



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Investigation de l'effet d'un complément alimentaire à base de glucosamine et de chondroïtine sulfate sur l'équilibre enzymatique articulaire chez le cheval sain au repos

Vandendriessche, Mélanie

Award date:
2007

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**INVESTIGATION DE L'EFFET D'UN COMPLEMENT ALIMENTAIRE A BASE DE
GLUCOSAMINE ET DE CHONDROÏTINE SULFATE SUR L'EQUILIBRE
ENZYMATIQUE ARTICULAIRE CHEZ LE CHEVAL SAIN AU REPOS**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

licenciée en Sciences biologiques

Mélanie VANDENDRIESSCHE

Septembre 2007

Remerciements

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux personnes suivantes pour leur aide et leur soutien lors de la rédaction de ce mémoire :

Ma promotrice, le Professeur Nathalie Kirschvink, directrice du laboratoire de Physiologie animale, département de médecine vétérinaire aux Facultés Universitaire Notre Dame de la Paix à Namur, pour m'avoir accueillie, pour son suivi permanent et ses conseils dans la réalisation de cette étude ;

Ma tutrice, Marie Daix, médecin vétérinaire et doctorante au laboratoire de Physiologie animale, pour sa disponibilité, sa supervision et son aide dans la réalisation des manipulations sur les chevaux et dans celle des expériences ;

Le docteur Jean-François Bastin, qui a réalisé les examens orthopédiques des chevaux ;

Laetitia Wiggers, technicienne au laboratoire en Physiologie animale, pour son aide dans la réalisation des analyses au laboratoire ;

L'Équipe aux Centres du Mouton, et plus particulièrement Marianne Raes, pour le soin apporté aux chevaux ;

L'équipe du laboratoire d'Anatomie animale, pour son aide dans les prélèvements tissulaires ;

La société Twydil Pavesco, pour la mise à disposition des compléments testés et son soutien ;

Bénédicte Dehandschutter, ma co-mémorante, pour son soutien ;

Le docteur Chantal Dumortier, pour ses relectures et ses conseils avisés.

Je remercie également tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont soutenue dans ce mémoire.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 Namur
Téléphone : +32(0)81.72.44.18 – Téléfax : +32(0)81.72.44.20
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Investigation de l'effet d'un complément alimentaire à base de glucosamine et de chondroïtine sulfate sur l'équilibre enzymatique articulaire chez le cheval sain au repos

VANDENDRIESSCHE Mélanie

Résumé

Dans l'espèce équine, les pathologies ostéo-articulaires représentent une cause majeure de boiteries. Elles comprennent plusieurs maladies qui ont en commun la destruction de la matrice extracellulaire cartilagineuse articulaire. Les métalloprotéinases de matrice (MMP) jouent un rôle majeur dans cette dégradation. Lors d'une pathologie articulaire, la balance entre les MMP et leurs inhibiteurs spécifiques, les TIMP (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*), est en déséquilibre en faveur des MMP. Certaines substances, comme la glucosamine et le chondroïtine sulfate, seraient capables de moduler l'activité MMP in vitro et amélioreraient, après administration orale, l'aspect symptomatique des animaux.

L'objectif de notre étude est d'investiguer l'effet d'un complément oral à base de glucosamine et de chondroïtine sulfate sur l'équilibre enzymatique articulaire.

Pour cela, deux groupes de huit poneys ont été formés. Le complément a été administré quotidiennement au premier groupe pendant six semaines tandis qu'un placebo a été administré de la même façon au deuxième groupe. Ante- et post-mortem, de la synovie a été prélevée sur plusieurs articulations. Les activités MMP-2 et -9 ont été mesurées par zymographie, l'activité TIMP-2 a été mesurée par zymographie inverse et les isoprostanes, marqueurs du stress oxydant, ont été quantifiés par test ELISA.

Les résultats obtenus montrent que l'administration pendant six semaines du complément testé chez des chevaux cliniquement sains permet de diminuer l'activité MMP-9 et d'augmenter l'activité MMP-2 dans la synovie.

Ces résultats suggèrent que le complément enrichi en glucosamine et en chondroïtine sulfate permet de moduler l'équilibre enzymatique articulaire.

Mémoire de licence en sciences biologiques

Septembre 2007

Promoteur : N. Kirschvink

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 Namur
Téléphone : +32(0)81.72.44.18 – Téléfax : +32(0)81.72.44.20
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Investigation of the effect of an oral glucosamine and chondroitin sulphate-based complement on the enzymatic articular balance in healthy resting horses

VANDENDRIESSCHE Mélanie

Summary

Joint disease is an important cause of lameness in horses. The degradation of extracellular matrix of articular cartilage is the common feature of these diseases. The matrix metalloproteinases (MMP) are considered to be the major enzymes in this degradation and the balance between MMP and their specific inhibitors, the Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP), is critical. Certain substances, like glucosamine and chondroitin sulphate, may have a modulating effect on the MMP activity in vitro and may result, after oral administration, in improvement of lameness symptoms in horses.

The aim of this study is to investigate the effect of an oral glucosamine and chondroitin sulphate-based complement on the enzymatic articular balance.

For that reason, two groups of eight ponies were formed. The complement was daily administered during six weeks to the first group whereas a placebo was administered to the second group. Ante- and post-mortem, synovial fluid was collected from different articulations. MMP-2 and -9 activities were measured by zymography, TIMP-2 activity was measured by reverse zymography and isoprostanes were quantified as a marker of oxidative stress by ELISA test.

The results show that a six-week complementation to clinically healthy horses allowed decreasing synovial MMP-9 activity whereas MMP-2 activity increased.

These findings suggest that a complement enriched in glucosamine and chondroitin sulphate allows modulation of the articular enzymatic equilibrium

Master degree of biological sciences

September 2007

Promoter: N. Kirschvink

Table des matières

INTRODUCTION	1
AVANT-PROPOS	1
1. L'ARTICULATION SAINE	2
1.1. <i>L'os</i>	2
1.2. <i>La capsule articulaire</i>	2
1.3. <i>Le cartilage articulaire</i>	3
1.3.1. <i>Les cellules cartilagineuses : les chondroblastes et chondrocytes</i>	3
1.3.2. <i>La matrice extracellulaire (MEC)</i>	3
1.4. <i>La cavité synoviale et la synovie</i>	5
2. APERÇU DE QUELQUES PATHOLOGIES ARTICULAIRES	6
2.1. <i>L'ostéoarthrite</i>	6
2.2. <i>L'arthrose</i>	6
2.3. <i>L'ostéochondrose</i>	6
3. LES FACTEURS IMPLIQUÉS DANS LA DÉGRADATION DU CARTILAGE	8
4. LES MÉTALLOPROTÉINASES DE MATRICE (MMP)	9
4.1. <i>Présentation des MMP</i>	9
4.1.1. <i>Rôle des MMP</i>	9
4.1.2. <i>Structure des MMP</i>	9
4.1.3. <i>Classifications des MMP</i>	10
4.2. <i>La régulation des MMP</i>	11
4.2.1. <i>Régulation de la transcription des gènes</i>	11
4.2.2. <i>Régulation de l'activation des pro-MMP</i>	11
4.2.3. <i>Régulation de l'activité par des inhibiteurs endogènes : les TIMP</i>	12
4.3. <i>Techniques utilisées pour quantifier les MMP ou mesurer leur activité</i>	13
4.3.1. <i>Le Western Blot</i>	13
4.3.2. <i>La RT-PCR</i>	13
4.3.3. <i>Le test ELISA</i>	13
4.3.4. <i>La zymographie</i>	13
5. LES FACTEURS ÉTUDIÉS INFLUENÇANT L'ACTIVITÉ MMP CHEZ LE CHEVAL	15
5.1. <i>Facteurs physiologiques</i>	15
5.1.1. <i>L'âge</i>	15
5.1.2. <i>Le sexe</i>	15
5.1.3. <i>La race</i>	15
5.1.4. <i>L'exercice</i>	15
5.2. <i>Facteurs pathologiques</i>	16
6. LA PRÉVENTION DE LA DÉGRADATION CARTILAGINEUSE	17
6.1. <i>Substances utilisées préventivement dans la dégradation cartilagineuse</i>	17
6.2. <i>Effets in vitro de la glucosamine et du chondroïtine sulfate</i>	19
6.2.1. <i>Effets de la glucosamine</i>	19
6.2.2. <i>Effets du chondroïtine sulfate</i>	20
6.2.3. <i>Effets combinés de la glucosamine et du chondroïtine sulfate</i>	20
6.3. <i>Effets in vivo de la glucosamine et du chondroïtine sulfate sur l'aspect symptomatique des pathologies ostéo-articulaires</i>	20
7. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	21

MATÉRIEL ET MÉTHODES.....22

1. SCHÉMA EXPÉRIMENTAL.....	22
2. INVESTIGATIONS SUR LES PONEYS	23
2.1. Tests préliminaires (T ₀).....	23
2.2. Tests après complémentation (T ₆).....	23
2.3. Investigation post-mortem.....	23
3. ANALYSES	24
3.1. Traitement et conservation des échantillons.....	24
3.1.1. Echantillons de sang	24
3.1.2. Echantillons de synovie	24
3.2. Détermination de l'activité MMP (Métalloprotéinases de matrice).....	24
3.2.1. La zymographie	24
3.2.2. Quantification de l'activité MMP	26
3.3. Détermination de l'activité TIMP (Tissue Inhibitor of MetalloProteinase)	27
3.3.1. La zymographie inverse	27
3.3.2. Quantification de l'activité TIMP	28
3.4. Détermination de la quantité d'isoprostanes	28
3.5. Cytologie du liquide synovial.....	29
3.5.1. Le Cytospin.....	29
3.5.2. Coloration des lames.....	30
3.5.3. Comptage différentiel des cellules	30
4. TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNÉES	30

RÉSULTATS.....31

1. SCORES DE BOITERIES	31
2. FROTTIS SANGUINS	32
3. CYTOLOGIE DU LIQUIDE SYNOVIAL	33
4. CONTAMINATION DE LA SYNOVIE PAR LES GLOBULES ROUGES	34
5. ACTIVITÉ GÉLATINOLYTIQUE DE LA MMP-2.....	36
6. ACTIVITÉ GÉLATINOLYTIQUE DE LA MMP- 9.....	37
7. ACTIVITÉ INHIBITRICE DE LA TIMP-2	38
8. ACTIVITÉS MMP-2, MMP-9 ET TIMP-2 EN %	39
9. COMPARAISON T6- POST-MORTEM	40
10. COMPARAISON T0- POST-MORTEM.....	42
11. CORRÉLATIONS CYTOLOGIE – ACTIVITÉS GÉLATINOLYTIQUES	44
12. CONCENTRATION EN ISOPROSTANES DANS LE LIQUIDE SYNOVIAL.....	45

DISCUSSION.....46

CONCLUSION ET PERSPECTIVES **50**

BIBLIOGRAPHIE.....52

Liste des abréviations.

MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Métalloprotéinase de matrice
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
GAG	Glycosaminoglycanes
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
IL	Interleukine
TNF α	Tumor necrosis factor α
PMN	Neutrophile polymorphonucléaire
MT-MMP	Membrane-type MMP/MMP membranaire
RT-PCR	Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction
ARN	Acide ribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
SDS	Sodium dodecyl sulfate
FRO	Formes réactives de l'oxygène
AIS	Anti-inflammatoire stéroïdien
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
AP-1	Activating protein 1
NF κ B	Nuclear factor-kappa B
T0	Tests réalisés avant la complémentation
T6	Tests réalisés après la complémentation de 6 semaines
APS	Péroxodisulfate d'ammonium
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
UA	Unités d'absorbance

INTRODUCTION

Introduction

Avant-propos

Chez le cheval, les pathologies ostéo-articulaires représentent une cause majeure de boiterie. Le terme 'pathologies articulaires' regroupe plusieurs maladies dont la caractéristique commune est la destruction de la matrice extracellulaire (MEC) du cartilage articulaire (Van den Boom *et al.*, 2005). Ces lésions intra-articulaires représentent environ un tiers des pathologies totales dans l'espèce équine et sont particulièrement gênantes chez le cheval de sport dont les performances sont alors fortement diminuées.

Cette dégradation cartilagineuse est causée par l'activation en cascade de facteurs pro-inflammatoires et enzymatiques dont les métalloprotéinases de matrice (MMP) semblent être les plus importantes. Les MMP sont des protéinases dégradant la MEC qui jouent un rôle dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques tels que l'embryogenèse, la cicatrisation, les cancers ou les maladies ostéo-articulaires (Neil *et al.*, 2005a).

L'activité des MMP est régulée en grande partie par les 'Tissue Inhibitors of MetalloProteinases' (TIMP), leurs inhibiteurs spécifiques. C'est l'équilibre entre les MMP et les TIMP qui va déterminer l'activité protéinase (Nagase *et al.*, 2006).

En cas de pathologies articulaires, l'activité des MMP augmente (Brama *et al.*, 2000) et cette augmentation est positivement corrélée à l'importance des lésions cartilagineuses (Van den Boom *et al.*, 2005).

Certaines substances sont capables de moduler l'activité MMP. La glucosamine et le chondroïtine sulfate en font partie. Ils semblent permettre, d'une part, l'augmentation de la synthèse de la MEC et, d'autre part, la modulation de la cascade conduisant à l'activation des MMP (Henrotin *et al.*, 2002).

Cette introduction présente tout d'abord comment est constituée l'articulation saine et quelques maladies ostéo-articulaires, décrit ensuite les facteurs impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire et plus particulièrement les MMP et se termine par la présentation des modulateurs de l'activité MMP et de leurs effets connus actuellement.

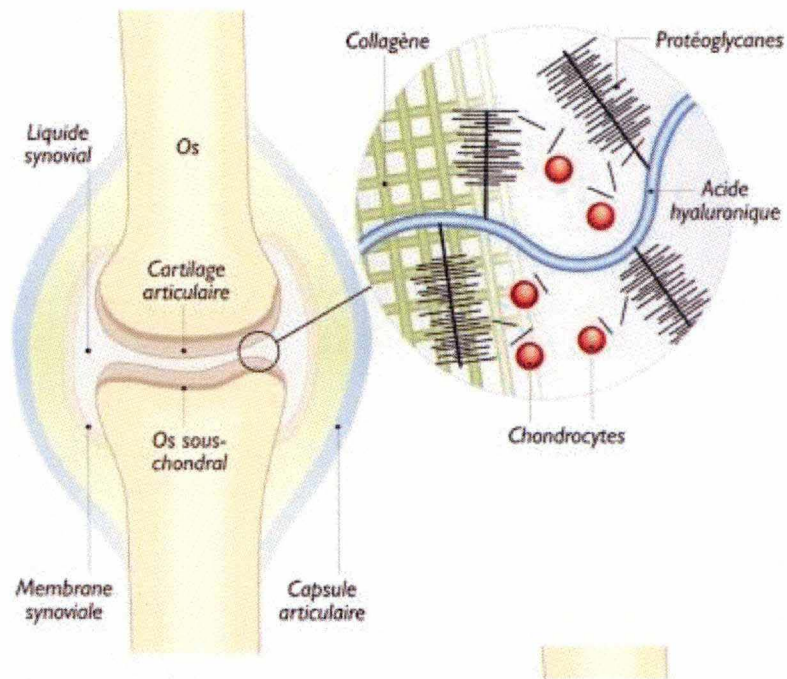


Figure 1 : Schéma de l'articulation saine¹

¹http://www.lanutrition.fr/upload/fckeditor/Image/Infographie/ZOOM_A%20articulation%20saine.jpg

1. L'articulation saine

(Histologie humaine, 1997 ; Atlas en couleur d'histologie, 2000)

Les os sont connectés entre eux par des articulations, qui leur permettent différents degrés de mouvements. Les articulations peuvent être classées en deux groupes principaux selon l'amplitude des mouvements qu'elles autorisent :

- les articulations permettant des mouvements limités ; par exemple, les articulations intervertébrales.
- les articulations permettant des mouvements amples appelées articulations synoviales.

Les articulations synoviales sont maintenues par des bandes de tissus fibreux denses, les ligaments. Ceux-ci peuvent être externes ou internes à la cavité articulaire. Les ligaments externes entourent une capsule fibreuse, elle-même disposée autour des extrémités osseuses. Les extrémités osseuses sont recouvertes d'une couche lisse de cartilage hyalin et sont lubrifiées par un film de liquide synovial, produit par la couche interne de la capsule articulaire, la membrane synoviale.

La figure 1 illustre cette description.

1.1. L'os

L'os est un tissu de soutien hautement spécialisé, caractérisé par sa rigidité et sa dureté. Il a pour rôle de fournir un support mécanique, de permettre la locomotion, de fournir une protection ou encore d'agir comme un réservoir métabolique de sels minéraux.

L'os est composé de cellules de soutien (ostéoblastes et ostéocytes), d'ostéoïde, de sels minéraux déposés au sein de l'ostéoïde et de cellules de remodelage, les ostéoclastes.

Les ostéoblastes élaborent l'ostéoïde qui se calcifie secondairement pour constituer l'os.

L'ostéoïde est une matrice de soutien composée essentiellement de collagène de type I, associé à des glycosaminoglycanes (GAG) extracellulaires, chondroïtine-sulfate et kératane-sulfate. Elle contient des glycoprotéines spécifiques, l'ostéocalcine et la sialoprotéine, qui lient fortement le calcium extracellulaire et augmentent la concentration locale de ce dernier.

Les sels minéraux se déposent sous forme de cristaux de calcium et d'hydroxyde de phosphate, appelés cristaux d'hydroxyapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$.

Ce sont ces sels liés à l'ostéoïde qui confèrent à l'os sa rigidité et sa force mécanique.

L'os est un tissu dynamique, continuellement construit et détruit. Le renouvellement osseux est normalement bas chez l'adulte, mais élevé chez le nouveau-né et l'enfant afin de permettre la croissance. Chez l'adulte, le niveau de base peut augmenter pour, par exemple, réparer une fracture.

1.2. La capsule articulaire

La capsule articulaire est composée de la capsule fibreuse et de la membrane synoviale. La portion fibreuse de la capsule est composée de tissu fibreux dense et confère une certaine stabilité mécanique à l'articulation (McIlwraith, 2001).

La membrane synoviale est constituée de 1 à 4 assises de cellules synoviales ou synoviocytes qui fusionnent à leur partie profonde avec une zone de tissu fibreux lâche, contenant des adipocytes, des fibroblastes, des mastocytes et des macrophages. C'est cette couche profonde qui se confond avec le tissu fibreux plus dense de la capsule articulaire. Deux types cellulaires ont été décrits dans la membrane synoviale : les cellules de type A,

phagocytaires et contenant de nombreux lysosomes, et les cellules de type B, possédant un important réticulum endoplasmique rugueux et semblant adaptées à la synthèse protéique.

Les fonctions principales de la membrane synoviale sont la phagocytose et la régulation de la composition du liquide synovial. En effet, la membrane synoviale est une barrière semi-perméable importante dans la régulation de l'apport des protéines et de l'acide hyaluronique du liquide synovial (McIlwraith, 2001).

1.3. Le cartilage articulaire

Le cartilage est un tissu de soutien particulier, composé en grande partie de GAG associés à des fibres de collagène.

Il existe trois types de cartilage, que l'on différencie en fonction des protéines fibreuses qu'ils contiennent :

- le cartilage hyalin qui ne contient que du collagène de type II
- le cartilage fibreux (ou fibrocartilage) qui contient des collagènes de type I et II
- le cartilage élastique qui contient du collagène de type II et des fibres élastiques.

Le cartilage articulaire chez le cheval est généralement de type hyalin bien que du fibrocartilage soit aussi présent à l'intersection du cartilage articulaire, de la membrane synoviale et du périoste (McIlwraith, 2001).

Le cartilage est composé de cellules cartilagineuses enchâssées dans la matrice extracellulaire constituée de collagène, de protéoglycanes et de glycoprotéines.

1.3.1. Les cellules cartilagineuses : les chondroblastes et chondrocytes

Ce sont les chondroblastes qui élaborent le cartilage lors de la croissance. Ils contiennent du glycogène, des lipides en abondance et un important réticulum endoplasmique rugueux qui a pour rôle la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire.

Après le dépôt de cartilage, les chondroblastes deviennent métaboliquement moins actifs et prennent le nom de chondrocytes.

1.3.2. La matrice extracellulaire (MEC)

La MEC est essentiellement formée d'eau (56-70% du poids frais), de molécules d'aggrégane (10 % du poids frais, 90 % des protéoglycanes du cartilage), de collagène de type II (10 % du poids frais et 90 % des collagènes du cartilage) et d'acide hyaluronique, qui sert de support aux protéoglycanes (Lejeune, 2007).

La figure 1 illustre la composition du cartilage.

➤ Les collagènes

Les collagènes forment une grande famille de protéines pouvant se grouper pour former des fibrilles ou des réseaux interagissant avec d'autres protéines pour assurer le soutien de la MEC. Il existe au moins 20 types de chaînes polypeptidiques collagènes (les chaînes α), codées par différents gènes, qui se combinent pour constituer différentes formes structurales. Les collagènes se répartissent en plusieurs familles selon leur structure.

Le collagène du cartilage articulaire est pour 90 à 95 % du collagène de type II, qui fait partie de la famille des collagènes fibrillaires. Il forme des fibrilles et des fibres qui s'entrecroisent dans la MEC.

GAG	Hexuronic or Iduronic acid	Galactose	Hexosamine	Disaccharide composition
Heparan sulphate/ Heparin	D-glucuronic acid (GlcA) L-iduronic acid (IdoA)	-	D-glucosamine (GlcNAc)	 <chem>CC(=O)N[C@@H]1[C@@H](O[C@@H]2[C@@H](CO)O[C@H](CO)O[C@H]2O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@@H]1O</chem> GlcA $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\alpha(1\rightarrow4)$ <chem>CC(=O)N[C@@H]1[C@@H](O[C@@H]2[C@@H](CO)O[C@H](CO)O[C@H]2O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@@H]1O</chem> IdoA $\alpha(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\alpha(1\rightarrow4)$
Keratan sulphate	-	Galactose (Gal)	D-glucosamine (GlcNAc)	 <chem>CC(=O)N[C@@H]1[C@@H](O[C@@H]2[C@@H](CO)O[C@H](CO)O[C@H]2O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@@H]1O</chem> Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow3)$
Chondroitin sulphate	D-glucuronic acid (GlcA)	-	D-galactosamine (GalNAc)	 <chem>CC(=O)N[C@@H]1[C@@H](O[C@@H]2[C@@H](CO)O[C@H](CO)O[C@H]2O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@@H]1O</chem> GlcA $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc $\beta(1\rightarrow4)$
Dermatan sulphate	D-glucuronic acid (GlcA) L-iduronic acid (IdoA)	-	D-galactosamine (GalNAc)	 <chem>CC(=O)N[C@@H]1[C@@H](O[C@@H]2[C@@H](CO)O[C@H](CO)O[C@H]2O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@@H]1O</chem> IdoA $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc $\beta(1\rightarrow4)$
Hyaluronic acid	D-glucuronic acid (GlcA)	-	D-glucosamine (GlcNAc)	 <chem>CC(=O)N[C@@H]1[C@@H](O[C@@H]2[C@@H](CO)O[C@H](CO)O[C@H]2O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@@H]1O</chem> GlcA $\beta(1\rightarrow3)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow4)$

Figure 2 : Structure des différents glycosaminoglycans (Prydz and Dalen, 2000)

On retrouve aussi dans le cartilage articulaire de petites quantités de collagène de type VI, IX, XI, XII et XIV. Ces types de collagène mineurs aident à la forme et à la stabilité du cartilage (McIlwraith, 2001).

➤ Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont formées par une protéine centrale liée à des GAG. Les protéoglycanes forment des agrégats avec l'acide hyaluronique, un GAG non sulfaté. Ce lien est aidé par une protéine, appelée 'link protein' (Neil *et al.*, 2005a).

Les GAG sont de longues chaînes polysaccharidiques non ramifiées composées de 70 à 200 unités disaccharidiques répétées : Des unités d'hexosamine (glucosamine ou galactosamine) alternent avec d'autres résidus de glucuronate, iduronate ou galactose.

Les GAG peuvent être divisés en plusieurs groupes selon leur structure :

- acide hyaluronique
- chondroïtine sulfate
- dermatane sulfate
- héparane sulfate et héparine
- kératane-sulfate

La figure 2 présente la structure des différentes GAG.

Les précurseurs des GAG sont des sucres aminés, comme la glucosamine, qui sont synthétisés, dans le cytosol, à partir du glucose (Neil *et al.*, 2005a). Ces sucres sont ensuite transportés vers le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi. C'est principalement dans l'appareil de Golgi qu'est réalisée la synthèse des GAG.

La synthèse des GAG est généralement initiée par le groupement de quatre monosaccharides. A partir de ce tétrasaccharide de liaison, la chaîne est allongée par l'addition des unités disaccharidiques. Ce sont ces sucres et parfois la modification du GAG par des groupements sulfatés, qui permettent aux GAG d'être chargés négativement (Prydz *and* Dalen, 2000). Cette charge électrique et l'arrangement spatial des GAG leur permettent de se gorger d'eau et de former un gel hydraté.

