

Université de Montréal

**Effet d'une supplémentation en vitamine E alimentaire sur
l'inflammation et la douleur chez le chien avec arthrose**

Par

Mohamed Rhouma

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M. Sc.)

en sciences vétérinaires

option pharmacologie

Mai 2011

© Mohamed Rhouma, 2011

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**Effet d'une supplémentation en vitamine E alimentaire sur
l'inflammation et la douleur chez le chien avec arthrose**

Présenté par

Mohamed Rhouma

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Eric Troncy, président-rapporteur

Dr Younès Chorfi, directeur de recherche

Dr Alexander de Oliveira El Warrak, codirecteur

Dre Ann Letellier, membre du jury

RÉSUMÉ

La vitamine E (VE) est parfois préconisée pour le traitement de l'arthrose chez le chien, par contre aucune étude n'a documenté cette efficacité. L'objectif de cette étude était de déterminer l'effet d'une forte dose de VE alimentaire sur l'inflammation et la douleur arthrosique chez le chien. Deux groupes de chiens avec arthrose provoquée par section du ligament croisé crânial du membre postérieur droit ; un groupe contrôle (n=8) et un groupe supplémenté avec la VE (n=7), ont été suivis selon un design parallèle, randomisé et en aveugle. La supplémentation a été commencée 1 jour après la chirurgie avec une dose de 400 UI/animal/jour par voie orale pendant 56 jours. Les évaluations objectives (activité électrodermique, EDA) et subjectives (VAS, NRS) de la douleur ont été faites avant la chirurgie J0, à J28 et à J55 après chirurgie. La détermination de la concentration synoviale des marqueurs de l'inflammation (IL-1 β , PGE2 et NOx) et l'étude lésionnelle ont été faites après l'euthanasie à J56. Une comparaison unilatérale avec un seuil alpha de 10% a été réalisée. Les concentrations synoviales de PGE2 et de NOx étaient faibles chez le groupe supplémenté en VE par rapport au contrôle ($P=0,03$ et $P<0,0001$ respectivement). Les valeurs de VAS, NRS et EDA ont montré une tendance constante à l'amélioration de la douleur dans le groupe traité, avec des résultats significatifs obtenus pour VAS à J55 et pour EDA à J28 (P ajusté = 0,07 dans les deux cas). L'analyse histologique du cartilage articulaire a montré une réduction significative des scores lésionnels dans le groupe traité. C'est la première fois qu'une étude menée chez le chien avec arthrose, a montré qu'une forte dose en VE alimentaire permet de réduire les marqueurs de l'inflammation articulaire, les lésions histologiques cartilagineuses et permet aussi d'améliorer les signes de la douleur associée à l'arthrose.

Mots-clés : arthrose, vitamine E, chien, inflammation, douleur.

ABSTRACT

Because of the evidence of some anti-inflammatory and analgesic activities of vitamin E (VE) in human osteoarthritis (OA), this double blind and randomized pilot study used a broad spectrum of clinical and laboratory parameters to investigate whether such beneficial effects could be detected in a canine experimental OA model. Dogs were divided into 2 groups: control group (n = 8) receiving a placebo, and test group (n = 7) receiving orally 400 IU/ animal/ day of VE during 55 days, starting the day after transection surgery of the cranial cruciate ligament. At d56, dogs were euthanized and concentrations of prostaglandin E2 (PGE2), nitric oxide (NO) and interleukin-1 β (IL-1 β) were measured in synovial fluid samples. Severity of lameness and pain was assessed using a visual analogue scale (VAS), a numerical rating scale (NRS) and electrodermal activity (EDA) at d0, d28 and d55. The size and grade of cartilage macroscopic lesions on femoral condyles and tibial plateaus were evaluated, and the histological severity of cartilage lesions and synovial inflammation was determined. One-side comparison was conducted at an alpha-threshold of 10%. Synovial amounts of NOx and PGE2 were lower in the test group ($P < 0.0001$ and $P = 0.03$, respectively). Values of VAS, NRS and EDA showed a consistent trend to be lower in the test group compared to the control, while statistical significance was reached for VAS at d55 and EDA at d28 (adjusted $P = 0.07$ in both cases). Histological analyses of articular cartilage showed a significant reduction in lesions' scores in the tested group. For the first time, a study in dog with OA using high dose of VE showed that this supplementation reduces inflammation joint markers and histological expression, as well as tends to improve signs of pain.

Key words: Osteoarthritis, vitamin E, dog, inflammation, pain.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	ii
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	viii
DÉDICACES	x
INTRODUCTION	1
RECENSION DES ÉCRITS	3
I. Classification des articulations	3
I.1. Les articulations non synoviales	3
I.2. Les articulations synoviales	3
II. Articulation synoviale saine	4
II.1. Composition du cartilage articulaire normal	4
II.1.1. Les chondrocytes.....	5
II.1.2. La matrice extracellulaire (MEC)	5
II.1.2.1. Le collagène.....	6
II.1.2.2. Le protéoglycane	6
II.1.2.3. L'acide hyaluronique.....	7
II.1.2.4. Les agrécane.....	8
II.1.2.5. Autres molécules	8
II.2. Morphologie du cartilage articulaire normal	9
II.3. Propriétés physiques et mécaniques du cartilage articulaire normal	11
II.4. Physiologie du cartilage articulaire normal	12
II.5. Os sous-chondral normal	13
II.6. Capsule articulaire normale	14
II.7. Membrane synoviale normale.....	14
II.8. Liquide synovial ou synovie	15
III. Articulation synoviale arthrosique	16
III.1. Physiopathologie de l'arthrose	16
III.1.1. Facteurs prédisposants	16
III.1.2. La dégradation du cartilage.....	17
III.1.2.1. Enzymes responsables du catabolisme : les métalloprotéases	17
III.1.2.2. Facteurs de régulation : les cytokines	17
III.1.2.3. Médiateurs de l'inflammation arthrosique (NOx et PGE2)	19
III.1.2.4. Radicaux libres.....	21
III.1.3. Altérations physiques du cartilage articulaire.....	22
III.1.4. Formation d'ostéophytes	23
III.1.5. Modifications de la membrane synoviale et de la synovie	23
III.1.6. Modification de l'os sous-chondral	24

III.1.7. Douleur arthrosique	25
III.1.8. Traitement de l'arthrose chez le chien	26
III.1.8.1. Traitement hygiénique	27
III.1.8.2. Traitement médical	27
III.1.8.2.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	27
III.1.8.2.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens	31
III.1.8.2.3. les analgésiques	31
III.1.8.3. Traitement nutritionnel	34
IV. Étude de la vitamine E	35
IV.1. Définition et structure	35
IV.2. Pharmacocinétique de la vitamine E et son rôle dans l'organisme	36
IV.2.1. Absorption, distribution et excrétion	36
IV.2. 2. Utilisation et rôle de la vitamine E dans l'organisme	39
IV.3. Effet de la vitamine E sur l'arthrose	40
IV.3.1. Effet de la vitamine E sur la douleur arthrosique	40
IV.3.2. Effet de la vitamine E sur l'inflammation	41
Hypothèse et objectif de recherche	43
I. Hypothèse	43
II. Objectifs	43
PRÉSENTATION DE L'ARTICLE	44
Abstract	45
Introduction	46
Materials and methods	48
1. Dog selection	48
2. Anesthesia and surgical procedures	48
3. Post-operative and oral supplementation procedures	49
4. Blood sample collections and analysis	49
5. Inflammation assessments	50
5.1. Determination of synovial fluid PGE2 concentration	50
5.2. Determination of synovial fluid IL-1 β concentration	50
5.3. Determination of synovial fluid NOx concentration	50
6. Pain assessments	51
6.1. Subjective behavioral pain assessments	51
6.1.1. Lameness/ discomfort assessment using a VAS	51
6.1.2. Numerical rating scale (NRS)	51
6.2. Objective pain assessment	51
6.2.1. Electrodermal activity (EDA)	51
7. Structural assessments	52
7.1. Macroscopic grading of OA lesions	52
7.2. Histological grading of cartilage and synovial membrane lesions	52
8. Statistical analysis	53
Results	54
1. Inflammatory joint markers	54

2. Lameness/ pain assessments	54
3. Structural assessments	55
3.1 Macroscopic evaluation of lesions	55
3.2 Histological evaluation of cartilage and synovial membrane	55
Discussion	56
Acknowledgements	59
Figure legend	60
References	63
DISCUSSION GÉNÉRALE	66
CONCLUSION GÉNÉRALE	77
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	78

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : AINS utilisés chez le chien pour la gestion de l'OA.....30

Tableau II : les analgésiques utilisés dans la gestion de l'OA chez le chien.....33

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique d'une diarthrose	4
Figure 2 : Disposition du collagène type II, PG, GAG et acide hyaluronique dans la couche moyenne du cartilage articulaire.....	7
Figure 3 : Représentation schématique des agrécane. G1, G2 et G3 sont des protéines de liaison.	8
Figure 4 : Composition de la Matrice Extra-Cellulaire du cartilage articulaire chez le chien	9
Figure 5 : Structure du cartilage articulaire	11
Figure 6 : Représentation schématique du phénomène de « pompe articulaire »	12
Figure 7 : IL-1 β au cœur de la balance entre facteurs anaboliques et cataboliques au cours de l'arthrose	19
Figure 8 : Voies de biosynthèse des prostanoïdes.....	20
Figure 9 : Physiopathologie de l'arthrose	22
Figure 10 : Structure chimique de la vitamine E.	36
Figure 11 : Absorption, transport et distribution de la vitamine E	38

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

AA :	Acide arachidonique, <i>Arachidonic acid</i>
AINS :	Anti-inflammatoire non stéroïdien
α-TTP :	<i>α-Tocopherol Transfer Protein</i>
CM :	Chylomicrons
COMP :	<i>Cartilage Oligomeric Matrix Proteins</i>
COX-2 :	Cyclooxygénase-2
EDA :	Activité électrodermique
EM :	Energie métabolisable
GAG :	Glycosaminoglycanes
HPLC :	Chromatographie en phase liquide à haute performance, <i>High-performance liquid chromatography</i>
IL :	Interleukine
IGF-1 :	Facteur de croissance semblable à l'insuline-1, <i>Insuline growth factor-1</i>
iNOS :	Synthase d'oxyde nitrique inductible, <i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IRM :	Imagerie par résonance magnétique
d0 :	Baseline
d28 :	Jour 28 après la chirurgie
d55 :	Jour 55 après la chirurgie
HDL :	Lipoprotéines de haute densité, <i>High-density lipoproteins</i>
LCC :	Ligament croisé crânial
LDL :	Lipoprotéines de faible densité, <i>Low-density lipoproteins</i>
MEC :	Matrice extracellulaire
MMP :	Métalloprotéinases matricielles, <i>Matrix metalloproteinases</i>
MS :	Matière sèche

NO :	Monoxyde d'azote, <i>Nitric oxide</i>
NFκB :	Facteur nucléaire Kappa-B, <i>Nuclear factor kappa B</i>
NMDA :	<i>N</i> -méthyl-D-aspartate
NRC :	Conseil national de recherches, <i>National Research Council</i>
NRS :	Echelle d'évaluation numérique, <i>Numerical rating scale</i>
OA :	Arthrose; <i>Osteoarthritis</i>
OCT :	<i>Optical Coherence Tomography</i>
PGE2 :	Prostaglandine E2
Pg/ml :	Picogramme/millilitre
PLA2 :	Phospholipase A2
PLTP :	Protéine du transfert plasmatique des phospholipides, <i>Phospholipid transfert protein,</i>
ROS :	Espèces réactives de l'oxygène, <i>Reactive oxygen species</i>
TNFα :	Facteur de nécrose tumorale α, <i>Tumor necrosis factor α</i>
TIMP :	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases, <i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TX :	Thromboxane
VAS :	Echelle visuelle analogique, <i>Visual analogue scale</i>
VE :	Vitamine E; <i>Vitamin E</i>
VLDL :	Lipoprotéines de très faible densité, <i>Very-low-density lipoprotein</i>

DÉDICACES

A Dieu tout puissant

D'avoir été toujours là pour moi, surtout dans les moments difficiles et de m'avoir donné la conviction que je puisse arriver au terme de ce travail. Je remercie dieu pour ce que j'ai et ce que je suis.

A mes parents

Votre confiance et votre patience sont mes biens les plus précieux, ni mon amour, ni rien au monde ne pourrait compenser tous les sacrifices que vous aviez consentis en ma faveur et que vous consentiez encore.

A ma femme

Ma source de lumière, d'espoir et de bonheur, que dieu te protège. Veuillez trouvez ici l'expression de mon profond amour et ma grande reconnaissance.

A mes frères

Pour leur affection. Que dieu leur accorde le succès, le bonheur et la santé et renforce notre union familiale.

A toute ma famille

Pour son encouragement.

Aux personnels de le Mission Universitaire de Tunisie à Montréal

Pour leurs conseils et encouragements qu'ils n'ont cessé de me fournir que ce travail leur témoigne de ma profonde affection.

A tous mes enseignants de l'Ecole Vétérinaire de Tunisie

Pour leurs soutien moral et encouragements

A tous ceux dont l'oubli du nom n'est pas celui du cœur

REMERCIEMENTS

Au terme de cette maîtrise, j'aimerais adresser mes plus vifs remerciements :

- Au Dr. Younès Chorfi pour avoir accepté d'être mon directeur de recherche, au terme de ce travail, j'ai l'immense plaisir de vous exprimer ma sincère gratitude et respectueuse reconnaissance pour vos directives et vos encouragements.
- Au Dr. De Oliveira El Warrak Alexander pour sa contribution, son professionnalisme, sa disponibilité, ses encouragements et ses précieux conseils.
- Au Dr. Francis Beaudry pour sa disponibilité, pour ces encouragements, en témoignage de ma profonde reconnaissance et de mon admiration.
- Au Pr. Eric Troncy pour sa contribution, que vous trouviez dans ce travail le témoignage de ma gratitude, mon profond respect et ma plus grande estime pour vos qualités humaines et intellectuelles.
- Au Dr. Ann Letellier qui m'a fait l'honneur de juger ce travail en participant au jury de ma maîtrise.
- Au Pr. Amer Silim pour ces qualités humaines, son amabilité et sa disponibilité.
- Au Dr. Guy Beauchamp pour l'aide dans les analyses statistiques.
- Au Dr. Jérôme del Castillo pour son aide et ses encouragements.
- A Mme Marie-Claude Gendron pour son soutien technique.
- Au personnel d'ArthroLab, Inc. pour son aide et sa gentillesse.
- A tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

INTRODUCTION

L'arthrose est une affection dégénérative à évolution lente qui peut, chez le chien, être à l'origine de douleur et de boiterie. Cette affection toucherait 20 % de la population canine de plus de un an (Johnston, 1997). L'arthrose fonctionne sur le principe d'un cercle vicieux ; les lésions cartilagineuses primaires ou secondaires entraînent une synovite qui induit la libération de médiateurs de l'inflammation, notamment d'interleukine 1 beta (IL-1 β) et de facteur de nécrose tumoral alpha (TNF α) qui déclenchent à leur tour la libération des métalloprotéinases (MMPs), aggravant la dégénérescence du cartilage (Arner et *al.*, 1998 ; Fernandes et *al.*, 2002 ; Kapoor et *al.*, 2011). Ces mêmes médiateurs stimulent la production du monoxyde d'azote (NO) qui inhibe la synthèse du collagène, des protéoglycanes et induit l'apoptose des chondrocytes (Fukui et *al.*, 2001). L'acide arachidonique est métabolisé en prostaglandines et en leucotriènes qui entraînent une baisse du seuil de la douleur et provoquent une augmentation de la perméabilité vasculaire, une vasodilatation et possèdent des effets chimiotactiques (Shi et Klotz, 2008). Ce cercle vicieux doit être rompu en éliminant la cause, en modifiant les voies de dégradation de l'acide arachidonique, en diminuant l'influence des médiateurs de l'inflammation et/ou en augmentant la capacité de régénération du cartilage.

Les principaux objectifs de la prise en charge thérapeutique de l'arthrose chez le chien sont de diminuer la douleur, de limiter la perte de la capacité fonctionnelle et de ralentir la progression de la maladie. La gestion de l'arthrose comporte plusieurs volets ; une activité physique régulière, le maintien d'un poids corporel idéal selon la race, un apport nutritionnel adapté et équilibré, une rééducation physique et l'administration d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) et d'analgésiques (Budsberg, 1997). Les AINS sont traditionnellement utilisés dans le traitement de l'arthrose chez le chien car ils permettent de diminuer la douleur et l'intensité de la boiterie en limitant l'inflammation.

Cependant, ils sont contre-indiqués chez certains patients souffrant d'insuffisance hépatique ou rénale, d'ulcères gastriques ou de coagulopathie, et ne peuvent pas être utilisés à long terme. De plus, des doutes persistent sur leur capacité à limiter l'évolution de la maladie. Les recherches ont donc amené à s'intéresser à des molécules capables, à long terme, de prévenir la dégradation du cartilage et d'améliorer les signes de la douleur associés à l'évolution de l'arthrose. La vitamine E (VE), en plus de ces propriétés antioxydantes classiques, possède des propriétés anti-inflammatoires et analgésiques puisqu'elle agit sur les phospholipases et les cyclooxygénases (Chan et *al.*, 1998). Plusieurs études ont montré l'efficacité de la VE dans le traitement d'affections orthopédiques chez l'homme (Link et *al.*, 1990 ; Scherak et *al.*, 1990). Malgré que la VE soit largement recommandée par les compagnies de fabrication de la nourriture pour la santé des articulations chez le chien, aucune étude n'a démontré son efficacité dans l'arthrose. Ainsi l'hypothèse de cette étude est qu'une forte dose de VE alimentaire chez le chien pourrait à la fois, réduire l'inflammation et les signes de douleur arthrosique, et restaurer les structures anatomiques impliquées dans la progression de l'arthrose. Les objectifs de cette études sont par conséquent de déterminer l'effet d'une forte dose de VE alimentaire ; (1) sur les marqueurs de l'inflammation articulaire (IL-1 β , PGE2 et NOx) et sur les signes de la douleur associée à l'évolution de l'arthrose et ceci par des évaluations subjectives et objectives (VAS, NRS et EDA) ; (2) sur les changements lésionnels des structures anatomiques impliquées dans la progression de l'arthrose chez le chien.

RECENSION DES ÉCRITS

I. Classification des articulations

I.1. Les articulations non synoviales

Ces articulations sont les moins touchées par l'arthrose chez le chien et on distingue les synarthroses qui sont des articulations dépourvues de mobilité, sans cartilage ni membrane synoviale ; les amphiarthroses qui sont des articulations dépourvues de membrane synoviale mais présentant des surfaces articulaires recouvertes de cartilage et liées par des ligaments (Chevalier et Richette, 2005).

I.2. Les articulations synoviales

Une articulation synoviale, ou diarthrose, est composée des épiphyses des deux os adjacents, de formes congruentes et recouvertes successivement par l'os sous-chondral et par le cartilage articulaire (Figure 1). Les épiphyses sont maintenues en contact par une capsule articulaire renforcée par des ligaments, formant avec les muscles et tendons environnants les structures de soutien de l'articulation. La membrane synoviale tapisse la face interne de la capsule et délimite la cavité articulaire contenant le liquide synovial ou synovie (McIlwraith, 2001).

