

EVALUATION D'UN COMPLEMENT ENRICHIS EN GLUCOSAMINE ET EN CHONDROITINE SULFATE SUR L'EQUILIBRE ENZYMATIQUE ARTICULAIRE CHEZ LE JEUNE CHEVAL

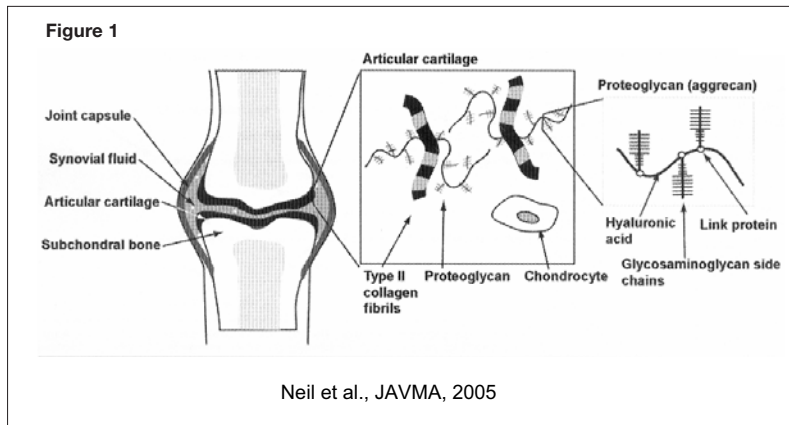
Drs Marie Daix, Jean-François Bastin & Nathalie Kirschvink

FUNDP- Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Département de Médecine Vétérinaire, Physiologie Animale, rue de Bruxelles 61, B- 5000 Namur



Implication des métalloprotéinases de matrice dans les pathologies ostéo-articulaires

Chez le cheval de sport, les pathologies ostéo-articulaires représentent une cause majeure de boiterie. L'articulation est une structure complexe constituée de différentes entités (voir figure 1). Les os adjacents sont recouverts de cartilage articulaire au niveau des zones de contact ce qui confère une bonne mobilité à l'articulation. Cette mobilité est encore accrue par la présence du liquide synovial qui joue un rôle de lubrifiant. L'ensemble de l'articulation est fermé par une membrane synoviale et maintenu stable par les ligaments et parfois les muscles qui l'entourent. La structure du cartilage articulaire joue un rôle prépondérant dans la locomotion. Il comprend des chondrocytes et une matrice extracellulaire. Cette matrice extracellulaire est composée en grande partie de collagène qui confère au cartilage sa résistance et de protéoglycans et glycoprotéines qui lui apportent l'élasticité permettant d'amortir les chocs causés par la locomotion. Le terme "pathologies ostéo-articulaires" englobe en fait un grand nombre de maladies différentes auxquelles on trouve néanmoins un dénominateur commun: la destruction de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire (Van Den Boom et al., 2005).



les protéines contenues dans la matrice extracellulaire, s'exprime. Certains facteurs pro-inflammatoires comme les cytokines et certaines hormones semblent capables d'activer les MMP et ainsi de favoriser la destruction de la matrice extracellulaire. Ces médiateurs interviendraient dans le déclenchement d'une réaction en cascade, dont les différents composants s'activeraient l'un l'autre pour résulter en une activité protéinase accrue (Nagase et al., 2006).

A plusieurs reprises, les chercheurs ont pu démontrer qu'il survient une augmentation de l'activité des MMP en cas de pathologie articulaire (Brama et al., 2000, Clegg and Cartler, 1999) ; cette augmentation semble

être l'élément déclencheur des lésions cartilagineuses et est positivement corrélée à l'importance de ces lésions observées par analyse histologique (Van Den Boom et al., 2005).

Les glycosaminoglycans et leurs précurseurs tels la glucosamine ou le chondroïtine sulfate semblent pouvoir moduler l'activité des MMP et favoriser la synthèse de la matrice extracellulaire (Henrotin et al., 2002).