Les GAG sont en grande partie responsables de la résistance compressive du cartilage (Neil *et al.*, 2005a).

Les protéoglycanes jouent un rôle de tampon dans les changements de pression et un rôle dans le contrôle de la croissance et de la différenciation.

La composition des protéoglycanes peut varier. De récentes études ont identifié environ 30 protéines centrales différentes dont le poids moléculaire varie de 10 à 500 kDa. Le nombre de GAG liés peut varier de un à plus d'une centaine. Le type de GAG lié à la protéine centrale peut aussi varier sur une même protéoglycane, celle-ci est alors appelée protéoglycane hybride.

Après leur synthèse, les protéoglycanes sont transportées de l'appareil de Golgi vers la MEC, la surface cellulaire ou les organelles intracellulaires (Prydz *and* Dalen, 2000).

La protéoglycane prédominante dans le cartilage est l'aggrécane, dont les GAG sont la chondroïtine sulfate et le kératane sulfate (Neil *et al.*, 2005a).

➤ *Les glycoprotéines*

Les glycoprotéines constituent une petite portion de la MEC et comprennent la chondronectine, la fibronectine, la 'cartilage oligomeric matrix protein' (COMP), la thrombospondine ou encore l'ancorin C-II (McIlwraith, 2001).

Elles servent d'intermédiaires à l'interaction entre les cellules et la MEC.

Par exemple, la fibronectine est reconnue d'un côté par des protéines réceptrices de la membrane plasmique, les intégrines, et de l'autre par le collagène, ce qui permet l'adhésion de la cellule à la MEC.

Lors du développement du tissu, la fibronectine joue vraisemblablement un rôle dans l'organisation du dépôt puis de l'orientation des premières molécules de collagène.

1.4. La cavité synoviale et la synovie

La synovie (ou liquide synovial) est normalement présente en très faibles quantités dans chaque cavité articulaire. Elle est constituée d'un dialysat de plasma sanguin renfermant un GAG de haut poids moléculaire sécrété par les synoviocytes, l'acide hyaluronique ou hyaluronate.

Le rôle de la synovie est multiple : elle agit comme lubrifiant en diminuant les frictions entre les surfaces articulaires au cours des mouvements, elle assure la nutrition et l'élimination des produits métaboliques (lactate ou gaz carbonique)¹ du cartilage qui ne bénéficie d'aucun apport sanguin.

Le liquide synovial est normal lorsqu'il est transparent, clair ou jaunâtre. Sa viscosité est directement proportionnelle à sa concentration en acide hyaluronique (Amouroux, 1998).

L'analyse du liquide synovial présente plusieurs intérêts.

Les ponctions de synovie font partie des examens complémentaires en orthopédie équine et les analyses ne demandent pas un grand volume de liquide synovial. L'analyse cytologique de la synovie peut apporter des informations sur l'état inflammatoire d'une articulation.

¹ <http://www.arlweb.ch/Docs/synovial.pdf>

2. Aperçu de quelques pathologies articulaires

À chaque étape normale de la croissance, du développement et de la maturation, la synthèse et la dégradation de la matrice cartilagineuse sont équilibrées. Certaines conditions pathologiques peuvent amener à un déséquilibre et à la dégradation des tissus (Brama *et al.*, 1998).

2.1. L'ostéoarthrite

L'ostéoarthrite est la plus commune des arthrites et est souvent associée à une importante invalidité. L'ostéoarthrite est causée par des traumatismes osseux et par l'amplitude excessive des mouvements. Les symptômes cliniques typiques sont la douleur et la raideur, particulièrement après une activité prolongée (Shikhman, 2006).

L'ostéoarthrite est caractérisée par une articulation tuméfiée et douloureuse avec :

- un épaississement de la capsule articulaire
- des protubérances irrégulières d'os élaborées aux extrémités des surfaces articulaires (ostéophytes)
- une réduction de l'espace synovial

Le processus de la maladie n'affecte donc pas seulement le cartilage articulaire, mais la structure entière de l'articulation, incluant l'os subchondral, les ligaments, la capsule et la membrane synoviale et les muscles péri-articulaires (Martel-Pelletier *et al.*, 1999).

La dégénérescence du cartilage est associée à une production excessive de cytokines pro-inflammatoires (Neil *et al.*, 2005b). Ces cytokines seraient produites par la membrane synoviale et diffusées dans le cartilage à travers le liquide synovial. Elles activeraient alors les chondrocytes qui, à leur tour, pourraient produire des facteurs cataboliques comme les protéases et de nouveau des cytokines pro-inflammatoires. L'interleukine-1 β (IL-1 β) et le 'tumor necrosis factor α ' (TNF α) sont les deux cytokines pro-inflammatoires prédominantes synthétisées dans le processus de l'ostéoarthrite (Martel-Pelletier *et al.*, 1999).

2.2. L'arthrose

L'arthrose est définie comme une usure continue des articulations synoviales qui entraîne une diminution de la quantité de GAG hydratés dans le cartilage. Le cartilage devient incapable de résister à des forces de compression et dégénère. Les surfaces osseuses adjacentes sont mises à nu, frottent les unes contre les autres et les os s'érodent. Par la suite, la surface osseuse se densifie et prend l'aspect de l'ivoire, c'est l'éburnation.

2.3. L'ostéochondrose

L'ostéochondrose est une affection ostéo-articulaire juvénile caractérisée par une absence de maturation et de minéralisation des cellules cartilagineuses². Il en résulte une perturbation de l'édification du squelette lors de son ossification à partir de sa maquette cartilagineuse.

Les raisons de l'absence de maturation des chondrocytes ne sont pas connues. Les cellules continuent de se multiplier et s'empilent, ce qui entraîne un épaississement du cartilage. Le cartilage étant nourri par imbibition, cet épaississement peut mener à une nécrose.

Par définition, cette affection ne touche que les jeunes animaux, en croissance.

² <http://dga.jouy.inra.fr/lgbc/projets/osteocondrose.html>

Dans l'espèce équine, la fréquence de cette anomalie est élevée. Les lésions s'installent progressivement, sans symptômes, avant l'âge d'un an. Cette zone étant non innervée, les lésions ne sont pas douloureuses sauf si la fissuration entraîne une inflammation articulaire, une synovite ou une chondrite³.

Il s'agit d'une affection multifactorielle : l'alimentation y joue un rôle certain tandis que les traumatismes, la rapidité de croissance et un fort poids corporel sont souvent cités comme causes de l'ostéochondrose mais aucune étude n'a permis de le démontrer.

L'ostéochondrose peut, dans le temps, entraîner des lésions d'ostéo-arthrose secondaires comme l'épaississement de la plaque osseuse sous-chondrale.

³ http://locus.jouy.inra.fr/respe/osteocondrose_18.htm

3. Les facteurs impliqués dans la dégradation du cartilage

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre profond entre les pro- et les anti-oxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles. Les radicaux hydroxyles, le peroxyde d'hydrogène ou les radicaux libres dérivés de l'oxygène comme l'anion superoxyde, font partie de ces pro-oxydants.

Dans l'articulation, lorsqu'elles sont en excès, ces formes réactives de l'oxygène (FRO) activeraient les médiateurs de l'inflammation et seraient capables de cliver l'acide hyaluronique et les protéoglycanes (Greenwald *and* Moy, 1979; 1980).

En réponse à ce stimulus inflammatoire, la membrane synoviale et les chondrocytes produisent des cytokines telles que l'IL-1 β et le TNF α (Martel-Pelletier *et al.*, 1999). Cette production de cytokines par les synoviocytes et les chondrocytes peut aussi être causée par les produits de dégradation du collagène de type II et des GAGs (Verset, 2005).

L'IL-1 β serait capable de stimuler la production d'IL-6 et -8. Ceux-ci stimuleraient à leur tour la synthèse de protéases, telles que les MMP et les aggrecanases, et de prostaglandines, principalement de la famille E, par exemple PGE₂ (McIlwraith, 2001).

L'IL-1 β activerait aussi des facteurs de transcription tels que l'AP-1 et le NF κ B. Ces derniers sont capables d'augmenter la transcription des MMP et de la NO synthétase (Neil *et al.*, 2005a).

Les prostaglandines peuvent induire une vasodilatation et une diminution des protéoglycanes. De plus, elles augmentent la nociception (Lejeune, 2006).

Parallèlement, les chondrocytes et les cellules inflammatoires sont capables, sous l'action de la NO synthétase, de synthétiser du monoxyde d'azote (NO) à partir de la L-arginine (Neil *et al.*, 2005). Le NO diminue la concentration en protéoglycanes et en collagène de type II, et augmente l'activité des MMP et des aggrecanases. Il diminuerait aussi l'IL-1 Receptor Antagonist (Neil *et al.*, 2005a).

Bien que leur importance relative soit peu connue et vraisemblablement variable en fonction des processus pathologiques, FRO, MMP, aggrecanases, prostaglandines et NO, participent donc à la dégradation de la matrice extracellulaire cartilagineuse.

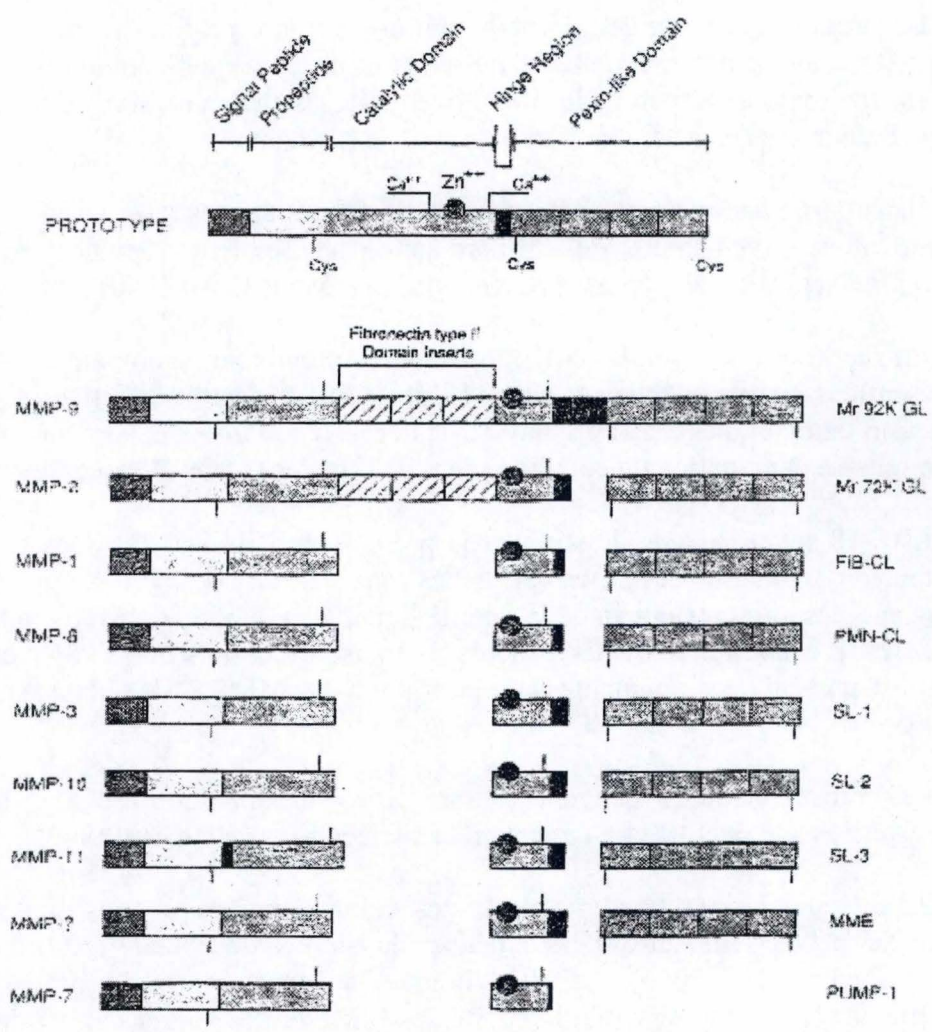


Figure 3 : Structure des MMPs (Birkedal-Hansen, 1993)

4. Les métalloprotéinases de matrice (MMP)

Les enzymes protéolytiques peuvent être classées en quatre types distincts en fonction de leurs mécanismes catalytiques : les protéinases à sérine, les protéinases à cystéine, les protéinases aspartiques et les métalloprotéinases (Clegg *et al.*, 1997a).

Les métalloprotéinases de matrice (MMP) sont considérées comme étant les enzymes majeures impliquées dans la dégradation cellulaire (Nagase *et al.*, 2006).

4.1. Présentation des MMP

Les MMP sont caractérisées par une exigence en zinc dans leur site actif. Le calcium est aussi nécessaire pour l'expression de leur pleine activité mais ne réside pas dans le site actif (McIlwraith, 2001).

Les MMP sont parfois appelées matrixines. Elles sont secrétées sous forme inactive, appelée forme zymogène ou pro-MMP. Cette forme latente a besoin d'une étape d'activation avant qu'elle ne soit capable de cliver les composants de la MEC (Snoek-van Beurden *and* Von den Hoff, 2005).

Les MMP sont extracellulaires mais de récentes études affirment que certaines MMP pourraient être aussi intracellulaires (Nagase *et al.*, 2006).

4.1.1. Rôle des MMP

Les MMP sont considérées comme les enzymes majeures de la dégradation de la matrice extracellulaire. Elles ont un rôle central dans le remodelage des tissus. Le remodelage est essentiel à différents niveaux physiologiques : le développement embryonnaire, le turnover du collagène, le développement des dents, la migration cellulaire ou encore la cicatrisation (Snoek-van Beurden *and* Von den Hoff, 2005).

Les MMP jouent aussi un rôle dans la progression de maladies telles que l'arthrite, le cancer ou encore les ulcérations chroniques lorsque leur activité n'est plus régulée (Nagase *et al.*, 2006).

4.1.2. Structure des MMP

Les MMP sont initialement produites sous formes de pré-pro-MMP. Le peptide signal doit être clivé pour que la pro-MMP soit formée.

Une pro-MMP consiste en un propeptide qui constitue le domaine NH₂-terminal, un domaine catalytique qui contient la 'machinerie' catalytique, en une proline qui constitue la région charnière et enfin en un domaine hémapexine ou 'vitronectin-like' qui constitue le domaine COOH-terminal et jouerait un rôle dans la spécificité du substrat (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993).

Le propeptide est composé d'environ 80 acides aminés, le domaine catalytique de près de 170 acides aminés, le peptide de liaison a une longueur variable et le domaine hémapexine est constitué d'environ 200 acides aminés.

Les domaines non catalytiques jouent un rôle clé pour certaines matrixines en déterminant le substrat spécifique (Nagase *et al.*, 2006).

La figure 3 schématise la structure des différentes MMP.

Subgroup	MMP	Name	Substrate
1. Collagenases	MMP-1	Collagenase-1	Col I, II, III, VII, VIII, X, gelatin
	MMP-8	Collagenase-2	Col I, II, III, VII, VIII, X, aggrecan, gelatin
	MMP-13	Collagenase-3	Col I, II, III, IV, IX, X, XIV, gelatin
2. Gelatinases	MMP-2	Gelatinase A	Gelatin, Col I, II, III, IV, VII, X
	MMP-9	Gelatinase B	Gelatin, Col IV, V
3. Stromelysins	MMP-3	Stromelysin-1	Col II, IV, IX, X, XI, gelatin
	MMP-10	Stromelysin-2	Col IV, laminin, fibronectin, elastin
	MMP-11	Stromelysin-3	Col IV, fibronectin, laminin, aggrecan
4. Matrilysins	MMP-7	Matrilysin-1	Fibronectin, laminin, Col IV, gelatin
	MMP-26	Matrilysin-2	Fibrinogen, fibronectin, gelatin
5. MT-MMP	MMP-14	MT1-MMP	Gelatin, fibronectin, laminin
	MMP-15	MT2-MMP	Gelatin, fibronectin, laminin
	MMP-16	MT3-MMP	Gelatin, fibronectin, laminin
	MMP-17	MT4-MMP	Fibrinogen, fibrin
	MMP-24	MT5-MMP	Gelatin, fibronectin, laminin
	MMP-25	MT6-MMP	Gelatin
6. Others	MMP-12	Macrophage metalloelastase	Elastin, fibronectin, Col IV
	MMP-19		Aggrecan, elastin, fibrillin, Col IV, gelatin
	MMP-20	Enamelysin	Aggrecan
	MMP-21	XMMP	Aggrecan
	MMP-23		Gelatin, casein, fibronectin
	MMP-27	CMMP	Unknown

Figure 4 : Classification des MMPs (Snoek-van Beurden *and* Von den Hoff, 2005)

4.1.3. Classifications des MMP

Les MMP sont classées de différentes façons. On leur a assigné un nombre mais les matrixines sont aussi classées en fonction de leur activité en 6 groupes :

- Les collagénases. Elles comprennent les MMP-1, -8 et -13. Elles clivent les collagènes I, II et III et d'autres protéines, de la MEC ou non.

- Les gélatinases. Ce groupe comprend les MMP-2 et -9. Les gélatinases digèrent principalement la gélatine, une forme dénaturée du collagène.

- Les stromelysines, c'est-à-dire les MMP-3, -10 et -11, qui digèrent les composants de la MEC comme le collagène IV et la fibronectine.

- Les matrilysines. Elles comprennent les MMP-7 et -26 et sont parfois appelées 'minimal domain MMP' car le domaine 'C-terminal hemopexin-like' est manquant. Elles clivent la fibronectine et la gélatine.

- Les membranes-types MMP (MT-MMP). Ce grand groupe comprend les MMP -14, -15, -16, -17, -24, -25. Ces MMP digèrent la gélatine, la fibronectine et la laminine.

- Les autres. Ces MMP sont différentes des autres groupes de part leur substrat spécifique, leur séquence d'acides aminés ou leur domaine d'organisation. Les MMP -12, -19, -20, -21, -23, -27 et -28 en font partie. Elles digèrent notamment l'élastine et l'aggrécane.

Cette classification est reprise dans la figure 4 mais peut différer selon les auteurs (Snoek-van Beurden *and* Von den Hoff, 2005).

Les gélatinases sont souvent utilisées dans la mesure de l'activité MMP articulaire.

En effet, elles sont relativement élevées dans le liquide synovial équin et peuvent servir de marqueurs dans les pathologies articulaires.

Chez le cheval, la MMP-2 est sécrétée par les fibroblastes synoviaux et les chondrocytes tandis que la MMP-9 est sécrétée par les chondrocytes équins, les monocytes sanguins, les neutrophiles polymorphonucléaires (PMN) (Clegg *et al.*, 1997b) et les cellules tumorales (Clegg *et al.*, 1997a).

La MMP-2 équine a un poids moléculaire de 64 kDa. La MMP-9 active a un poids moléculaire de 85 kDa, la MMP-9 inactive de 94 kDa tandis que la MMP-9 dimérique a un poids de 225 kDa. La dimérisation de la MMP-9 se produit uniquement lorsque les MMP sont en excès par rapport à leurs inhibiteurs, les TIMP (*Tissue Inhibitors of MetalloProteinases*) (Clegg *et al.*, 1997b).

4.2. La régulation des MMP

L'activité MMP est généralement faible ou négligeable dans les tissus à l'état normal. Le contrôle de l'expression et de l'activité enzymatique des MMP s'établit à trois niveaux :

4.2.1. Régulation de la transcription des gènes

Au niveau transcriptionnel, l'expression des MMP est régulée par des cytokines inflammatoires, des facteurs de croissance, des hormones et des interactions cellules à cellules ou cellules à matrice (Nagase *et al.*, 2006).

Clegg a pu montrer que l'IL-1 cause une augmentation significative de la production ou de l'expression des MMP-3 et -13 par les cellules articulaires équinnes (Clegg *and* Carter, 1999).

L'IL-1 et le TNF α peuvent stimuler, chez les cellules articulaires comme les chondrocytes et les cellules synoviales, la production d'autres cytokines comme l'IL-8 ou l'IL-6 et celle de protéases et de prostaglandines E2 (Martel-Pelletier *et al.*, 1999).

Certains facteurs de croissance auraient aussi un rôle dans la régulation transcriptionnelle des MMP (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993).

Plusieurs hormones sont capables de réguler l'expression des MMP. Par exemple, la progestérone inhibe la production de collagénases dans des explants de tissus utérins et l'oestradiol retarde la perte de collagène (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993).

4.2.2. Régulation de l'activation des pro-MMP

Les MMP sont synthétisées comme pré-pro-enzymes. Le peptide signal doit être clivé pour que les pro-MMP soient générées (Nagase *et al.*, 2006).

Ensuite, *in vivo*, l'activation de la pro-MMP se produit par le clivage protéolytique du propeptide. Ceci résulte en une diminution du poids moléculaire.

Certains facteurs pro-inflammatoires comme les cytokines, quelques hormones ou encore des formes réactives de l'oxygène sont capables d'activer les MMP et de favoriser ainsi la destruction de la matrice extracellulaire (Neil *et al.*, 2005a). L'activation de la pro-MMP peut aussi être stimulée par une autre MMP active, un traitement au mercure, ou encore des agents dénaturants (Nagase *et al.*, 2006).

Par exemple, l'activation de la MMP-9 se fait par clivage protéolytique par des enzymes comme les MMP -1, -2, -3 et -7, la neutrophile élastase, la plasmine, la kallikréine et des protéinases bactériennes.

Par contre, la MMP-2 est unique dans le sens où elle n'est pas activée par clivage protéolytique. Son activation se fait à la surface cellulaire et un unique activateur a été identifié, il s'agit d'une MT-MMP (Clegg *and* Carter, 1999).

A concentrations élevées, les FRO induisent un stress oxydant. Elles sont susceptibles d'induire des effets délétères sur certains constituants cellulaires, notamment les lipides, les membranes, les protéines et l'ADN (Zhao *et al.*, 2007).

Les FRO sont aussi capables de stimuler des facteurs de transcription tels que NF κ B induisant alors une synthèse accrue des médiateurs de l'inflammation (Valko *et al.*, 2007). Or,

les médiateurs de l'inflammation sont capables d'activer les MMP et d'ainsi favoriser la destruction de la matrice extracellulaire (Neil *et al.*, 2005a).

Les isoprostanes sont particulièrement appropriés pour la caractérisation du stress oxydant (Valko *et al.*, 2007).

Il s'agit d'une famille de prostaglandines générées *in vivo* par l'oxydation de l'acide arachidonique par des radicaux libres. Un des principaux isoprostanes, la 8-iso-prostaglandine F2 α est augmentée dans certains syndromes associés au stress oxydant. Elle a donc été proposée comme marqueur de stress oxydant articulaire (Basu *et al.*, 2001).

Les isoprostanes peuvent être détectés grâce à un test ELISA, la méthode de référence est cependant la spectrométrie de masse.

4.2.3. Régulation de l'activité par des inhibiteurs endogènes : les TIMP

L'activité MMP est inhibée de façon non spécifique, *in vitro*, par des agents chélateurs comme l'EDTA ou par des inhibiteurs synthétiques et *in vivo*, par l' α 2-macroglobuline.

In vivo, les principaux inhibiteurs spécifiques des MMP sont les TIMP.

C'est l'équilibre MMP-TIMP qui va définir l'activité protéinase. En effet, liée à son inhibiteur, l'enzyme est inactive. Ce n'est qu'une fois libre que son activité lytique s'exprime (Clegg *et al.*, 1998).

Les TIMP sont des glycoprotéines composées de 184 à 194 acides, subdivisées en deux domaines ; le N-terminal et le C-terminal. Chaque domaine contient trois liens disulfides et le domaine N-terminal se plie comme une unité indépendante avec une activité inhibitrice pour les MMP (Nagase *et al.*, 2006).

Deux types de liaisons sont possibles entre les MMP et les TIMP :

La première, au niveau du site catalytique de la MMP, permet l'inhibition de l'activité enzymatique. Ainsi, les TIMP possèdent des affinités sélectives pour les différents membres de la famille des MMP. Ils inhibent l'activité protéolytique en formant des complexes de stoechiométrie 1:1 avec les MMP activées (Stetler-Stevenson *et al.*, 1989).

La deuxième, au niveau du domaine C-terminal des proMMP, a un rôle dans la régulation de leur activation : les TIMP peuvent inhiber ou retarder l'activation des MMP zymogènes ou, au contraire, stimuler cette activation. Ainsi, la TIMP-2 aurait un rôle dans l'activation de la MMP-2 : le complexe TIMP-2/MMP-2 faciliterait la liaison de l'enzyme à la surface cellulaire et donc son activation par la MT-MMP (Strongin *et al.*, 1995).

Les TIMP sont produits par une variété de types cellulaires et de tissus, comme le cartilage et les chondrocytes, les fibroblastes synoviaux, les fibroblastes de la peau, les leucocytes polymorphonucléaires, les macrophages alvéolaires, l'os ou encore une variété de cellules tumorales. Actuellement, quatre TIMP sont connus, mais seuls les TIMP-1 et -2 ont été étudiés dans l'espèce équine. Ainsi, chez le cheval, les chondrocytes et les fibroblastes synoviaux sont capables de produire les TIMP-1 et -2 tandis que les monocytes périphériques produisent uniquement la TIMP-1 (Clegg *et al.*, 1998).