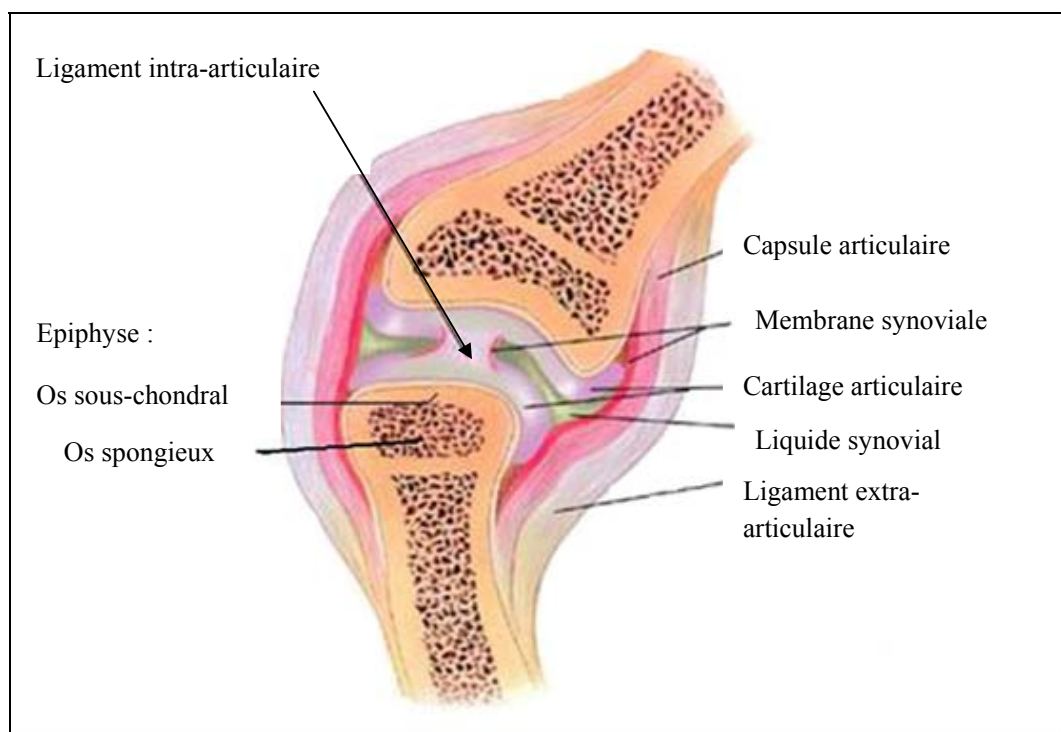


Figure 1 : Représentation schématique d'une diarthrose (McIlwraith, 2001).

L'articulation synoviale est la plus prédisposée à développer l'arthrose chez le chien, et l'unité anatomique qui paye le plus lourd tribut durant cette affection orthopédique est le cartilage articular.

II. Articulation synoviale saine

II.1. Composition du cartilage articular normal

Le cartilage articular chez le chien est un tissu sans innervation et sans vascularisation. L'apport de nutriments au cartilage superficiel et à ses couches profondes se fait par le liquide synovial et par l'os sous-chondral respectivement (Chevalier et Richette, 2005). Son épaisseur varie selon l'articulation, selon l'âge du sujet et selon le point articular considéré. Elle est directement proportionnelle à l'intensité des pressions qui s'exercent sur le cartilage. Ainsi, il y a des différences dans l'épaisseur du cartilage entre les différentes articulations d'une même espèce (Frisbie et *al.*, 2006 ; Pepin et *al.*, 2009). Le cartilage permet le glissement des surfaces osseuses grâce à un coefficient de friction

très faible. C'est un tissu viscoélastique et résistant, ce qui explique sa déformabilité et sa résistance à la compression. Ces propriétés mécaniques lui permettent de jouer deux rôles majeurs ; protéger l'os sous-chondral en amortissant et en répartissant les forces de pression, et protéger l'articulation de l'usure causée par les frottements grâce à sa surface particulièrement lisse (Chevalier et Richette, 2005). Le cartilage normal est composé d'un seul type de cellules, les chondrocytes, et une matrice extracellulaire (MEC).

II.1.1. Les chondrocytes

En microscopie électronique, le chondrocyte est sphérique ou ovoïde, et mesure de 30 à 40 μm de diamètre (Corvol, 2000). Ces cellules ont un noyau central, des prolongements cytoplasmiques, un réticulum endoplasmique développé, un appareil de Golgi, de nombreux lysosomes, des vacuoles lipidiques et des grains de glycogène. Les chondrocytes fonctionnent principalement en anaérobie (Chevalier et Richette, 2005). Ces cellules sont peu nombreuses et représentent moins de 5% du poids sec du cartilage articulaire. Le rôle des chondrocytes est d'assurer l'entretien et le remaniement du tissu cartilagineux. Ils synthétisent les fibres de collagène et les protéoglycanes qui constituent la MEC (anabolisme) tout en assurant la dégradation de cette dernière en sécrétant des enzymes cataboliques (catabolisme). Ces cellules ne migrent pas et se multiplient peu ou pas dans un cartilage articulaire normal (Johnston, 1997).

II.1.2. La matrice extracellulaire (MEC)

La MEC est la partie la plus importante, en volume, du cartilage articulaire et elle est composée d'eau à 65-80 % et de protéines et glycosaminoglycanes (GAG) à 20-35 % du poids humide (Urban, 2000). Elle se compose d'une trame fibrillaire structurale, constituée de fibres de collagène, qui baignent dans une substance composée

essentiellement, à côté de l'eau, par des protéoglycanes, de l'acide hyaluronique, des agrécanes et des protéines de liaison.

II.1.2.1. Le collagène

Les fibrilles de collagène sont le support de la MEC. Il y a 19 types de collagène différents, parmi lesquels le collagène type II, qui est la forme prédominante dans le cartilage articulaire. On trouve cependant aussi du collagène de type V, VI, IX, et X en petites quantités (Johnston, 1997). A l'exception du type X, aucun de ces collagènes n'est spécifique du cartilage articulaire car ils sont aussi présents dans le cartilage de croissance, les fibrocartilages des ménisques et des disques intervertébraux, la cornée, et l'humeur vitrée (Thomas et *al.*, 1994). Cependant, le collagène type II représente 95 % des collagènes du cartilage articulaire. Sa disposition et sa répartition varient en fonction de la couche du cartilage articulaire (Figure 2).

II.1.2.2. Le protéoglycane

Le protéoglycane est le deuxième constituant majeur du cartilage articulaire. Un monomère de protéoglycane est composé d'une protéine axiale ou *core protein* sur laquelle sont fixées un ou plusieurs types de chaînes de GAG. Les GAG les plus représentés dans le cartilage articulaire sont le sulfate de chondroïtine et le sulfate de kératane. Ces chaînes de GAG sont de longueurs variables et composées de la répétition de sous-unités disaccharidiques. Ainsi, le sulfate de chondroïtine est composé de N-acétylgalactosamine et d'acide glucuronique, et le sulfate de kératane est composé de N-acétylglucosamine et de galactose (Johnston, 1997 ; Roughley, 2001). Les PG ont une affinité remarquable pour l'eau en formant un mélange intime sous forme d'un gel polyélectrolytique de pression osmotique élevée qui confère au cartilage son rôle

d'amortisseur (Urban, 2000 ; Chevalier et Richette, 2005). La cohésion PG-collagène est assurée par des molécules appelées adhésines (Figure 2).

II.1.2.3. L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique est un GAG non sulfaté, formé de monomères disaccharidiques constitués de N-acétylglucosamine et d'acide glucuronique (Dougados, 2000). Il forme une chaîne qui interagit de façon non covalente avec les monomères de PG. Cette liaison est stabilisée par une petite glycoprotéine ou protéines de liaison ou *link protein*. Cet assemblage est à l'origine de l'agrécane, qui est la forme prédominante des PG dans le cartilage (Figure 3). L'acide hyaluronique du liquide synovial et de la membrane synoviale est synthétisé par les synoviocytes tandis que celui de la MEC du cartilage est synthétisé par les chondrocytes (Dougados, 2000).

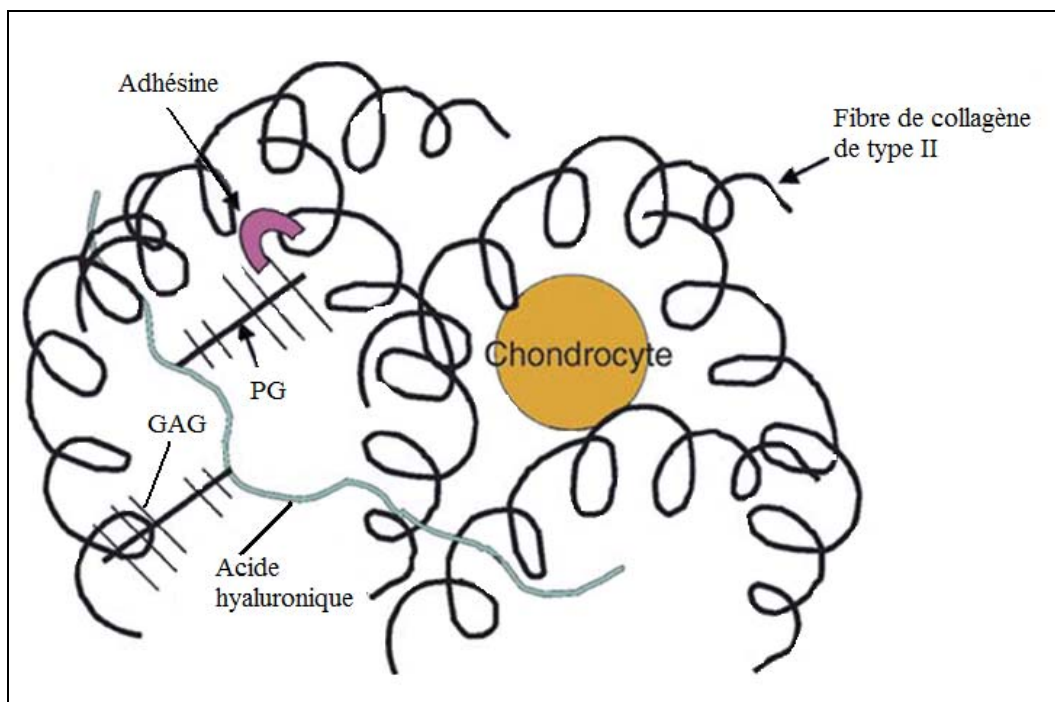


Figure 2 : Disposition du collagène type II, PG, GAG et acide hyaluronique dans la couche moyenne du cartilage articulaire d'après Chevalier et Richette (2005).

II.1.2.4. Les agrécanes

Un agrécane désigne un monomère de PG fixé sur une molécule d'acide hyaluronique (Johnston, 1997). Les agrécanes possèdent d'importantes propriétés hydrophiles et la rétention d'eau qu'ils engendrent au sein de la MEC confère au cartilage normal ses propriétés d'élasticité qui lui permettent de jouer son rôle biomécanique d'amortissement. La dégradation des agrécanes est liée aux changements des propriétés biomécaniques du cartilage. Ce sont les interactions répulsives entre ces agrécanes qui confèrent au cartilage une grande résistance à la compression (Patwari et *al.*, 2000).

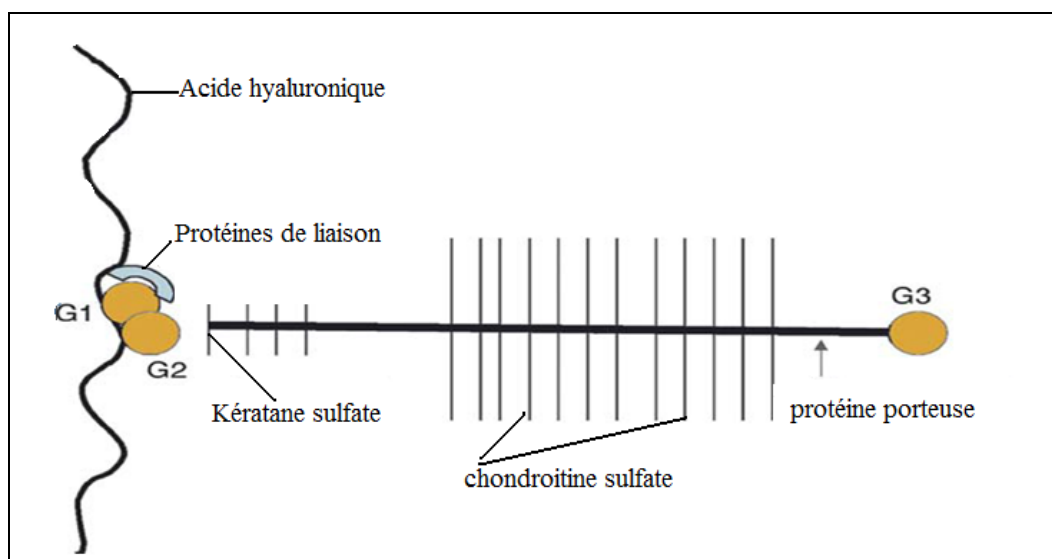


Figure 3 : Représentation schématique des agrécanes d'après Chevalier et Richette (2005). G1, G2 et G3 sont des protéines de liaison.

II. 1.2.5. Autres molécules

D'autres molécules ne sont présentes qu'à un stade physiologique précis ou lors de phénomènes pathologiques. Les CMP (*Cartilage Matrix Protein*) sont de puissantes molécules de liaison entre les chondrocytes et la MEC, formant une trame filamenteuse dans la zone péri-cellulaire des chondrocytes. On n'en retrouve pas dans le cartilage articulaire en bonne santé mais seulement dans le cartilage hypertrophique. La fibronectine pouvant relier la MEC à des récepteurs chondrocytaires n'est détectable

que dans le cartilage articulaire en croissance, âgé ou encore pathologique. De même, des molécules chondrogéniques comme la tenascine ou la laminine ont été mises en évidence dans le cartilage articulaire lors de phénomènes pathologiques (Roughley, 2001). Des molécules d'adhésion entre les chondrocytes et la MEC se trouvent dans le cartilage ; comme l'anchorine, la chondronectine et la fibronectine qui permettent l'attachement des chondrocytes au collagène type II (Roughley, 2001).

Ainsi, la composition simplifiée de la MEC du cartilage articulaire est illustrée dans la Figure 4.

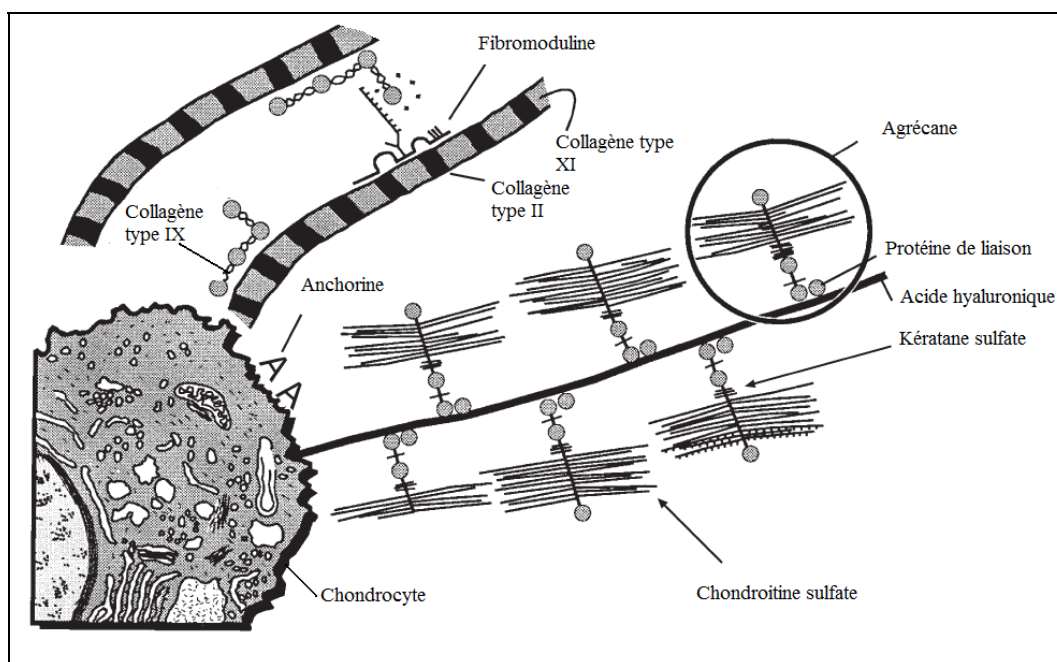


Figure 4 : Composition de la Matrice Extra-Cellulaire du cartilage articulaire chez le chien d'après Hauselmann (2001).

II.2. Morphologie du cartilage articulaire normal

L'organisation du cartilage articulaire chez le chien n'est pas homogène. Quatre zones peuvent être distinguées sur la base de critères morphologiques ; selon l'orientation des fibres de collagène, la répartition du PG et l'organisation des chondrocytes (Figure 5). De l'extérieur vers l'intérieur on distingue ; une couche superficielle qui constitue 5 à 10% de l'épaisseur, où les chondrocytes sont petits et plats avec une allure

fibroblastique, et pourraient correspondre à des préchondrocytes. Les fibres de collagène sont disposées parallèlement à la surface et cette disposition confère une résistance aux forces de tension. Une couche intermédiaire ou moyenne qui constitue 40 à 45 % de la totalité de la hauteur, où la densité de chondrocytes est moindre mais où la concentration en agrécane est plus élevée. Les fibres de collagène, de diamètre plus grand, n'ont pas d'orientation préférentielle dans cette couche. Une couche profonde ou radiale qui constitue 40 à 45 % de la totalité de la hauteur, où la densité de chondrocytes est encore plus faible mais où la concentration en agrécane est encore plus élevée. Le diamètre des fibres de collagène est lui aussi maximal. Les chondrocytes se regroupent en colonnes verticales séparées par des fibres de collagène organisées en rayon perpendiculaire à la surface articulaire. Le contenu aqueux est réduit et cette couche est caractérisée par sa rigidité. Enfin une couche calcifiée ou minéralisée, constitue 5 à 10 % de la totalité de la hauteur, composée de cartilage minéralisé et de chondrocytes hypertrophiques, pauvre en PG. Elle est délimitée superficiellement par la ligne de démarcation de minéralisation qui constitue une barrière interdisant la pénétration des vaisseaux présents dans l'os sous-chondral, et par la plaque sous-chondrale en profondeur. C'est une interface plus ou moins tortueuse servant d'ancrage au cartilage hyalin sur la plaque sous-chondrale (Hayes et *al.*, 2003 ; Dowthwaite et *al.*, 2004 ; Bhosale, 2008 ; Onyekwelu et *al.*, 2009)

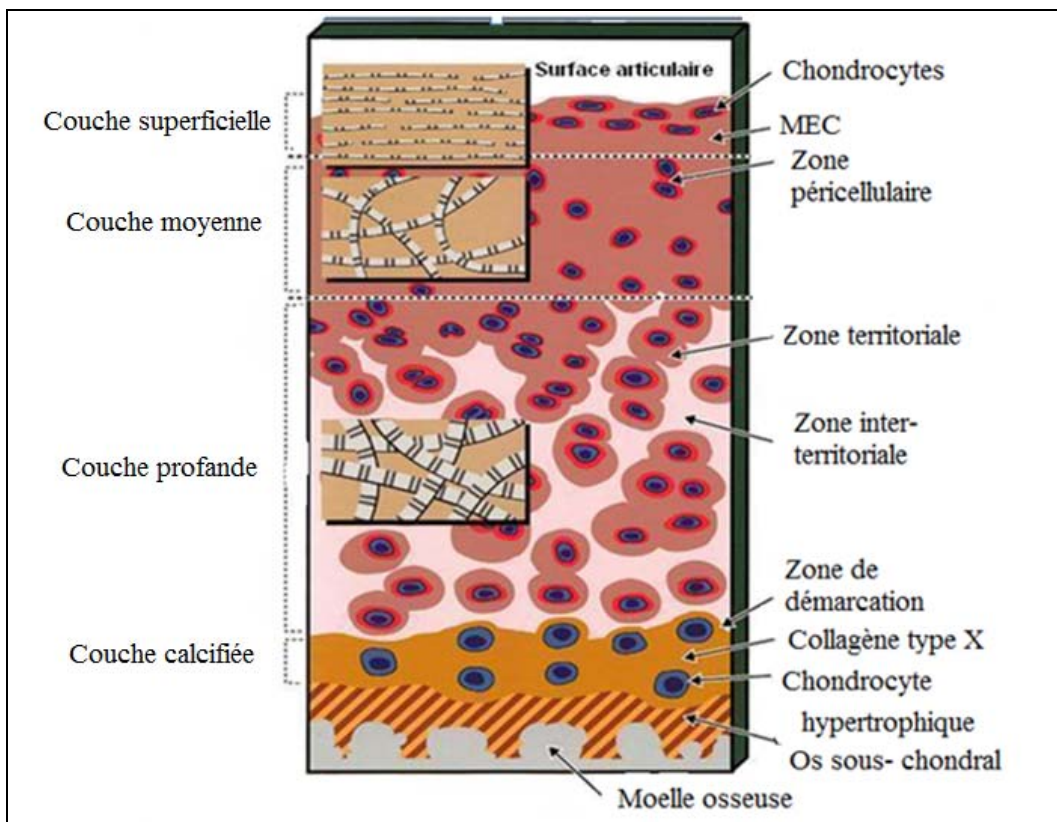


Figure 5 : Structure du cartilage articulaire d'après Poole et *al.* (2001).