Des études réalisées *in vitro* sur culture de chondrocytes ou *in vivo* avec des rongeurs complémentés par voie orale ont permis de prouver l'effet bénéfique de ces compléments sur la dégradation cartilagineuse (Beren

Plusieurs auteurs ont montré que cette destruction du cartilage fait suite à l'activation en cascade de facteurs pro-inflammatoires et enzymatiques parmi lesquels les plus importants semblent être les métalloprotéinases de matrice (MMP) (Brama et al., 2004, Neil et al., 2005 a).

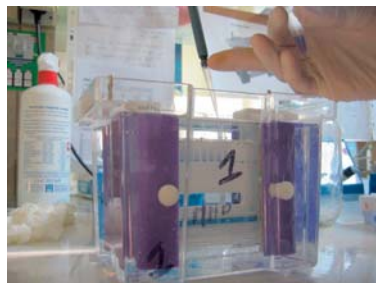
Les MMP sont des enzymes zinc dépendantes impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Il s'agit de protéinases capables de dégrader la matrice extracellulaire. Leur activité est soumise à un contrôle complexe et dépend notamment d'inhibiteurs spécifiques: les "Tissue Inhibitors of Metalloproteinases" ou TIMP. C'est en grande partie l'équilibre entre les MMP et les TIMP qui définit l'activité protéinase. En effet, liée à son inhibiteur, l'enzyme est inactive. Ce n'est qu'une fois libre que son activité lytique, c.-à-d. sa capacité de cliver





de glucosamine hydrochloride et de chondroïtine sulfate, pendant 12 semaines, induit une augmentation significative de la longueur de la foulée, de la mobilité articulaire et de la durée de la phase de suspension. Cette étude semble confirmer l'effet bénéfique de ce complément sur la locomotion chez le cheval (Forsyth et al., 2006).

L'objectif de la présente étude était d'évaluer l'effet d'un complément alimentaire contenant entre autre de la glucosamine, du chondroïtine sulfate et de l'harpagophytum sur l'équilibre MMP-TIMP chez le jeune cheval sain au repos.



Préparation du dosage des MMP en zymographie

Les poneys ont été divisés en deux groupes homogènes sur base de leur taille, poids, sexe, âge et score de boiterie.

Pendant les six semaines qui ont suivi, les poneys ont reçu quotidiennement de manière individuelle un complément A* ou B**, mélangé à leur concentré.

Au terme des six semaines de complémentation, une nouvelle investigation a été réalisée (T6) identique à la première.

Les examens spécifiques du système locomoteur ont permis de déterminer pour chaque membre un score

et al., 2001, Neil et al., 2005 b). 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 induite chez des rats de laboratoire (Beren et al., 2001).

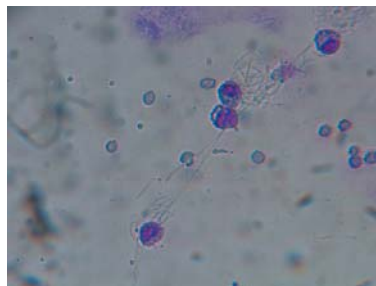
Chez l'homme, on répertorie de nombreuses investigations concernant l'effet des glycosaminoglycans et leurs précurseurs sur diverses pathologies ostéo-articulaires. La plupart de ces recherches font état d'une diminution de la gravité des symptômes et de la douleur chez les patients traités. Ces compléments semblent également indiqués dans un but de prévention des pathologies ostéo-articulaires, tant chez l'homme que chez les animaux (Henrotin et al., 2002).

Par ailleurs, une autre étude réalisée sur des chevaux âgés a permis de montrer qu'une complémentation, par voie orale, à base d'une combinaison