L'expression des TIMP est régulée par différents agents. Par exemple, la production de la TIMP-1 est stimulée par un certain nombre de facteurs pro-inflammatoires tels que les cytokines IL-1 et TNF α (Clegg *et al.*, 1998).

4.3. Techniques utilisées pour quantifier les MMP ou mesurer leur activité

Différentes techniques peuvent être utilisées pour détecter la présence de MMP. Le Western Blot, la RT-PCR, le test ELISA et la zymographie en font partie.

4.3.1. *Le Western Blot*

Le Western Blot ou immunoblot est une méthode de protéomique qui permet de détecter une protéine spécifique dans un échantillon donné. La technique utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour séparer, selon leur masse, les protéines qui sont préalablement dénaturées. Les protéines sont alors transférées du gel à une membrane en nitrocellulose où elles sont exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. Il est ainsi possible de déterminer la présence d'une protéine dans un échantillon, sa taille ou sa concentration⁴.

4.3.2. *La RT-PCR*

La RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) est une PCR (Polymerase Chain Reaction) classique effectuée après transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc).

La RT-PCR a été mise au point pour utiliser l'ARN comme matrice d'amplification de la PRC. Elle est une des méthodes les plus sensibles pour détecter et éventuellement quantifier les ARN messagers. Elle a, par exemple, permis de révéler que, dans certaines conditions, certaines MMP sont plus exprimées au niveau transcriptionnel que d'autres (Zhao *et al.*, 2007).

L'une des difficultés de cette méthode est la préparation des ARN qui peuvent être facilement dégradés et contaminés par de l'ADN génomique⁵.

4.3.3. *Le test ELISA*

Le test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) est un dosage immunoenzymatique sur support solide.

C'est une technique qui permet de détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon. La technique utilise un ou deux anticorps. L'un de ceux-ci est spécifique à l'antigène tandis que l'autre réagit aux complexes immuns et est couplé à une enzyme⁶.

Le test ELISA a été développé pour les MMP (Chang *et al.*, 2006) mais donne des informations uniquement sur la présence de l'enzyme ; il n'est pas possible de déterminer à partir des résultats si l'enzyme détectée est active ou non. De plus, il n'existe pas d'anticorps MMP spécifiquement équins actuellement (Clegg *et al.*, 1997b).

4.3.4. *La zymographie*

La zymographie est une technique largement utilisée dans l'identification de l'activité protéolytique des enzymes (Hattori *et al.*, 2002).

Cette technique identifie les MMP par la dégradation de leur substrat préférentiel et par leur poids moléculaire.

⁴ http://fr.wikipedia.org/wiki/Western_blot

⁵ http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/ressources/apects_techniques/rtpcr/rtpcr01.htm

⁶ http://fr.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked_immunosorbent_assay

Les protéines sont séparées par électrophorèse sous sodium dodécyl sulfate (SDS) dénaturant. La séparation est réalisée dans un gel de polyacrylamide contenant un substrat spécifique copolymérisé à l'acrylamide. Par exemple, la gélatine est utilisée comme substrat spécifique pour la détection des MMP-2 et -9, les gélatinases.

Pendant l'électrophorèse, le SDS dénature les MMP qui deviennent inactives. Après l'électrophorèse, le gel est lavé, causant l'échange entre le SDS et le Triton X-100 et permettant aux enzymes de partiellement se renaturer et récupérer leur activité.

Les pro-MMP sont aussi activées sans clivage du propeptide.

Le gel est ensuite incubé dans un tampon approprié où le substrat est digéré si des MMP sont présentes dans l'échantillon testé.

Après l'incubation, le gel est coloré au Bleu de Coomassie. Ce dernier colore le substrat. Les MMP sont donc détectées par les bandes claires contrastant avec le gel coloré, où le substrat n'a pas été dégradé. Ces bandes peuvent être quantifiées par densitométrie.

La zymographie est présentée plus en détail dans le chapitre 'matériel et méthodes'.

Quelques aspects de la zymographie doivent être pris en compte dans l'analyse des résultats (Snoek-van Beurden *and* Von den Hoff, 2005) :

- Le SDS dissocie les MMP des TIMP, ce qui peut avoir pour conséquence une plus forte activité qu'*in vivo*
- La reformation des MMP après l'électrophorèse recouvre seulement une partie de l'activité de départ
- La digestion du substrat par les proMMP est quelque peu réduite par rapport à celles des MMP actives à cause du domaine propeptide
- D'autres MMP peuvent aussi lyser le substrat. Par exemple les collagénases, dans le cas de la zymographie sur gélatine. Ce signal sera probablement très faible étant donné qu'il ne s'agit pas de leur substrat préférentiel.

Intérêt de mesurer l'activité des MMP par la zymographie

La mesure de l'activité des MMP dans les fluides biologiques comme le liquide synovial est difficile car pour les mesures, qui dépendent de la destruction du substrat, il est nécessaire que les enzymes soient actives et non-inhibées.

La zymographie sur gélatine permet la mesure de l'activité MMP potentielle totale car, d'une part, les composants du gel activent les enzymes et, d'autre part, les inhibiteurs sont séparés des enzymes pendant la migration (Clegg *et al.*, 1997b).

Le fait que les pro-enzymes soient activées sans que le domaine pro-peptide soit clivé permet de les distinguer des enzymes actives par leur poids moléculaire ; deux bandes sont présentes sur le gel.

La zymographie sur gélatine se fait essentiellement pour les gélatinases, c'est-à-dire les MMP-2 et -9. Cette technique est extrêmement sensible, 10 pg de MMP-2 peuvent être détectés (Snoek-van Beurden *and* Von den Hoff, 2005).

5. Les facteurs étudiés influençant l'activité MMP chez le cheval

Certains facteurs physiologiques et pathologiques peuvent moduler l'activité MMP et peuvent donc prédisposer aux maladies articulaires. Parmi les facteurs physiologiques, les effets de l'âge, du sexe, de la race et de l'exercice sont présentés même si seuls ceux de l'âge ont pu être démontrés significativement. Les auteurs restent partagés sur l'influence qu'aurait le sexe et la race tandis qu'un exercice modéré n'aurait aucune influence sur l'activité MMP.

5.1. Facteurs physiologiques

5.1.1. L'âge

Brama *et al.* ont montré que les taux de MMP actives dans le liquide synovial sont significativement plus élevés chez les chevaux juvéniles, c'est-à-dire âgés de 11 mois maximum, que chez les chevaux matures, âgés de 4 à 30 ans. Au sein du groupe des juvéniles, l'activité MMP est plus élevée chez les poulains de 5 mois que chez ceux de 11 mois. Par contre, chez les chevaux adultes, l'activité MMP est indépendante de l'âge (Brama *et al.*, 1998).

Une autre étude a montré que les taux de stromelysines actives dans le liquide synovial sont 30 à 80 fois plus élevés chez des fœtus de chevaux que chez les chevaux juvéniles ou adultes. L'activité stromelysine est deux à trois fois plus forte chez les juvéniles, âgés de 5 et 11 mois, que chez les chevaux adultes (Brama *et al.*, 2000).

5.1.2. Le sexe

Lohmander *et al.* (1993) ont comparé, chez l'homme, les activités MMP en fonction du sexe et n'ont trouvé aucune différence. Manicourt *et al.* (1994) ont montré que le sexe n'influençait pas les MMP-1 et TIMP-1 du sérum. Par contre, Van den Boom a trouvé, chez le cheval, des concentrations de MMP-3 plus élevées dans le sérum chez les mâles que chez les femelles chez les adultes sains, mais pas chez ceux atteints d'ostéoarthrite (van den Boom *et al.*, 2004)

5.1.3. La race

Il est possible que des différences dans l'activité MMP existent entre les poneys et les chevaux. L'influence de la race sur l'activité MMP dans le liquide synovial n'a jamais été étudiée chez le cheval mais Todhunter *et al.* (1997) ont décrit une différence, entre plusieurs races de chevaux, de concentration de kératane sulfate dans la synovie ; une différence pourrait donc aussi exister pour d'autres marqueurs (van den Boom *et al.*, 2004).

5.1.4. L'exercice

Une étude a comparé les activités MMP de deux groupes de chevaux, le premier étant sujet à un programme d'exercices modérés tandis que le deuxième constituait le groupe contrôle. Il n'existe aucune différence significative entre les activités MMP des deux groupes de chevaux (van den Boom *et al.*, 2004).

5.2. Facteurs pathologiques

Comme expliqué dans le chapitre 3, des cytokines telles que l'IL-1 sont libérées dans des conditions pathologiques.

Il a été montré que, *in vitro*, les cellules et les tissus articulaires augmentent leur production de MMP-2 en réponse à une stimulation à l'IL-1 β . La stimulation des cellules et des tissus articulaires causerait non seulement une augmentation de la production des MMP mais aussi une augmentation de la quantité d'enzymes activées.

Ainsi, l'activité MMP dans le liquide synovial provenant de patients atteints d'arthrite rhumatoïde ou d'ostéoarthrite est significativement plus élevée comparée à celle des contrôles. Cela a pu être démontré pour la MMP-2 (Clegg *and* Carter, 1999) et la MMP-3, dont l'activité est environ quatre fois plus élevée que dans les articulations normales (Brama *et al.*, 2000).

Dans les articulations saines, le ratio activité MMP-3/activité MMP totale ne change pas avec l'âge. Par contre, dans les articulations touchées par l'ostéoarthrite, le ratio est plus que doublé comparé aux articulations saines, ce qui indiquerait une régulation sélective de l'expression des gènes, de l'activation de la proMMP-3 ou des deux dans les pathologies articulaires (Brama *et al.*, 2000).

Les avis sont controversés en ce qui concerne l'ostéochondrose. En effet, Brama *et al.* montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre l'activité stromelysine (MMP-3) dans les articulations touchées par l'ostéochondrose et celle des articulations contrôles mais Clegg a identifié une augmentation des activités MMP-2 et -9 dans toutes les maladies articulaires aseptiques, y compris l'ostéochondrose. Dans la mesure où Clegg n'a pas précisé l'âge de ses animaux, il est possible que ses résultats proviennent du fait que l'âge du groupe atteint d'ostéochondrose soit plus faible que celui du groupe contrôle (Brama *et al.*, 1998 ; Clegg *and* Carter, 1999).

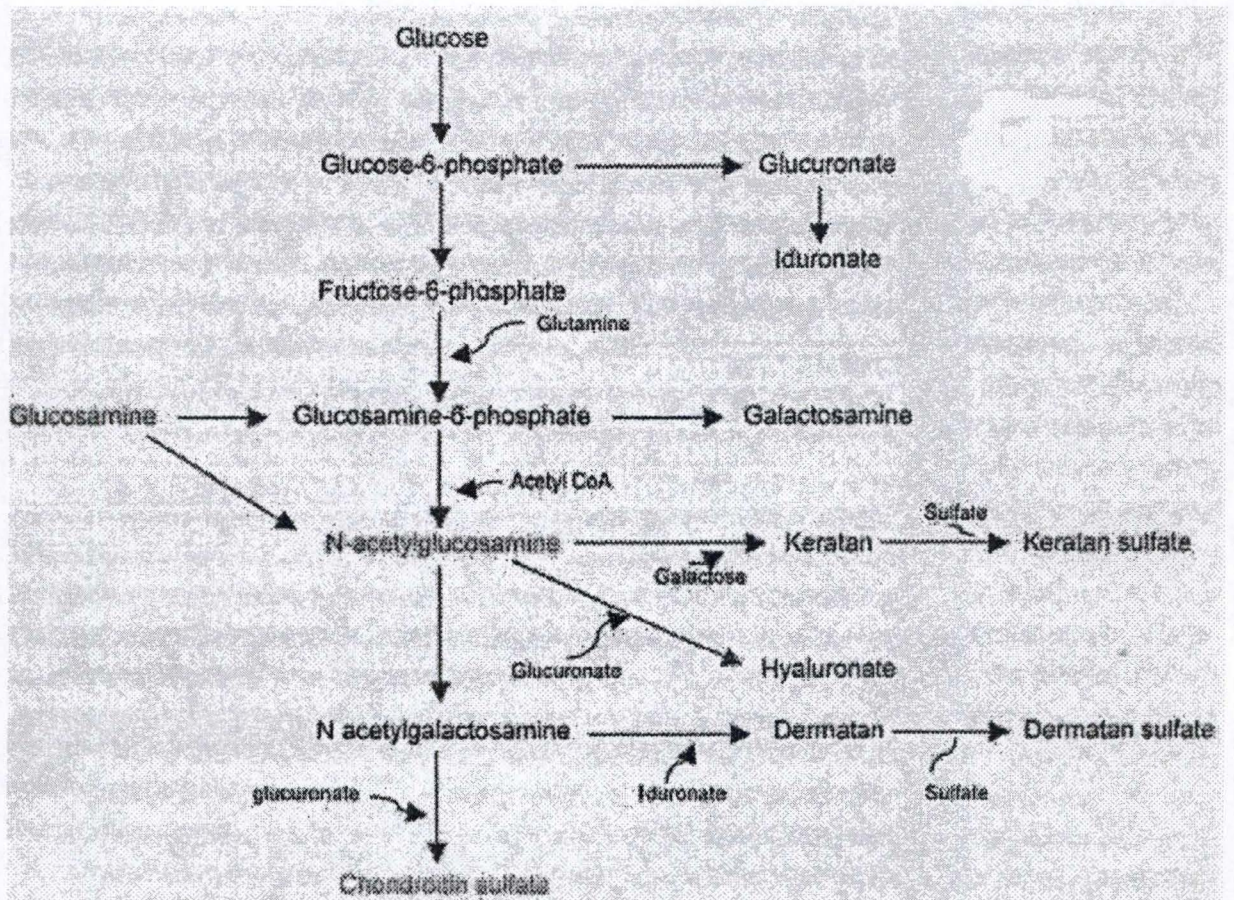


Figure 5 : Voie de synthèse de la glucosamine et de ses dérivés (Neil, 2005)

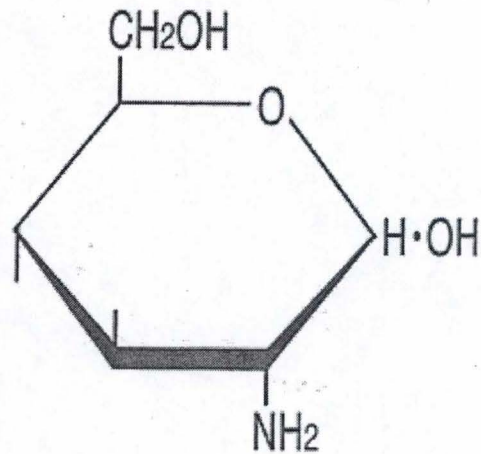


Figure 6 : Structure moléculaire de la glucosamine²

² <http://www.glucosamine-celadrin.info/img/glucosamine.gif>

6. La prévention de la dégradation cartilagineuse

Parmi les approches thérapeutiques visant à contrôler ou à moduler les effets des maladies articulaires figure l'administration d'acide hyaluronique, d'anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) et non stéroïdiens (AINS), d'*Harpagophytum procumbens* et de glycosaminoglycans et précurseurs tels que la glucosamine et le chondroïtine sulfate.

6.1. Substances utilisées préventivement dans la dégradation cartilagineuse

L'acide hyaluronique est un constituant normal de la MEC. Il est généralement utilisé par voie intra-articulaire car sa fragilité et son poids moléculaire élevé ne laissent pas présager que sa biodisponibilité soit bonne lors d'une absorption orale. L'administration par injection est une source de complications car, si elle est mal réalisée, elle peut provoquer des infections dans l'articulation.

Les AIS sont, de par leur mécanisme d'action (inhibition de la transcription des gènes 'pro-inflammatoires'), des agents thérapeutiques dont l'effet anti-inflammatoire est puissant, permettant de diminuer la progression des lésions cartilagineuses et de contrôler la douleur. En médecine équine, leur administration par voie intra-articulaire est fréquemment prodiguée mais est considérée comme une forme de dopage et comporte les mêmes risques d'infection que l'administration d'acide hyaluronique.

Quant aux AINS, leurs effets anti-inflammatoires et antalgiques sont moins prononcés que ceux des AIS ; vraisemblablement parce que leur administration ne permet que de contrôler les processus anti-inflammatoires dépendants de la cyclo-oxygénase (COX).

Les AINS sont administrés par voie orale ou par voie intraveineuse chez le cheval et une administration prolongée (>10 jours) peut causer des effets secondaires, notamment au niveau du tractus digestif (développement d'ulcères gastriques et intestinaux). On décrit également une toxicité rénale et hépatique de même qu'une destruction cartilagineuse lors d'administrations prolongées (Gaby, 2007; Minaud, 2007).

Comme les AIS, les AINS font partie des agents dopants, ce qui limite leur utilisation chez le cheval de compétition. Dès lors, l'intérêt pour des substances 'non dopantes' à effet chondro-protecteur ne cesse de croître.

L'*Harpagophytum procumbens* est une plante que l'on retrouve spécifiquement au sud de l'Afrique. Ses racines secondaires contiennent entre autres des glucosides qui auraient une action anti-inflammatoire en inhibant la synthèse de la prostaglandine synthétase⁷. Elles sont souvent utilisées sous forme de poudre cryobroyée pour lutter contre l'inflammation, la douleur ou le gonflement articulaire⁸.

La glucosamine est un amino-monosaccharidique, correspondant à une molécule de glucose portant une fonction amine en C2 (Prouvost, 2000). La glucosamine est souvent administrée sous forme de sels de glucosamine, par exemple, en sulfate de glucosamine⁹.

La figure 5 présente la voie de synthèse de la glucosamine, la figure 6 sa structure moléculaire.

La glucosamine entre directement dans la composition de certains GAG, comme la chondroïtine sulfate, de l'acide hyaluronique et de protéoglycans du cartilage articulaire.

⁷ <http://www.01sante.com/xoops/modules/icontent/index.php?page=633>

⁸ <http://www.aquadesign.be/news/article-3261.php>

⁹ http://www.nce.gc.ca/annualreport2003_2004/Fre/3_0/3_3.asp#top

Son faible poids moléculaire, sa haute solubilité dans l'eau et son pKa de 6,91 à 37°C permettent une bonne absorption dans l'intestin grêle (pH 6,8) (De los Reyes *et al.*, 2000).

La glucosamine a une demi-vie plasmatique de quatre heures chez le chien (Prouvost, 2000). Chez le cheval, elle est comprise entre 1,45 et 6,17 heures.

Sa biodisponibilité per os est en moyenne de 5,9 % (Laverty *et al.*, 2005). Cette faible biodisponibilité est vraisemblablement due à un premier passage hépatique important ou à une transformation dans le tube digestif, sous l'action de la flore intestinale (Gazadeh-Habashi *et al.*, 2006).

La glucosamine a une faible toxicité. Les seuls effets secondaires observés à long terme sont des troubles gastro-intestinaux mineurs et une faible diminution du taux d'hématocrite et du nombre de neutrophiles qui peut être expliquée par l'analogie de composition de la glucosamine avec l'héparine et par l'effet anti-inflammatoire des chondroprotecteurs (McNamara *et al.*, 1996).

La plupart de la glucosamine dans le corps est présente sous forme de glucosamine-6-phosphate.

De récentes méthodes révèlent une absorption de près de 90% après administration orale (via des transporteurs au glucose), incorporation dans des protéines plasmatiques et biotransformation dans le foie. Dans toutes les études effectuées, la glucosamine est rapidement distribuée dans les tissus, avec un tropisme particulier pour le cartilage articulaire (Neil *et al.*, 2005a).

La glucosamine, une fois modifiée en N-acétylglucosamine, est un précurseur des unités disaccharidiques des GAG comme l'hyaluronane et le kératane sulfate. L'isomérisation convertit la glucosamine en galactosamine, un composant structural du chondroïtine sulfate et du dermatane sulfate.

Le chondroïtine sulfate est un GAG constitué d'unités disaccharidiques alternées d'acide glucuronique et de N-acétylgalactosamine sulfatée. Le chondroïtine sulfate est un constituant normal du cartilage. Le chondroïtine-4-sulfate prédomine dans le cartilage immature mais le ratio chondroïtine-6-sulfate/chondroïtine-4-sulfate augmente avec l'âge.

Il semble clair que l'administration exogène de chondroïtine sulfate est capable d'influencer le métabolisme du cartilage sain ou malade.

Le sort métabolique du chondroïtine sulfate administré oralement est controversé. De part sa taille, la forme du chondroïtine sulfate disponible chez un animal après administration orale peut être affectée par la dégradation intestinale et le métabolisme dans le foie. Le chondroïtine sulfate ne peut être absorbé intact mais plutôt sous forme de métabolites disaccharidiques. Les résultats de récentes études suggèrent que la biodisponibilité orale du chondroïtine sulfate est assez limitée. Comme pour la glucosamine, un tropisme pour le cartilage articulaire a été détecté pour le chondroïtine sulfate (Neil *et al.*, 2005a).

6.2. Effets in vitro de la glucosamine et du chondroïtine sulfate

6.2.1. Effets de la glucosamine

La glucosamine a de nombreux effets in vitro et influence l'expression ou l'activité de certains médiateurs de l'ostéoarthrite. Ces actions incluent une réduction de la dégradation des protéoglycanes et l'inhibition de la synthèse ou de l'activité d'enzymes dégradatives ou de médiateurs inflammatoires comme les aggrécases, les MMP, l'oxyde nitrique et la prostaglandine E₂ (McCarty *et al.*, 2000; Byron *et al.*, 2003).

Une étude réalisée sur culture cellulaire a montré que l'ajout de glucosamine aurait pour effet la stimulation de la synthèse de l'acide hyaluronique (McCarty *et al.*, 2000). La glucosamine agit comme un substrat et augmente la production de protéoglycanes et de GAG. De plus, la glucosamine prévient la répression du galactose β -1,3-glucuronosyltransferase I, une enzyme clé dans la synthèse des GAG. Ses effets anaboliques sont limités à la stimulation de la production de GAG et de protéoglycanes, incluant l'aggrécane, ils n'ont pas d'effets sur le collagène de type II (Neil *et al.*, 2005a).

La glucosamine n'aurait pas d'action sur la synthèse de collagène par les cellules cartilagineuses (Oegema *et al.*, 2002; Dodge and Jimenez, 2003).

La glucosamine a aussi des effets sur la libération de médiateurs inflammatoires ; elle prévient l'augmentation d'oxyde nitrique dans les cultures d'explants cartilagineux équins stimulés à l'IL-1 recombinante humaine (Fenton *et al.*, 2000) et entraîne une diminution significative de la production de prostaglandines E₂ par des chondrocytes de rats (Gouze *et al.*, 2001).

Spécifiquement, la glucosamine réduit l'expression de la MMP-1, de la MMP-3 et de la MMP-13 dans les cultures de chondrocytes équins (Neil *et al.*, 2005b).

La glucosamine est disponible dans le commerce sous 3 formes : glucosamine hydrochloride, glucosamine sulfate, et N-acétyl-D-glucosamine. La forme de la glucosamine semble influencer sur son activité in vitro : La glucosamine hydrochloride et la glucosamine sulfate semblent moduler la dégénérescence cartilagineuse de manière plus efficace que la N-acétyl-glucosamine.

De fortes doses de glucosamine pourraient avoir un effet préjudiciable sur la viabilité des chondrocytes in vitro mais ces effets ne sont pas confirmés par toutes les études. Selon Neil *et al.* l'exposition à long terme à la glucosamine ne semble pas avoir d'effets préjudiciables sur le métabolisme des chondrocytes (Neil *et al.*, 2005a).

Les résultats de récentes études indiquent que la glucosamine a un effet préventif en terme de réduction de transcription des facteurs impliqués dans la signalisation intracellulaire de l'IL-1.

Les facteurs de transcription AP-1 et NF κ B sont augmentés dans les cartilages affectés par l'ostéoarthrite et stimulent la transcription des gènes qui jouent un rôle clé dans la dégradation du cartilage.

Une étude réalisée in vitro sur des chondrocytes de rats stimulés par des FRO ou de l'IL-1 β a montré que la glucosamine semblait inhiber l'activité de la NF κ B mais n'aurait pas d'effets sur l'AP-1 (Gouze *et al.*, 2002).

6.2.2. Effets du chondroïtine sulfate

In vitro, le chondroïtine sulfate inhibe la production de cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-1 α , le TNF α ou encore l'IL-6 mais aussi des PGE₂ dès 500 μ g/ml (Bassleer *et al.*, 1998) et diminue la libération d'oxyde nitrique qui provoque l'apoptose des chondrocytes.

Le chondroïtine sulfate diminue l'activité collagénolytique des chondrocytes humains, stimule la production de TIMP et celle des protéoglycanes. Il augmente aussi la viscosité du liquide synovial chez les chevaux arthrosiques (Bali *et al.*, 2001; Bassleer *et al.*, 1998) en stimulant la production d'acide hyaluronique par les synoviocytes (Neil *et al.*, 2005b). De plus, il stimule la synthèse des GAG et inhibe la synthèse d'enzymes dégradantes, incluant les MMP.

Contrairement à la glucosamine, le chondroïtine sulfate inhibe la dégénérescence du collagène de type II induite par l'IL-1 (Neil *et al.*, 2005a).