II.3. Propriétés physiques et mécaniques du cartilage articulaire normal

Le cartilage articulaire normal chez le chien va permettre le glissement des surfaces osseuses grâce à un coefficient de friction extrêmement faible. Il est résistant, élastique et lubrifié. Il joue en quelque sorte un rôle d'amortisseur, et absorbe ainsi les pressions auxquelles il est soumis. La base de l'os, dénommé os sous-chondral, joue également un rôle important dans les fonctions de résistance et de déformabilité. La composition et l'architecture du cartilage expliquent ses propriétés biomécaniques. On parle d'un tissu viscoélastique et résistant ce qui explique sa déformabilité et sa résistance à la compression. Le caractère élastique est expliqué par l'hydrophilie du PG qui autorise un mouvement de va-et-vient des molécules d'eau au cours des charges mécaniques cycliques c'est « l'effet pompe ». La rigidité du système est assurée par un réseau de

fibres de collagènes type II. L'absence suite à des maladies inflammatoires ou auto-immunes d'effet pompe entraîne à long terme une atrophie du cartilage qui peut faire le lit d'une arthropathie dégénérative comme l'arthrose (Chevalier et Richette, 2005).

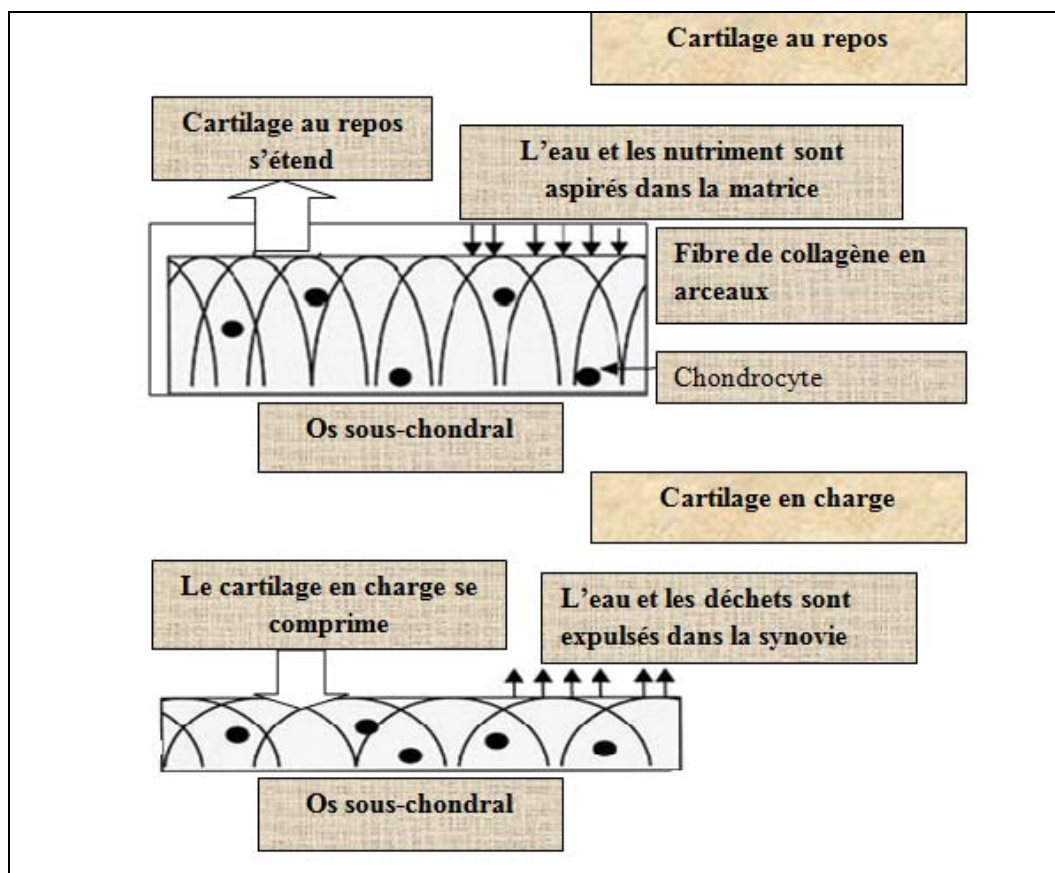


Figure 6 : Représentation schématique du phénomène de « pompe articulaire » d'après Le Blaye (2004).

II.4. Physiologie du cartilage articulaire normal

On trouve de façon physiologique chez le chien, des enzymes de dégradation du cartilage dans la MEC. L'articulation normale maintient un équilibre délicat entre les activités anaboliques et cataboliques associées à un turnover normal de la MEC. Les chondrocytes synthétisent de façon continue les composants de la MEC, ainsi que les enzymes de dégradation qui éliminent la MEC existante (Johnston, 1997). Les activités des chondrocytes sont régulées par plusieurs médiateurs inflammatoires et facteurs de

croissance. Il existe ainsi des facteurs cataboliques telles que les cytokines IL-1 et TNF- α et des facteurs anaboliques comme IGF-1 (Insuline-like Growth Factor-1) et TGF- β (Transforming Growth Factor-beta) (Fernandes et *al.*, 2002 ; Hedbom et Häuselmann, 2002). Dans un cartilage normal, les processus anaboliques et cataboliques évoluent à la même vitesse, ce qui crée un équilibre qui permet de préserver les fonctions biomécaniques du cartilage. Lors d'arthrose, cet équilibre est rompu en faveur des processus cataboliques et donc entraîne l'accélération de la dégénérescence du cartilage articulaire et l'exacerbation de la maladie.

II.5. Os sous-chondral normal

L'os sous-chondral chez le chien, en dehors d'une arthropathie dégénérative, est constitué de tissu osseux spongieux. Il représente une fine couche mince qui sépare le cartilage articulaire de l'os épiphysaire (Burr, 2004). Sa vascularisation très riche et sa faible densité lui confèrent une possibilité d'évolution et de remaniement très rapide. Il se modifie pour former juste en dessous du cartilage articulaire, une couche particulièrement dense et solide ; la plaque osseuse sous-chondrale. Elle se modifie lors de processus inflammatoires ou dégénératifs qui siègent au niveau articulaire (Li B, 1999). Pour que les pressions exercées sur le cartilage ne soient pas focales, l'os sous-chondral entretient une certaine incongruence des surfaces articulaires lorsqu'elles ne sont pas soumises à une charge. Ainsi, lorsque des charges importantes leur sont appliquées, les deux surfaces sont congruentes et les forces sont réparties sur leur ensemble. L'os sous-chondral entretient donc des relations étroites avec le cartilage et fait sans aucun doute partie intégrante de l'organe articulaire (Johnston, 1997). Lors d'arthrose, le cartilage ayant perdu ses facultés d'amortissement, de par son amincissement puis sa disparition, l'os sous-chondral se retrouve alors soumis à des

contraintes mécaniques trop importantes, et des microfractures qui sont responsables des déformations épiphysaires (Johnston, 1997).

II.6. Capsule articulaire normale

La capsule articulaire en dehors d'arthrose chez le chien, est une structure fibreuse très résistante avec une cellularité faible, comprenant majoritairement des fibres de collagène, en particulier de type I, du PG et de l'eau. Elle est doublée intérieurement par la membrane synoviale et extérieurement par des ligaments collatéraux (McIlwraith, 2002). Sa vascularisation limitée rend le temps de cicatrisation lent qui peut aller de 4 à 5 semaines lors de rupture traumatique. Elle est impliquée dans la proprioception et la nociception car elle est riche en fibres nerveuses sensibles et sympathiques (Ralphs et Benjamin, 1994). Elle participe aux symptômes de douleur qu'on observe chez le chien arthrosique. L'arthrose est à l'origine d'un épaissement et une sclérose de la capsule articulaire et donc une réduction de l'amplitude des mouvements.

II.7. Membrane synoviale normale

C'est un tissu conjonctif lâche d'origine mésenchymateuse qui recouvre la face interne de la capsule articulaire. Cette membrane en absence d'arthrose est constituée d'une bordure intimale, du côté de la cavité articulaire et d'un tissu conjonctif sous intimal. Les principales cellules à la surface de la membrane synoviale sont les synoviocytes de type A et B. Les cellules de type A ressemblant à des macrophages sont impliquées dans la résorption de la synovie, et les cellules de type B d'allure fibroblastique jouent un rôle dans l'élaboration du liquide synovial et la synthèse de l'acide hyaluronique. Elle comprend 3 couches de l'extérieur vers l'intérieur; un tissu conjonctif de faible cellularité, contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques ; une couche sous-intimale composée de synoviocytes, fibroblastes, cellules endothéliales, mastocytes et macrophages, dotée d'une vascularisation abondante et finalement, une couche intimale

composée de 2 ou 3 strates de cellules synoviales ou synoviocytes, sa surface interne étant recouverte de villosités microscopiques qui peuvent s'hypertrophier lors de processus pathologique, comme l'arthrose (McIlwraith, 2001). La membrane synoviale est richement vascularisée et cette vascularisation lui permet une grande capacité réactionnelle en cas d'inflammation et donc une cicatrisation rapide et facile (Johnston, 1997).

II.8. Liquide synovial ou synovie

Le liquide synovial, ou synovie, est élaboré par la membrane synoviale. En absence d'arthrose il est peu abondant, très visqueux, transparent et difficile à aspirer (Damiano et Bardin, 2005). Le liquide synovial normal contient moins de 300 cellules/mm³. Il correspond à un dialysat sélectif du plasma auquel manquent les protéines de poids moléculaire élevé. Le liquide synovial sert de lubrifiant pour l'articulation, amortit les chocs et évite le contact des cartilages articulaires entre eux. Cette lubrification permet les glissements des surfaces articulaires tout en prévenant les adhésions ou abrasions et a donc un rôle important pour inhiber la dégénérescence du cartilage articulaire. Ce pouvoir lubrifiant du liquide synovial est dû à l'abondance en acide hyaluronique de haut poids moléculaire et explique sa viscosité. Le liquide synovial a un pouvoir nutritif, il permet aussi l'évacuation des débris issus du cartilage articulaire (Allan, 1998). Lors d'arthrose, il ya une augmentation du volume du liquide synovial et une diminution de la viscosité ce qui va entraîner un trouble mécanique dans le fonctionnement du cartilage articulaire.

III. Articulation synoviale arthrosique

III.1. Physiopathologie de l'arthrose

III.1.1. Facteurs prédisposants

L'arthrose se définit chez le chien comme une affection douloureuse et déformante des articulations synoviales, primitivement dégénérative et non inflammatoire, mais caractérisée par une inflammation chronique d'intensité variable, associée à une dégradation du cartilage articulaire. Elle est caractérisée par la formation d'ostéophytes, un remodelage osseux, et des modifications des tissus périarticulaires (Johnston, 1997).

L'arthrose résulte d'un déséquilibre entre les contraintes qui s'exercent sur le cartilage et la résistance mécanique de ce dernier, ce phénomène correspond à deux situations. En effet, la dégénérescence du cartilage ou chondrose mécanique, est la conséquence des contraintes mécaniques anormalement élevées qui s'exercent sur un cartilage initialement normal. C'est le cas d'une instabilité articulaire, des fractures, des déchirures ligamentaires, d'obésité, d'anomalie de conformation articulaire, de défaut d'aplomb et d'immobilisation articulaire prolongée. Alors que pour les chondroses structurelles, qui sont observées suite à une altération des propriétés mécaniques du cartilage consécutives à une inflammation articulaire chronique d'origine auto-immune, ou liées à l'âge et aux facteurs biochimiques et héréditaires. Toutefois, ces deux types de chondroses sont souvent associés chez le même chien (Genevois, 2005).

Le processus physiopathologique à l'origine de l'arthrose, implique le cartilage articulaire, l'os sous-chondral, les ligaments, la capsule articulaire, la membrane synoviale et les muscles périarticulaires (Reginster et Henrotin, 2000).

III.1.2. La dégradation du cartilage

III.1.2.1. Enzymes responsables du catabolisme : les métalloprotéases

Les métalloprotéases de la matrice (MMPs) et les agrécanases sont des enzymes responsables de la dégradation de la MEC. Elles font partie de la famille des métalloprotéases et sont inhibées physiologiquement par les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases (TIMPs). Lors d'arthrose, la production des TIMPs est insuffisante pour contrôler l'augmentation d'activité des MMPs. Lors d'arthrose, les MMPs les plus importantes dans la destruction de la MEC sont les collagénases, les gélatinases et les stromélysines. Les collagénases clivent la triple hélice de collagène en fragments. Les gélatinases peuvent lyser ces fragments de collagène mais sont aussi à l'origine du clivage de l'agrécan. Les stromélysines sont capables de dégrader l'agrécan, le collagène type II dénaturé, et le petit PG de la MEC. Les agrécanases sont les principales enzymes de dégradation de l'agrécan. Leur rôle est de libérer la protéine axiale et les GAG dans le liquide synovial (Neil *et al.*, 2005).

III.1.2.2. Facteurs de régulation : les cytokines

Les cytokines pro-inflammatoires (IL1 et PGE2) sont produites par la membrane synoviale et diffusent dans le liquide synovial jusqu'au cartilage où elles activent les chondrocytes. Ceux-ci produisent à leur tour des cytokines dont IL-1, TNF- α , IL-6, IL-17 et LIF (Leukemia Inhibitor Factor). L'IL-1 et le TNF- α sont les principaux acteurs de la dégradation du cartilage. Ces deux cytokines sont trouvées en quantité élevée dans la membrane synoviale, le liquide synovial et le cartilage lors d'arthrose. Les chondrocytes présents dans le cartilage arthrosique surexpriment les récepteurs IL-1 et TNF- α (cytokines impliquées dans la fonction catabolique), alors que l'expression des récepteurs TGF- β (Transforming Growth Factor), un facteur de croissance impliqué dans la réparation du cartilage, est diminuée. Plusieurs études récentes ont démontré que

l'IL-1 β joue un rôle important dans la régulation du turnover de la MEC, mais elle aurait besoin d'autres facteurs pour jouer un rôle dans l'arthrose, en particulier le TNF- α et IL-6 (Henrotin et *al.*, 2005).

Les cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6 et IL-17) se fixent sur les récepteurs des cellules impliquées dans la réaction inflammatoire et transmettent un signal qui va amener à la production de protéines de l'inflammation et à la synthèse d'enzymes protéolytiques. Ces enzymes vont détruire la MEC en clivant les fibres de collagène, principaux constituant de la MEC (Lotz, 2001). La principale cytokine incriminée au cours de l'arthrose est l'IL-1 β (Figure 7), elle inhibe la synthèse des composants matriciels tels que le collagène type II et le PG. Par ailleurs, elle induit la dégradation des composants matriciels en augmentant l'expression des MMPs et des agrécanases. Elle crée ainsi un déséquilibre entre le taux des enzymes et de leurs inhibiteurs naturels en défaveur de ces derniers (Chevalier, 1997). Une partie de cet effet inhibiteur est véhiculée par l'intermédiaire du NO dont la production est stimulée par l'IL-1 β et dont l'action majeure se traduit par l'apoptose des chondrocytes (Goggs et *al.*, 2003). Une autre action de l'IL-1 β est d'induire la production de prostaglandines pro-inflammatoires notamment la PGE2 via l'expression de la phospholipase A2 et de la cyclo-oxygénase-2 [Cox-2] à partir des phospholipides membranaires (Pelletier et *al.*, 2001). L'action de l'IL-1 β est régulée par des inhibiteurs naturels tels que les récepteurs solubles ou encore le récepteur antagoniste (IL1Ra). Il a été montré que IL1Ra est produit en quantité insuffisante au cours de l'arthrose, comparativement à la production d'IL-1 β . La production d'IL1Ra est inhibée par le NO, ce qui augmente en retour l'activité de l'IL-1 β (Pelletier et *al.*, 2000). Les cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL4 et l'IL10 peuvent contrecarrer l'action de l'IL-1 β soit directement en inhibant sa synthèse, soit indirectement en inhibant la synthèse de la iNOS (NO synthase inductible) qui est l'enzyme majeure impliquée dans la production du NO (Berenbaum, 2000). Des

facteurs de croissance peuvent aussi réguler les actions de l'IL-1 β , c'est le cas par exemple de l'IGF1 et du TGF β qui vont augmenter la synthèse des produits matriciels et inhiber l'apoptose des chondrocytes (Golding, 2000).

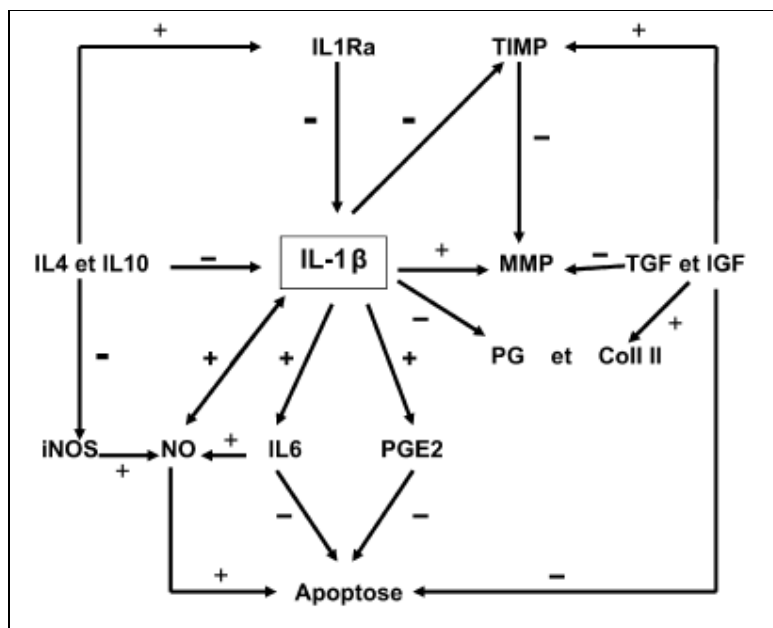


Figure 7 : IL-1 β au cœur de la balance entre facteurs anaboliques et cataboliques au cours de l'arthrose d'après Laadhar et *al.* (2007).

III.1.2.3. Médiateurs de l'inflammation arthrosique (NOx et PGE2)

Le NO est un radical libre inorganique cytotoxique trouvé en grande quantité dans le cartilage arthrosique. Il provient de l'oxydation de la L-arginine par la NO synthase inducible (iNOS). Il aggrave l'inflammation et la dégénérescence du cartilage articulaire en augmentant la production des cytokines IL-1 β et IL-6 et l'expression des MMPs en inhibant la synthèse du PG et du collagène type II et en inactivant les TIMPs. Au cours de l'arthrose la quantité de NO libérée est augmentée en raison de la surexpression de la iNOS (Chan et *al.*, 2005).