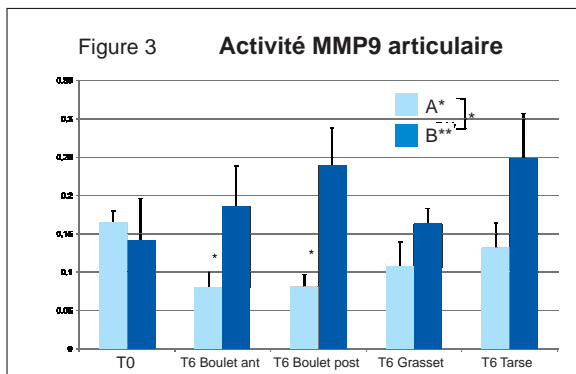
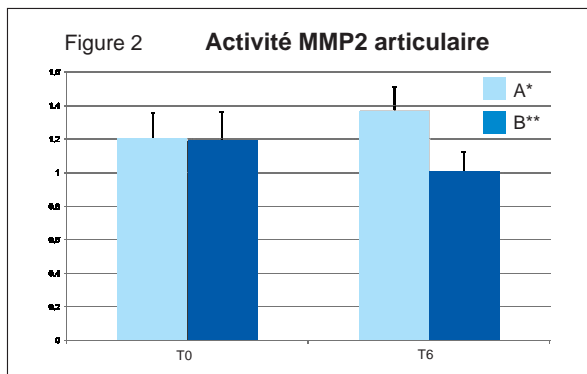
Présentation de l'étude

Seize poneys sains d'âge moyen de 2.5 ans, d'une taille moyenne de 1.35 m et d'un poids de 300 kg furent utilisés pour cette étude. Les poneys étaient logés en stabulation libre aux Centres de Recherches Ovines des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix de Namur. Leur alimentation tout au long de l'étude était composée de concentrés, donnés de manière individuelle, une fois par jour, et de foin, deux fois par jour. Les poneys disposaient d'un accès en prairie une heure par jour. Deux semaines ont été consacrées à l'acclimatation des animaux à leur nouvel environnement.

Au terme de ces deux semaines d'acclimatation une première investigation a été réalisée (T0). Un examen général ainsi qu'un examen spécifique du système locomoteur ont été effectués, permettant d'attribuer un score de boiterie à chaque animal. Des ponctions articulaires permettant le prélèvement de liquide synovial ont également été pratiquées.



Chondrocyte en suspension dans le liquide synovial



de boiterie. Dans le liquide synovial, les marqueurs suivants ont été analysés: activité des MMP2 et 9 et activité des TIMP en tant que marqueurs du stress enzymatique. Une analyse cytologique du liquide synovial a également été réalisée. Les investigateurs n'ont pris connaissance de l'identité des compléments A* et B** qu'après avoir réalisé l'ensemble des analyses.

L'étude a été approuvée par la Commission d'Ethique locale responsable en matière d'expérimentation animale.

Résultats de l'étude

a) Scores de boiterie:

A T0, les scores de boiteries des poneys des deux groupes étaient très faibles attestant qu'aucun d'entre eux ne présentait de boiterie sévère. A T6, les scores de boiterie étaient similaires à leurs valeurs de départ et ne différaient pas entre les groupes A* et B**. De façon peu surprenante, il n'y a donc pas eu d'effet significatif de la complémentation sur ces scores de boiterie déjà très faibles.

b) Activité de la MMP2:

A T0, l'activité MMP2 était semblable entre les deux groupes. Cette activité n'a pas montré de différence significative après la période de complémentation. Les groupes A* et B** ont donc montré des activités comparables tout au long de l'expérience (voir figure 2).

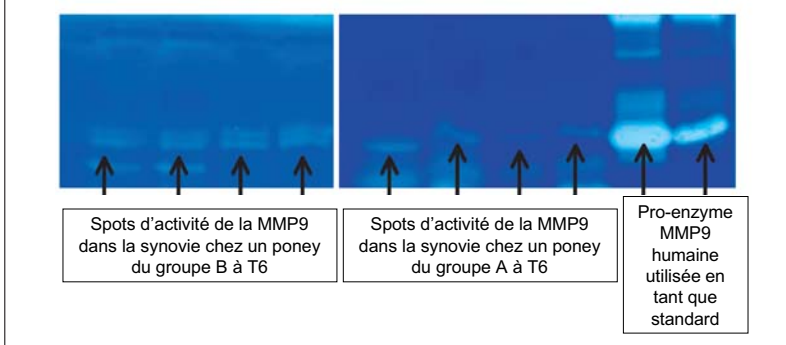
c) Activité de la MMP9:

L'activité de la MMP9 dans le liquide synovial à T6 était significativement plus faible chez les chevaux du groupe A* que chez les chevaux du groupe B**. En plus, l'activité MMP9 mesurée à T6 était différente de sa valeur à T0 dans les articulations des boulets antérieurs et postérieurs dans le groupe A*. Dans le groupe B**, cette activité à T6 n'était pas significativement différente de sa valeur à T0 (voir figure 3).

d) Activité du TIMP2:

L'activité du TIMP2 dans le liquide synovial est restée similaire tout au long de l'expérience.

Gel d'électrophorèse permettant de déterminer l'activité MMP dans le liquide synovial



e) Analyse cytologique:

L'analyse cytologique du liquide synovial n'a révélé aucune anomalie et aucune différence significative n'a été constatée entre le groupe A* et le groupe B**.

In vitro, dans une situation de stress enzymatique articulaire (activité MMP accrue) mimant une pathologie ostéo-articulaire débutante, la glucosamine et le chondroïtine sulfate permettent de diminuer l'activité



des MMP (Byron et al., 2003, Fenton et al., 2002). Dans notre étude in vivo, l'activité des MMP dans le liquide synovial était faible étant donné qu'il s'agissait d'animaux sains. Au vu de la variabilité interindividuelle assez grande au niveau des groupes A* et B**, une mise en évidence d'un effet de la complémentation n'était pas évidente. Cependant, un effet modulateur significatif sur l'activité de la MMP9 a pu être mis en évidence chez les poneys ayant reçu pendant 6 semaines le complément A*, suggérant une diminution de l'activité protéasique au niveau articulaire.

Conclusion

Dans cette expérience, le complément A* n'a pas eu d'effet significatif sur l'activité de la MMP2 et du TIMP2. Une diminution significative de l'activité MMP9 a cependant été mise en évidence. **Ces résultats nous permettent de conclure que le complément A* a permis de moduler l'équilibre enzymatique articulaire.**

Références bibliographiques

- Beren J., Hill S.L., Diener-West M. and Rose N.R. Effect of pre-loading oral glucosamine HCl/chondroïtine sulphate/manganese ascorbate combination on experimental arthritis in rats. 2001. *Experimental biology and medicine*, **226**, pp 144-151.
- Brama P.A.J., Tekoppele J.M., Beekman B., Van El B., Barneveld A., and Van Weeren P.R. Influence of development and joint pathology on stromelysin enzyme activity in equine synovial fluid. 2000. *Annals of the rheumatic diseases*, **59**, pp 155-157.
- Brama P.A.J., Van Den Boome R., Degroot J., Kiers G.H. and Van Weeren P.R. Collagenase 1 (MMP1) activity in equine synovial fluid: influence of age, joint pathology, exercise and repeated arthrocentesis. 2004. *Equine Veterinary Journal*, **36**, pp 34-40.
- Byron C.R., Orth M.W., Venta P.J., Lloyd J.W. and Caron J.P. Influence of glucosamine on matrix metalloproteinase expression and activity in lipopolysaccharide-stimulated equine chondrocytes. 2003. *American Journal of Veterinary Research*, **11**, pp 1861-1869.
- Clegg P.D. and Cartler S.D. Matrix metalloproteinases 2 and 9 are activated in joint diseases. 1999. *Equine Veterinary Journal*, **31** (4), pp 324-330.
- Fenton J.I., Chlebek-Brown K.A., Caron J.P. and Orth M.W. Effect of glucosamine on interleukin-1 conditioned articular cartilage. 2002. *Equine Veterinary Journal Supplement*, **34**, pp 219-223.
- Forsyth R.K., Brigden C.V. and Northrop A.J. Double blind investigation of the effects of oral supplementation of combined glucosamine hydrochloride (GHCL) and chondroïtine sulphate (CS) on stride characteristics of veteran horses. 2006. *Equine Veterinary Journal Supplement*, **36**, pp 622-625.
- Henrotin Y., Sanchez C. and Reginster J.Y. The inhibition of metalloproteinases to treat osteoarthritis: reality and new perspectives. 2002. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **1**, pp 29-43.