6.2.3. Effets combinés de la glucosamine et du chondroïtine sulfate

Les effets de la glucosamine et du chondroïtine sulfate semblent relativement complémentaires. En effet, la glucosamine agit surtout en stimulant la synthèse des composants de la MEC tandis que le chondroïtine sulfate inhibe leur dégradation.

Dans le cartilage équin in vitro, la combinaison de glucosamine et de chondroïtine sulfate diminuerait la production d'oxyde nitrique et la dégradation des protéoglycanes et inhiberait l'activité de la MMP-9 mais pas celle de la MMP-2.

Une synergie est donc possible, même si les effets combinés de la glucosamine et du chondroïtine sulfate restent peu explorés (Neil *et al.*, 2005a).

6.3. Effets in vivo de la glucosamine et du chondroïtine sulfate sur l'aspect symptomatique des pathologies ostéo-articulaires

Les effets in vivo de la glucosamine et du chondroïtine sulfate sont encore peu connus. Chez l'homme, des effets modérés tels qu'une diminution de la douleur et une amélioration de la mobilité auraient été détectés. Les effets du chondroïtine sulfate semblent meilleurs que ceux de la glucosamine.

Chez le cheval, une étude a permis d'évaluer l'efficacité d'un traitement oral à base d'un mélange de glucosamine et de chondroïtine sulfate sur des chevaux atteints d'arthropathie dégénérative. Les auteurs ont constaté une diminution de la boiterie ainsi qu'une amélioration du test de flexion (Hanson, 1997). Toutefois, le manque de contrôle placebo peut constituer un biais quant à l'interprétation des résultats.

Forsyth a montré que huit semaines de complémentation orale par de la glucosamine et du chondroïtine sulfate sur 15 chevaux âgés de 15 à 35 ans ont déjà un effet positif sur l'allongement des foulées et sur l'étendue du mouvement de l'articulation. La présence d'un groupe contrôle (n=5) permet de renforcer ces résultats (Forsyth *et al.*, 2006).

7. Objectifs de l'étude

Plusieurs chercheurs ont pu démontrer une augmentation de l'activité des MMP en cas de pathologies articulaires (Brama *et al.*, 2000; Clegg and Carter, 1999). Les cytokines, certaines hormones et des formes réactives de l'oxygène sont capables d'activer les MMP. Ces phénomènes forment apparemment une cascade dont les différents composants s'activent l'un l'autre, ce qui conduit à l'activation des MMP (Nagase *et al.*, 2006). L'importance des lésions cartilagineuses observées par analyse histologique est positivement corrélée à cette augmentation de l'activité des MMP (van den Boom *et al.*, 2005a).

Les recherches se sont donc concentrées sur le développement de modulateurs de l'activité des MMP qui, en préservant l'équilibre enzymatique articulaire, pourraient être utilisés dans un but curatif ou préventif.

Parmi ces modulateurs de MMP, les glycosaminoglycanes et leurs précurseurs sont les plus utilisés. Ils semblent permettre à la fois l'augmentation de la synthèse de la MEC et la modulation de la cascade conduisant à l'activation des MMP (Henrotin *et al.*, 2002). Les anti-oxydants pourraient également jouer un rôle favorable en inhibant cette même cascade.

De nombreux modulateurs ont donc été développés, la plupart étant composés d'un cocktail de ces différents modulateurs.

Des études réalisées *in vitro* sur cultures de chondrocytes équins ou *in vivo* avec des rats complémentés par injection ont permis de prouver l'effet bénéfique de ces compléments sur la dégradation cartilagineuse (Neil *et al.*, 2005b; Beren *et al.*, 2001).

Une étude a montré qu'une complémentation par voie orale à base d'un mélange de glucosamine, chondroïtine sulfate et ascorbate de manganèse permet de retarder l'apparition d'une arthrite auto-immune chez le rat (Beren *et al.*, 2001). Chez l'homme, quelques études ont été réalisées sur l'effet des glycosaminoglycanes et précurseurs sur diverses pathologies articulaires. Une diminution de la gravité des symptômes et de la douleur a été rapportée chez les patients traités.

Chez le cheval, plusieurs compléments alimentaires à donner par voie orale sont disponibles sur le marché. Ils sont surtout destinés aux chevaux de sport et certains sont spécifiques à la prévention des pathologies ostéo-articulaires. Les études réalisées sur les effets de ces compléments oraux se sont, jusqu'à présent, concentrées sur l'aspect symptomatique des animaux. Il existe aussi un certain nombre d'études *in vitro*, où les effets des glycosaminoglycanes et précurseurs sur l'activité des MMP sont testés.

A ce jour, aucune étude investiguant l'effet des compléments oraux de glycosaminoglycanes sur l'équilibre enzymatique articulaire *in vivo* n'est publiée. Dès lors, l'objectif de ce projet est de tester l'effet d'un complément alimentaire à base de glucosamine et de chondroïtine sulfate sur l'équilibre enzymatique articulaire chez le cheval.

MATERIEL ET METHODES

Dates	Chevaux					
	A1 A2 B1	A3 B2 B3	A4 A5 B4	A6 B5 B6	A7 A8 B7	B8
3/01/2007	Arrivée	Arrivée	Arrivée	Arrivée		
	Habituation					
	Début comp.					
22/01/2007		Début comp.				
29/01/2007			Début comp.			
5/02/2007				Début comp.		
12/02/2007				Début comp.	Arrivée	Arrivée
					Habituation	
4/03/2007	Fin comp.					
5/03/2007					Début comp.	
6/03/2007	Euthanasie					
11/03/2007		Fin comp.				
12/03/2007		Euthanasie				Début comp.
18/03/2007			Fin comp.			
19/03/2007			Euthanasie			
25/03/2007				Fin comp.		
26/03/2007				Euthanasie		
15/04/2007					Fin comp.	
17/04/2007					Euthanasie	
22/04/2007						Fin comp.
23/04/2007						Euthanasie
30/04/2007	Début des analyses de laboratoire.					

Tableau 1 : Calendrier du protocole expérimental
 Comp. = Administration journalière du complément (A) ou du placebo (B).

Matériel et méthodes.

1. Schéma expérimental

Pour cette étude, 16 poneys sont utilisés. Deux groupes homogènes en âge et en sexe sont formés. Les poneys du premier groupe reçoivent pendant six semaines un complément alimentaire à base de glucosamine, de chondroïtine sulfate et d'harpagophytum tandis que les poneys du deuxième groupe reçoivent de la même façon un placebo. Ante mortem, des échantillons de sang et de synovie sont prélevés avant et après la période de complémentation. Post mortem, de la synovie et du cartilage sont prélevés.

Tous les poneys pèsent environ 200-300 kg et ne présentent aucune pathologie apparente. Pour nous en assurer, nous avons effectué un examen clinique approfondi de chacun d'entre eux et tous ont été vermifugés. Deux groupes homogènes ont été constitués, en fonction de l'âge et du sexe des poneys. Le groupe A comprend deux femelles de quatre ans, deux femelles de deux ans et quatre mâles castrés de deux ans. Le groupe B est constitué d'un mâle castré de quatre ans, de trois femelles de deux ans et de quatre mâles castrés de deux ans. Le protocole expérimental a été accepté par la Commission d'Éthique et de Bien-Être Animal locale (FUNDP-CRAGx-FUSAGx).

Les poneys sont logés à Faulx-Les-Tombes, au Centre de Recherches Ovines des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix (FUNDP). Les poneys sont en stabulation libre et vont en prairie environ une heure par jour. Ils sont nourris deux fois par jour avec du foin et une fois par jour avec des concentrés. Pour que les poneys reçoivent chacun la même quantité de concentrés, ils sont attachés devant leur seau grâce à un licol le temps de manger. Les poneys disposent de deux semaines d'acclimatation pour s'habituer à leur nouvel environnement avant que la complémentation ne commence.

La complémentation est réalisée pendant six semaines consécutives. Chacun des poneys du premier groupe reçoit quotidiennement le complément alimentaire à base de glucosamine, de chondroïtine sulfate et d'harpagophytum tandis que l'autre groupe est complémenté de la même façon par un placebo. Le complément et le placebo se présentent sous forme d'une poudre à mélanger aux concentrés alimentaires. Afin de réaliser l'étude en aveugle, le complément et le placebo sont fournis sous forme de sachets A et B et les investigateurs n'ont pris connaissance de l'identité du complément qu'après avoir réalisé la totalité des analyses. Pour des raisons pratiques, tous les poneys n'ont pas été complémentés en même temps. En effet, les travaux pratiques d'anatomie pour les étudiants en second baccalauréat en médecine vétérinaire nécessitent trois poneys chaque semaine.

Un calendrier est présenté en tableau 1.

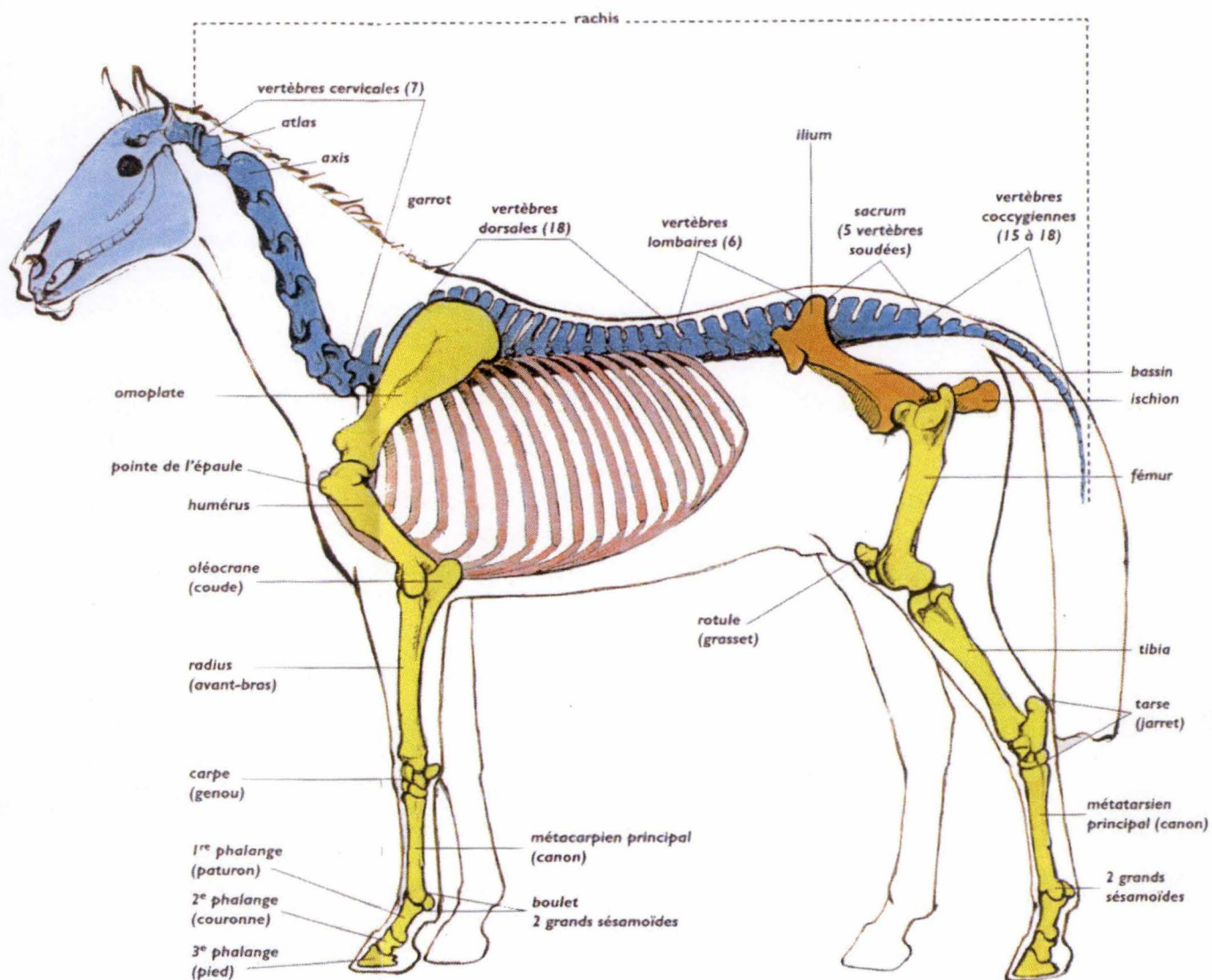


Figure 7 : Os et articulations chez le cheval³

³ http://www.le-paddock.com/le-squelette_fichiers/squelette.jpg

2. Investigations sur les poneys

2.1. Tests préliminaires (T₀)

Avant que la complémentation ne commence, chaque poney subit un examen clinique général, un examen en mouvement et des tests de flexion pour déceler une éventuelle boiterie. Ces examens sont filmés afin d'en garder une trace.

Les examens en mouvement sont réalisés sur un sol dur non incliné et comportent un premier passage au pas et un deuxième au trot. Les tests de flexion consistent à fléchir chaque membre du cheval pendant environ une minute et à directement lui faire faire un passage au trot. Ceux-ci permettent d'accentuer une éventuelle boiterie. Enfin, les chevaux trotent sur un cercle, à main droite et à main gauche.

Les poneys sont ensuite tranquilisés par injection intraveineuse avec un mélange composé de 50 % de *Domosedan* (principe actif = Detomidine ; 2 mg/100 kg) et de 50 % de *Torbugesic* (principe actif = Butorphanol ; 2,2 mg/100 kg), afin de faire les manipulations sans danger pour le vétérinaire, pour l'animal ou pour le matériel. Les membres des poneys ont été partiellement tondus afin d'améliorer la qualité des images de l'échographie et de la radiographie et afin de permettre l'asepsie lors des ponctions articulaires.

Des radiographies et des échographies sont effectuées sur un boulet antérieur et sur un grasset. Celles-ci permettent d'avoir des informations complètes sur l'articulation avant et après la complémentation. Le choix du boulet et du grasset est fonction des tests de boiterie ; les tests se font sur la meilleure des deux articulations, soit à gauche, soit à droite pour s'assurer que les résultats ne soient pas faussés par une éventuelle blessure. Tous les résultats sont enregistrés.

Une ponction de synovie est réalisée après désinfection cutanée sur ces mêmes articulations. La ponction se fait à l'aide d'aiguilles TERUMO de 0,8 x 25 mm.

2.2. Tests après complémentation (T₆)

Après la complémentation, chaque poney subit à nouveau les examens en mouvement et les tests de flexion. Une ponction de synovie et une échographie sont refaites sur les articulations qui avaient été choisies à T₀ et une prise de sang est renouvelée. Une prise de sang sur tube EDTA est effectuée en plus pour connaître la valeur hématocrite et pouvoir réaliser une analyse hématologique.

2.3. Investigation post-mortem

Une fois la complémentation et les tests achevés, les poneys sont euthanasiés par saignée sous anesthésie générale au Laboratoire d'Anatomie et Ethologie des Animaux Domestiques des FUNDP.

Dès la mort de l'animal, des ponctions de synovie sont effectuées, à l'aide d'aiguilles TERUMO 0,9x70mm, au niveau des boulets antérieurs et postérieurs, du carpe, du tarse, du coude et du grasset, à chaque fois à gauche et à droite.

Un schéma des différentes articulations du cheval est présenté dans la figure 7.

Les cadavres des poneys sont ensuite utilisés pour les travaux pratiques d'Anatomie des Animaux Domestiques des étudiants en second baccalauréat de médecine vétérinaire aux FUNDP.

Standards MMP

Standards MMP-2 (1ng/μl, 200 μl)

Dilutions	Concentration	Volume éch.	Volume Laemmly	Volume total
S0	0,3	éch 200	467	667
S1	0,0375	S0 100	700	800
S2	0,0188	S1 200	200	400
S3	0,0094	S2 200	200	400
S4	0,0047	S3 200	200	400
S5	0,0023	S4 200	200	400
S6	0,0012	S5 200	200	400
S7	0,0006	S6 200	200	400
S8	0,0003	S7 200	200	400

Standards MMP-9 (1ng/μl, 200μl)

Dilutions	Concentration	Volume éch.	Volume Laemmly	Volume total
S0	0,32	éch 200	425	625
S1	0,08	S0 100	300	400
S2	0,04	S1 200	200	400
S3	0,02	S2 200	200	400
S4	0,01	S3 200	200	400
S5	0,005	S4 200	200	400
S6	0,0025	S5 200	200	400
S7	0,0013	S6 200	200	400
S8	0,0006	S7 200	200	400

Tableau 2 : Préparation des standards MMP

3. Analyses

3.1. Traitement et conservation des échantillons

3.1.1. *Echantillons de sang*

Le sang contenu dans les tubes EDTA sert à mesurer la valeur hématocrite, à faire un frottis et à compter le nombre d'érythrocytes et de leucocytes grâce à une cellule de Burcker.

3.1.2. *Echantillons de synovie*

La synovie est centrifugée pendant dix minutes à 3000 rpm (rotations par minutes). Comme pour le sang, le surnageant est prélevé, aliquoté par 100 µl et congelé. Si la quantité de liquide synovial est suffisante, 1 ml est conservé à part pour l'analyse des isoprostanes. Le culot est remis en suspension avec 300 µl de sérum physiologique et est utilisé pour l'analyse cytologique de la synovie après cyto-centrifugation.

L'ensemble des échantillons est conservé à -80°C au laboratoire de physiologie animale des FUNDP à Namur.

3.2. Détermination de l'activité MMP (Métalloprotéinases de matrice)

L'analyse de chaque échantillon est faite en duplicata.

3.2.1. *La zymographie*

La zymographie est une analyse qui consiste en une séparation électrophorétique des protéines dans un gel de polyacrylamide – sodium dodecyl sulfate (SDS) imprégné de gélatine. Les gélatinases sont mises en évidence par leur capacité à dégrader leur substrat, ce qui se traduit, après coloration de la gélatine, par des bandes blanches sur un fond bleu (Kleiner *and* Stetler-Stevenson, 1994 ; Stetler-Stevenson *et al.*, 1989).

➤ *Préparation des échantillons et des standards*

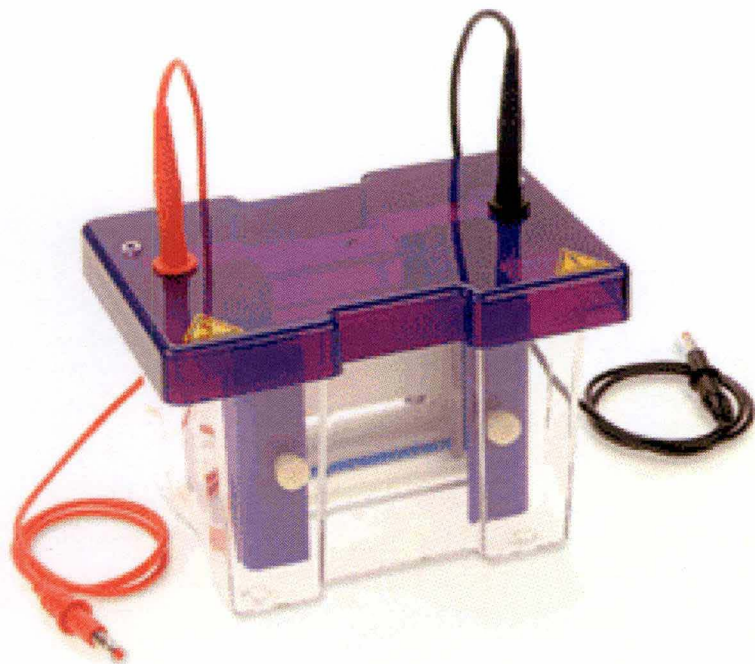
Plusieurs dilutions de standards sont effectuées. Seules les deux dilutions qui englobent de façon optimale l'activité MMP des échantillons sont gardées et utilisées pour la zymographie.

Le tableau 2 décrit la préparation des standards.

Les échantillons de synovie sont décongelés et sont dilués au Laemmli.

Le Laemmli est composé de 5 g de SDS, de 2 g de sucrose et d'une pointe de Bleu de Bromophénol dissous dans 50 ml de Tris-HCL 0,25M à pH 6,8.

Des études préliminaires ont montré que les dilutions des échantillons varient en fonction de la MMP dont on veut montrer l'activité. Pour mettre en évidence l'activité de la MMP-9, une dilution 12,5 fois est réalisée, tandis que pour la MMP-2, une dilution 20 fois est effectuée. En effet, l'activité de la MMP-2 est supérieure à celle de la MMP-9 (Arican *et al.*, 2000).



Complete System



Internal Running Module

Figure 8 : OmniPAGE Vertical Gel Casting System⁴

⁴ <http://www.denvillescientific.com/images/photos/omnipagemini.gif>

Zymographie : Composition des gels

Gel de séparation (10 % d'acrylamide)

Volumes (ml)	10	15
Eau	2,96	4,44
Acrylamide 30 %	3,33	5
Gélatine 1 %	1	1,5
Tris pH 8,8	2,5	3,75
SDS 10 %	0,1	0,15
APS 10 %	0,1	0,15
TEMED	0,01	0,015

10 ml = 1 gel

15 ml = 2 gels

Gel de compression (4 % d'acrylamide)

Volumes (ml)	10	15
Eau	5,96	8,935
Acrylamide 30%	1,33	2
Tris pH 6,8	2,5	3,75
SDS 10%	0,1	0,15
APS 10%	0,1	0,15
TEMED	0,01	0,015

10 ml = 6 gels

15 ml = 9 gels

Tableau 3 : Composition des gels de zymographie

On laisse ensuite les échantillons et les standards incubés à 37°C pendant une heure afin d'activer les MMP.

➤ ***Préparation du dispositif et des gels***

Le dispositif utilisé est l'OmniPAGE Vertical Gel casting system.

Le montage du dispositif se fait de la façon suivante : la petite plaque de verre est placée sur la plaque « spacer », la plus grande. Les deux plaques sont insérées dans le dispositif de façon à ce que la plaque « spacer » soit à l'extérieur par rapport à la petite plaque. Le montage doit se faire sur un support pour que les plaques soient bien alignées l'une par rapport à l'autre. Les vis de pression sont serrées pour sceller les plaques. L'assemblage est alors transféré sur la base de coulage où, en tenant les plaques, les pinces sont serrées jusqu'à sentir une résistance, ce qui bloque le dispositif.

Une photo en figure 8 illustre le dispositif.

Le gel de séparation est un gel de 1 mm d'épaisseur. C'est un gel de polyacrylamide 10 % copolymérisé avec 10 mg/ml de gélatine.

La composition du gel est donnée en tableau 3.

Une fois le SDS, l'APS et le TEMED ajoutés, le gel est directement coulé entre les deux plaques, jusqu'à environ 1 cm du bord supérieur, ce qui représente environ 5,5 ml de solution. On recouvre ensuite le gel avec 300 µl d'isobutanol et on laisse poser 30 minutes. L'isobutanol est alors absorbé par papier filtre et le montage est rincé à l'eau distillée.

Le gel de compression contient 4 % d'acrylamide.

Sa composition est aussi présentée dans le tableau 3.

Lorsque le SDS, l'APS et le TEMED sont ajoutés au mélange, on recouvre le gel de séparation jusqu'au bord des plaques et on glisse le peigne ad hoc de façon à éviter les bulles d'air. Un temps de pose de 45 minutes est nécessaire pour que le gel polymérise.

Le gel est ensuite placé dans la cuve d'électrophorèse et les peignes sont enlevés délicatement. La cuve est alors remplie au moyen du tampon de migration jusqu'à immersion complète des plaques de verre.

➤ ***Dépôt des échantillons et des standards***

Les standards et les échantillons sont déposés dans les puits grâce à des pipettes munies de tips à capillaire. Les standards sont toujours placés dans les puits aux extrémités gauches et droites du gel.

Les échantillons sont déposés dans les puits à raison de 30 µl pour la synovie et pour les standards. La position des échantillons dans les puits est notée.