La PGE2 appartient à la famille des eicosanoïdes, famille qui englobe les composés lipidiques oxygénés dont la chaîne carbonée possède 20 carbones, la biosynthèse de PGE2 résulte de trois réactions enzymatiques. L'étape initiale est une libération de

l'acide arachidonique (AA) à partir des membranes cellulaires par l'action hydrolytique des phospholipases. En réponse aux stimuli inflammatoires, la phospholipase A2 (PLA2) se mobilise vers la membrane pour libérer de façon directe l'AA. Métabolisé par les cyclo-oxygénases (Cox1 et Cox2), l'AA est séquentiellement oxydé en PGG₂ et transformé en un intermédiaire lipidique instable, la PGH₂. Ce dernier composé est rapidement converti en divers prostanoides. L'enzyme terminal de synthèse de la PGE₂ est la PGE synthase (PGES). Les études pharmacologiques ont identifié quatre récepteurs EP pour la PGE₂ : EP1, EP2, EP3, EP4. (Shi et Klotz, 2008) (Figure 8).

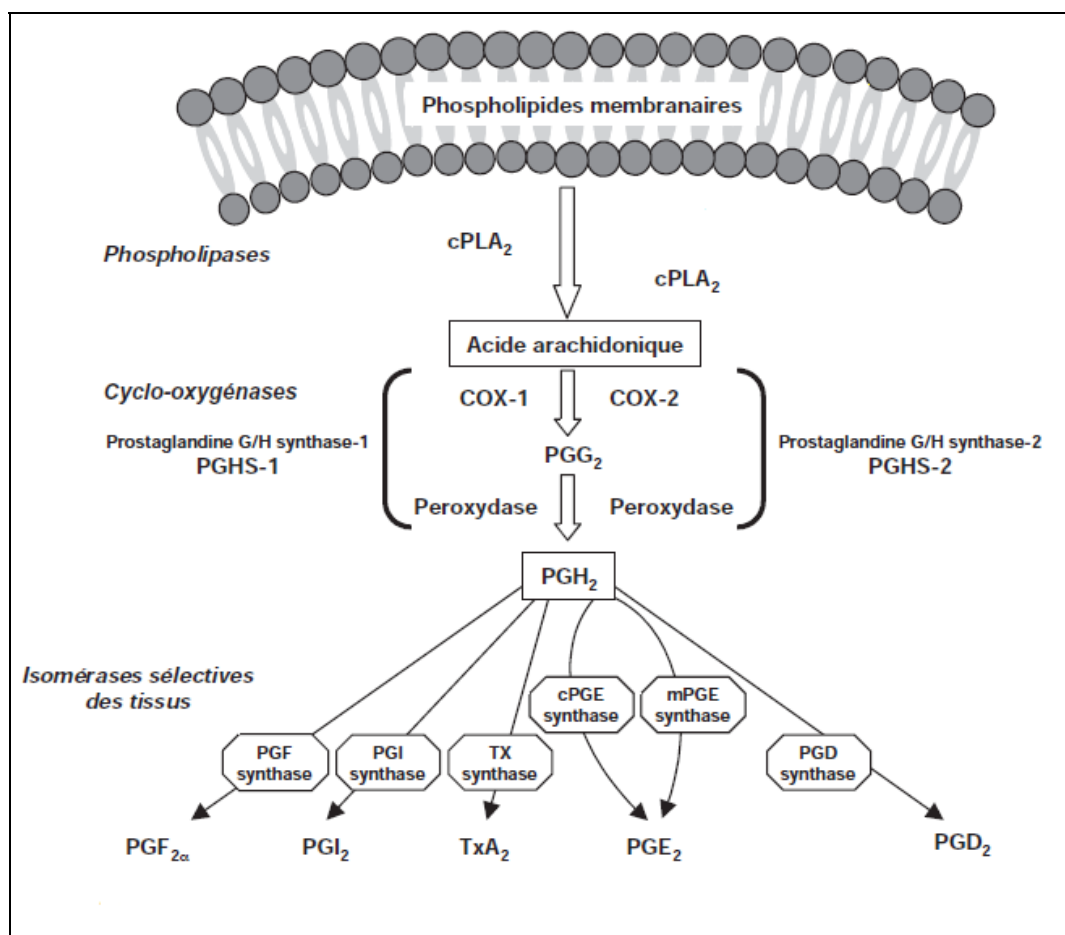


Figure 8 : Voies de biosynthèse des prostanoides d'après Jouzeau *et al.* (2004).

La PGE₂ un médiateur de l'inflammation responsable de l'hyperalgie par augmentation de la sensibilité des récepteurs à la douleur. La PGE₂ possède une activité pro-inflammatoire puissante pour la membrane synoviale et joue un rôle majeur dans

l'apparition de la synovite. Elle provoque une augmentation de la vasodilatation et de la perméabilité vasculaire, et possèdent des effets chimiotactiques (Chan *et al.*, 2005).

III.1.2.4. Radicaux libres

Le métabolisme cellulaire produit à l'état physiologique une variété de radicaux libres dérivés de l'oxygène (RLO). Dans certaines conditions pathologiques, ces RLO ainsi que leurs dérivés sont produits de façon excessive. Parmi les RLO, l'anion superoxyde (O_2^-) joue un rôle clé dans l'inflammation en général, et dans les maladies rhumatismales en particulier (Afonso *et al.*, 2007). Ces RLO sont synthétisés par les macrophages et les neutrophiles lors de la phagocytose (Martel-Pelletier, 1997).

Les RLO ont montré un rôle majeur dans la pathogénie de l'arthrose. Leur influence sur la destruction cartilagineuse a déjà été montrée dans plusieurs modèles d'arthrose ; chez la souris (Kurtz *et al.*, 2000), et chez le cheval (Van der Harst *et al.*, 2006). Des traitements avec des molécules antioxydantes et antiradicalaires (VE et Sélénium) ont montré une amélioration significative des lésions d'arthrose chez la souris.

La physiologie complète de l'arthrose est simplifiée dans la figure 9, qui montre l'association des cytokines pro-inflammatoires, PGE2 et NOx dans la genèse et l'expression des MMPs responsables de la dégradation du cartilage et l'entretien du cercle vicieux de dégradation une fois installé.

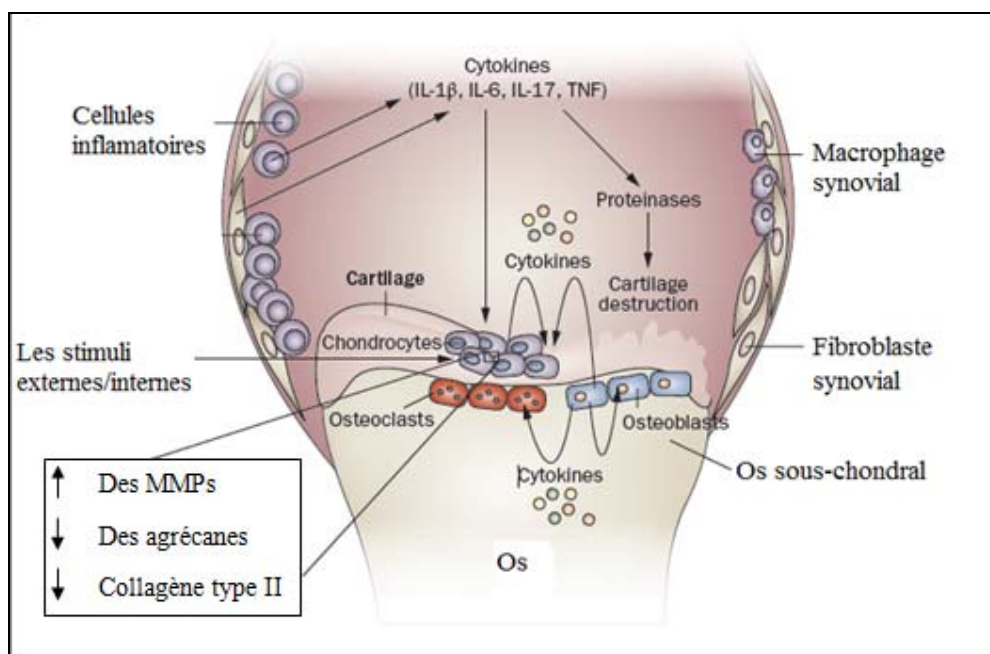


Figure 9 : Physiopathologie de l'arthrose d'après Kapoor et *al.* (2011).

III.1.3. Altérations physiques du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est, en général, la première structure articulaire altérée lors d'arthrose. Ainsi chez le chien, après rupture du LCC, qui constitue un facteur déterminant dans l'apparition de l'arthrose, seulement 3 à 4 semaines sont nécessaires à l'apparition d'anomalies macroscopiques. Les lésions s'installent généralement en zone de charge. Elles débutent par une phase d'œdème du cartilage non observable macroscopiquement, suivie d'une perte de substance qui donne un aspect opaque et dépoli au cartilage (Genevois, 2005). C'est le stade de fibrillation correspondant à une fuite du gel d'agrégats hors des mailles du filet collagénique, provoquant une aggravation de la perte d'élasticité et de résistance du cartilage, et par la suite une rupture des fibres de collagène. Si la dégradation du cartilage s'accroît, les fibres de collagènes se rompent et des fissures cartilagineuses apparaissent. D'abord tangentielles à la surface, ces fissures deviennent progressivement perpendiculaires à la plaque osseuse sous-chondrale. La fissuration aboutit à une perte progressive du tissu cartilagineux dont l'épaisseur s'amenuise. Le cartilage peut finir par disparaître totalement, l'os sous-

chondral étant mis à nu, on parle alors d'éburnation qui est le stade terminal des lésions du cartilage articulaire lors d'arthrose chez le chien (Genevois, 2005).

III.1.4. Formation d'ostéophytes

La formation d'ostéophytes est une des principales modifications radiologiques de l'arthrose chez le chien, et c'est un critère pathognomonique de cette maladie. Ce sont des excroissances osseuses de tissu spongieux recouvertes d'un fibrocartilage néoformé. La production d'ostéophytes correspond à une tentative de réparation aberrante sous l'effet de facteurs de croissance produits localement (Laadhar et *al.*, 2007). Ils se développent en général à la périphérie de l'articulation, le plus fréquemment à la jonction de la synoviale avec le périoste. Ces ostéophytes peuvent avoir des répercussions cliniques non négligeables et sont à l'origine de douleur et de perte de fonction, avec réduction de la mobilité articulaire. (van der Kraan et van den Berg, 2007).

On estime généralement que les ostéophytes augmentent la stabilité de l'articulation en élargissant les surfaces articulaires. Ils participent parallèlement au phénomène douloureux par distension du périoste et des tissus périarticulaires, et peuvent entraver le mouvement de l'articulation (Genevois, 2000). Plusieurs facteurs biochimiques ont été étudiés et certains d'entre eux stimulent le développement des ostéophytes, parmi lesquels le TGF- β et l'IGF-1. Cependant, une stimulation mécanique de l'articulation semble être nécessaire à l'initialisation du processus de formation des ostéophytes (van der Kraan et van den Berg, 2007).

III.1.5. Modifications de la membrane synoviale et de la synovie

On observe souvent dans l'arthrose chez le chien, une discrète inflammation synoviale, plus rare au stade initial de la maladie. Il s'agit vraisemblablement d'un phénomène

secondaire provoqué par des débris de cartilage ou de cristaux qui se retrouvent dans le liquide synovial.

Les modifications histologiques sont très précoces et apparaissent 1 à 2 semaines après rupture expérimentale du LCC (Johnston, 1997). La synovite peut également être présente sans lésions cartilagineuses et elle est à l'origine de la majorité de la douleur arthrosique. On constate une augmentation de la vascularisation et du nombre de couches cellulaires un développement des villosités synoviales et une infiltration leucocytaire du tissu sous synovial (Johnson et Johnson, 1993). Les lésions microscopiques qui caractérisent la membrane synoviale lors d'arthrose sont la fibrose diffuse, la formation d'agrégat lymphoïde et la fibrose périvasculaire qui varient en fonction de l'état d'avancement de l'arthrose et des sites d'examen (Revell et *al.*, 1988). Macroscopiquement, la membrane synoviale lors d'arthrose est couverte d'innombrables villosités, La fibrose de la membrane, fréquemment observée lors d'arthrose, serait liée à l'IL-1 stimulant la synthèse de collagène par les fibroblastes de la membrane synoviale (Pelletier et *al.*, 1994). Lors d'arthrose, l'élasticité et la viscosité du liquide synovial peuvent être diminuées par la présence de molécules d'acide hyaluronique de plus bas poids moléculaire et par l'effet de dilution causé par l'exsudation de liquide dans la cavité synoviale suite à la réaction inflammatoire. Le liquide synovial est généralement d'aspect normal voire subnormal. Il peut devenir légèrement opalescent et perdre en partie son aspect jaune visqueux. Généralement, une augmentation de volume, liée à l'hydarthrose, est constatée (Johnston, 1997).

III.1.6. Modification de l'os sous-chondral

L'os sous-chondral se modifie en fonction des charges qui lui sont appliqués au cours du temps. Ces charges entraînent des remodelages, compromis entre synthèse et résorption (Barneveld et Van Weeren, 1999). Le processus de remodelage est initié par

une phase de résorption, qui implique l'activation des ostéoclastes. Ces derniers ont pour rôle de dégrader la matrice osseuse minéralisée (Teitelbaum, 2007). Ensuite, vient la phase de formation, implique l'activation des ostéoblastes, durant laquelle on observe une minéralisation soit rapide soit lente qui mène à la formation d'un os hypominéralisé facile à se déformer sous pression (Burr, 2004).

Le mécanisme de cette activité est encore méconnu. De plus, IL-1 sécrétée par les chondrocytes et les synoviocytes lors d'arthrose, entraîneraient une résorption osseuse en activant les ostéoclastes (Ding et *al.*, 2003). Le turn-over accéléré des ostéocytes modifie les propriétés absorbantes de l'os sous-chondral qui se sclérose ce qui conduit à l'apparition de microlésions. En réponse à ces dernières, une néo vascularisation se met en place et envahit le cartilage calcifié puis hyalin. Le cartilage se calcifie alors au niveau de la zone de démarcation. L'épaisseur de cartilage hyalin diminue et on retrouve plusieurs zones de démarcation irrégulières (Norrdin et *al.*, 1999).

III.1.7. Douleur arthrosique

La douleur est un signe majeur de l'arthrose chez le chien. Le cartilage articulaire n'est pas innervé, mais la capsule articulaire, le périoste, les ligaments et l'os sous-chondral le sont. Les récepteurs nociceptifs peuvent être activés par un stimulus mécanique ou chimique. Lors de stimulation d'un de ces récepteurs, la réponse peut être une contracture musculaire à l'origine d'une aggravation de la douleur (Genevois, 2005). Les neuropeptides sont des petites molécules synthétisées dans les racines neuronales et qui peuvent être libérées sous l'effet d'une stimulation nerveuse. Il existe beaucoup de neuropeptides, mais deux semblent jouer un rôle important dans l'arthrose chez le chien : la substance P et la calcitonine. Ces deux neuropeptides sont à l'origine d'une vasodilatation et d'une inflammation, et la substance P est associée à un état hyperalgique. La libération de substance P dans l'articulation a été associée à une

arthrose sévère. Suite à l'amincissement du cartilage articulaire, la pression exercée sur l'os sous-chondral est plus importante. Cela va entraîner une stimulation des nocicepteurs qui sont à l'origine de douleur qui entraîne une situation auto-aggravante. En effet, la douleur induit une diminution de l'exercice physique qui peut conduire à une atrophie musculaire. En conséquence les tensions sur la capsule, les ligaments et le cartilage articulaire augmentent, et les lésions du cartilage sont à l'origine de la libération de médiateurs de l'inflammation, d'où une diminution du seuil nociceptif et une hyperalgésie (Vergne-Salle *et al.*, 2004 ; Genevois, 2005).

L'arthrose est donc bien une pathologie d'organe. Sur le plan chronologique, elle se décompose en deux temps ; une phase de déséquilibre de l'homéostasie du cartilage puis une phase de dégradation de ce dernier. La connaissance de la physiopathologie de cette affection orthopédique aidera à la compréhension du mécanisme d'action des substances testées dans le cadre de la gestion de cette maladie.

III.1.8. Traitement de l'arthrose chez le chien

Le diagnostic de l'arthrose chez le chien se base sur l'historique de la maladie, les observations cliniques et les examens radiographiques. L'examen clinique consiste en une palpation (sensation du chaleur ou du gonflement) et une mobilisation (flexion, extension, abduction et adduction) de chaque articulation. La radiographie permet de révéler un épanchement articulaire, des ostéophytes sur les bords de l'articulation et une sclérose de l'os sous-chondral ou un rétrécissement de l'espace articulaire. Des examens complémentaires tels qu'une arthrocentèse, une analyse de sang et du liquide synovial et d'autres types d'imagerie médicale peuvent s'avérer nécessaires pour confirmer le diagnostic de la maladie (Beale, 2005).

L'objectif du traitement de l'arthrose chez le chien est de soulager l'animal, réduire la douleur et l'inflammation, améliorer l'activité de l'articulation et ralentir ou arrêter le processus arthrosique.

III.1.8.1. Traitement hygiénique

Le principal objectif de ce traitement doit être une perte de poids chez les chiens en surcharge pondérale et l'élimination du poids gagné pendant la période de mobilité réduite consécutive à l'arthrose. Chez les chiens obèses atteints d'arthrose, la perte de poids peut à elle seule améliorer les fonctions locomotrices (Impellizeri et *al.*, 2000).

Une alimentation appropriée de jeunes chiens prédisposés aux maladies orthopédiques diminue significativement la prévalence et la sévérité de l'arthrose dans différentes articulations (Kealy et *al.*, 2000). Il est important de lutter contre l'amyotrophie et entretenir la mobilité articulaire par le biais d'un exercice régulier adapté à l'état de l'animal. Ainsi, pour un chien présentant une rupture des ligaments croisés, les promenades en laisse sont préférables à l'exercice en liberté dans de grands espaces ; il faut éviter de soumettre l'articulation instable à des rotations fréquentes. Il est préconisé de prescrire au chien avec arthrose un repos strict pendant 3 à 5 jours au moment des crises aiguës, puis un type d'exercice variable en fonction de l'état du chien, qui ne doit pas entraîner l'apparition d'une douleur, d'une boiterie ou d'une raideur (Genevois, 2005).

III.1.8.2. Traitement médical

III.1.8.2.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les AINS sont les plus fréquemment recommandés dans le traitement de l'arthrose chez le chien. La popularité de cette classe de médicaments dans la gestion de cette affection

orthopédique est généralement attribuée à leur efficacité dans la réduction des symptômes, de l'inflammation et leur facilité d'administration chez le chien.