QUESTIONS AU PROFESSEUR KIRSCHVINK



Prof. N. Kirschvink

HPH: En quoi résidait le caractère d'originalité de cette étude?

Prof. N. Kirschvink: Pour la première fois, l'évaluation d'un complément à effet chondroprotecteur chez les équidés a été réalisée par un examen clinique associé à l'investigation de marqueurs articulaires, permettant d'étudier l'effet du complément directement au niveau des structures cibles.

HPH: Depuis des années, faute d'éléments tangibles, les scientifiques sont divisés sur l'efficacité avérée ou non des chondroprotecteurs qui inondent le marché. En ce qui concerne la formule originale

testée, qu'est-il permis de soutenir avec certitude?

Prof. N. Kirschvink: Notre étude semble indiquer qu'un effet préventif permettant de maintenir la santé articulaire existe pour la formule testée. Cette hypothèse reste cependant à confirmer sur le terrain où des jeunes chevaux sains sont soumis à des exercices physiques intenses, facteur qui n'a pas pu être pris en compte dans la présente étude.

HPH: Etes-vous surprise par l'absence d'effet sur les signes cliniques des poneys utilisés dans cette étude?

Prof. N. Kirschvink: Etant donné que la taille du groupe expérimental était réduite, que les poneys étaient cliniquement sains et qu'ils montraient un score de boiterie très faible avant la complémentation, une amélioration significative des signes cliniques était très peu probable. Il serait néanmoins intéressant de réaliser ce type d'étude à plus grande échelle dans des conditions de terrain.

- Nagase H., Visse R. and Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. 2006. *Cardiovascular research*, **69**, pp 526-573.
- Neil K.M., Caron J.P. and Orth M.W. The role of glucosamine and chondroïtine sulphate in treatment for and prevention of osteoarthritis in animals. 2005 a. *Journal of American Veterinary Medical Association*, **7**, pp 1079-1088.
- Neil K.M., Orth M.W., Coussens P.M., Chan P.S. and Caron J.P. Effects of glucosamine and chondroïtine sulphate on mediators of osteoarthritis in cultured equine chondrocytes stimulated by use of recombinant equine interleukine-1. 2005 b. *American Journal of Veterinary Research*, **11**, pp 1861-1869.
- Van Den Boom R., Van Der Harst M.R., Brommer H., Brama P.A.J., Barneveld A., Van Weeren P.R. and Degroot J. Relationship between synovial fluid levels of Glycosaminoglycans, hydroxyproline and general activity of Matrix Metallo proteinases and the presence and severity of articular cartilage change on the proximal articular surface of P1. 2005. *Equine veterinary journal*, **37** (1), pp 19-25.

CURRICULUM VITAE PROFESSEUR KIRSCHVINK

Originaire des cantons germanophones de Belgique, Nathalie Kirschvink a effectué un brillant cursus universitaire aux Facultés

Notre-Dame de Namur puis à l'Université de Liège où elle a ensuite réalisé une thèse de doctorat en science vétérinaire au service de physiologie du Professeur Lekeux (ULg, Belgique). Sa thèse était intitulée «étude du rôle des F2-iso-prostanés en tant que marqueur et acteur du stress oxydant pulmonaire». Cette spécialiste du stress oxydant a ensuite poursuivi son cursus en pharmacologie et toxicologie chez le Professeur Gustin (ULg, Belgique) où elle a, entre autre, étudié de façon plus approfondie, le stress enzymatique. Cette passionnée de chevaux est, depuis 2005, chargée de cours en physiologie animale aux Facultés universitaires Notre-Dame de Namur, Belgique.

Remerciements:

Les auteurs tiennent à remercier Ing. Marianne Raes, Laetitia Wiggers, Mélanie Vandendriessche, Bénédicte Dehandschutter et le Laboratoire du Professeur Jean-Marie Giffroy pour leur contribution à cette étude.