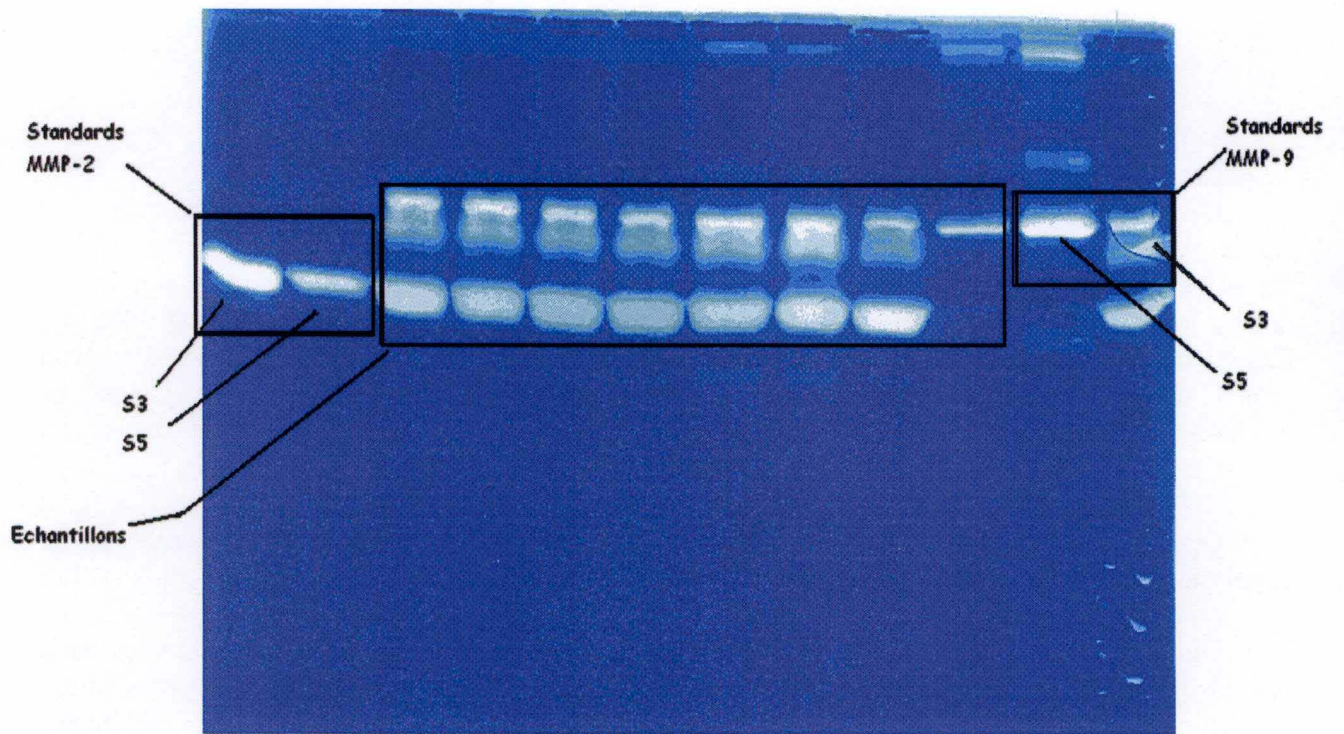


Figure 9 : Exemple de gel obtenu par zymographie

➤ *Migration*

Une fois tous les échantillons déposés, on installe le couvercle de la cuve et on applique un ampérage constant de 190 mA pour huit gels. On note le voltage et la puissance.

Avant que le front de migration ne dépasse la limite inférieure du gel, on arrête le générateur de champ électrique et on retire le tampon de migration.

➤ *Récupération et incubation des gels*

Pour récupérer les gels, on démonte le dispositif et on démoule les gels sous un filet d'eau courante avant de les déposer dans des cuves en plastique remplies de solution de renaturation : le Triton X-100 2 %. On laisse les gels sous agitation pendant 30 minutes avant de renouveler la solution de Triton X-100 2 %. Après une seconde période de 30 minutes, on rince les gels à l'eau distillée et on les place dans le milieu d'incubation, c'est-à-dire un tampon Tris-HCl pH 7,5 contenant 66 mM de CaCl₂, pendant dix minutes sous agitation à température ambiante puis pendant 48 heures sous étuve à 37°C. Les cuves en plastique sont entourées de papier aluminium afin d'éviter l'évaporation du milieu d'incubation.

➤ *Coloration des gels*

Après l'incubation, les gels sont rincés abondamment à l'eau distillée dans le but d'éliminer les traces de calcium qui pourraient précipiter.

Le colorant, du bleu de Coomassie G250 0,1 % dans une solution contenant 40 % de méthanol et 10 % d'acide acétique, est ajouté dans les cuves, qui restent sous agitateur pendant 20 minutes. Après ce laps de temps, on retire le colorant, le gel est rincé à l'eau distillée et on plonge le gel dans le décolorant, une solution contenant 20 % de méthanol et 10 % d'acide acétique. Cette phase dure 30 minutes et est toujours réalisée sous agitateur. On renouvelle ensuite le décolorant pour laisser poser le gel environ deux heures, jusqu'à obtenir des bandes de décoloration translucides.

Les gels sont ensuite placés dans l'eau distillée, dans des cuves recouvertes de papier aluminium et au frigo, où ils peuvent rester plusieurs jours avant d'être scannés.

La figure 9 montre un exemple de gel obtenu par zymographie.

3.2.2. *Quantification de l'activité MMP*

La quantification de l'activité MMP se fait grâce à un programme informatique, il est donc nécessaire de scanner les gels.

Une fois scannés, les gels sont numérisés et chaque gel est marqué d'une annotation où figure la date et le contenu du gel.

Tous les gels sont ensuite enregistrés.

La quantification en elle-même se fait à l'aide du programme Scion, permettant d'exprimer les bandes de lyse qui reflètent l'activité gélatinolytique des standards et des échantillons en pixels, repris comme unités de lyse. L'ensemble des deux bandes correspondant aux pro-MMP et aux MMP actives est mesuré.

Standards TIMP-2

	Volumes	Concentration
S0	Aliquot de 10µl à 6 ng/µl + 140 µl Tris pH 6,8	0,4 ng/µl
S1	50µl de S0 + 50 µl de Laemmly	0,2 ng/µl
S2 bis	50 µl de S0 + 50 µl de Tris pH 6,8	
S2	50 µl de S2 bis + 50 µl de Laemmly	
S3 bis	50 µl de S2 bis + 50µl de Tris pH 6,8	
S3	50 µl de S3 bis + 50 µl de Laemmly	
S4 bis	50 µl de S3 bis + 50µl de Tris pH 6,8	
S4	50 µl de S4 bis + 50 µl de Laemmly	
S5 bis	50 µl de S4 bis + 50 µl de Tris pH 6,8	
S5	50 µl de S5 bis + 50 µl de Laemmly	
S6 bis	50 µl de S5 bis + 50 µl de Tris pH 6,8	
S6	50 µl de S6 bis + 50 µl de Laemmly	
S7	50 µl prélevés de (50 µl de S6bis + 50µl de Tris pH 6,8) + 50 µl de Laemmly	

Standards TIMP-1

	Volumes	Concentration
S0 bis	Aliquot de 10 µl à 10ng/µl + 90µl de Tris pH 6,8	1 ng/µl
S0	50 µl de S0 bis + 50 µl de Laemmly	
S1 bis	50 µl de S0 bis + 50 µl de Tris pH 6,8	
S1	50 µl de S1 bis + 50 µl de Laemmly	
S2	50 µl prélevés de (50 µl de S1 bis + 50µl de Tris pH 6,8) + 50 µl de Laemmly	

Tableau 4 : Préparation des standards TIMP

Zymographie inverse

Gel de séparation (15% d'acrylamide)

Volume (ml)	10
H ₂ O	0,79
MMP-2	1
Tris pH 8,8	2,5
Acrylamide 30%	5
Gélatine	0,5

Vortexer

Incubation 10 minutes à 37°C

Incubation 10 minutes à température ambiante sous agitation

SDS	0,1
APS	0,1
TEMED	0,01

1 gel = 5,5 ml

Gel de compression (4,49% d'acrylamide)

volume (ml)	7,5
H ₂ O	4,34
Tris pH 6,8	1,87
Acrylamide 30%	1,124
SDS	0,075
APS	0,075
TEMED	0,015

1 gel = 2 ml

Tableau 5 : composition des gels de zymographie inverse

3.3. Détermination de l'activité TIMP (Tissue Inhibitor of MetalloProteinase)

3.3.1. La zymographie inverse

Le principe est le même que pour la zymographie classique sauf que l'on incorpore de la MMP-2 au gel. La MMP-2 dégrade la gélatine pendant l'incubation, de sorte que seules les zones protégées par les TIMP apparaissent colorées par le bleu de Coomassie (DeClerck, 1988).

➤ Préparation des échantillons et des standards

Les échantillons de synovie sont dégelés et sont dilués 5X grâce à une solution composée de 50 % de Laemmli et de 50 % de tampon Tris pH 6,8.

Aucune pré-incubation n'est nécessaire.

Le standard TIMP-1 (10 ng/μl) est dilué une fois par du laemmli.

Seule la dilution S2 est gardée pour la standard TIMP-2 (6 ng/μl).

Le tableau 4 en décrit la préparation.

➤ Préparation du dispositif et des gels

Le dispositif utilisé est le même que celui employé pour la zymographie et son montage est identique.

Le gel de séparation est un gel à 15 % d'acrylamide et a donc un pouvoir de séparation de molécules dont la taille est comprise entre 15 et 45 kDa.

La composition du gel est présentée en tableau 5.

Avant d'ajouter le SDS, l'APS et le TEMED, le mélange est vortexé, incubé 10 minutes à 37°C et incubé 10 minutes à température ambiante sous agitation.

De la même façon que pour la zymographie, le gel est coulé jusqu'à environ 1 cm du bord supérieur des plaques et 300 μl d'isobutanol sont ajoutés. On laisse le gel polymériser 30 minutes et on éponge l'isobutanol grâce à du papier filtre avant de rincer le montage à l'eau distillée.

Le gel de compression est un gel à 4,49 % d'acrylamide.

Sa composition est aussi donnée en tableau 5.

Le gel est coulé jusqu'au bord des plaques et les peignes sont placés de la même façon que pour la zymographie. Après 45 minutes, le dispositif est placé dans les cuves à électrophorèse et les peignes sont retirés.

La cuve est ensuite remplie de tampon de migration.

➤ Dépôt des échantillons et des standards

Cette étape est faite de la même façon que pour la zymographie si ce n'est que les échantillons sont déposés dans un puits sur deux afin de faciliter leur quantification ultérieure.

➤ Migration et récupération des gels

Ces étapes sont faites de façon identique à celles décrites pour la zymographie.

➤ **Incubation**

Après le rinçage au Triton X100, les gels sont placés dans du tampon d'incubation pendant 10 minutes à température ambiante puis mis à 37°C pendant 16 à 17 heures.

➤ **Coloration**

Après l'incubation, les gels sont rincés trois fois à l'eau distillée. Ils sont alors placés dans 50ml de colorant, du bleu de Coomassie G250 0,05 % dans une solution contenant 40 % de méthanol et 10 % d'acide acétique, sous agitation pendant 30 minutes, puis dans 50 ml de décolorant, dont la composition est la même que celui pour la zymographie, pendant 30 minutes. Le décolorant est ensuite remplacé et laissé pendant deux heures.

3.3.2. **Quantification de l'activité TIMP**

La quantification de l'activité TIMP se fait de la même façon que celle de l'activité MMP.

3.4. Détermination de la quantité d'isoprostanes

Le taux d'isoprostanes est augmenté par le stress oxydant. En effet, les isoprostanes sont produites par l'oxydation de phospholipides tissulaires par des formes réactives de l'oxygène.

La 8-isoprostane est donc utilisée comme marqueur de stress oxydant.

L'ELISA de compétition est employé pour déterminer la quantité d'isoprostanes de nos échantillons (kit EIA).

Dès que les échantillons sont décongelés, ils sont concentrés 5X grâce au SpeedVac.

Un kit ELISA 8-isoprostane (Cayman) est utilisé.

Il s'agit d'un ELISA de compétition entre la 8-isoprostane et la 8-isoprostane-acétylcholinestérase (8-isoprostane-AChE). L'AChE est le traceur.

La concentration de 8-isoprostane couplée au traceur est gardée constante. La quantité de 8-isoprostane couplée au traceur et liée à l'anti-sérum lui-même lié à la plaque de détection sera donc inversement proportionnelle à la concentration d'isoprostanes dans les échantillons.

Une fois la plaque incubée pendant 18 heures, celle-ci est lavée pour éliminer tout ce qui n'y est pas fixé. On ajoute ensuite le réactif d'Ellman dans les puits. Celui-ci contient le substrat de l'AChE et le produit de la réaction enzymatique a une couleur jaune. L'intensité de la couleur dans les puits sera donc directement proportionnelle à la quantité d'isoprostanes liées au traceur et inversement proportionnelle à la quantité d'isoprostanes présente dans l'échantillon.

On garde des puits pour les blancs qui ne contiennent que du réactif d'Ellman, les NSB (Non Specific Binding) qui mesurent l'absorbance des fixations non spécifiques, c'est-à-dire lorsque l'on n'ajoute pas d'antisérum, les TA (total activity), qui mesurent l'activité enzymatique totale de l'AChE, et les B₀ qui mesurent la quantité maximale de traceur que l'antisérum peut fixer en l'absence d'isoprostanes libres.

Les différentes étapes sont réalisées de la façon suivante :

Etapes	Réactif	Puits				
		Blanc	T.A.	NBS	B0	Standard/éch
Lavage de la plaque une fois par le tampon de lavage						
1. Addition des réactifs	Tampon EIA			100 µl	50 µl	
	Standard/éch					50 µl
	Traceur			50 µl	50 µl	50 µl
	Anticorps				50 µl	50 µl
2. Incubation	Incubation de la plaque 18h à température ambiante et à l'abri de la lumière					
3. Lavage	Lavage de la plaque 5X par le tampon de lavage					
4. Addition des réactifs	Traceur		5 µl			
	Ellman	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
5. Lecture	Lecture de la plaque à 405nm tous les quarts d'heure jusqu'à avoir une valeur de B0 entre 0,5 et 1,0.					

Remarque : éch = échantillon

Les standards et les solutions sont préparés selon les instructions du kit. Celles-ci sont données en annexe.

Deux puits sont utilisés par échantillon.

L'absorbance des blancs doit être d'environ 0,1 UA et cette valeur doit être soustraite à celles des autres puits.

Les résultats sont traités par un programme adapté, Ascent Software.

3.5. Cytologie du liquide synovial

L'examen cytologique permet de connaître la proportion de chaque type cellulaire présent dans le liquide synovial et d'ainsi pouvoir comparer les résultats aux normes.

Le Cytospin est une centrifugeuse qui projette de façon régulière l'échantillon de synovie sur des lames. La coloration des lames permet de différencier plus facilement les différents leucocytes.

3.5.1. *Le Cytospin*

Comme expliqué au point 3.1.2, les échantillons de synovie sont centrifugés, le surnageant aliquote et le culot remis en suspension par 300 µl de sérum physiologique.

La date et le nom de l'échantillon sont notés sur la lame qui est ensuite glissée dans un cytofunnel dans lequel on dépose 100 µl d'échantillon. Ceux-ci sont ensuite placés dans le Cytospin. Les échantillons sont centrifugés pendant 10 minutes à 1200 rpm (rotations par minutes).

Les lames sont alors retirées des cytofunnels et sont prêtes à être colorées.

3.5.2. Coloration des lames

La coloration des lames est effectuée au May Grünwald – Giemsa.

La lame est plongée dans un bain de May Grünwald pur pendant 4 à 5 minutes. Ensuite, pendant 2 minutes, on l'immerge dans de l'eau distillée avant de la placer pendant 7 minutes dans un bain de Giemsa dilué (200 ml d'eau distillée + 20 ml de Giemsa). La lame est alors rincée à l'eau neutre et séchée.

3.5.3. Comptage différentiel des cellules

Le comptage différentiel des cellules est réalisé à l'aide d'un microscope au grossissement 40X ou 100X. Le comptage est effectué manuellement, de façon régulière, il est nécessaire de compter au minimum 100 cellules et de refaire le comptage deux fois. Les proportions de chaque type cellulaire (basophiles, éosinophiles, monocytes, lymphocytes et neutrophiles) sont notées. De plus, un score de contamination par les globules rouges allant de 0 à 4 a été précisé pour toutes les lames.

4. Traitement statistique des données

L'analyse statistique est effectuée à l'aide du logiciel StatView.

Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse des scores de boiterie. Il s'agit d'un test non-paramétrique.

Toutes les valeurs d'activités MMP et TIMP ont été divisées par la valeur du standard dilution S5 présent sur le même gel que l'échantillon. Ces valeurs ont ensuite été analysées par une analyse de variance (ANOVA) et par une analyse de variance en mesures répétées.

Les valeurs d'activité MMP-2,-9 et TIMP-2 post-mortem ont été analysées par une ANOVA 2, en fonction du groupe et de l'articulation.

Les concentrations en isoprostanes ont été analysées par une ANOVA 1 (groupe 'A' versus groupe 'B'), tout comme les valeurs obtenues pour les frottis sanguins et pour la cytologie de la synovie.

Les corrélations entre la cytologie de la synovie et les activités gélatinolytiques des MMP-2 et -9 ont été analysées par régression simple.

Les variables non-paramétriques sont montrées sous forme de médianes avec leur minimum et maximum respectifs ; les variables paramétriques sont montrées sous forme de moyennes avec leurs écart-types. Le seuil de signification a été fixé à une valeur de $P < 0,05$.

RESULTATS

Résultats

1. Scores de boiteries

		AG	AD	PG	PD	TOTAUX
T0	A	0 (0-2)	0 (0-2)	1 (0-4)	1 (0-1)	2 (1-5)
	B	0 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-2)	1 (0-4)
T6	A	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	1 (0-2,5)
	B	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	1 (0-2)	2 (0-4)

Tableau 6 : Scores de boiteries réalisés sur les membres antérieurs gauche (AG) et droit (AD), les membres postérieurs gauche (PG) et droit (PD), avant (T0) et après l'administration pendant six semaines (T6) d'un complément 'A' à huit poneys et d'un complément 'B' à huit poneys. Les valeurs sont les médianes, minimum et maximum.

Un test de boiterie a été effectué sur chaque poney, avant et après les six semaines de complémentation. Les niveaux du test de boiterie sont compris entre 0 et 5. Le grade maximum pour le total des 4 membres est donc de 20.

Le tableau 6 reprend les médianes, les minima et les maxima des scores de boiteries, pour les groupes 'A' et 'B', avant (T0) et après la complémentation (T6), et ce pour chaque membre.

Avant la complémentation comme après, les scores ne sont pas significativement différents entre les deux groupes 'A' et 'B'. Pour les deux groupes, les scores n'ont pas non plus évolué de façon significative au cours du temps.

2. Frottis sanguins

	Htc (%)	G.R. (x10 ⁶)	G.B. (x10 ³)	Baso (%)	Éosino (%)	Mono (%)	Lympho (%)	Neutro (%)
A	38 ± 6	8,3 ± 3,2	11,4 ± 4,12	0,0 ± 0,0	1,6 ± 0,5	0,8 ± 0,8	36,4 ± 6,5	61,2 ± 6,9
B	35 ± 6	10,1 ± 4,1	10,1 ± 3,9	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,7	0,4 ± 0,5	33,6 ± 11,1	65,0 ± 10,7

Tableau 7 : Hématocrite (Htc), nombre de globules rouges (GR) par mm³ en millions, nombre de globules blancs (GB) par mm³ en milliers et pourcentage de basophiles (baso), éosinophiles (éosino), monocytes (mono), lymphocytes (lympho) et neutrophiles (neutro) dans le frottis sanguin obtenu après l'administration pendant six semaines d'un complément 'A' à huit poneys et d'un complément 'B' à huit poneys. Les valeurs sont des moyennes et leurs écarts-types.

Après six semaines de complémentation, une prise de sang sur tube EDTA a été effectuée.

Celle-ci nous a permis de nous renseigner sur l'hématocrite, le nombre d'érythrocytes et de leucocytes, et le pourcentage de basophiles, d'éosinophiles, de monocytes, de lymphocytes et de neutrophiles.

Le tableau 7 présente les résultats obtenus pour les deux groupes ; l'hématocrite, le nombre de globules rouges par mm³ exprimé en millions, le nombre de globules blancs par mm³ exprimé en milliers et le pourcentage de cellules sanguines.

Il n'existe aucune différence significative entre les groupes 'A' et 'B'.

3. Cytologie du liquide synovial

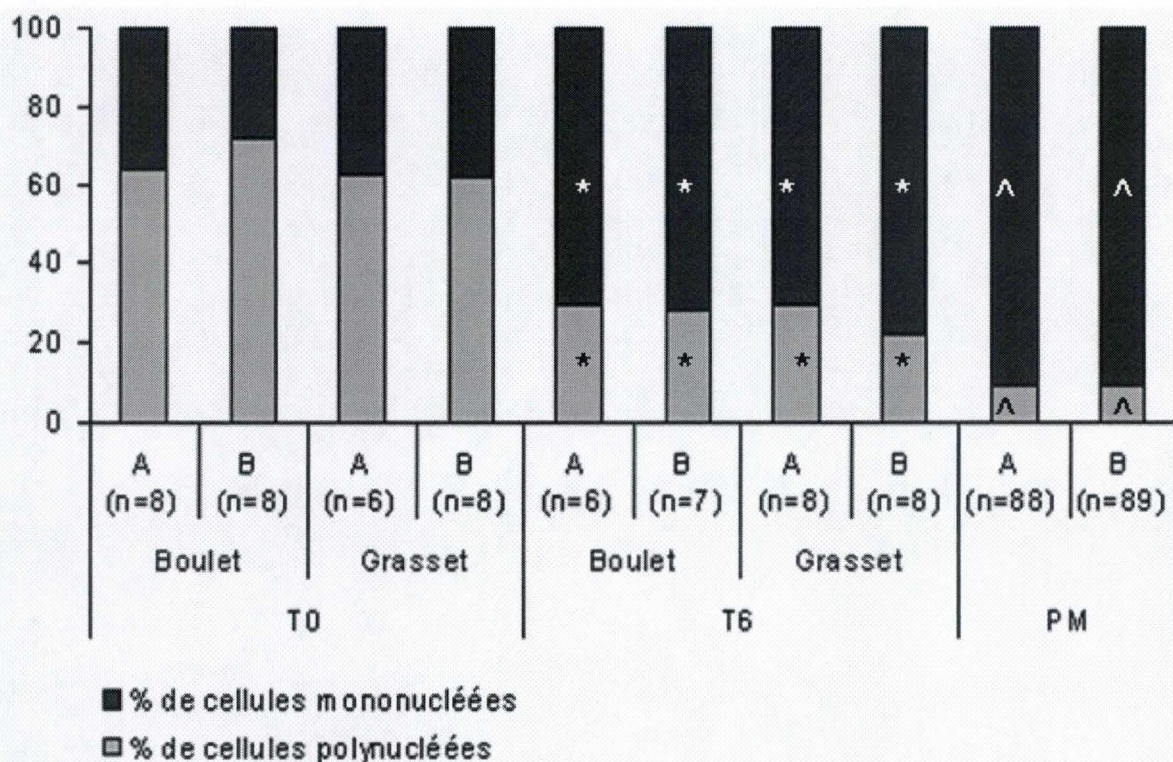


Figure 10 : Pourcentage de cellules polynucléées et mononucléées (%) dans le liquide synovial prélevé au niveau du boulet antérieur et du grasset avant (T0) et après l'administration pendant six semaines (T6) et post-mortem (PM) dans différentes articulations (boulets antérieurs et postérieurs, carpe, coude, tarse et grasset, gauches et droites) d'un complément 'A' à huit poneys et d'un complément 'B' à huit poneys.

* Significativement différent de la valeur respective en T0 ($P < 0,05$).

^ Significativement différent de la valeur respective en T0 et en T6 ($P < 0,05$).

Un comptage différentiel des cellules polynucléées et mononucléées a été réalisé sur la synovie prélevée dans le boulet antérieur et le grasset avant et après l'administration d'un complément 'A' à huit poneys et d'un complément 'B' à huit poneys et sur la synovie prélevée post-mortem sur différentes articulations (boulets antérieurs et postérieurs, carpes, coudes, torses et grassets, gauches et droites). Aucune différence significative n'existe entre les mêmes articulations gauches et droites. Celles-ci ont donc pu être regroupées.

La figure 10 montre le pourcentage des cellules polynucléées et mononucléées obtenu dans la synovie à T0, à T6 et post-mortem.

Les moyennes des groupes 'A' et 'B' ne sont pas significativement différentes.

Les moyennes de T6 sont significativement différentes des valeurs respectives en T0 ($P < 0,05$).

Les moyennes post-mortem sont significativement différentes des valeurs respectives en T0 et en T6 ($P < 0,05$).

4. Contamination de la synovie par les globules rouges

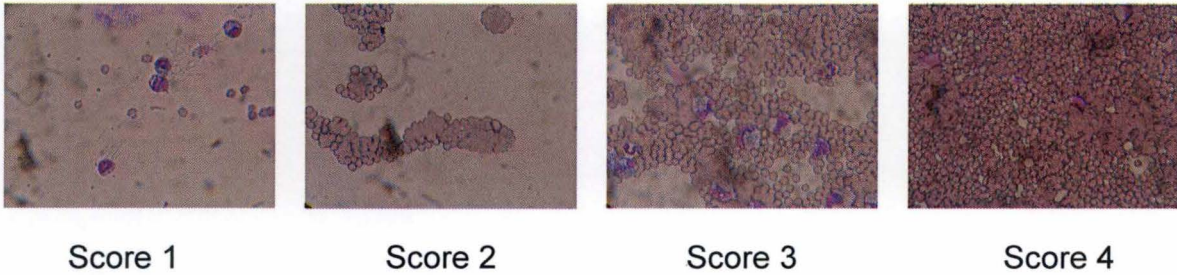


Figure 11 : Exemple de scores de contamination par des globules rouges (GR) dans la synovie. Les scores sont compris entre 0 et 4 ; le score 0 (absence de GR) n'est pas représenté.

Pour chaque lame de cytologie de la synovie, un score de contamination par les globules rouges a été réalisé. Ce score est compris entre 0 et 4 ; 0 indiquant l'absence de globules rouges et 4 indiquant une présence massive de globules rouges.

La figure 11 montre des exemples de scores de contamination par les globules rouges dans la synovie.