Les AINS bloquent la transformation de l'AA en médiateurs de l'inflammation par le biais de la voie des cyclo-oxygénases (COX) ; la COX1 (constitutive) stimule la production de certains prostaglandines qui ont un rôle physiologique dans l'organisme, tandis que la COX-2 (inductible) stimule la production de PGE₂, en réponse à une « agression » inflammatoire, ou infectieuse, et est responsable de signes cliniques tels que la douleur et l'hyperémie (articulation chaude, surproduction de liquide synovial) (De Leval et *al.*, 2000). Certains AINS (tepoxalin, kétoprofène, carprofène et licofelone) agissent également sur la voie des lipo-oxygénases en empêchant la libération des leucotriènes (Genevois, 2005). Les leucotriènes sont connues par leur stimulation de la production des cytokines pro-inflammatoires essentiellement l'IL-1 β (Jovanovic et *al.*, 2001). Les différents AINS utilisés chez le chien pour la gestion de l'arthrose ainsi que les doses recommandées et les voies d'administration sont présentés dans le tableau I. Les AINS sont généralement associés à des effets secondaires consécutifs à leurs mécanismes d'action, ces effets sont essentiellement très marqués au niveau digestive et rénal. Les lésions digestives induites par les AINS consécutives à l'inhibition de COX-1, altèrent considérablement les barrières de protection naturelles de la muqueuse digestive qui devient alors sensible à l'action locale des stimuli inflammatoires. Les lésions engendrées peuvent aller de la simple hémorragie sous-mucosale, puis l'érosion et l'ulcération pouvant mener à la perforation digestive avec péritonite. Chez le chien, ces lésions sont principalement gastriques et duodénales (Wallace et *al.*, 1990 ; Johnston et *al.*, 1995). Lorsque ces lésions sont associées à une expression clinique, l'animal présente généralement un abattement, de l'anorexie, des vomissements (avec ou sans sang), du méléna, des muqueuses pâles et une douleur abdominale. Lors de perforation digestive, l'animal est généralement présenté en état de choc. À côté des

effets secondaires au niveau digestif, il y a des effets secondaires rénaux, causés par la capacité des AINS à inhiber la production des prostanoïdes produits par le rein. Celle-ci provoque une diminution de la perfusion, une insuffisance fonctionnelle et une ischémie rénale. Lorsque cette ischémie se prolonge, les cellules épithéliales tubulaires dégèrent, nécrosent puis finissent par desquamer dans la lumière tubulaire. Cliniquement, les chiens présentent tous les signes d'une insuffisance rénale aiguë oligo-anurique (Narita et *al.*, 2005).

Au niveau hématologique, les AINS sont capables d'inhiber l'activité des cyclo-oxygénases plaquettaires et sont susceptibles d'altérer la fonction plaquettaire, en empêchant la synthèse des thromboxanes (TX). Des études ont montré qu'une administration unique de kétoprofène (2 mg/kg en sous-cutané ou intra-musculaire) à des chiens en bonne santé, inhibe fortement l'agrégation plaquettaire au moins 24 heures (Dossin et *al.*, 1998 ; Lemke et *al.*, 2002).

L'utilisation de certains AINS chez le chien fut, comme pour beaucoup d'autres médicaments, à l'origine d'épiphénomènes d'hépatotoxicité ; ils ont été rapportés, par exemple, dans le cas du carprofène et l'acétaminophène (McPhail et *al.*, 1998 ; MacNaughton, 2003). Ainsi les AINS sont à proscrire chez les chiens souffrants d'insuffisance rénale ou de maladies digestives.

Plusieurs études ont démontré *in vitro* les effets néfastes de certains AINS sur la synthèse des protéoglycanes par les chondrocytes. Ces effets sont plus prononcés pour les chondrocytes provenant de cartilage arthrosique que pour les chondrocytes du cartilage sain. L'acide acétylsalicylique, l'ibuprofène, l'indométacine et le fénoprofène ont des effets délétères, à certains dosages, sur les cultures des chondrocytes favorisant ainsi l'évolution de l'arthrose en accélérant la destruction du cartilage articulaire. Le kétoprofène, le carprofène, le piroxicam, le méloxicam sont classés comme des AINS

n'ayant pas d'activité catabolique sur le cartilage articulaire (Benton et *al.*, 1997 : Genevois, 2005).

Tableau I : AINS utilisés chez le chien pour la gestion de l'arthrose d'après Beale, 2005 ; Henrotin et *al.*, 2005; Johnston et *al.*, 2008; Innes et *al.*, 2010.

Principe actif	Doses et voies d'administration	Indications	Effets secondaires
Acide acétylsalicylique	10 à 25 mg/kg 2 à 3 fois/jour (Per os)	Pas d'essais cliniques qui ont évalué son efficacité dans l'arthrose	Saignements et érosions gastriques
Carprofène	2,2 mg/kg 2 fois/jour ou 4,4 mg/kg une fois/jour (Per os)	Réduit le score de la boiterie, diminue la taille des ostéophytes et des lésions du cartilage	Toxicité gastro-intestinale et toxicose hépatocellulaire
Etodolac	10 à 15 mg/kg une fois/jour (Per os)	Soulage la douleur associée à l'arthrose de la hanche	Kératoconjunctivite sèche, une hypoprotéïnémie et une diarrhée
Meloxicam	0,1 mg/kg une fois/jour (Per os) 5 mg/mL (IV ou SC)	soulage la douleur arthrosique	Diarrhée, Toxicité gastro-intestinale réduite
Licofelone	2,5 à 5 mg/kg une fois/jour (Per os)	Réduit les lésions du cartilage	Toxicité gastro-intestinale réduite
Tepoxalin	10 à 20 mg/kg une fois/jour (Per os)	Pas d'essais cliniques qui ont évalué son efficacité dans l'arthrose	Vomissement et diarrhée
Firocoxib	5 mg/kg une fois/jour (Per os)	Réduit le score de la douleur associée à l'arthrose	Vomissement et diarrhée
Deracoxib	3 à 4 mg/kg une fois/jour (Per os)	Réduit le score de la boiterie associée à l'arthrose	Toxicité gastro-intestinale (ulcérogène)

IV : intraveineuse. SC : sous-cutanée

III.1.8.2.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Ils agissent à toutes les étapes de la cascade pathogénique qui aboutit à la dégradation du cartilage et inhibent l'activité de la phospholipase au début du cycle inflammatoire. L'utilisation des corticoïdes chez le chien avec arthrose est habituellement réservée à des stades avancés de la maladie (Henrotin et *al.*, 2005). Il est démontré, que les corticoïdes ont un rôle préventif sur la progression de l'arthrose ; en effet, dans un modèle expérimental d'arthrose par section du LCC chez le chien, l'injection intra-articulaire de l'acétate de méthylprednisolone (20mg) au moment de l'intervention chirurgicale, puis un mois plus tard, réduit significativement la taille des ostéophytes et des lésions histologiques au niveau du cartilage articulaire (Pelletier et *al.*, 1994). Cependant, l'utilisation prolongée ou répétée de ces substances, en particulier par voie intra-articulaire et à dose élevée, est contre-indiquée à cause de leur effet inhibiteur de la régénération du cartilage. En effet, il a été démontré *in vitro* que des fortes doses des corticoïdes ont un effet cytotoxique sur les chondrocytes, ce qui se traduit par une diminution de la synthèse chondrocytaire du collagène et des protéoglycanes (Genevois, 2005).

III.1.8.2.3. les analgésiques

Ces substances sont utilisées chez le chien avec arthrose dans le cadre d'une thérapie multimodale afin de bien contrôler la douleur et réduire la dose administrée pour limiter les effets secondaires des AINS. Cependant, l'efficacité d'une dose modifiée d'un traitement ou une combinaison de plusieurs traitements pour gérer l'arthrose est toujours sous investigations (Kidd et *al.*, 2007). Parmi les analgésiques les plus utilisés chez le chien, on note essentiellement le tramadol, l'amantadine, la gabapentine et l'amitriptyline (Tableau II). Le tramadol est un antalgique ayant un effet opioïde faible

(action sur les récepteurs morphiniques μ) et un effet monoaminergique (inhibition de la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine). Sa puissance analgésique est d'environ 1/4 à 1/3 de celle de la morphine (Mathews, 2008). L'amantadine inhibe le *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA), un récepteur qui assure la transmission de l'influx nerveux sur un mode de dépolarisation lente et qui participe à l'établissement possible d'une douleur chronique (Johnston et *al.*, 2008). La gabapentine est un agent antiépileptique utilisée également dans le traitement des douleurs neuropathiques, elle semble agir *via* les canaux calciques voltage-dépendants, mais son mécanisme d'action n'est pas encore parfaitement connu (Johnston et *al.*, 2008). L'amitriptyline est un antidépresseur tricyclique, utilisé en médecine vétérinaire essentiellement dans le traitement des troubles du comportement. L'amitriptyline agit comme un antagoniste du NMDA, elle agit au niveau périphérique par blocage des canaux sodiques (Dick et *al.*, 2007). Il a été rapporté qu'une prise journalière de 2 à 4 semaine de cette molécule augmente l'efficacité du traitement de l'arthrose.

Tableau II : les analgésiques utilisés dans la gestion de l'arthrose chez le chien d'après Dick et *al.*, 2007 ; Mathews, 2008 ; Johnston et *al.*, 2008

Analgésiques	Dose et voies d'administration	Effets sur l'arthrose	Effets secondaires
Tramadol	2 à 5mg/kg tous les 8 à 12 heures Per os	Utilisé en combinaison avec d'autres AINS (acétaminophène) pour réduire la douleur arthrosique	Nausées, vomissements, constipation, étourdissements et somnolence
Amantadine	3 à 5 mg/kg une fois par jour Per os	Utilisé en combinaison avec le meloxicam pour soulager la douleur arthrosique	Moins d'effets secondaires que la kétamine (désordres psychomimétiques)
Gabapentine	10 mg/kg tous les 8 heures Per os	Soulage la douleur mais pas d'essais cliniques qui ont évalué son efficacité	Baisse d'activité, état déprimé et sommeil important
Amitriptyline	1 à 2 mg/kg tous les 12 à 24 heures Per os	Soulage la douleur mais pas d'essais cliniques qui ont évalué son efficacité	Hypotension, mydriase, bouche sèche et rétention urinaire

III.1.8.3. Traitement nutritionnel

La gestion de l'arthrose chez le chien est basée essentiellement sur l'utilisation des AINS, des corticoïdes et des analgésiques. Cependant, ces traitements utilisés à long terme provoquent des effets néfastes sur le cartilage articulaire. Ceci a poussé les scientifiques à chercher des agents chondroprotecteurs permettant la diminution de la dégradation cartilagineuse tout en limitant les effets secondaires causés par les substances utilisées. Les agents chondroprotecteurs recherchés stimulent le métabolisme des chondrocytes et des synoviocytes, inhibent les enzymes de dégradation et les médiateurs inflammatoires et empêchent la formation de fibrine, de thrombi et de plaque sur la membrane synoviale et sur les vaisseaux de l'os sous-chondral (McLaughlin, 2000). C'est difficile de trouver une molécule capable de réunir toutes ces propriétés. Ainsi, le terme d'agents à action lente modificateurs de l'arthrose ou antiarthrosique symptomatique d'action lente, doit être préféré à celui d'agents chondroprotecteurs. L'effet bénéfique de ces agents ne s'observe qu'après de longues périodes d'administration. Il existe une large gamme de suppléments alimentaires que l'on utilise dans le traitement de l'arthrose chez le chien ; la combinaison glucosamine/chondroïtine, les acides gras polyinsaturés, les produits dérivés de la Moule verte et les extraits d'avocat/ soja. La glucosamine et la chondroïtine sont souvent utilisées conjointement car elles agissent en synergie. McCarthy et *al.* (2007) rapportent que les deux substances administrées à des chiens arthrosiques permettent une locomotion et des mouvements articulaires normaux par rapport à des témoins non traités. Cependant Moreau et *al.* (2003) n'ont pas trouvé d'effets positifs de ces substances sur l'arthrose chez le chien. Les acides gras polyinsaturés, principalement les oméga-3, ont un effet bénéfique sur le cartilage (diminution du catabolisme et de l'inflammation sur les chondrocytes *in vitro*) et diminuent la synthèse de médiateurs de l'inflammation comme

l'IL-1 β , l'expression d'ARNm des médiateurs de l'inflammation comme la COX-2 ou la 5-LOX et diminuent l'activité des collagénases (Curtis et *al.*, 2002). De même, l'incorporation des oméga-3 dans la nourriture pour chiens avec arthrose améliore la mobilité et réduit les scores de la douleur arthrosique à partir de la 6^{ème} semaine de supplémentation (Roush et *al.*, 2010). La Moule verte de Nouvelle-Zélande (*Perna canaliculus*) contient des substances anti-inflammatoires (oméga-3) et d'autres nutriments (chondroïtine et glutamine) qui sont favorables à la santé des articulations. Bierer et Bui (2002) ont rapporté que la supplémentation des chiens arthrosiques pendant 6 semaines, avec la Moule verte a réduit significativement le gonflement articulaire, la douleur et les crépitations. Le mélange d'insaponifiables d'avocat / soja contrecarre l'effet de l'IL-1 β en réduisant la production chondrocytaire de stromélysine, d'IL-6, d'IL-8 et de PGE2 (Henrotin et *al.*, 1996). Dans un modèle d'arthrose par section du LCC chez le chien, le mélange d'insaponifiables d'avocat / soja, pour une période de traitement de 8 semaines à une dose journalière de 10 mg/kg, réduit le score lésionnel histologique au niveau du cartilage articulaire et l'os sous-chondral *via* son action inhibitrice sur la synthèse d'oxyde nitrique inductible (iNOS) et le MMP-13 (Boileau et *al.*, 2009).

IV. Étude de la vitamine E

IV.1. Définition et structure

La VE fait partie de la famille des tocophérols qui comprend 4 substances, l' α -tocophérol, qui est la VE proprement dite, le β -tocophérol, le γ -tocophérol et le δ -tocophérol. La biosynthèse de la VE s'effectue dans les plantes, les algues et certaines plantes non photosynthétiques telles que les champignons mais pas chez les animaux (Cuvelier et *al.*, 2003a).

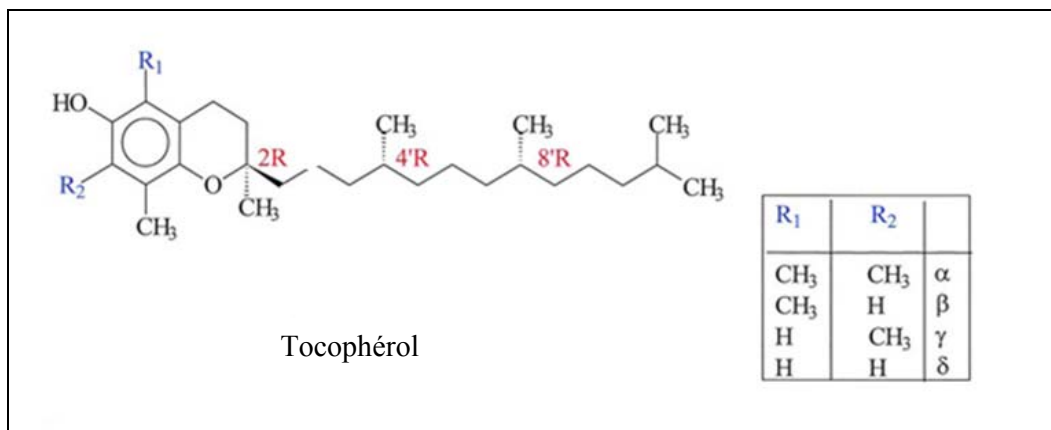


Figure 10 : Structure chimique de la vitamine E d'après Azzi et Stocker (2000).

L'appellation VE regroupe les substances constituées par un noyau chromanol et une chaîne latérale saturée phytyle à 16 carbones. Dans le commerce, la VE se présente généralement soit sous la forme de *RRR-α-tocophérol*, le stéréo-isomère naturel, soit sous une forme synthétique, appelée *all-racemic- α-tocophérol* ou *all-rac-α-tocophérol*. De plus, la VE peut exister soit sous forme non estérifiée, soit, plus fréquemment, sous forme estérifiée. Les esters de VE s'obtiennent par estérification du groupement hydroxyl en position 6 du cycle chromanol avec de l'acétate, ou encore avec du succinate, du nicotinate ou du phosphate. Ces formes estérifiées ont l'avantage d'être plus stables et moins sensibles à l'oxydation (Rupérez, 2001).

IV.2. Pharmacocinétique de la vitamine E et son rôle dans l'organisme

IV.2.1. Absorption, distribution et excrétion

La VE est absorbée depuis la lumière intestinale par un processus de diffusion passive à travers l'entérocyte en même temps que les lipides alimentaires. Le taux d'absorption le plus élevé se rencontre au niveau de la partie proximale de l'intestin grêle chez le chien et dépend en partie de la teneur de la ration en lipides, la sécrétion biliaire et les estérases pancréatiques. Au niveau intestinal, les tocophérols sont réassemblés en chylomicrons par l'appareil de Golgi des cellules de la muqueuse, ces chylomicrons sont

stockés sous forme de granules de sécrétion et finalement excrétés par exocytose dans le compartiment lymphatique, d'où ils atteignent la circulation sanguine par l'intermédiaire du canal thoracique. Ils sont ensuite transformés en chylomicrons (CM) résiduels, par la lipoprotéine lipase (LPL), une enzyme attachée à la surface de l'endothélium capillaire (Azzi et Stocker, 2000) (Figure 11).

Le devenir des différentes formes de VE est alors très différent : le γ -tocophérol sera excrété dans la bile, alors que le α -tocophérol sera majoritairement incorporé dans les *Very-low-density lipoprotein* (VLDL) naissants. Cet assemblage est assuré par *α -Tocopherol Transfer Protein* (α -TTP), une protéine cytosolique du foie qui permet l'incorporation du α -tocophérol au sein des VLDL, avant leur relargage dans la circulation sanguine (Cuvelier et *al.*, 2003b).

La protéine du transfert plasmatique des phospholipides (PLTP), qui est connue pour favoriser l'échange de phospholipides et d'autres composés amphiphiles entre les structures lipidiques, facilite l'échange du α -tocophérol entre les *High-density lipoproteins* (HDL) et les *Low-density lipoproteins* (LDL) (Desrumaux et *al.*, 1999). Approximativement la moitié du α -tocophérol plasmatique est présente dans les LDL et l'autre moitié est distribuée entre les VLDL et les HDL (Cuvelier et *al.*, 2003b).

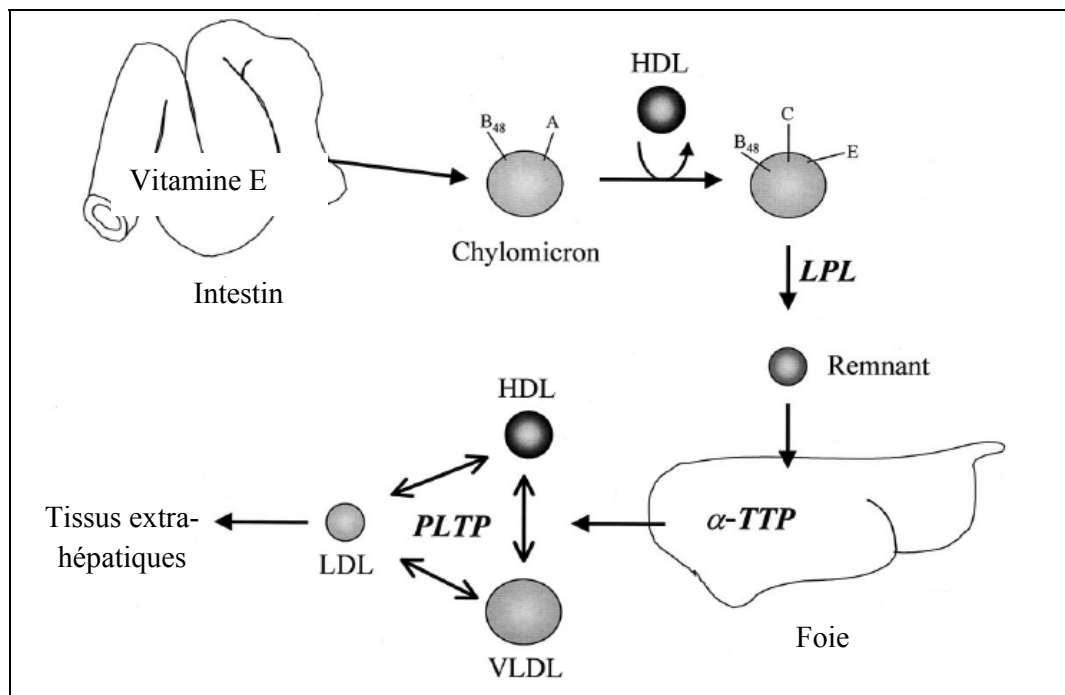


Figure 11 : Absorption, transport et distribution de la vitamine E D'après Azzi et Stocker (2000).

Chez les carnivores domestiques, les concentrations plasmatiques de la VE sont variables selon les auteurs, approximativement de 18 à 36 $\mu\text{g/ml}$ chez le chien et de 14 à 16 $\mu\text{g/ml}$ chez le chat. Une augmentation de l'ingestion de VE est responsable d'une augmentation de la concentration en VE plasmatique. Jewell et *al.* (2000) constatent en effet chez le chien une augmentation de 26 % de la concentration sérique lorsqu'ils doublent les apports en VE et une augmentation de 40 % lorsque ces apports sont multipliés par 4. En 2002, ces mêmes auteurs constatent une augmentation de la concentration sérique de 61 % lorsqu'ils triplent la dose de VE administrée (Traber et Kayden, 1989).

Les doses de VE recommandées chez le chien sont de 50 UI/kg de matière sèche (MS), quelque soit l'âge. Pour des régimes contenant des huiles de poissons, il est conseillé d'ajouter 10 UI de VE/g d'huile de poisson/kg de nourriture, pour protéger les acides gras contre l'oxydation. Ces valeurs sont établies pour des régimes dont la densité

énergétique est de 3500 Kcal EM kg de MS. Elles correspondent donc à 14 UI/1000 kcal d'EM chez le chien (Cuvelier et *al.*, 2003b).

La VE connaît 2 voies d'excrétion : une excrétion urinaire pour les métabolites résultant de l'action antioxydante du α -tocophérol et ceux qui proviennent d'une voie d'excrétion non oxydative. L'excrétion fécale est majeure pour la VE ingérée (Traber et Kayden, 1989).

IV.2. 2. Utilisation et rôle de la vitamine E dans l'organisme

L'utilisation de la VE dans les aliments pour animaux domestiques est à l'heure actuelle largement répandue. La VE est reconnue comme antioxydant, grâce à sa capacité d'inhiber la peroxydation lipidique. A cet égard, elle participe, avec de nombreuses autres substances, à la lutte contre les ROS c'est-à-dire la lutte contre les radicaux libres et les éléments non radicalaires produits lors de la formation de radicaux libres (Cuvelier et *al.*, 2003a).

La VE protège *in vivo* les structures sensibles à l'oxydation ; les lipides, essentiellement sous forme condensée dans les membranes et les lipoprotéines, les bases nucléotidiques des brins d'ADN et des protéines (Leger, 2000). Elle est utilisée chez l'homme dans différentes situations pathologiques (thérapies curatives) et environnementales (protection des structures de la peau). Son rôle dans la prévention du cancer n'est pas établi, bien que son action bénéfique puisse être évoquée dans le cancer de la prostate (Chan et *al.*, 1999 ; Kirsh et *al.*, 2006 ; Adaramoye et *al.*, 2010). Son rôle préventif, le plus souvent comme adjuvant dans la vaccination contre les maladies neurodégénératives est sous investigation. C'est dans le domaine de la prévention des maladies cardio-vasculaires que l'on a le plus de données et que la VE suscite le plus d'intérêt (Stampfer et *al.*, 1993 ; Clarke et *al.*, 2008 ; Patel et *al.*, 2011). Le rôle antioxydant majeur, particulièrement au niveau des LDL, de la VE et le rôle crucial des LDL oxydées dans l'athérosclérose ont suggéré très tôt qu'il pouvait exister une

corrélation négative entre le taux plasmatique de VE et le risque de maladies cardiovasculaires (Gey et *al.*, 1991). Il a été montré que l'âge pouvait avoir une influence sur le transport post-prandial de la VE, cette influence provenant principalement de modifications affectant le métabolisme des lipoprotéines. La possibilité d'une diminution de la biodisponibilité du *all-rac*-alpha-tocophérol acétate avec l'âge est évoquée (Borel et *al.*, 1997).

IV.3. Effet de la vitamine E sur l'arthrose

IV.3.1. Effet de la vitamine E sur la douleur arthrosique

Le traitement classique de l'arthrose se base essentiellement sur l'utilisation des AINS pour soulager la douleur et arrêter l'inflammation, avec les risques secondaires bien connus des AINS. Ainsi plusieurs publications ont montré l'importance de la médecine complémentaire dans la réduction des symptômes de l'arthrose et limiter ainsi le recours aux AINS (Chan et *al.*, 2005 ; Boileau et *al.*, 2009 ; Jacquet et *al.*, 2009). Dans ce cadre, plusieurs études en double aveugle contre placebo ont évalué l'efficacité d'une supplémentation en VE sur l'arthrose chez l'homme. Pour l'une (Machtay et Ouaknine, 1978), 600 mg d' α -tocophérol pendant 10 jours avaient un effet antalgique supérieur au placebo. Pour l'autre (Blankenhorn, 1986), 400 UI d' α -tocophérol pendant 6 semaines chez 50 patients arthrosiques, étaient plus efficaces sur la douleur, à la station debout, à la pression et à la mobilité et permettaient de réduire la prise d'antalgique. Scherak et *al.* (1990) ont évalué l'effet d'une supplémentation de 400 mg de α -tocophérol/j par rapport à un AINS, le diclofénac (50 mg/j) pendant 3 semaines chez 53 patients atteints d'arthrose de la hanche ou du genou. La VE est apparue aussi efficace que le diclofénac. Elle a permis de réduire la douleur à la station debout de 77 % par rapport à 85 % sous diclofénac, la douleur à la pression de 67 % par rapport à 85 %, et la douleur à la mobilisation de 62 % par rapport à 63 %. Les deux traitements réduisaient de manière

équivalente le gonflement des genoux, le temps de marche pour parcourir 20 mètres, et augmentaient la mobilité articulaire. Les patients dont la concentration plasmatique en α -tocophérol était supérieure à deux déviations standards de la valeur moyenne ($> 25,2$ mg/l), semblaient avoir une plus forte réduction de la douleur comparée à ceux n'ayant qu'une élévation modérée de la concentration plasmatique. Les effets secondaires étaient 3,4 fois moindres sous VE (7,7 %) que sous diclofénac (25,9 %).

Alors qu'il n'y a aucune étude faite chez le chien pour montrer l'effet de la VE sur les symptômes de l'arthrose, cette vitamine est incorporée dans toutes les diètes industrielles pour les chiens arthrosiques, et ce même à des doses supérieures à celles recommandées par le conseil national de recherches (NRC).

IV.3.2. Effet de la vitamine E sur l'inflammation

La VE bloque la dégradation de l'AA et la formation des éicosanoïdes (prostanoides et leucotriènes) respectivement par son action sur les phospholipases A2 (Chandra et *al.*, 2002) et sur les cyclooxygénases (Jiang et *al.*, 2008). Ceci suggère que la VE pourrait inhiber l'inflammation synoviale qui accompagne l'arthrose et agir ainsi sur les symptômes de cette affection. En effet, l'action positive de la VE pendant des essais d'arthrite à court terme pourrait être expliquée par un effet sur l'inflammation (Mcalindon et Felson, 1997). Il s'est avéré que la concentration de la VE au niveau du liquide synovial de l'articulation arthrosique est faible par comparaison avec l'articulation saine (Sutipornpalangku et *al.*, 2009). Celle-ci est en relation avec le rôle de la VE d'empêcher la peroxydation des lipides au niveau de l'articulation arthrosique, il y a donc une consommation accrue de cette vitamine.

Des doses élevées d' α -tocophérol ont également été à l'origine d'une diminution de la libération des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF α) (Scherak et *al.*, 1990). La VE a également montré une efficacité dans l'inhibition de la production d'IL-

1 β des monocytes activés par inhibition de la voie de 5-lipoxygénase (Devaraj et Jialal, 1999). Un nombre limité d'investigations ont été menées pour évaluer l'efficacité de VE sur l'inflammation arthrosique, cependant, plusieurs études ont montré l'efficacité de la VE sur les marqueurs de l'inflammation dans les maladies cardio-vasculaires chez l'homme. En effet, Singh et Jialal (2004) ont montré que le traitement par α -tocophérol, en particulier à des doses élevées, est à l'origine d'une diminution de la libération des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , IL-6, TNF α et IL8, et contribue à la diminution de l'adhérence des monocytes à l'endothélium. En outre, l' α -tocophérol diminue les niveaux de la protéine C réactive, chez les patients souffrant de maladies cardiovasculaires (Devaraj et Jialal, 1999).

Hypothèse et objectif de recherche

I. Hypothèse

Plusieurs études ont montré l'efficacité de la vitamine E dans le traitement des affections orthopédiques chez l'homme (Link et *al.*, 1990 ; Scherak et *al.*, 1990 ; Haflah et *al.*, 2009). La vitamine E est très souvent incorporée dans les diètes destinées aux chiens souffrants d'arthrose, mais aucune étude n'a démontré l'efficacité de la vitamine E contre cette affection orthopédique chez le chien. Nous avançons dès lors l'hypothèse d'un effet bénéfique structurel (anti-inflammatoire) et fonctionnel d'une supplémentation à haute dose en VE pour contrer le développement de l'arthrose expérimentale induite chirurgicalement chez le chien.

II. Objectifs

Les objectifs de la présente étude étaient de déterminer l'effet d'une forte dose orale de vitamine E sur l'inflammation, la douleur et les changements structuraux des pièces anatomiques sous jacents impliquées dans l'évolution de l'arthrose chez le chien après la création d'arthrose par section du ligament croisé crânial (LCC) du membre postérieur droit.

PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

Anti-inflammatory response of dietary vitamin E during early stages of surgically-induced osteoarthritis in dogs and its consequences on pain and joint structures.

Mohamed Rhouma¹, Alexander de Oliveira El Warrak², Francis Beaudry^{1,3}, Younes Chorfi^{1,3}

¹Research Group in Animal Pharmacology of Quebec (GREPAQ) – Département de Biomédecine Vétérinaire; ²Département de Sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire – Université de Montréal (3200 Sicotte St., P.O. Box 5000, Saint-Hyacinthe, QC, J2S 7C6, Canada); ³Osteoarthritis Research Unit, University of Montreal Hospital Research Centre (CRCHUM), Notre-Dame Hospital (1560 Sherbrooke St. East, Montreal, QC, H2L 4M1, Canada).

Corresponding author: Dr Younès Chorfi. Tel: 450-773-8521; Fax: 450-778-8109;

Email address: 

Key words: osteoarthritis, vitamin E, dog, inflammation, pain.

Abstract

Because of the evidence of some anti-inflammatory and analgesic activities of vitamin E (VE) in human osteoarthritis (OA), this double blind and randomized pilot study used a broad spectrum of clinical and laboratory parameters to investigate whether such beneficial effects could be detected in a canine experimental OA model. Dogs were divided into 2 groups; control (n = 8) receiving a placebo, and test group (n = 7) receiving orally 400 IU/ animal/ day of VE during 55 days, starting the day after cranial cruciate ligament transection. At d56, dogs were euthanized and concentrations of PGE2, NOx and IL-1 β were measured in synovial fluid. Lameness and pain were assessed using visual analogue scale (VAS), numerical rating scale (NRS) and electrodermal activity (EDA) at d0, d28 and d55. Cartilage and synovial inflammation lesions were assessed. One-side comparison was conducted at an alpha-threshold of 10%. Synovial NOx and PGE2 were lower in the test group ($P < 0.0001$ and $P = 0.03$, respectively). Values of VAS, NRS and EDA showed a consistent trend to be lower in the test group compared to the control, while statistical significance was reached for VAS at d55 and EDA at d28 (adjusted $P = 0.07$ in both cases). Histological analyses of cartilage showed a significant reduction in lesions' scores in the test group. For the first time, a study in dog with OA using high dose of VE showed a reduction of inflammation joint markers and histological expression, as well as a trend to improve signs of pain.

Introduction

In dogs, osteoarthritis (OA) is a slowly progressive, degenerative, and active disease. In terms of lesion changes, OA is characterized by degeneration of articular cartilage, with loss of matrix, fibrillation, and formation of fissures, which can result in complete loss of the cartilage surface (1). In OA, synoviocytes and synovial macrophages produce a wide array of inflammatory mediators including prostaglandins (PGs), reactive oxygen species (ROS) and pro-inflammatory cytokines such as interleukin 1 β (IL-1 β), IL-6 and tumour necrosis factor α (TNF α). In turn, these pro-inflammatory cytokines stimulate articular chondrocytes and synoviocytes to produce matrix-degrading enzymes such as matrix metalloproteinases (MMPs) and pro-inflammatory enzymes such as cyclooxygenase-2 (COX-2). The subsequent release of PGs promotes, sustains and enhances additional cytokine production and inflammation, leading to cartilage extracellular matrix (ECM) destruction and degeneration (2,3). Reactive oxygen and nitric oxide (NO) specie inhibit collagen and proteoglycan synthesis, activate MMPs, increase the susceptibility of cartilage to injury by other oxidants, and induce chondrocytes apoptosis (4).

Vitamin E (VE) is the principal and most potent lipid-soluble antioxidant found in human plasma erythrocytes and tissues. It decreases monocytes' ability to release potent ROS such hydrogen peroxide and superoxide anion, and consequently reduces lipid oxidation of cell membranes. Also, VE affects NO synthesis by inhibiting the activation of the transcription nuclear factor kappa B (NF- κ B) implicated in NO synthase gene expression (5). Many studies have shown anti-inflammatory effects of VE, with actions on several enzymes involved in inflammatory pathways, such as protein kinase C (PKC), protein phosphatase 2A, , 5-, 12- and 15-lipoxygenases, phospholipase A2 (PLA2), and COX-2 (6,7,8). In addition, VE supplementation induced suppression of a potentially atherogenic cytokine, IL-1 β , and inhibition of a crucial event in

atherogenesis, monocyte-endothelial cell adhesion (9). Consumption of VE has been associated with a lowered risk of coronary heart disease and reduced oxidation of low-density lipoprotein (10). Furthermore, VE plays a major role in regulating arachidonate release from membrane phospholipids and its subsequent metabolism to bioactive lipids such as PGs, prostacyclin, leukotrienes, thromboxanes and other inflammatory mediators (11).

Antioxidant and anti-inflammatory properties of VE related in cardiovascular pathologies have been translated to the OA field. Several clinical human studies have found therapeutic benefits of VE in symptomatic treatment of OA over a short-term period; most of these studies showed an improvement in pain at rest and during movements. In patient with OA, a 6-week double-blinded study using 400 IU of α -tocopheryl acetate once a day was superior to placebo as assessed by a joined patients' and practitioners' global assessment of pain (12). Another 3-week double-blinded study demonstrated similar efficacy of VE (α -tocopheryl acetate 544 mg TID) to diclofenac (50 mg TID) in decreasing pain of OA patients using a visual analogue scale (VAS) (13). However, in long-term double-blinded studies, a daily 500 IU VE showed no symptomatic or structure-modifying benefits over placebo, as assessed by Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index or by magnetic resonance imaging, on knee OA (14,15).

Vitamin E is a common component of canine therapeutic diet to promote joint health. However, no study yet has demonstrated specifically its efficacy on canine OA. Therefore, the aim of the present study was to assess the effect of a high dose α -tocopherol supplementation on inflammatory markers, pain assessment, and joint structural changes of OA in the dog experimental cranial cruciate ligament (CCL) transection model.

Materials and methods

1. Dog selection

Fifteen adult crossbred dogs, 1 to 4 years old, 22.2 to 30.5 kg body weight (BW), were used in this study. They were housed in a large kennel with individual galvanized steel cages (1 m [width] × 1.75 m [length] × 2.4 m [height]). All cages were equipped with an automatic watering system. Dogs were selected following complete physical and musculoskeletal evaluations by a veterinarian. Animals were subjected to hematological and biochemical analyses to be within normal range before their inclusion into the study (16). Animal care procedures followed the guidelines of the Canadian Council on Animal Care, and the protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (10-Rech-1463).

2. Anesthesia and surgical procedures

After evaluation of baseline pain and functional outcome levels, all anesthetized dogs were subjected to a surgical sectioning of the right knee CCL as previously described (16). Twenty-four hours before surgery, animals had a fentanyl patch (Duragesic[®]; 50 or 75 µg/h, Janssen Ortho, Markham, ON, Canada), placed in the neck; prior to surgery they received a subcutaneous analgesic premedication (meperidine, acepromazine and glycopyrrolate), followed by propofol intravenous induction of anesthesia. Dogs were endotracheally intubated and maintained on 2% isoflurane – oxygen anesthetic mixture. A medial arthrotomy was performed, distal to the patella and parallel to the patellar ligament. A retractor was inserted to view the CCL to be sectioned, the completeness of which was verified by obtaining a large drawer motion in both flexion and extension. The capsule and the retinaculum were sutured in a simple continuous pattern. Bupivacaine (Marcaïne[®] 0.5%; Hospira, St-Laurent, QC, Canada) was injected (5 to 8 mL) in the capsule as an intra-articular block. Finally, the subcutaneous tissues were

sutured, followed by intra-dermal and skin sutures.

3. Post-operative and oral supplementation procedures

In the first week after surgery, dogs were exposed to a progressive resumption of physical activity from d2 to d6. Subsequently, they were housed to allow free exercise in a large enclosure. All dogs actively exercised in exterior runs (1.35 m [width] × 9.15 m [length]) for a 2-hour period, 5 days a week, under animal care technician supervision (16).

All dogs were fed the same food (Harlan Teklab Global 27% Protein Dog Diet®) starting 2 months prior to surgery until the end of the experiment. Food quantities were adjusted according to animal weight. Dogs were randomly separated into two experimental OA groups; control group (n= 8) consisted of OA dogs that received a placebo maltodextrin treatment and test group (n=7) consisted of OA dogs given orally VE, once a day, as liquid α -tocopheryl acetate, 0.044 ml/kg BW daily (ROVIMIX® E-40% 400 I.U./mL; DSM Nutritional Products Inc, Fort Worth, TX, USA). This dosage (\approx 400 IU per dog SID) corresponds to 10 times the recommended daily dosage of VE according to the Association of American Feed Control Officials (17). Besides, this dose is far from a toxic dose, as dogs tolerate high levels of VE (1.000 to 2.000 IU/kg of food) without adverse effects (18). Treatment was initiated the day following surgery and continued until d55.

4. Blood sample collections and analysis

At d0, d21, d42 and d55 post-surgery, sera were taken to measure VE concentration by HPLC reverse phase based on the method published by Gueguen *et al.* (19). This method was also used to determine synovial fluid VE concentrations after dogs' euthanasia (d56). Standard hematological and biochemistry analyses were performed on

d0 and d55 by the Diagnostic Service of the Faculty of veterinary medicine – Université de Montréal.

5. Inflammation assessments

5.1. Determination of synovial fluid PGE2 concentration

Synovial fluid was collected from stifle joints after euthanasia of dogs (d56) *via* a standard arthrocentesis technique. However, because of the limited and inconsistent amounts of fluid collected from the unaffected left stifle joint, analysis was only performed on fluid from the right stifle joints. Synovial fluids were immediately centrifuged (14000g, 15 mn at 4°C) and PGE2 concentrations measured by an enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) kit from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) with a quantification limit of 15 pg/mL (16). Measurements were performed in duplicate and results were expressed in picograms in the joint total synovial fluid (16).

5.2. Determination of synovial fluid IL-1 β concentration

Levels of IL-1 β in synovial fluid were determined after dogs' euthanasia, using a specific ELISA kit (Bethyl Laboratories, Inc., TX, USA) (20) in duplicate. Results were expressed as total picograms in joint synovial fluid.