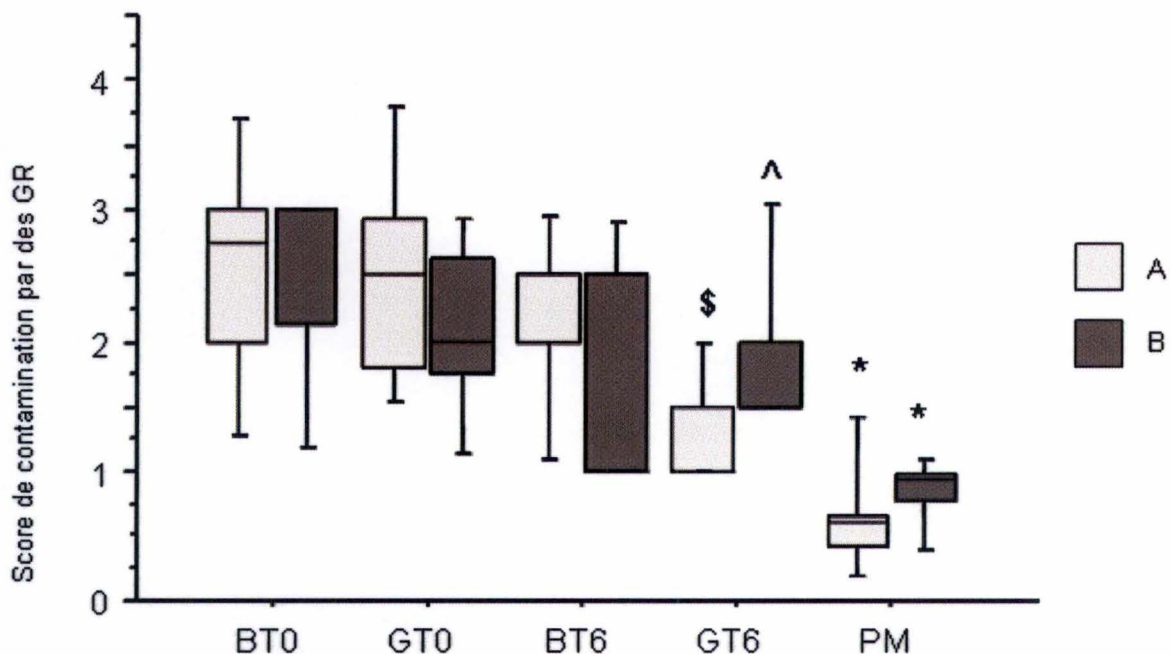


Figure 12 : Score de contamination par les globules rouges (GR) de la synovie dans le boulet (B) ou dans le grasset (G) avant (T0), après l'administration pendant six semaines (T6) d'un complément 'A' à huit poneys et d'un complément 'B' à huit poneys et post-mortem (PM) dans plusieurs articulations (boulets antérieurs et postérieurs, carpes, coudes, tarses et grassets, gauches et droits). Les résultats sont présentés sous forme de scores allant de 0 (absence de GR) à 4 (présence massive de GR). La ligne dans chaque boîte représente la médiane, les lignes inférieures et supérieures de la boîte représentent respectivement les 25 et 75 percentiles et les tirets inférieurs et supérieurs de la boîte représentent respectivement les 10 et 90 percentiles.

* Significativement différent des valeurs respectives mesurées à T0 et à T6 ($P < 0,05$).

^ Significativement différent de la valeur respective du groupe 'A' ($P < 0,05$).

\$ Significativement différent de la valeur respective en T0 ($P < 0,05$).

La figure 12 représente ces scores sous forme de boîtes dont la ligne dans la boîte représente la médiane, les lignes inférieures et supérieures représentent respectivement les 25 et 75 percentiles et dont les tirets inférieurs et supérieurs représentent respectivement les 10 et 90 percentiles.

Aucune différence significative n'a été montrée entre les groupes 'A' et 'B', excepté pour les valeurs du grasset en T6 ($P < 0,05$). Cette dernière est, pour le groupe 'A', significativement différente de sa valeur respective en T0 ($P < 0,05$).

Les valeurs post-mortem, reprenant le total des scores obtenus pour les boulets antérieurs et postérieurs, les carpes, les coudes, les torses et les grassets gauches et droits, sont significativement inférieures aux valeurs respectives en T0 et en T6, pour les groupes 'A' et 'B' ($P < 0,05$).

5. Activité gélatinolytique de la MMP-2

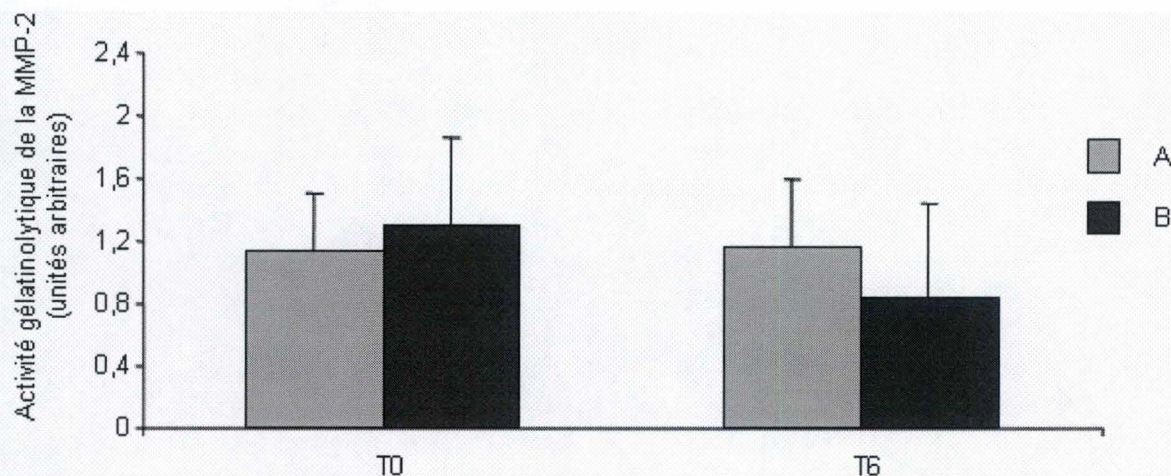


Figure 13a

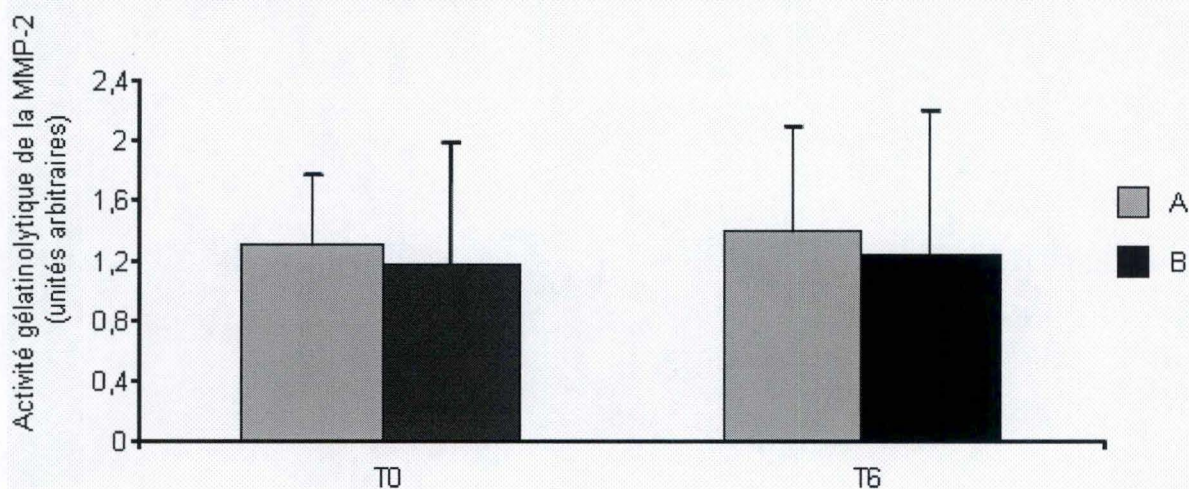


Figure 13b

Figure 13 : Activité gélatinolytique de la MMP-2 (unités arbitraires) dans la synovie prélevée au niveau du boulet antérieur (figure 13a) et au niveau du grasset (figure 13b) avant (T0) et après l'administration pendant six semaines (T6) d'un complément 'A' à huit poneys et d'un complément 'B' à huit poneys.

Les valeurs sont des moyennes accompagnées des écarts-types.

Une mesure de l'activité gélatinolytique de la MMP-2 a été réalisée par zymographie, avant (T0) et après (T6) l'administration pendant six semaines d'un complément 'A' à huit poneys et d'un complément 'B' à huit poneys.

Les figures 13a et 13b présentent les moyennes de ces activités dans les boulets antérieurs et dans les grassets à T0 et à T6.

Les moyennes ne sont pas significativement différentes entre les groupes 'A' et 'B', à T0 et à T6, pour les boulets antérieurs et les grassets.

Les différences entre les moyennes ne sont pas non plus significatives entre T0 et T6, qu'il s'agisse du groupe 'A' ou du groupe 'B' et ce, dans les boulets antérieurs ou dans les grassets.

6. Activité gélatinolytique de la MMP-9

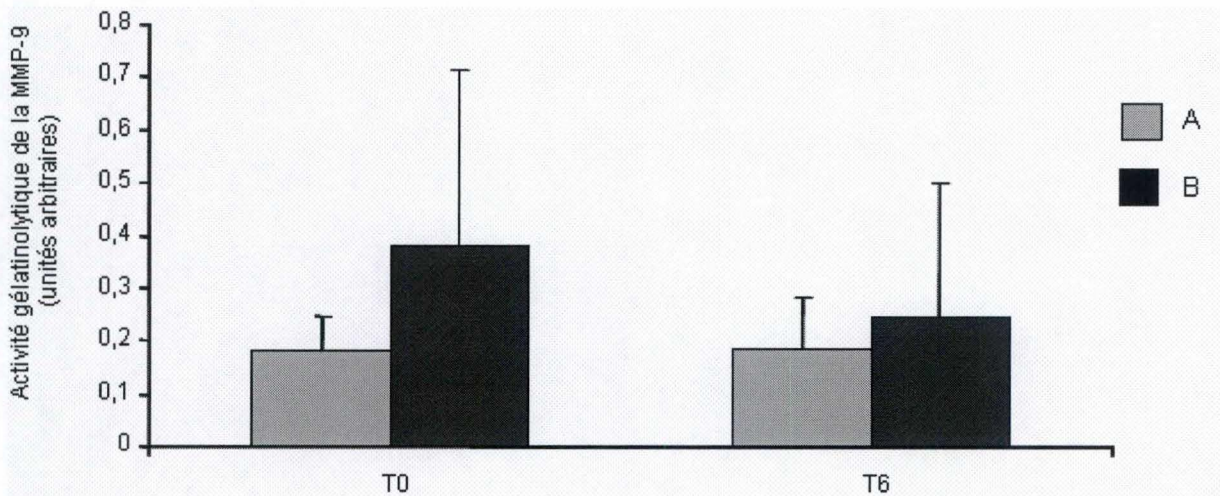


Figure 14a

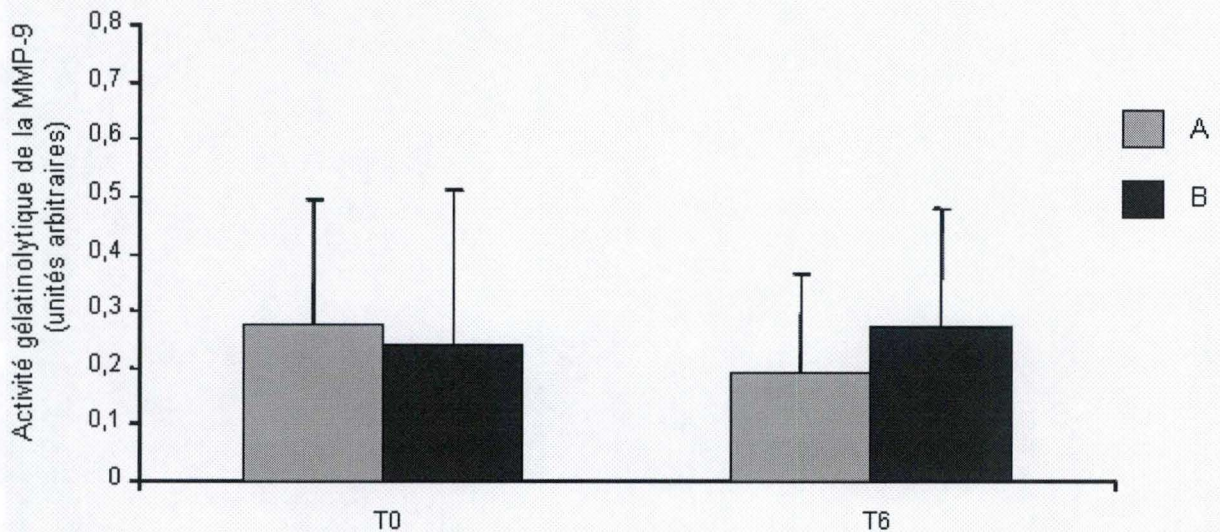


Figure 14b

Figure 14 : Activité gélatinolytique de la MMP-9 (unités arbitraires) dans la synovie prélevée au niveau du boulet antérieur (figure 14a) et au niveau du grasset (figure 14b) avant (T0) et après l'administration pendant six semaines (T6) d'un complément 'A' à huit poneys et d'un complément 'B' à huit poneys.

Les valeurs sont des moyennes accompagnées des écarts-types.

Une mesure de l'activité gélatinolytique de la MMP-9 a été réalisée par zymographie, avant (T0) et après (T6) l'administration pendant six semaines d'un complément 'A' à huit poneys et d'un complément 'B' à huit poneys.

Les figures 14a et 14b présentent les moyennes de ces activités dans les boulets antérieurs et dans les grassets à T0 et à T6.

Les moyennes ne sont pas significativement différentes entre les groupes 'A' et 'B', ni à T0, ni à T6, et ce, pour les boulets antérieurs et pour les grassets.

Les moyennes ne sont pas non plus significativement différentes entre T0 et T6 pour les groupes 'A' et 'B', dans les boulets antérieurs et dans les grassets.

7. Activité inhibitrice de la TIMP-2

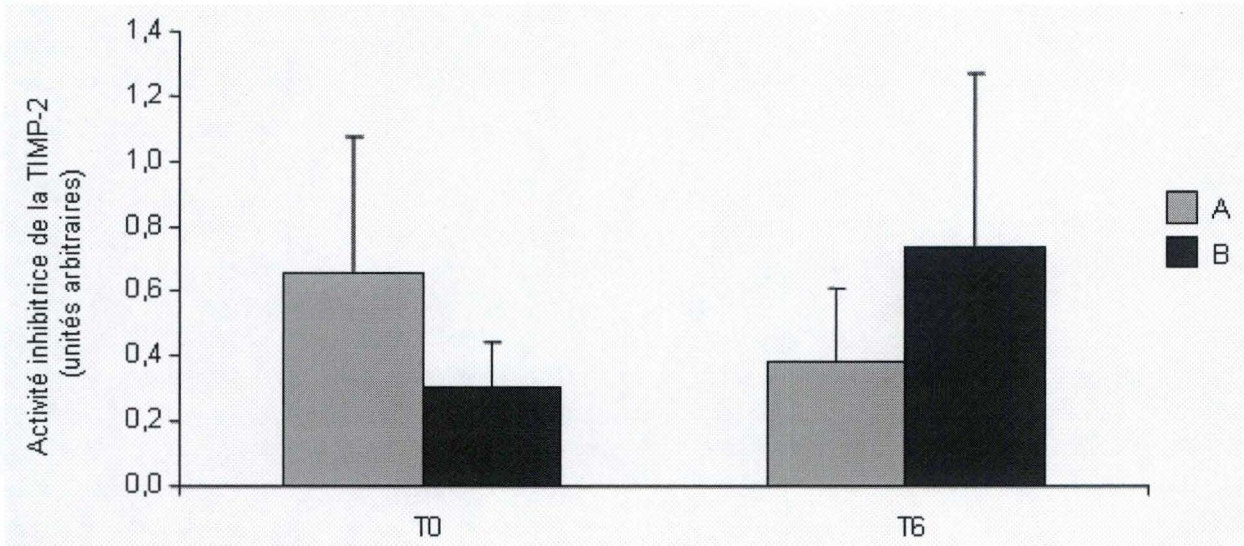


Figure 15a

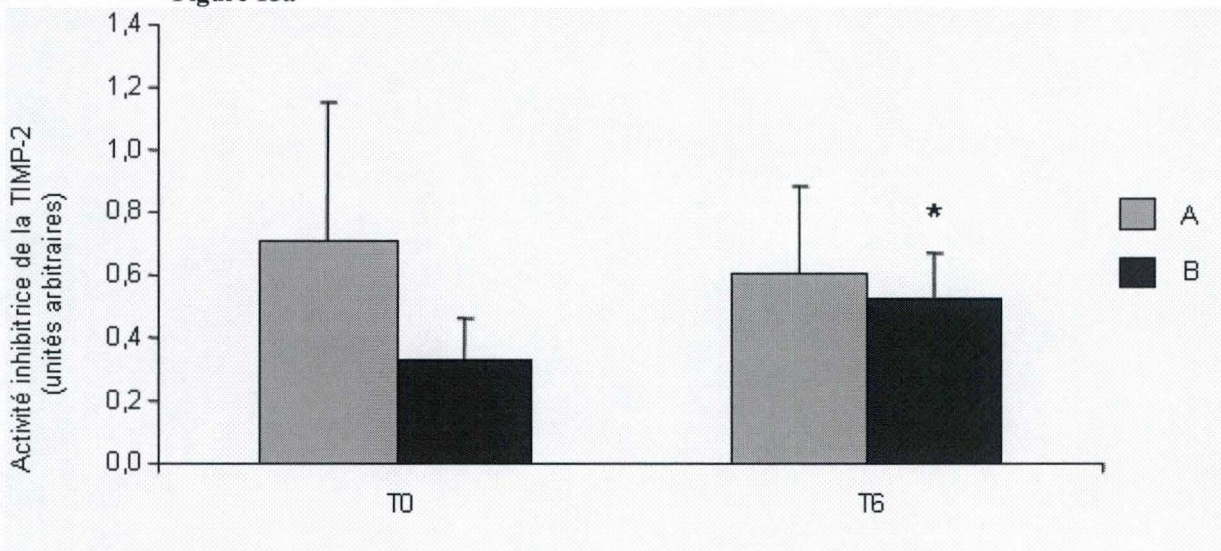


Figure 15b

Figure 15 : Activité inhibitrice de la TIMP-2 dans la synovie prélevée au niveau du boulet antérieur (figure 15a) et du grasset (figure 15b) avant (T0) et après l'administration pendant six semaines (T6) d'un complément 'A' à huit poneys et d'un complément 'B' à huit poneys.

Les valeurs sont des moyennes accompagnées des écarts-types.

* Significativement différent de sa valeur respective en T0 ($P < 0,05$).

Une mesure de l'activité inhibitrice de la TIMP-2 a été réalisée par zymographie inverse, avant (T0) et après (T6) l'administration pendant six semaines d'un complément 'A' à huit poneys et d'un complément 'B' à huit poneys.

Les figures 15a et 15b présentent les moyennes de ces activités dans les boulets antérieurs et dans les grassetts à T0 et à T6.

Les différences entre les moyennes de T0 et de T6 ne sont pas significativement différentes, excepté pour les moyennes de grasset chez les chevaux B, où la moyenne en T6 est significativement supérieure à celle de T0 ($P < 0,05$).

8. Activités MMP-2, MMP-9 et TIMP-2 en %

Dans le but de réduire éventuellement la variabilité des résultats, l'activité gélatinolytique des MMP-2 et -9 et l'activité inhibitrice de la TIMP-2 ont aussi été analysées sous formes de pourcentages, l'activité T0 valant 100%.

Aucune différence significative entre les groupes ou entre T0 et T6 n'a pu être montrée pour les activités gélatinolytiques des MMP-2 et -9.

En ce qui concerne l'activité inhibitrice de la TIMP-2, une différence significative entre les valeurs des groupes 'A' et 'B' en grasset T6 a pu être montrée ($P < 0,05$). En effet, la valeur de A est significativement inférieure à celle de B avec respectivement $89,01 \pm 36,57$ et $174,08 \pm 56,67$.

Chez les chevaux 'A', la moyenne du boulet antérieur en T6 est significativement inférieure à celle de T0, avec $64,04 \pm 24,74$ contre 100 ± 0 .

Chez les chevaux 'B', la moyenne du grasset en T6 est significativement supérieure à celle du grasset en T0, avec $174,08 \pm 56,67$ contre 100 ± 0 .

9. Comparaison T6- Post-mortem

		MMP-2		MMP-9		TIMP-2	
		A	B	A	B	A	B
T6	B.A. T6	1,17 ±	0,85 ±	0,18 ±	0,25 ±	0,38 ±	0,74 ±
		0,43	0,61	0,10	0,25	0,23	0,53
	Grasset T6	1,39 ±	1,23 ±	0,19 ±	0,27 ±	0,51 ±	0,53 ±
		0,70	0,97	0,18	0,21	0,13	0,15
PM	B.A.	1,06 ±	0,78 ±	0,08 ±	0,18 ±	0,55 ± *	1,11 ±
		0,48	0,33	0,06	0,15	0,29	1,07
	Carpe	1,33 ±	0,80 ±	0,15 ±	0,19 ±	1,04 ± *	0,88 ±
		0,42	0,35	0,07	0,12	0,64	0,74
	Coude	1,51 ±	1,11 ±	0,12 ±	0,18 ±	0,91 ± *	0,89 ±
		0,56	0,26	0,08	0,17	0,53	0,45 #
	B.P.	1,08 ±	0,84 ±	0,08 ±	0,24 ±	0,84 ± *	0,64 ±
		0,46	0,28	0,04	0,14	0,35 #	0,34
	Tarse	1,79 ±	1,17 ±	0,12 ±	0,25 ±	0,80 ±	1,02 ±
		1,13	0,41	0,09	0,16	0,36	0,52 #
	Grasset	1,48 ±	1,04 ±	0,11 ±	0,16 ±	0,46 ±	0,77 ±
		0,39	0,59	0,09	0,04	0,16	0,34

Tableau 8 : Activités MMP-2, MMP-9 et TIMP-2 (unités arbitraires) dans la synovie prélevée dans les boulets antérieurs (B.A.) et dans les grassetts après l'administration pendant six semaines (T6) d'un complément 'A' à huit poneys et d'un complément 'B' à huit poneys et dans la synovie prélevée post-mortem (PM) dans différentes articulations (boulets antérieurs et postérieurs (B.P.), carpe, coude, tarse et grassetts, gauches et droits regroupés).

En post-mortem, l'ensemble des activités MMP-2 et MMP-9 de toutes les articulations chez les chevaux 'A' est significativement différent de celui des chevaux 'B'.

Les différences significatives entre les articulations post-mortem ne sont pas indiquées dans le tableau.

* Significativement différent de sa valeur respective en B.A. en T6.

Significativement différent de sa valeur respective en grasset en T6.

L'activité gélatinolytique de la MMP-2 et de la MMP-9 et l'activité inhibitrice de la TIMP-2 dans la synovie prélevée dans le boulet antérieur et dans le grasset après l'administration pendant six semaines d'un complément 'A' à huit poneys et d'un complément 'B' à huit poneys ont été comparées à celles de la synovie prélevée post-mortem dans différentes articulations (boulets antérieurs et postérieurs, carpes, coudes, torses et grassetts, gauches et droits). La différence entre les valeurs d'une même articulation à gauche et à droite n'étant pas significative, les données ont été rassemblées par articulation.

Le tableau 8 reprend les moyennes et les écarts-types de ces activités à T6 et en post-mortem.

Pour l'activité gélatinolytique de la MMP-2, un effet significatif du traitement a été montré, les valeurs du groupe 'A' étant significativement plus élevées que celles du groupe 'B' ($P < 0,05$). Post-mortem, seule la moyenne du carpe post-mortem est significativement plus élevée dans le groupe 'A' que dans le groupe 'B' ($P < 0,05$).

En ce qui concerne l'activité gélatinolytique de la MMP-9, un effet significatif du traitement a été détecté, les valeurs de 'A' sont significativement inférieures à celles de 'B' ($P < 0,005$). Post-mortem, pour les différentes articulations, une seule différence significative a été montrée entre les chevaux 'A' et 'B', il s'agit du boulet postérieur post-mortem, la moyenne du groupe 'A' étant significativement inférieure à celle du groupe 'B' ($P < 0,05$).

De plus, les valeurs globales en T6 sont significativement supérieures aux valeurs post-mortem ($P < 0,05$).

Enfin, pour l'activité inhibitrice de la TIMP-2, aucune différence significative entre les groupes 'A' et 'B' n'a été détectée. Par contre, les valeurs de T6 sont significativement inférieures aux valeurs post-mortem ($P < 0,005$).

Chez les chevaux 'A', la moyenne du boulet antérieur en T6 est significativement inférieure à celle du carpe, du coude, du boulet postérieur et du tarse en post-mortem ($P < 0,05$). La différence entre les moyennes du grasset en T6 et du boulet postérieur en post-mortem est significative ($P < 0,05$).