5.3. Determination of synovial fluid NOx concentration

Nitrites and nitrates (NOx) levels (nmol/knee) were measured using a Sievers NO Analyzer (280i[®], Sievers Instruments, Boulder, CO, USA). This assay is based on spectrophotometric analysis following a chemiluminescent reaction between NO and ozone (21). Each sample (0.025 mL) was placed into a purge vessel containing 5 mL of vanadium chloride (VCl₃) and the solution was heated at 95°C. Samples were analyzed

in duplicate (values averaged) and plotted against a calibration curve obtained from known concentrations of nitrate solution as previously described (21).

6. Pain assessments

6.1. Subjective behavioral pain assessments

Subjective assessments of lameness or signs of pain were performed at d0, d28, and d55 after CCL transection. The same technician, blinded to experimental design, performed all scoring throughout the experiment.

6.1.1. Lameness/ discomfort assessment using a VAS

To record any changes in the posture and behavior of dogs, the veterinary technician assessed each dog by using a VAS (0 “no” to 100 “worst imaginable” mm pain length) completed in rest (static) and in dynamic position (16).

6.1.2. Numerical rating scale (NRS)

The composite NRS includes the 7 following criteria (16): Global assessment (score 0–4); Evaluation of lameness while the dog is standing up (score 0–4), walking (score 0–4) and trotting (score 0–4); Willingness to hold up contralateral limb (score 0–4); Evaluation of response to palpation (score 0–4); Evaluation of response to flexion and extension (score 0–4).

6.2. Objective pain assessment

6.2.1. Electrodermal activity (EDA)

Skin electrical conductance or EDA was recorded at d0, d28 and d55 using a Pain Gauge[®] (PHIS, Inc., Dublin, OH, USA) system which is a palm-sized electronic device that assigns a ‘pain score’ between 0.1 and 9.9 indicative of pain/stress levels following

the manufacturer's instructions (22). The device was placed for 2 seconds on the right palmar paw (ethanol-dipped and non-clipped) for a measure in triplicate.

7. Structural assessments

7.1. Macroscopic grading of OA lesions

Immediately after sacrifice, dogs' right knees were placed on ice and dissected for quantification of gross morphological changes, including presence of osteophytes formation and cartilage lesions. Two independent observers who were blinded to treatment group allocation graded the findings with a consensual value (16,23). Macroscopic lesion areas at the cartilage surface on the femoral condyles and tibial plateaus were measured (in mm²) with an electronic digital calliper (Digimatic Caliper model No. 2071M; Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Japan). The depth of erosion was graded with scores ranging between 0 (a normal surface) and 4 (erosion extending to the subchondral bone). The degree of osteophytes' formation was graded by measuring maximum width (mm) of the spurs on the medial and lateral femoral condyles (16,23).

7.2. Histological grading of cartilage and synovial membrane lesions

Histological evaluation was performed on sagittal sections of cartilage from the lesional areas of femoral condyle and tibial plateau as previously described (16,23). Specimens were dissected, fixed in TissuFix #2 (Laboratories Gilles Chaput, Montreal, QC, Canada) for 24 hours, and embedded in paraffin. Then, serial sections (5 µm) were stained with haematoxylin/ Fast green and Safranin-O. The severity of cartilage pathology was graded by two independent observers, using the OARSI histopathology scoring system (24) in blind and consensual conditions. Scale of 0 to 29, was used to evaluate the severity of OA lesions based on the loss of Safranin-O staining (scale 0 to 4), cellular changes (scale 0 to 12), structural changes (scale 0 to 10) and pannus

formation (scale 0 to 3). The final score (range 0 to 87) corresponds to the sum of the final scores for the three subregions of each specimen from the femoral condyle or tibial plateau.

Synovial membrane was removed and processed as described previously (25). Samples were stained with haematoxylin-phloxine-saffron. The severity of synovitis was graded on a scale of 0 to 10 (16,23) by two blinded and independent observers. Histological criteria were synovial cell hyperplasia (scale 0 to 2), villous hyperplasia (scale 0 to 3), and mononuclear (scale 0 to 4) and polymorphonuclear (scale 0 to 1) cell infiltration; 0 indicates normal structure.

8. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Student's *t*-test to compare biomarker inflammation levels in synovial fluid and lesion scores between the two groups of OA dogs after euthanasia. Repeated measures ANOVA was used to perform comparisons between test and control groups on pain and lameness assessments. Values are expressed as mean (SD).

With regards to the preliminary exploration of VE effects on canine OA, sample size was limited (to $n < 8$ per group) for this study. We expected a between-groups difference of 20% in pain assessment methods with a sigma variation of 20% in the measurement. Therefore to keep a desired beta power of analysis around 80%, we fixed *a priori* the alpha threshold of statistical significance for one-sided test to the value of 10%. Sequential Bonferroni correction for multiple pairwise comparisons was applied, when necessary.

Results

There was no significant change in dogs' BW or evidence of any significant side effects of VE treatment during this study. In test group, serum concentrations of VE were significantly higher starting from the first time-point of analysis (d21) to the end of the experiment ($P < 0.001$) compared to control group (Figure 1). Also, concentration of VE in synovial fluid of test group was significantly higher than the control ($P = 0.005$) (Figure 2).

1. Inflammatory joint markers

Amounts of PGE2 and NOx in synovial fluid were significantly lower in the treated group compared to control group ($P = 0.03$ and $P < 0.0001$ respectively) (Figure 3), indicating an effect of VE on inflammatory markers. Concentrations of IL-1 β in synovial fluid samples of both groups were below the detection limit of the dog specific ELISA kit used.

2. Lameness/ pain assessments

Both VAS and NRS scores varied significantly ($P < 0.0001$, and $P < 0.0001$, respectively) within time with a maximum reached at the intermediate time-point (d28). In veterinary technician VAS, a difference between test and control groups was observed at d55 (adjusted $P = 0.07$) (Figure 4). The averaged decrease in VAS pain score in the test compared to the control group by 40% at d55 was yet present at d28 as a trend (decrease by 15%). Similar evolution was observed for NRS, with a non-significant averaged decrease by 18% in the test compared to control group at d55 (adjusted $P = 0.24$), and by 14% in favor of the test group at d28 (adjusted $P = 0.36$).

Variation within-time of EDA was significant for the control group ($P < 0.009$), but EDA was stable within-time for the test group ($P > 0.60$) (Figure 5). At d28 and d55,

EDA values were, respectively, lower (adjusted $P = 0.07$) and not significantly different (adjusted $P = 0.27$) in the test compared to the control group.

3. Structural assessments

3.1 Macroscopic evaluation of lesions

There were no differences in macroscopic grading including osteophytes and cartilage lesions in both groups of dogs (data not shown).

3.2 Histological evaluation of cartilage and synovial membrane

Cartilage specimens from control dogs exhibited modifications that are typical of OA. The total histological scores for cartilage lesions severity on femoral condyles and tibial plateaus were decreased in VE-treated dogs (Table I). A beneficial effect of VE was significant on lateral femoral condyle lesions ($P = 0.04$), and in both medial and lateral tibial plateaus ($P = 0.06$ and $P = 0.07$, respectively). However, such effect of VE was not observed in medial femoral condyle lesions ($P = 0.13$). Moreover, there was no difference in histological lesion scores of synovial membrane between the two groups ($P > 0.1$).

Discussion

To our knowledge, the present study is the first report to show that VE supplementation in early stages of surgically-induced OA in dogs reduces production of proinflammatory markers (PGE2, NOx) in synovial fluid. This vitamin also reduces histological lesions in articular cartilage and decreases pain associated with OA development. Indeed, α -tocopherol appears to modulate a variety of cellular functions that are not necessarily a result of its antioxidant activity. The metabolism of arachidonic acid is obviously influenced by α -tocopherol. Complex interactions of VE with eicosanoid system appear to result in an inhibition of PG synthesis (6-8,26). Vitamin E depresses PGE2 biosynthesis possibly by preventing arachidonic acid release and by inhibiting PLA2 and COX expression (6-8). This is supported by our results of lower joint concentrations of PGE2 in the test group compared to the control.

In our study, there was an important decrease of NOx concentrations in OA joint of VE treated group compared to the control. Normal cartilage explants produce little NOx, however, chondrocytes and synovial membrane in OA and rheumatoid arthritis patients produce NOx abundantly (27). This inorganic free radical, NO, promotes increased vasodilatation and vasopermeability associated to the inflammation of synovial tissue (28). The effect of NOx in OA is likely to be exerted within cartilage, where it promotes a number of catabolic effects on chondrocyte functions that would be expected to result in the loss of matrix, a feature of progressive OA (29). Vitamin E has effectively inhibited the activation of cytokine-induced NF κ B that plays a critical role in iNOS gene induction (30). Indirectly, VE acts as antioxidant that inhibits IL-1 β and TNF- α and oxidative stress which in turn enhance NF- κ B activation (31). In our study, VE supplementation led to a major decrease of synovial NOx production.

Vitamin E had apparently no effect on synovial IL-1 β concentrations despite the use of dog specific ELISA kit. Vitamin E therapy, especially at high doses, has been shown to

decrease proinflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, and TNF α in patients with cardiovascular disease. It has a biological effect of inhibiting the release of IL-1 β , *via* the inhibition of the 5-lipoxygenase pathway. Previous study showed that VE has no effect on IL-1 β mRNA levels, suggesting a possible post-transcriptional effect (7). This discrepancy may be due to the fact that in our study IL-1 β was measured 56 days after surgery. While this cytokine plays a role in the initiation of OA, there are other substances such as PGE2 and MMPs that take place to ensure the progression of OA. This probably explains the very low concentrations of IL-1 β found in synovial fluid (32).

In our study, we found that subjective pain assessments (VAS and NRS) were globally in favor of an analgesic effect of VE. Our results are in agreement with other studies in human OA, showing that VE was effective in short term OA pain (12,13). Machtey and Ouaknine (33) showed too that in a small 10-day single-blind crossover study on spondylosis, 600 mg of VE per day were superior to placebo as assessed by a patient questionnaire. However, the positive effect of VE on pain relief in OA demonstrated in short-term studies has not been supported by the results of well-conducted studies over longer periods of time (14,15).

To assess objectively pain in OA dogs, EDA was measured. The follow-up of EDA showed an improvement in pain (and stress) score in VE-treated group compared to the control at d28. Most importantly, the level of EDA remained constant in the VE-treated group, whereas it increased with OA development in the control group. Because EDA is very dependant of the dermal vasomotor tone, this could be related to the inhibition of inflammatory mediators as observed in our synovial fluid samples. Indeed, PGE2 is recognized to be correlated with pain and functional disability in human OA (34). In the canine CCL model of OA, concentration of PGE2 in synovial fluid is involved in acute inflammation and is associated with lameness and signs of pain during the early stage

after CCL transection (35). It is likely that NO contributed to the disability and perception of pain (36). The interaction of VE with NO is a mechanism by which it could exert its analgesic effect (37). Our results support that VE can improve short-term pain in OA dogs.

In the present study, treatment with VE reduced histological lesions in articular cartilage in femoral condyles and tibial plateaus, with a significant effect of the treatment except on medial condyle lesions. Several studies have shown a positive effect of VE on different compounds of articular cartilage. Tiku *et al.* (38) showed that when rabbit chondrocytes were submitted to an oxidative burst, VE reduced collagen catabolism by preventing protein oxidation mediated by aldehydic down products of lipid peroxidation. Incubation of avian chondrocytes subjected to oxidative stress with VE restored collagen synthesis (39). These findings can explain the positive effect of VE in histological articular cartilage lesions in early stages of surgically-induced OA in dogs of our study. Moreover, the decrease in NO_x levels by VE treatment in our study may have contributed to the protection of chondrocytes. It is though surprising that VE, despite its effect in synthesis pathways of PGE₂ and NO_x, could not reduce synovial membrane inflammation in test group, even if synovial membrane inflammation occurs early, 1 to 2 weeks, after CCL section (40).

Our study has limitations largely imposed by the study design including the duration of the study (8 weeks) and the number of dogs used ($n \leq 8$). A longer study would provide more information on the potential effects of VE against the long-term development of OA. The mechanisms of action of VE, especially its global effect on catabolic / anabolic factors, needs further investigation in order to reach a better understanding of VE mechanism of action in OA pathways.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. Authors are grateful to Marie-Claude Gendron, Colombe Otis, Dominique Gauvin, Carolle Sylvestre, Pascale Saint-Onge and Maxim Moreau for their technical support and to Dr Guy Beauchamp for his help in statistics. Authors would also like to thank DSM Nutritional Products Inc. for providing vitamin E.

Table I. Total histological scores of femoral condyles and tibial plateaus of articular cartilage lesions in control and test dogs.

		Total scores		
		Control group	Test group	<i>P</i> value
Femoral condyles	Lateral	11.30 (6.58)	5.48 (0.97)	0.04
	Medial	12.21 (7.47)	7.67 (0.90)	0.13
Tibial plateaus	Lateral	13.38 (5.52)	9.20 (1.57)	0.07
	Medial	13.97 (5.97)	9.05 (2.37)	0.06

Score was determined as described in the materials and methods section. The total score corresponds to the sum of scores obtained for three subregions (0-87). Data are expressed as mean (SD) and were analyzed using student's *t*-test.

Figure legend

Figure 1. Serum vitamin E concentrations at baseline (d0), and d21, d42 and d56 after beginning vitamin E supplementation. Each point corresponds to the mean (SD) of 7 dogs for test group (solid bar) and 8 dogs for control group (open bar). *** indicates a significant difference ($P < 0.001$).

Figure 2. Synovial fluid vitamin E concentrations after euthanasia of dogs (d56). Each point corresponds to the mean (SD) of 7 dogs for test group (solid bar) and 8 dogs for control group (open bar). ** indicates a significant difference ($P < 0.01$).

Figure 3. Prostaglandin (PG) E2 and NOx amounts in synovial fluid from osteoarthritic stifle joints. Each point corresponds to the mean (SD) of 7 dogs for treated group (solid bar) and 8 dogs for control group (open bar). *** indicates a significant difference ($P < 0.001$), and ** indicates a significant difference ($P < 0.01$).

Figure 4. Technician VAS assessment changes from baseline (d0) exerted by lame osteoarthritic dogs, 28 and 55 days after surgery. Each point corresponds to the mean (SD) of 7 dogs for test group (solid bar) and 8 dogs for control group (open bar). * indicates a significant difference ($P < 0.1$).

Figure 5. Electrodermal activity changes from baseline (d0) exerted by lame osteoarthritic dogs after 28 and 55 days of surgery. Each point corresponds to the mean (SD) of 7 dogs for test group (solid bar) and 8 dogs for control group (open bar). * indicates a significant difference ($P < 0.1$).

Figure 1

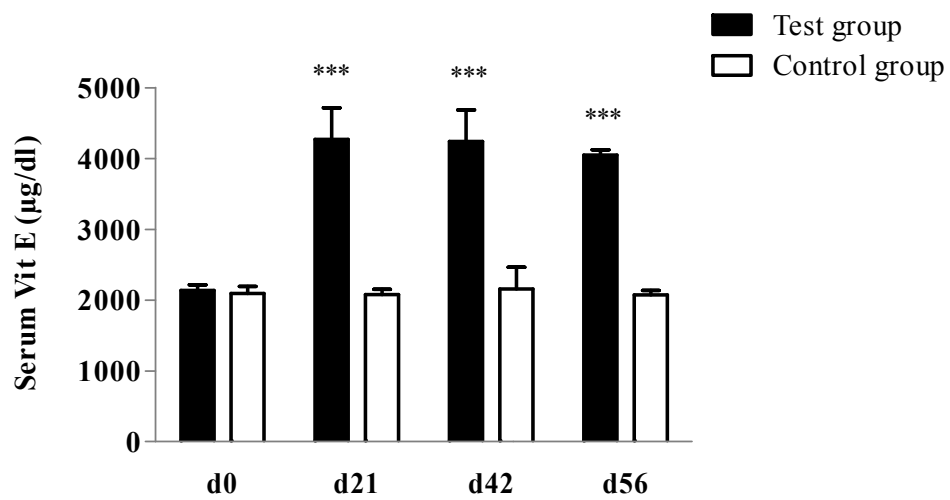


Figure 2

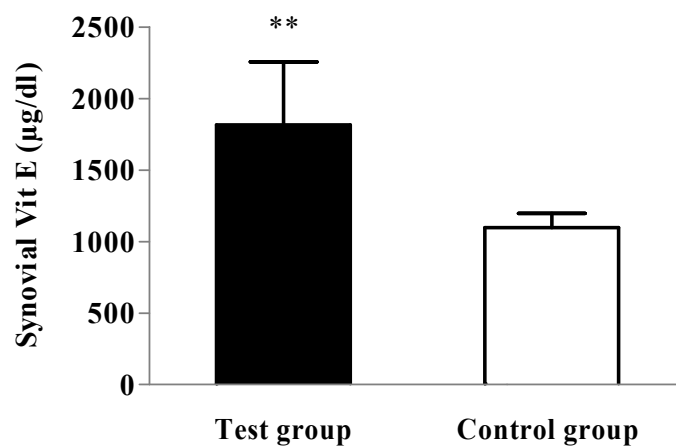


Figure 3

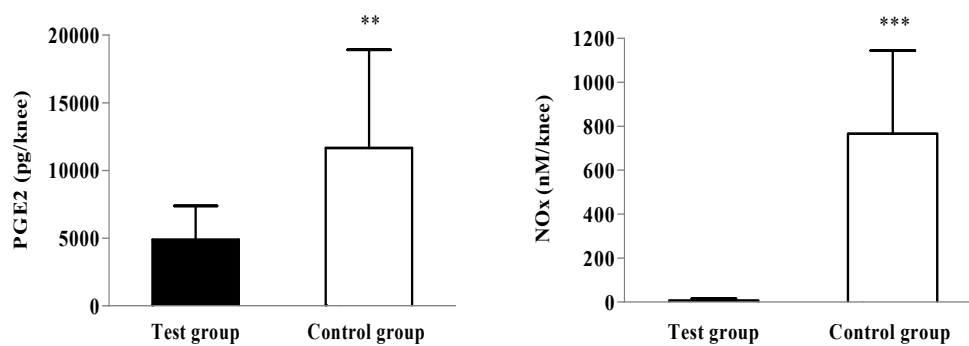


Figure 4

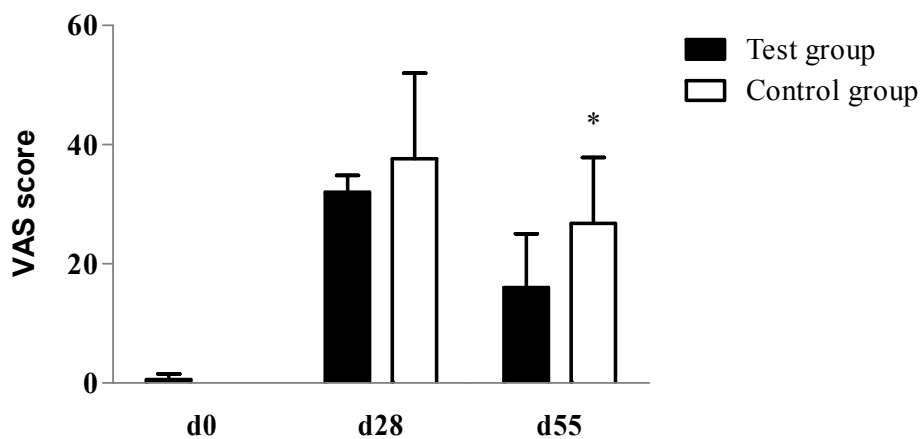
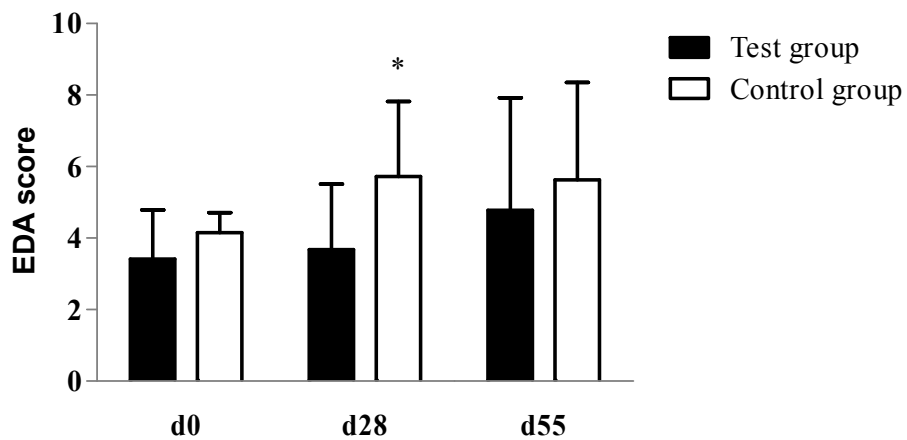