Chez les chevaux 'B', la moyenne du grasset en T6 est significativement différente de celle du coude et du tarse en post-mortem ($P < 0,05$).

10. Comparaison T0- post-mortem

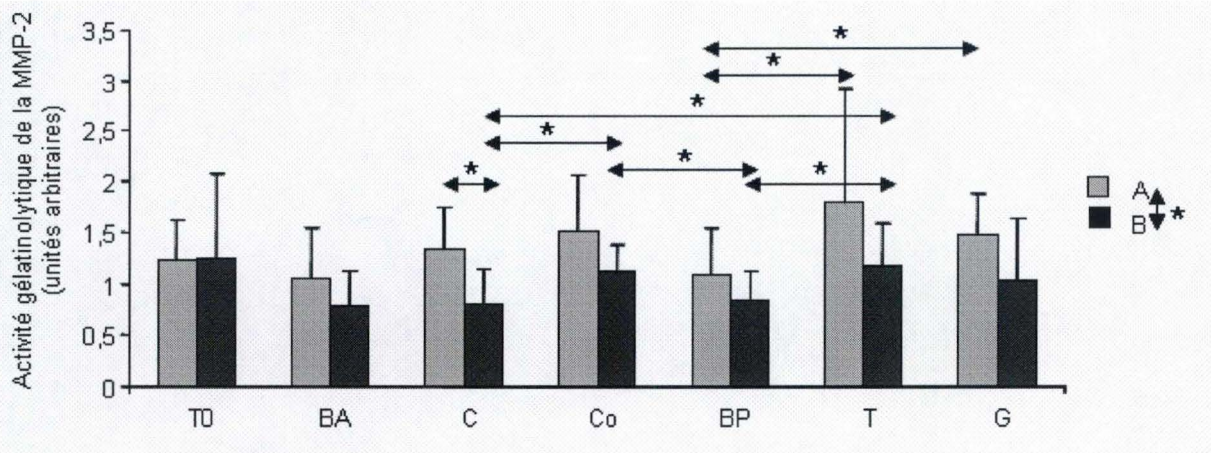


Figure 16a

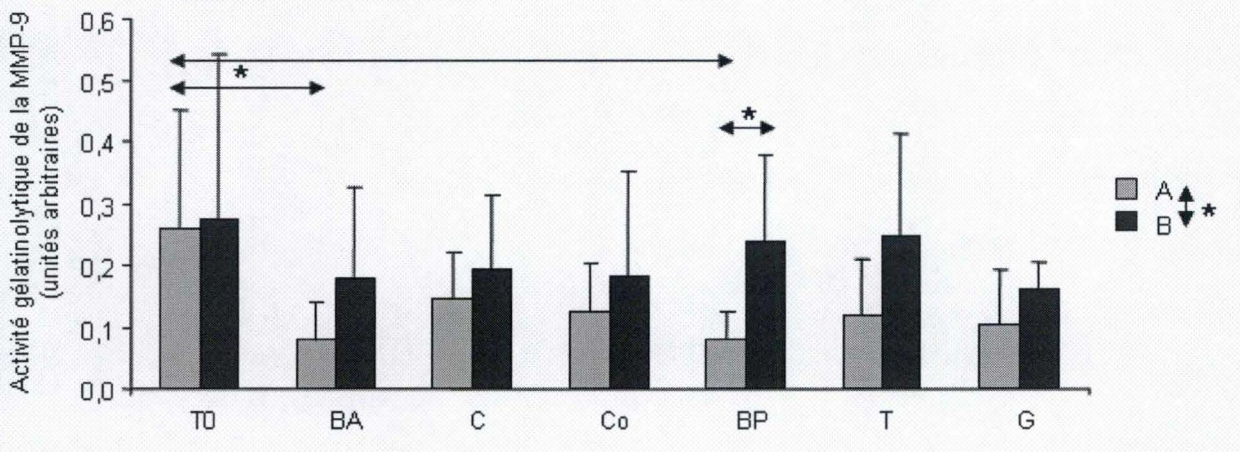


Figure 16b

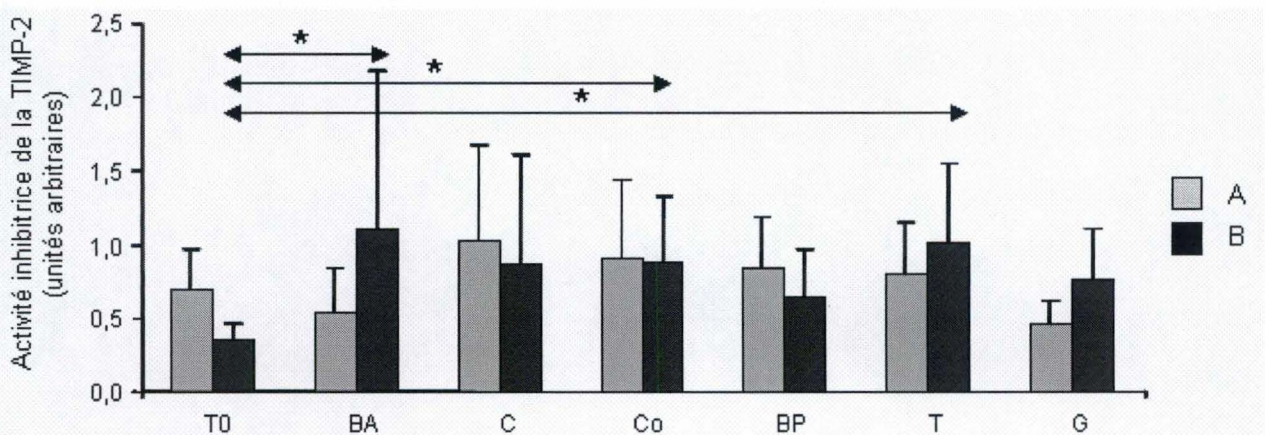


Figure 16c

Figure 16 : Activité gélatinolytique de la MMP-2 (figure 16a) et de la MMP-9 (figure 16b) et activité inhibitrice de la TIMP-2 (figure 16c) dans la synovie prélevée avant (T0) l'administration pendant six semaines d'un complément 'A' à huit poneys et d'un complément 'B' à huit poneys et post-mortem dans différentes articulations (boulet antérieur (BA), carpe (C), coude (Co), boulet postérieur (BP), tarse (T) et grasset (G)).

* Valeurs significativement différentes ($P < 0,05$).

L'activité gélatinolytique de la MMP-2 et de la MMP-9 et l'activité inhibitrice de la TIMP-2 dans la synovie prélevée dans le boulet antérieur et dans le grasset avant l'administration pendant six semaines d'un complément 'A' à huit poneys et d'un complément 'B' à huit poneys ont été comparées à celles de la synovie prélevée post-mortem dans différentes articulations (boulets antérieurs et postérieurs, carpes, coudes, tarses et grassets, gauches et droites).

Les figures 16a, 16b et 16c présentent les moyennes et les écarts-types de ces activités.

Pour l'activité gélatinolytique de la MMP-2, une ANOVA 2 a révélé un effet du traitement et un effet articulation. L'interaction entre ces deux facteurs n'est pas significative. Des ANOVA 1 ont ensuite été réalisées et ont révélé une différence significative entre les moyennes des chevaux 'A' et 'B' pour le carpe post-mortem ($P < 0,05$).

Elles ont aussi révélé que, chez les chevaux 'A', post-mortem, la moyenne du boulet postérieur est significativement différente de celle du tarse et du grasset ($P < 0,05$).

De plus, chez les chevaux 'B', les moyennes du carpe et du boulet postérieur sont significativement différentes de celles du coude et du tarse ($P < 0,05$).

Pour l'activité gélatinolytique de la MMP-9, l'ANOVA 2 a révélé un effet du traitement mais pas d'effet articulation. Les ANOVA 1 réalisées ensuite ont montré que la différence entre les moyennes du boulet postérieur post-mortem des groupes 'A' et 'B' est significative ($P < 0,05$).

Chez les chevaux 'A', la moyenne de T0 (boulets antérieurs et grassets confondus) est significativement différente de celles du boulet antérieur et du boulet postérieur.

En ce qui concerne l'activité inhibitrice de la TIMP-2, aucun effet global du traitement ou des articulations n'a été mis en évidence par ANOVA 2.

Seul le groupe 'B' a montré des différences significatives entre les valeurs obtenues en T0 et en post-mortem. La moyenne de T0 est significativement différente de celle du boulet antérieur, du coude et du tarse post-mortem.

11. Corrélations cytologie – Activités gélatinolytiques

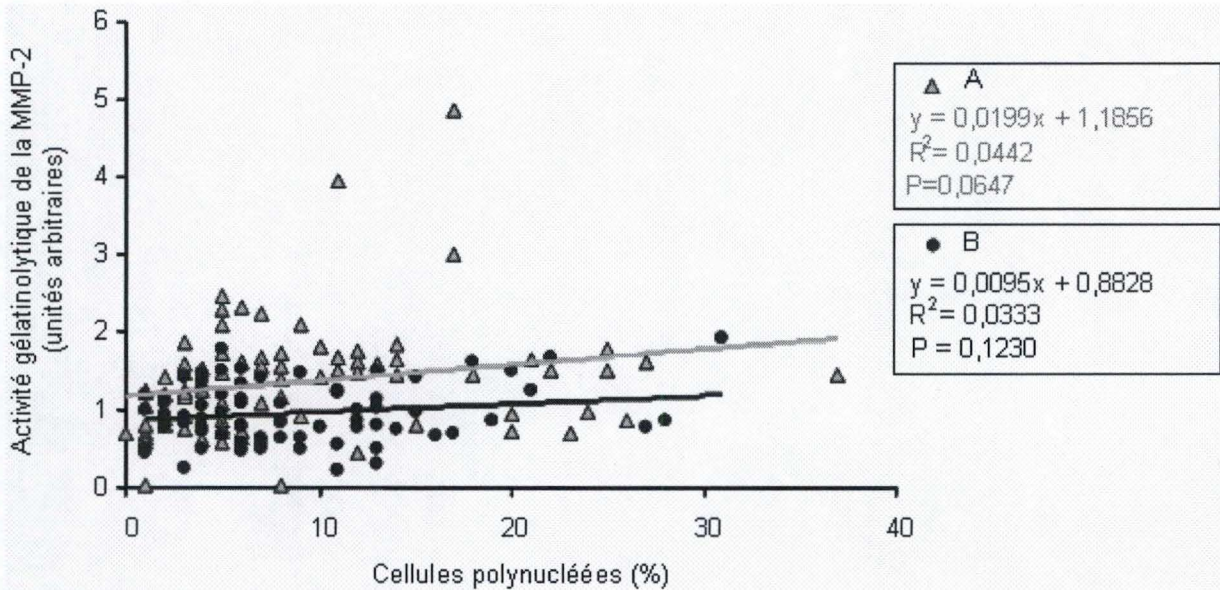


Figure 17a

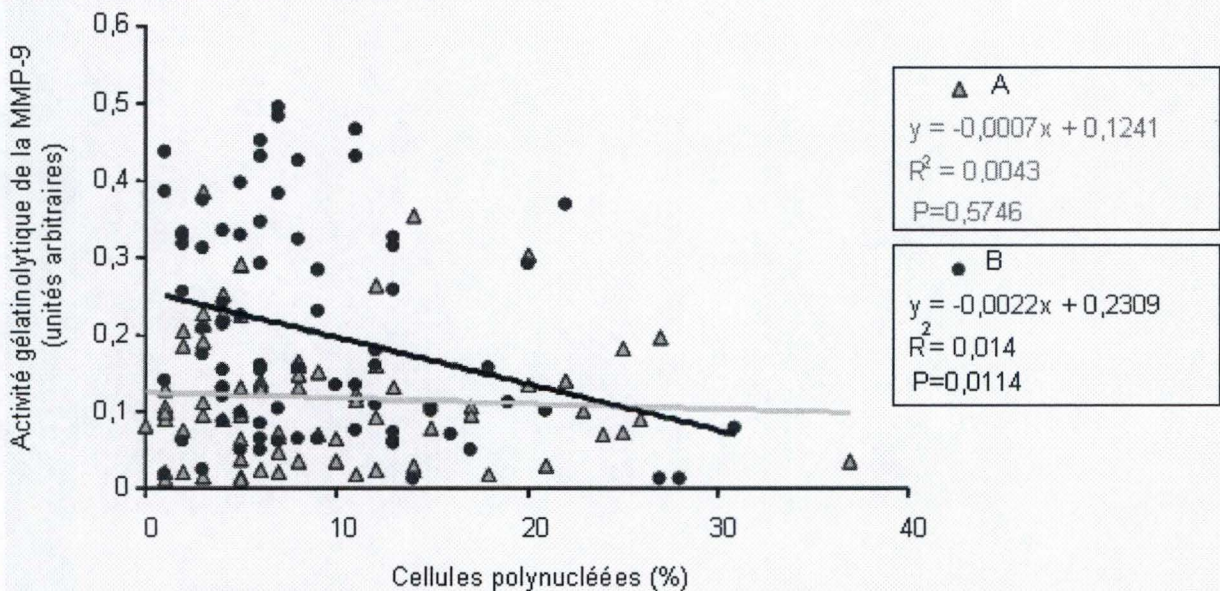


Figure 17b

Figure 17 : Corrélation entre le pourcentage de cellules polynucléées et l'activité gélatinolytique de la MMP-2 (figure 17a) et de la MMP-9 (figure 17b) dans la synovie prélevée post-mortem dans différentes articulations (boulet antérieur et postérieur, carpe, coude, tarse et grasset, gauches et droits) après l'administration pendant six semaines d'un complément 'A' à huit poneys et d'un complément 'B' à huit poneys.

La corrélation entre le pourcentage de cellules polynucléées et l'activité gélatinolytique des MMP-2 et -9 dans la synovie prélevée en post-mortem a été analysée au moyen d'une régression linéaire.

Les figures 17a et 17b présentent ces corrélations pour les chevaux 'A' et 'B'. Une courbe de tendance, l'équation de cette droite, le coefficient de détermination R^2 et la valeur de P sont affichés.

La corrélation entre le pourcentage de cellules polynucléées et l'activité gélatinolytique de la MMP-2 est positive pour les chevaux 'A' et 'B' rassemblés ($P < 0,05$) avec un R de 0,1924 et un R^2 de 0,037.

La corrélation entre le pourcentage de cellules polynucléées et l'activité gélatinolytique de la MMP-9 est négative pour les chevaux 'A' et 'B' rassemblés avec un R de -0,1844 et un R^2 de 0,034. Cette corrélation est aussi significative pour les chevaux 'B' seuls ($P < 0,05$).

Ces corrélations ont aussi été mesurées en T0 et en T6. Aucune corrélation significative n'a pu être détectée.

12. Concentration en isoprostanes dans le liquide synovial

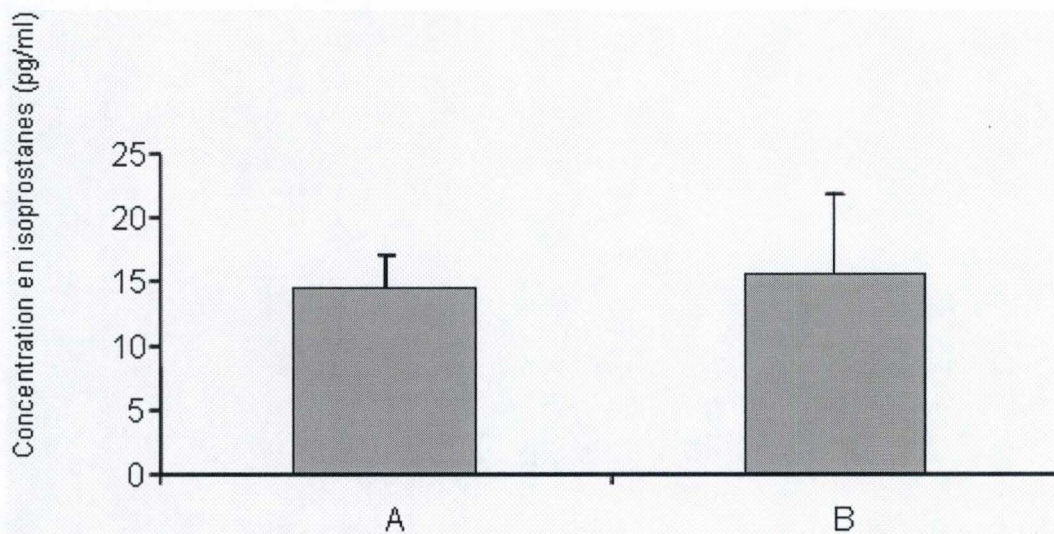


Figure 18 : Concentration en isoprostanes (pg/ml) dans la synovie prélevée post-mortem dans le carpe droit après l'administration d'un complément 'A' à huit poneys et d'un complément 'B' à huit poneys. Les valeurs sont des moyennes accompagnées des écarts-types.

Une mesure de la concentration en isoprostanes a été effectuée dans la synovie prélevée post-mortem dans le carpe droit de chaque poney.

La figure 18 présente ces concentrations pour les groupes 'A' et 'B'.

Aucune différence significative n'a pu être détectée entre les deux groupes.

DISCUSSION

Discussion

L'objectif de ce mémoire est de tester l'effet d'un complément alimentaire à base de glucosamine, de chondroïtine sulfate et d'harpagophytum sur le stress enzymatique articulaire chez le cheval sain au repos.

Pour cela, différents tests ont été effectués avant (T0) et après six semaines de complémentation (T6) sur huit poneys ayant reçu le complément, le groupe 'A' et de huit poneys ayant reçu le placebo, le groupe 'B'.

Un examen général a été réalisé sur chaque poney à T0 et à T6. Dans la synovie, l'activité gélatinolytique de métalloprotéinases de matrice, les gélatinases, ainsi que celle des inhibiteurs tissulaires, les TIMP, a été mesurée. Ces mesures ont aussi été réalisées sur la synovie prélevée post-mortem. De plus, un marqueur de stress oxydant, les isoprostanes, a été quantifié.

Dans cette discussion, les scores de boiteries seront abordés, suivis par les résultats obtenus pour la cytologie du liquide synovial et pour l'activité gélatinolytique. Enfin, les résultats obtenus pour les isoprostanes seront discutés.

Avant que la complémentation ne commence, les poneys ont subi un examen général qui comprenait un examen orthopédique. Cet examen nous a permis d'attribuer des scores de boiteries pour chaque membre de chaque poney. Ces résultats nous ont confirmé que les poneys étaient exempts de pathologies articulaires sévères.

Après la complémentation de six semaines, cet examen a été renouvelé. Aucune amélioration n'a pu être montrée par rapport aux résultats obtenus avant la complémentation, ce qui ne semble pas particulièrement étonnant puisque les chevaux étaient déjà cliniquement sains. Le fait que les chevaux soient au repos implique aussi que les résultats soient moins flagrants entre les deux groupes. On peut imaginer que, si l'étude s'était déroulée sur des chevaux soumis à un exercice régulier et intense, tel que c'est le cas pour les chevaux de course auxquels le complément est destiné, un éventuel effet bénéfique sur la locomotion aurait pu être mis en évidence. En effet, une étude récente menée par Forsyth *et al.* a montré qu'un complément oral de glucosamine et de chondroïtine sulfate améliorait significativement la longueur des foulées et l'envergure des mouvements des chevaux adultes après huit semaines de traitement. Cette étude a été effectuée pendant 12 semaines sur 15 chevaux complémentés et cinq chevaux recevant un placebo. Les chevaux étaient âgés de 15 à 35 ans (Forsyth *et al.*, 2006). L'âge avancé des chevaux pourrait constituer un élément d'explication dans l'effet plus marqué du complément sur les boiteries chez Forsyth que dans notre étude.

Les examens orthopédiques nous ont confirmé que les chevaux ne présentaient pas de pathologies articulaires graves, suggérant qu'ils étaient cliniquement sains. Cependant, les résultats obtenus pour la cytologie de la synovie prélevée *in vivo* avant la complémentation (T0) correspondent approximativement à ceux que l'on trouve en conditions pathologiques. En effet, lors d'une inflammation articulaire, la proportion de cellules polynucléées est supérieure à 70%, donc des valeurs proches de nos observations à T0.

Après la complémentation (T6), la proportion de cellules polynucléées est plus faible mais est toujours supérieure au pourcentage accepté pour une articulation saine qui est de 25 (Amouroux, 1998). En ce qui concerne les résultats obtenus pour la synovie prélevée post-mortem, la proportion de cellules polynucléées est inférieure à 10, correspondant à une articulation saine.

Une contamination par le sang lors de la ponction articulaire pourrait expliquer ces résultats aberrants. En effet, lors d'une contamination de la synovie par le sang, la proportion de neutrophiles est fortement augmentée car cette dernière est de 40 à 75% des leucocytes dans le sang.

De plus, l'effet investigateur ne semble pas avoir joué un rôle dans ces résultats ; tout a été fait pour que celui-ci soit le plus faible possible. Pour cela, la lecture des lames a été réalisée « en aveugle », les lames issues du début de la complémentation (T0) ont été alternées avec celles d'après la complémentation (T6) et une contre-lecture partielle par une autre personne a été réalisée.

Ainsi, qu'il s'agisse du groupe 'A' complémenté ou du groupe 'B' ayant reçu un placebo, les résultats obtenus pour la cytologie de la synovie semblent essentiellement attribuables à une contamination sanguine qui est élevée lors d'un prélèvement réalisé *in vivo*.

La caractéristique commune des pathologies articulaires est la dégradation de la matrice extracellulaire. Parallèlement, une augmentation de l'activité des MMP est observée (Brama *et al.*, 2000). Chez les chevaux, une étude menée par Clegg a permis de montrer que les MMP-2 et -9 étaient les principales enzymes protéolytiques impliquées dans les pathologies articulaires (Clegg *et al.*, 1997b).

Rappelons que, à notre connaissance, notre étude est la première à investiguer l'effet d'une complémentation *in vivo* par des tests cliniques mais aussi biochimiques *in vivo* et post-mortem.

L'étude des métalloprotéinases et de leur inhibiteurs a été effectuée sur de la synovie. Celle-ci a été prélevée avant la complémentation (T0) et après la complémentation (T6) sur un boulet antérieur et un grasset et post-mortem sur 12 articulations.

Signalons tout d'abord l'importante variabilité intra-groupe, malgré la standardisation maximale au niveau de l'âge, du sexe et de la taille des poneys entre les deux groupes et malgré le coefficient de variation de la technique de zymographie, qui est inférieur à 5 %.

Aucun effet temps ou traitement n'a été détecté pour les résultats en T0 et en T6. Pour respecter le bien-être animal, seules deux ponctions articulaires ont été réalisées *in vivo*, une fois à T0 et une autre à T6. Le peu de prélèvements effectués *in vivo* pourrait expliquer en partie ces résultats qui diffèrent de ceux obtenus en post-mortem. Cette faible quantité de données pourrait aussi prendre part dans nos autres résultats obtenus pour T0 et T6 et notamment l'augmentation significative de la TIMP-2 de T0 à T6 pour les grassets des chevaux du groupe 'B', c'est-à-dire ceux qui ont reçu le placebo ou encore les différences significatives obtenues pour la TIMP-2 entre les résultats en T6 et en post-mortem.

Signalons aussi que nous n'avons pas pu détecter la TIMP-1 par zymographie inverse. L'article de Snoek-van Beurden explique que la zymographie inverse où la MMP-2 est incorporée au gel n'est pas la plus recommandée pour détecter des TIMP autres que la TIMP-2, étant donné la faible mobilité électrophorétique de, par exemple, la TIMP-1 (Snoek-van Beurden *and* Von den Hoff, 2005).

Les résultats obtenus en post-mortem pour la MMP-2 nous montrent une activité gélatinolytique supérieure dans le groupe 'A', complémenté, que dans le groupe 'B'. Ces activités ne sont pas significativement supérieures à celles obtenues pour T0, mais, comme signalé précédemment, il est difficile de comparer de si faibles quantités de données. Dans la littérature, aucune étude ne mentionne une augmentation de la MMP-2 par un traitement à la glucosamine ou au chondroïtine sulfate mais plusieurs auteurs signalent ne pas avoir détecté, *in vitro*, de diminution de l'activité gélatinolytique de la MMP-2 (Orth *et al.*, 2002 ; Mello *et al.*, 2001).

En ce qui concerne l'activité de la MMP-9, même si seules les différences d'activité gélatinolytique de deux articulations sont significatives entre T0 et post-mortem, l'analyse de variance rend compte que la moyenne de l'activité de la MMP-9 (toutes articulations confondues) est significativement inférieure en post-mortem pour les chevaux du groupe 'A' par rapport aux chevaux de groupe 'B'. Bien sûr, les résultats de la cytologie en T0 pourraient prendre part à ces différences, puisque nous savons que la MMP-9 peut être produite par les neutrophiles, et que ceux-ci étaient plus élevés à T0. Cependant, ceci ne peut prendre part dans les résultats obtenus post-mortem puisque la cytologie obtenue était tout à fait normale. Orth démontre dans son étude réalisée *in vitro*, sur des chondrocytes équins, une diminution de l'activité gélatinolytique de la MMP-9 par la glucosamine et le chondroïtine sulfate (Orth *et al.*, 2002).

Nos résultats pourraient donc indiquer un potentiel effet per os de la glucosamine et du chondroïtine sulfate sur l'activité gélatinolytique de la MMP-9. Un dosage de la glucosamine sérique ou synoviale aurait été intéressant. Toutefois, nous savons que chez le cheval la glucosamine passe dans le sang et dans la synovie après administration orale. Dans le sang, un pic de concentration est observé 20 à 30 minutes après injection intraveineuse et ensuite, une forte diminution de cette concentration est observée dans l'heure qui suit. Lors d'une administration orale, la concentration sérique est environ 30 fois inférieure à celle mesurée après injection intraveineuse, et une forte variabilité individuelle a été observée. Dans la synovie, même si sa concentration est très inférieure, de l'ordre de 4 à 9 % de celle mesurée dans le sang, la glucosamine est détectable après une heure et sa demi-vie est supérieure à celle du sang, elle reste en effet encore détectable pendant environ 12 heures (Laverty *et al.*, 2005 ; Neil *et al.*, 2005). Conclure par ses résultats à un effet du traitement sur la dégradation cartilagineuse serait hâtif. En effet, nous devons tenir compte du fait que les gélatinases ne sont pas les seules enzymes à dégrader la matrice extracellulaire cartilagineuse mais qu'elles font partie d'un ensemble de protéases.

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre dans la balance entre pro- et anti-oxydants, en faveur des derniers, ce qui peut conduire à des dégâts cellulaires irréversibles. L'interaction de ces formes oxydantes, et plus particulièrement du radical hydroxyle, avec l'acide arachidonique conduit à la formation d'isoprostanes (Pincemail *et al.*, 1999).

L'implication du stress oxydant dans le développement de pathologies articulaires dégénératives a pu être démontré chez l'homme. En diminuant les capacités anti-oxydantes du cartilage articulaire, les formes réactives de l'oxygène (FRO) induisent un raccourcissement des télomères des chondrocytes. Ce raccourcissement des télomères induit la sénescence des chondrocytes et est dès lors impliqué dans le développement de l'ostéoarthrite (Yudoh *et al.*, 2005). Les FRO sont aussi capables de stimuler des facteurs de transcription tels que NFκB et induisent alors une synthèse accrue de médiateurs de l'inflammation (Valko *et al.*, 2007). Or, ces derniers sont capables d'activer les MMP et ainsi d'entraîner une activité protéinase accrue (Brama *et al.*, 2000 ; Van den Boom *et al.*, 2004).

Dans notre étude, aucun effet traitement n'a pu être mis en évidence. Il est utile de rappeler que ce marqueur a seulement pu être déterminé en post-mortem dans l'articulation du carpe droit, étant donné qu'un volume relativement important de synovie était nécessaire pour réaliser son dosage. A notre connaissance, il n'existe pas de publications sur l'effet de la glucosamine ou du chondroïtine sulfate sur la production d'isoprostanes au niveau articulaire.

Un aspect de l'étude mérite d'être discuté, à savoir la durée du traitement. Dans son étude, Forsyth avait montré que les effets de son traitement sur la longueur des foulées des

chevaux était détectable après huit semaines (Forsyth *et al.*, 2006). Par contre, Beren montre, chez le rat où une arthrite auto-immune est induite, des effets du traitement oral comprenant de la glucosamine, du chondroïtine sulfate et de l'ascorbate de manganèse après 52 jours de complémentation. Il montre ainsi une diminution significative dans la prévalence de l'arthrite chez 26 rats traités par rapport aux deux groupes contrôles de chacun 12 rats (Beren *et al.*, 2000). Si l'effet du traitement sur l'arthrite est détectable après 52 jours de traitement, nous pouvons imaginer que l'effet du traitement sur les protéases doit précéder ce dernier, et que, dans notre étude, la durée de six semaines serait donc suffisante.

Autre aspect, la composition exacte du complément n'est pas connue. Puisqu'il s'agit d'un produit qui sera bientôt mis sur le marché, il est compréhensible que ces informations ne soient pas divulguées par le producteur. Outre la glucosamine et le chondroïtine sulfate, le complément est composé d'*Harpagophytum procumbens*, plante sud-africaine couramment utilisée pour le traitement de pathologies articulaires. Même si les études concernant les évaluations des risques d'effets secondaires sont très limitées et que des études à plus long terme sont requises pour confirmer la sûreté de cette plante (Brien *et al.*, 2006), plusieurs études ont testé son efficacité sur l'ostéoarthrite. Chrubasik montre que des préparations contenant au minimum 50 mg d'harpagoside, le principe actif d'*Harpagophytum*, agirait sur la douleur ostéoarthritique chez l'homme. Des études *in vitro* ont été réalisées et montrent que le principe actif inhiberait non seulement la libération de médiateurs de l'inflammation mais aussi celle de médiateurs de la dégradation cartilagineuse articulaire comme TNF α , IL-1 β , NO ou les MMP (Chrubasik *et al.*, 2006). De plus, l'étude réalisée par Chrubasik sur des lapins complémentés par des extraits d'*Harpagophytum* pendant 27 semaines a montré un effet chondroprotecteur de la plante dans lequel la TIMP-2 serait impliquée (Chrubasik *et al.*, 2006).

En résumé, considérant la faible quantité de données, aucune conclusion ne peut être tirée des résultats obtenus en T0 et en T6. Par contre, les résultats obtenus en post-mortem nous permettent de montrer un effet du complément sur les activités MMP-2 et -9 et d'ainsi confirmer que de nouvelles études investiguant les effets du complément sur d'autres critères seraient intéressantes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Au vu des résultats, nous pouvons imaginer qu'il existe un effet du complément alimentaire sur les activités gélatinolytiques des MMP-2 et -9 dans la synovie, ce qui indiquerait que le complément est correctement assimilé par le cheval et qu'il pourrait ralentir la dégradation cartilagineuse.

Notre étude est, à notre connaissance, la première à investiguer les effets d'un complément alimentaire sur des facteurs biochimiques in vivo et post-mortem. Elle laisse, par ses résultats, entrevoir de nombreuses perspectives.

Réaliser une même étude sur des chevaux sains mais pratiquant un exercice régulier et intense nous permettrait de nous approcher de l'effet pour lequel le complément est prévu, à savoir la prévention de la dégradation articulaire chez les chevaux de sport. De plus, bien que l'effet du complément semble être plus préventif que curatif, il serait intéressant de faire le même type d'étude que celle que nous avons réalisé sur des chevaux souffrant d'arthrite.

Une durée du traitement plus longue montrerait peut-être des effets plus accentués sur les activités MMP et TIMP. Dans l'idéal, mesurer ces activités pour différentes concentrations de glucosamine et de chondroïtine sulfate serait intéressant. Toutefois, le nombre de chevaux nécessaires serait très élevé, cette étude est donc impensable.

Nous pourrions nous attaquer à la mesure d'autres facteurs impliqués dans la dégradation cartilagineuse. Nous savons que d'autres MMP, en particulier les MMP-1 et -13, seraient impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire cartilagineuse. Doser l'IL-1 β ou le facteur de transcription NF κ B serait aussi intéressant.

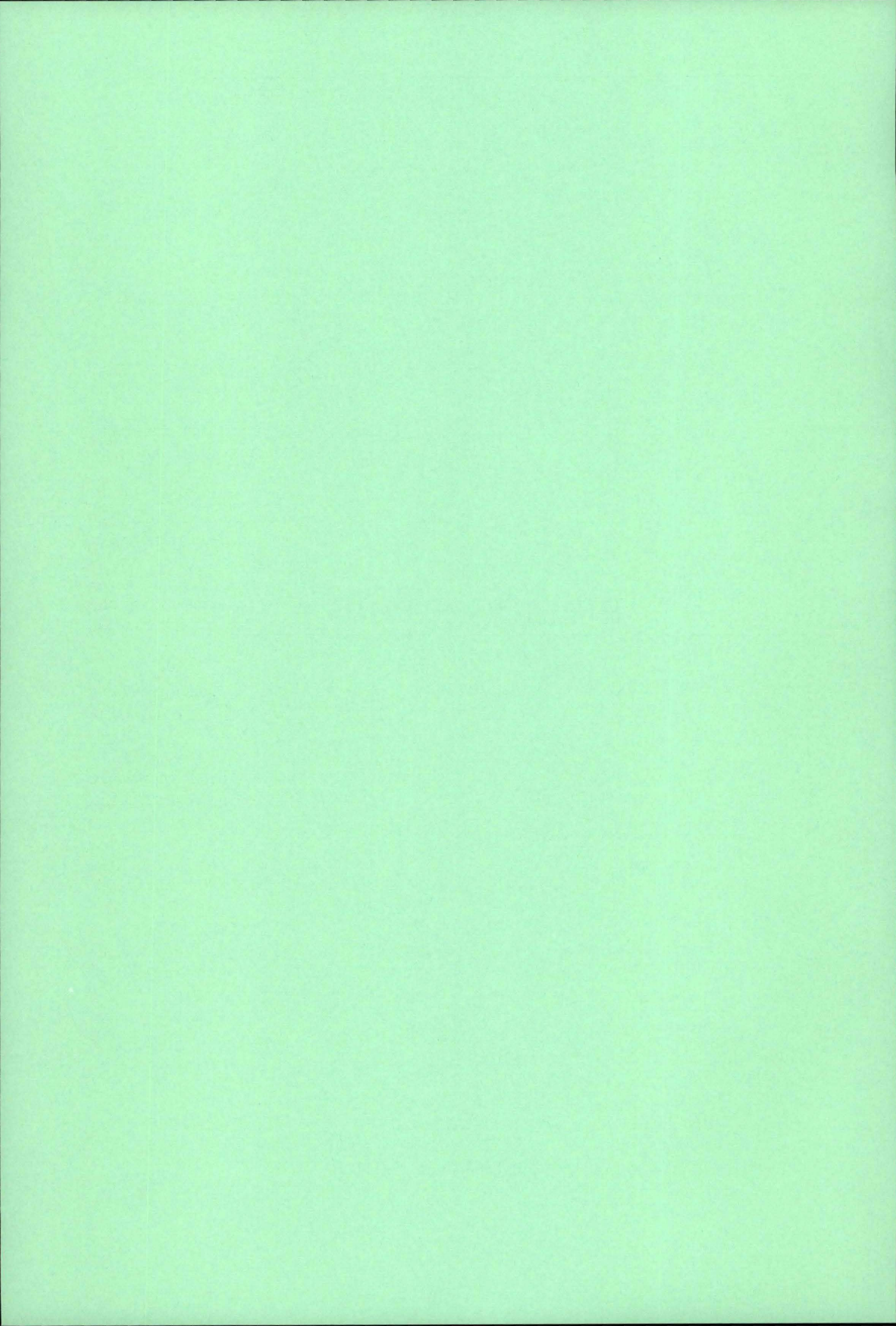
Nous pourrions aussi réaliser une étude histologique des cartilages prélevés sur des chevaux ayant été complétés et mesurer le volume de MEC, la concentration de collagène ou encore mesurer la quantité de protéoglycanes dans la MEC. Toutefois, étant donné l'état sain des chevaux des deux groupes, nous ne nous attendons pas à avoir de grandes différences à ce niveau.

Certaines perspectives font déjà partie de l'étude qui englobe ce mémoire. En effet, différentes mesures vont être effectuées sur des cultures cellulaires issues de chondrocytes prélevés sur les chevaux complétés ou ayant reçu le placebo. Pour cela, du cartilage a été immédiatement prélevé sur deux boulets après l'euthanasie des poneys. Le cartilage a été digéré et les chondrocytes ont été mis en primoculture pendant quelques jours. Ensuite, les chondrocytes ont été stimulés ou non à des doses croissantes d'IL-1 β . Le surnageant est alors prélevé et diverses mesures sont réalisées. Ceci permettra peut-être d'obtenir des résultats plus précis des activités inhibitrices des TIMP-1 et -2 que ceux obtenus post-mortem pour l'articulation entière.

Les chondrocytes ne sont pas les seules cellules présentes dans l'articulation, les synoviocytes jouent aussi un rôle important dans l'articulation. Nous ne pouvons donc pas considérer les cultures de chondrocytes comme une représentation complète de ce qui se passe dans l'articulation. Dans les études à venir, il serait intéressant de réaliser également des cultures de synoviocytes qui nous permettraient de savoir dans quelles mesures les synoviocytes sont impliqués dans la production des facteurs de dégradation de la MEC.

De plus, mesurer la concentration de glucosamine dans le sang et dans la synovie tout au long du traitement nous permettrait de tester si le complément est correctement assimilé et qu'un effet sur l'articulation est possible. Le manque de temps ne nous ayant pas permis de l'effectuer pour ce mémoire, ces mesures seront prochainement réalisées sur les échantillons de T6 et post-mortem.

BIBLIOGRAPHIE



Bibliographie.

- Amouroux J. Examen cytologique du liquide articulaire. *Revue française des laboratoires.* **308** (1998).
- Arican M., Coughlan A.R., Clegg P.D., Carter S.D. Matrix metalloproteinases 2 and 9 activity in bovine synovial fluids. *J Vet.Med.A Physiol Pathol.Clin.Med.* **47**, 449-456 (2000).
- Bali J. P., Cousse H., Neuzil E. Biochemical basis of the pharmacologic action of chondroitin sulfates on the osteoarticular system. *Semin.Arthritis Rheum.* **31**, 58-68 (2001).
- Bassleer C.T., Combal J.P., Bougaret S., Malaise M. Effects of chondroitin sulfate and interleukin-1 beta on human articular chondrocytes cultivated in clusters. *Osteoarthritis.Cartilage.* **6**, 196-204 (1998).
- Basu S., Whiteman M., Matthey D.L., Halliwell B. Raised levels of F(2)-isoprostanes and prostaglandin F(2alpha) in different rheumatic diseases. *Ann.Rheum.Dis.* **60**, 627-631 (2001).
- Beren J., Hill S.L., Ener-West M., Rose N.R. Effect of pre-loading oral glucosamine HCl/chondroitin sulfate/manganese ascorbate combination on experimental arthritis in rats. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* **226**, 144-151 (2001).
- Birkedal-Hansen H., Moore W.G., Bodden M.K., Windsor L.J., Birkedal-Hansen B., DeCarlo A., Engler, J. A. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev.Oral Biol.Med.* **4**, 197-250 (1993).
- Brama P.A., TeKoppele J.M., Beekman B., van Weeren P.R., Barneveld A. Matrix metalloproteinase activity in equine synovial fluid: influence of age, osteoarthritis, and osteochondrosis. *Ann.Rheum.Dis.* **57**, 697-699 (1998).
- Brama P.A., TeKoppele J.M., Beekman B., Barneveld A., van Weeren P.R. Influence of development and joint pathology on stromelysin enzyme activity in equine synovial fluid. *Ann.Rheum.Dis.* **59**, 155-157 (2000).
- Brien S., Lewith G.T., McGregor G. Devil's Claw (*Harpagophytum procumbens*) as a treatment for osteoarthritis: a review of efficacy and safety. *J.Altern.Complement Med.* **12**, 981-993 (2006).
- Byron C.R., Orth M.W., Venta P.J., Lloyd J.W., Caron J.P. Influence of glucosamine on matrix metalloproteinase expression and activity in lipopolysaccharide-stimulated equine chondrocytes. *Am.J.Vet.Res.* **64**, 666-671 (2003).
- Chang H.R., Yang S.F., Li M.L., Lin C.C., Hsieh Y.S., Lian J.D. Relationships between circulating matrix metalloproteinase-2 and -9 and renal function in patients with chronic kidney disease. *Clin.Chim.Acta.* **366**, 243-248 (2006).

- Chrubasik J.E., Lindhorst E., Neumann E., Gerlach U., Faller-Marquardt M., Torda T., Muller-Ladner U., Chrubasik S. Potential molecular basis of the chondroprotective effect of *Harpagophytum procumbens*. *Phytomedicine*. 13, 598-600 (2006).
- Clegg P.D., Burke R.M., Coughlan A.R., Riggs C.M., Carter S.D. Characterisation of equine matrix metalloproteinase 2 and 9; and identification of the cellular sources of these enzymes in joints. *Equine Vet.J* **29**, 335-342 (1997a).
- Clegg P.D., Carter S.D. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are activated in joint diseases. *Equine Vet.J* **31**, 324-330 (1999).
- Clegg P.D., Coughlan A.R., Carter S.D. Equine TIMP-1 and TIMP-2: identification, activity and cellular sources. *Equine Vet.J* **30**, 416-423 (1998).
- Clegg P.D., Coughlan A.R., Riggs C.M., Carter S.D. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in equine synovial fluids. *Equine Vet.J* **29**, 343-348 (1997b).
- De los Reyes G.C., Koda R.T., Lien E.J. Glucosamine and chondroitin sulfates in the treatment of osteoarthritis: a survey. *Prog. Drug Res.* **55**, 81-103 (2000).
- Dodge G.R., Jimenez S.A. Glucosamine sulfate modulates the levels of aggrecan and matrix metalloproteinase-3 synthesized by cultured human osteoarthritis articular chondrocytes. *Osteoarthritis. Cartilage*. **11**, 424-432 (2003).
- Fenton J.I., Chlebek-Brown K.A., Peters T.L., Caron J.P., Orth M.W. Glucosamine HCl reduces equine articular cartilage degradation in explant culture. *Osteoarthritis. Cartilage*. **8**, 258-265 (2000).
- Forsyth R.K., Brigden C.V., Northrop, A.J. Double blind investigation of the effects of oral supplementation of combined glucosamine hydrochloride (GHCL) and chondroitin sulphate (CS) on stride characteristics of veteran horses. *Equine Vet.J. Suppl* 622-625 (2006).
- Gaby A.R. Natural treatments for osteoarthritis. *Alternative Medicine Review* **4(5)**, 330-341 (2007).
- Ghazadeh-Habashi A., Ibrahim A., Carran J., Anastassiades T., Jamali F. Single dose pharmacokinetics and bioavailability of butyryl glucosamine in the rat. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **9**, 359-364 (2006).
- Gouze J.N., Bianchi A., Becuwe P., Dauca M., Netter P., Magdalou J., Terlain B., Bordji, K. Glucosamine modulates IL-1-induced activation of rat chondrocytes at a receptor level, and by inhibiting the NF-kappa B pathway. *FEBS Lett.* **510**, 166-170 (2002).
- Gouze J.N., Bordji K., Gulberti S., Terlain B., Netter P., Magdalou J., Fournel-Gigleux S., Ouzzine M. Interleukin-1beta down-regulates the expression of glucuronosyltransferase I, a key enzyme priming glycosaminoglycan biosynthesis: influence of glucosamine on interleukin-1beta-mediated effects in rat chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **44**, 351-360 (2001).

- Greenwald R.A., Moy W.W. Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum.* **23**, 455-463 (1980).
- Greenwald R.A., Moy W.W. Inhibition of collagen gelation by action of the superoxide radical. *Arthritis Rheum.* **22**, 251-259 (1979).
- Hanson R.R. Oral treatment with glucosamine-chondroïtin sulphate compound for degenerative joint disease in horses : 25 cases. *Equine Practice* **19(9)**, 16-22 (1997).
- Hattori S., Fujisaki H., Kiriyaama T., Yokoyama T., Irie S. Real-time zymography and reverse zymography: a method for detecting activities of matrix metalloproteinases and their inhibitors using FITC-labeled collagen and casein as substrates. *Anal.Biochem.* **301**, 27-34 (2002).
- Henrotin Y., Sanchez C. Reginster, J. Y. The inhibition of metalloproteinases to treat osteoarthritis : reality and new perspectives. *Expert Opinion* **12**, 29-43 (2002).
- Kleiner D.E., Stetler-Stevenson W.G. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal.Biochem.* **218**, 325-329 (1994).
- Laverty S., Sandy J.D., Celeste C., Vachon P., Marier J.F., Plaas, A. H. Synovial fluid levels and serum pharmacokinetics in a large animal model following treatment with oral glucosamine at clinically relevant doses. *Arthritis Rheum.* **52**, 181-191 (2005).
- Lejeune J.P. L'ostéo-arthropathie dégénérative du cheval : pathogénie et moyens diagnostiques (2007).
- Martel-Pelletier J., Alaaeddine N., Pelletier J. P. Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci.* **4**, D694-D703 (1999).
- McCarty M.F., Russell A.L., Seed M.P. Sulfated glycosaminoglycans and glucosamine may synergize in promoting synovial hyaluronic acid synthesis. *Med.Hypotheses* **54**, 798-802 (2000).
- McIlwraith W.C. Disease processes of synovial membrane, fibrous capsule, ligaments, and articular cartilage. *AAEP Proceedings* **47**, pp. 142-156 (2001).
- McNamara P.S., Barr S.C., Erb H.N. Hematologic, hemostatic, and biochemical effects in dogs receiving an oral chondroprotective agent for thirty days. *Am.J.Vet.Res.* **57**, 1390-1394 (1996).
- Mello D.M., Nielsen B.D., Peters T.L., Caron J.P., Orth M.W. Comparison of inhibitory effects of glucosamine and mannosamine on bovine articular cartilage degradation in vitro. *Am.J.Vet.Res.* **65**, 1440-1445 (2004).
- Minaud B. Etude clinique de l'efficacité des insaponifiables d'avocat et de soja dans le traitement des arthropathies dégénérative chez le cheval. Thèse Doct.Vét.,Maison Alfort (2007).

- Nagase H., Visse R., Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc.Res.* **69**, 562-573 (2006).
- Neil K.M., Caron J.P., Orth M.W. The role of glucosamine and chondroitin sulfate in treatment for and prevention of osteoarthritis in animals. *J Am.Vet.Med.Assoc.* **226**, 1079-1088 (2005a).
- Neil K.M., Orth M.W., Coussens P.M., Chan P.S., Caron J.P. Effects of glucosamine and chondroitin sulfate on mediators of osteoarthritis in cultured equine chondrocytes stimulated by use of recombinant equine interleukin-1beta. *Am.J Vet.Res.* **66**, 1861-1869 (2005b).
- Oegema T.R. Jr., Deloria L.B., Sandy J.D., Hart D.A. Effect of oral glucosamine on cartilage and meniscus in normal and chymopapain-injected knees of young rabbits. *Arthritis Rheum.* **46**, 2495-2503 (2002).
- Orth M.W., Peters T.L., Hawkins J.N. Inhibition of articular cartilage degradation by glucosamine-HCl and chondroitin sulphate. *Equine Vet.J.Suppl* 224-229 (2002).
- Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O. Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme : importance en matière de prévention. *Medisphere.* **95** (1999).
- Prouvost C., Laverty S. La glucosamine dans le traitement de l'ostéoarthrose. *Prat.Vét.Equine* **32(128)**, 31-36 (2000).
- Prydz K., Dalen K.T. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci.* **113 Pt 2**, 193-205 (2000).
- Shikhman A.R. Glucosamine and osteoarthritis. *Future Medicine.* **1**, 67-78 (2006).
- Snoek-van Beurden P.A., Von den Hoff J.W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* **38**, 73-83 (2005).
- Stetler-Stevenson W.G., Kruttsch H.C., Liotta L.A. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol.Chem.* **264**, 17374-17378 (1989).
- Strongin A.Y., Collier I., Bannikov G., Marmer B.L. Grant G.A., Goldberg G.I. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J.Biol.Chem.* **270**, 5331-5338 (1995).
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **39**, 44-84 (2007).
- Van den Boom R., Brama P.A., Kiers G.H., DeGroot J., Barneveld A., Van Weeren R.R. The influence of repeated arthrocentesis and exercise on matrix metalloproteinase and tumour necrosis factor alpha activities in normal equine joints. *Equine Vet.J* **36**, 155-159 (2004).

- Van den Boom R., Van Der Harst M.R., Brommer H., Brama P.A., Barneveld A., van Weeren P.R., DeGroot J. Relationship between synovial fluid levels of glycosaminoglycans, hydroxyproline and general MMP activity and the presence and severity of articular cartilage change on the proximal articular surface of P1. *Equine Vet.J* **37**, 19-25 (2005).
- Verset M. Etude expérimentale des lésions macroscopiques et histologiques d'arthrose du genou 90 jours après rupture chirurgicale du ligament croisé antérieur chez le chien. *Ecole nationale vétérinaire de Lyon*, thèse 93 (2005).
- Yudoh K., Nguyen T., Nakamura H., Hongo-Masuko K., Kato T., Nishioka K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res.Ther.* **7**, R380-R391 (2005).
- Zhao J.X., Yang L.P., Wang Y.F., Qin L.P., Liu D.Q., Bai C.X., Nan X., Shi S.S., Pei X.J. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in rat brain after implantation of 9L rat glioma cells. *Eur.J.Neurol.* **14**, 510-516 (2007).

Ouvrages.

Atlas en couleur d'histologie, Gartner - Hiatt ; Editions Pradel (2000).

Equine sport medicine and surgery. Basic and clinical sciences of the equine athlete, chapter 9: Joint physiology: responses to exercise and training, 152-158. Hinchcliff K.W., Kaneps A.J. (2004).

Histologie humaine, Stevens, Lowe ; Deboeck Université (1997).