Figure 5



References

1. Johnson SA. Osteoarthritis: joint anatomy, physiology, and pathobiology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1997;27:699–723.
2. Appleton CT, Usmani SE, Bernier SM, Aigner T, Beier F. Transforming growth factor alpha suppression of articular chondrocytes phenotype and Sox9 expression in a rat model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:3693–3705.
3. Martel-Pelletier J. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6:374–376.
4. Fukui N, Purple CR, Sandell LJ. Cell biology of osteoarthritis: The chondrocyte's response to injury. *Curr Rheumatol Rep* 2001;3:496–505.
5. Hattori S, Hattori Y, Barba N, Kasai K, Shimoda S. Pentamethyl hydroxychromone, vitamin E derivative, inhibits induction of nitric oxide synthase by bacterial lipopolysaccharide. *Biochem Mol Biol Int* 1995;35:177–183.
6. Azzi A, Gysi R, Kempna P, *et al.* Regulation of gene and protein expression by vitamin E. *Free Radic Res* 2002;36(1):30–35.
7. Zingg JM, Azzi A. Non-antioxidant activities of vitamin E. *Cur Med Chem* 2004;11(9):1113–1133.
8. Singh U, Devaraj S, Jialal I. Vitamin e, oxidative stress, and inflammation. *Annu Rev Nutr* 2005;25:151–174.
9. Devaraj S, Li D, Jialal I. The effects of α -tocopherol supplementation on monocyte function: decreased lipid oxidation, interleukin-1 β secretion, and monocyte adhesion to endothelium. *J Clin Invest* 1996;98:756–763.
10. Ford ES, Mokdad AH, Giles WH, Brown DW. The metabolic syndrome and antioxidant concentrations. *Diabetes* 2003;52:2346–2352.
11. Farooqui AA, Ong WY, Horrocks LA. Inhibitors of brain phospholipase A2 activity: Their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders. *Pharmacol Rev* 2006;58(3):591–620.
12. Blankenhorn G. Clinical effectiveness of Spondyvit (vitamin E) in activated arthroses. A multicenter placebo-controlled double-blind study. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1986;124:340–343.
13. Scherak O, Kolarz G, Schodl C, Blankenhorn G. High dosage vitamin E therapy in patients with activated arthrosis. *Z Rheumatol* 1990;49:369–373.
14. Brand C, Snaddon J, Bailey M, Cicuttini F. Vitamin E is ineffective for symptomatic relief of knee osteoarthritis: a six month double blind, randomised, placebo controlled study. *Ann Rheum Dis* 2001;60:946–949.

15. Wluka AE, Stuckey S, Brand C, Cicuttini FM. Supplementary vitamin E does not affect the loss of cartilage volume in knee osteoarthritis: A 2 year double blind randomized placebo controlled study. *J Rheumatol* 2002;29:2585–2591.
16. Moreau M, Rialland P, Pelletier JP, *et al.* Tiludronate treatment improves structural changes and symptoms of osteoarthritis in the canine anterior cruciate ligament model. *Arthritis Res Ther* 2011;13(3):R98.
17. Association of American Feed Control Officials (AAFCO). Official publication, 1998.
18. Morris JG, Rogers QR. Assessment of the nutritional adequacy of pet foods through the life cycle. *Journal of Nutrition* 1994;124:2520S–2534S.
19. Gueguen S, Herbeth B, Siest G, Leroy P. An isocratic liquid chromatographic method with diode-array detection for the simultaneous determination of alpha-tocopherol, retinol, and five carotenoids in human serum. *J Chromatogr Sci* 2002;40(2):69–76.
20. Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, *et al.* Reduced progression of experimental osteoarthritis *in vivo* by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* 1998;41(7):1275–1286.
21. Yang F, Troncy E, Francoeur M, *et al.* Effects of reducing reagents and temperature on conversion of nitrite and nitrate to nitric oxide and detection of NO by chemiluminescence. *Clin Chem.* 1997;43:657–662.
22. Benford MS, Dannemiller S. Use of electrodermal activity for assessment of pain/stress in laboratory animals. *Animal Laboratory News* 2004;1:13–23.
23. Boileau C, Martel-Pelletier J, Caron J, *et al.* Protective effects of total fraction of avocado/ soybean unsaponifiables on the structural changes in experimental dog osteoarthritis: inhibition of nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-13. *Arthritis Res Ther* 2009; 11(2):R41.
24. Cook JL, Kuroki K, Visco D, Pelletier JP, Schulz L, Lafeber FP: The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the dog. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18(Suppl 3):S66–S79.
25. Pelletier JP, Di Battista JA, Raynauld JP, Wilhelm S, Martel- Pelletier J. The *in vivo* effects of intra articular corticosteroid injections on cartilage lesions, stromelysin, interleukin1 and oncogene protein synthesis in experimental osteoarthritis. *Lab Invest* 1995;72:578–586.
26. Singh U, Jialal I. Anti-inflammatory effects of α -tocopherol. *Ann NY Acad Sci* 2004;1031: 195–203.
27. Abramson SB, Attur M, Amin AR, Clancy R. Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2001;3:535–541.

28. Mayhan WG. Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheek pouch in response to adenosine 5'-diphosphate and bradykinin. *Inflammation* 1992;16:295–305.
29. Amin AR, Dave M, AtturM, Abramson SB. COX-2, NO, and cartilage damage and repair. *Curr Rheumatol Rep* 2000;2(6):447–453.
30. Calvis DF, Ladu S, Hironaka K, Factor VM, Thorgeirsson SS. Vitamin E down-modulates iNOS and NADPH oxidase in c-Myc/TGF- α transgenic mouse model of liver cancer. *Journal of Hepatology* 2004;41:815–822.
31. Hamada M, Yamamoto S, Kishino Y, Moriguchi S. Vitamin E suppresses the development of murine aids through the inhibition of nuclear factor-kappa B expression. *Nutrition Research* 2000;20(8):1163–1171.
32. Kamm JL, Nixon AJ, Witte TH. Cytokine and catabolic enzyme expression in synovium, synovial fluid and articular cartilage of naturally osteoarthritic equine carpi. *Equine Vet J* 2010;42(8):693-699.
33. Machtay I, Ouaknine L. Tocopherol in osteoarthritis. a controlled pilot study. *J Am Geriatr Soc* 1978;26:328–330.
34. Brenner SS, Klotz U, Alscher DM, *et al.* Osteoarthritis of the knee--clinical assessments and inflammatory markers. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:469–475.
35. Trumble TN, Billingham RC, McIlwraith CW. Correlation of prostaglandin E2 concentrations in synovial fluid with ground reaction forces and clinical variables or pain or inflammation in dogs with osteoarthritis induced by transection of the cranial cruciate ligament. *Am J Vet Res* 2004;65:1269–1275.
36. Abramson SB. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2008;10(Suppl 2):S2.
37. Edmonds SE, Winyard PG, Guo R, *et al.* Putative analgesic activity of repeated oral doses of vitamin E in the treatment of rheumatoid arthritis. Results of a prospective placebo controlled double blind trial. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1997;56:649–655.
38. Tiku ML, Shah R, Allison GT. Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation. Possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis. *J Biol Chem* 2000;275(26):20069–20076.
39. Watkins BA, Xu H, Turek JJ. Linoleate impairs collagen synthesis in primary cultures of avian chondrocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996;212(2):153–159.
40. Johnson JM, Johnson AL. Cranial cruciate ligament rupture: Pathogenesis, diagnosis and postoperative rehabilitation. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1993;23:717–733.

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'arthrose est une maladie dégénérative chronique des articulations synoviales, caractérisée par de la douleur, une destruction progressive du cartilage articulaire et un remodelage osseux. Chez le chien, l'arthrose secondaire est beaucoup plus fréquente que l'arthrose primaire (idiopathique), elle peut être causée par des traumatismes articulaires, des anomalies de conformation congénitales, des troubles métaboliques endocriniens et neuropathiques ou des causes iatrogènes. La maladie est diagnostiquée sur la base des signes cliniques, l'examen physique, la radiographie des articulations et l'analyse du liquide synovial (McLaughlin, 2000). L'importance de la maladie repose sur sa fréquence, on estime qu'elle concerne plus de 20% de la population canine chez les individus âgés de plus d'un an (Johnston, 1997). Elle peut constituer, un motif d'euthanasie.

Il est largement admis que l'arthrose est le résultat d'un déséquilibre entre les phénomènes de dégradation et les tentatives de réparation élaborées par les différents éléments cellulaires de l'articulation (Hamerman, 1989). Suite à une première agression d'origine mécanique, chimique, hormonale ou autre, le chondrocyte va réagir en élaborant une première réponse anabolique. Il va augmenter la synthèse des facteurs de croissance et de renouvellement des composants matriciels. Puis une réponse catabolique vient prendre place, caractérisée par l'augmentation de la production des MMPs et des cytokines pro-inflammatoires qui sont synthétisées par les chondrocytes et les synoviocytes (Martel-Pelletier *et al.*, 1999 ; Goetz, 2005). La principale cytokine incriminée dans l'arthrose est l'IL-1 β (Laadhar *et al.*, 2007 ; Kapoor *et al.*, 2011). Elle inhibe la synthèse des composants matriciels tels que le collagène type II et les protéoglycanes, elle stimule la synthèse de PGE2, responsable en partie de la synovite,

et elle induit aussi la dégradation des composants matriciels en augmentant l'expression des MMPs et des agrécanases (Chevalier, 1997). Elle crée ainsi un déséquilibre majeur entre le taux des enzymes et de leurs inhibiteurs naturels en défaveur de ces derniers (Blanco, 1999).

En outre, l'augmentation de la synthèse de PGE2 par les chondrocytes et les synoviocytes en réponse à l'IL-1 β pourrait expliquer les manifestations cliniques notamment algiques de l'arthrose chez le chien.

Les chondrocytes, suite à une stimulation par l'IL-1 β , synthétisent le NO sous l'action des NOS constitutive ou plus sûrement inductible (iNOS). Au cours de l'arthrose, la quantité de NO libérée est augmentée en raison de la surexpression de la iNOS. A côté de son rôle comme relais pour l'IL-1 β (Taskiran et *al.*, 1994), le NO peut par lui-même inhiber la synthèse des protéoglycanes, du collagène type II, stimuler l'action des MMPs et augmenter le relargage des agrécanes dans le liquide synovial entraînant une synovite et enfin une apoptose des chondrocytes (Lotz, 1999).

Les principaux objectifs de la prise en charge thérapeutique de l'arthrose sont de diminuer la douleur, de limiter la perte de capacité fonctionnelle et de ralentir la progression de la maladie. La gestion de l'arthrose chez le chien comporte plusieurs volets ; une activité physique régulière, un maintien de poids corporel idéal selon la race, un apport nutritionnel adapté et équilibré, une rééducation physique, une administration d'AINS et d'analgésiques. Les AINS sont traditionnellement utilisés dans le traitement de l'arthrose car ils diminuent la douleur et l'intensité de la boiterie en limitant l'inflammation (Jordan et *al.*, 2003). Cependant, ils possèdent des effets secondaires digestifs et rénaux, surtout suite à une longue utilisation chez des chiens âgés aux prises avec l'arthrose. Les recherches ont donc amené à s'intéresser à des molécules capables de prévenir la dégradation du cartilage avec des effets secondaires minimes.

Le but de l'utilisation de la nutrition dans la gestion de l'arthrose chez le chien est de palier aux effets secondaires des AINS, de fournir des éléments nutritifs qui améliorent la santé du cartilage et des articulations, de diminuer la douleur et l'inflammation, d'accroître la mobilité et de diminuer la libération des facteurs qui contribuent à la dégradation cartilagineuse (Roush et *al.*, 2010). Plusieurs études ont montré l'efficacité de la VE dans la gestion de l'arthrose chez l'homme (Blankenhorn, 1986 ; Link et Dreher, 1990 ; Scherak et *al.*, 1990 ; Haflah et *al.*, 2009). Par extrapolation de ces résultats et pour son effet antioxydant, cette vitamine est parfois utilisée dans les diètes destinées à l'amélioration de la mobilité articulaire avec des taux variables entre les compagnies de fabrication des aliments pour animaux de compagnies; Purina® JM (*Joint Mobility*) contient 25,4 mg de VE/100 Kcal EM, c'est l'équivalent de 317 UI de VE/animal de 25kg/jour. Dans Hill's® j/d Canine Mobilité, on trouve dans sa diète destinée à la gestion de l'arthrose chez le chien, une concentration de 582 UI VE/kg d'aliment, c'est l'équivalent de 260 UI de VE/animal de 25kg/jour. Pour Royal Canin® on trouve 16,2 mg de VE/100 kcal EM dans sa diète destinée à la gestion de l'arthrose MS (*Mobility Support*) qui est l'équivalent de 202 UI de VE/animal de 25kg/jour. Enfin, dans sa diète destinée à la gestion de l'arthrose chez le chien la compagnie Iams® (*Joint Health Canine Dry Formula*), on trouve une concentration de VE de l'ordre de 200 UI/Kg d'aliment qui est l'équivalent de 100 UI de VE/animal de 25 kg/jour. Il est à noter qu'aucune étude n'a montré l'efficacité de cette vitamine suite à son incorporation aux diètes destinées à la gestion de l'arthrose chez le chien. L'objectif de cette étude était de démontrer l'effet d'une supplémentation à forte dose en VE, supérieure aux doses proposées dans les diètes commerciales destinées la gestion de l'arthrose, sur l'inflammation et la douleur chez des chiens souffrants d'arthrose.

Dans cette étude, la supplémentation de VE à forte dose, sur une durée expérimentale de 55 jours fut capable de réduire les concentrations synoviales des marqueurs

inflammatoires PGE2 et NOx, d'améliorer les signes de la douleur associée à l'évolution de l'arthrose et de réduire les lésions histologiques du cartilage articulaire. Cependant, cette supplémentation n'a pas eu d'effet sur la formation d'ostéophytes, sur les lésions macroscopiques du cartilage articulaire et sur les lésions histologiques de la membrane synoviale.

La VE réduit la synthèse de la PGE2 par son action sur le métabolisme de l'acide arachidonique, les interactions complexes entre VE et les eicosanoïdes donnent lieu à une inhibition de la synthèse des prostaglandines (Singh et Jialal, 2004). En effet, la VE inhibe l'expression de phospholipase A2 et des cyclooxygénases (Tran et *al.*, 1996 ; Chan et *al.*, 1998a ; Chan et *al.*, 1998b ;). En agissant sur les voies de synthèse de médiateurs pro-inflammatoires tels que la PGE2, la VE montre un intérêt thérapeutique dans la gestion de l'arthrose chez le chien.

Dans notre étude, la concentration synoviale de NOx chez le groupe traité avec la VE était très faible par comparaison au groupe non traité. La VE inhibe l'activation de facteur nucléaire Kappa B (NFκB), qui joue un rôle primordial dans l'induction de la synthèse de iNOS qui est l'enzyme majeure impliquée dans la production de NOx inflammatoire (Hattori et *al.*, 1995 ; Calvis et *al.*, 2004). L'action de la VE sur la voie de synthèse des NOx est à l'origine de sa faible concentration dans le liquide synovial des animaux traités. En effet, les NOx jouent un rôle catabolique important dans le cartilage arthrosique et contribue à la progression de l'arthrose (Lotz, 1999). Ainsi l'utilisation de la VE pourrait limiter les effets nocifs des NOx au niveau de l'articulation du chien arthrosique à un stade précoce de la maladie, et pourrait ainsi limiter l'évolution de la maladie.

Dans la présente étude, IL-1β n'a pas été détectée dans le liquide synovial des chiens des deux groupes, probablement en relation avec l'évolution de l'arthrose, et la difficulté de détecter cette cytokine dans le liquide synovial (Kamm et *al.*, 2010). En

effet, la VE essentiellement à forte dose, est à l'origine d'une diminution de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF) *via* l'inhibition de la 5-lipoxygénase chez des patients souffrants des maladies cardio-vasculaires (Devraraaj et Jialal, 1999).

Dans notre étude, les scores VAS et NRS aux jours 28 et 55 après l'induction d'arthrose, étaient inférieurs chez le groupe traité avec la VE par rapport au groupe contrôle. Le traitement avec la VE a montré une tendance à l'amélioration des signes de la douleur. Ces résultats sont en relation avec le mécanisme d'action de la VE sur les voies de synthèse de la PGE2 et du NOx. En effet, il ya une corrélation positive qui a été identifiée entre la concentration de PGE2 et la substance P au niveau de l'articulation arthrosique (Kirker-Head et *al.*, 2000). Ainsi, la VE en agissant sur la synthèse de la PGE2 pourrait diminuer indirectement la concentration de substance P et par conséquent ceci pourrait expliquer (au moins partiellement) l'amélioration observée sur les signes de douleur chez le groupe traité. Les résultats trouvés dans cette expérimentation sont en corrélation avec d'autres études, à court terme, faites chez des humains souffrant d'arthrose. En effet, Machtey et Ouaknine (1978) ont montré que 600 mg d' α -tocophérol pendant 10 jours avaient un effet antalgique supérieur au placebo. De même, Blankenhorn (1986) a montré que chez 50 patients arthrosiques, 400 IU d' α -tocophérol pendant 6 semaines, étaient plus efficaces que le placebo dans l'amélioration de la douleur à la station debout, à la pression et à la mobilisation, et permettaient de réduire la prise d'antalgique. Ensuite, Scherak et *al.* (1990) ont montré que 544 mg d'acétate d' α -tocophérol trois fois par jour est aussi efficace sur la douleur arthrosique que 50 mg de diclofénac sur une période de 3 semaines. Ainsi, la VE a montré une efficacité sur l'amélioration de la douleur associée à l'arthrose à court terme, cette constatation supporte les résultats de cette étude. L'évaluation objective de la douleur, en utilisant l'EDA, a montré une diminution des scores attribués pour le groupe traité

avec la VE à J 28 et à J 55 (sans significativité statistique à ce temps) après induction de l'arthrose. Pour la première, fois, cette étude montre que le traitement avec la VE a eu une tendance à l'amélioration des signes de la douleur associées à l'arthrose. En effet, la valeur de l'EDA qui reflète l'activité des glandes de la sudation et du système nerveux autonome (Dawson et *al.*, 2007) est en relation directe avec la libération des catécholamines et autres agents vasomoteurs, qui sont à l'origine de l'augmentation de la perfusion de la peau. Il est probable que la VE agit indirectement sur l'EDA, par son action sur les voies de synthèse des marqueurs de l'inflammation et sur l'hypersensibilisation nociceptive.

La présente étude prouve que le traitement alimentaire avec une forte dose de VE réduit les lésions histologiques au niveau du cartilage articulaire (plateaux tibiaux et condyles fémoraux) avec un effet significatif au niveau du condyle fémoral latéral. Ces résultats sont supportés par d'autres études qui ont montré l'effet bénéfique de la VE sur la composition de la MEC du cartilage articulaire chez d'autres espèces animales. En effet, Tiku et *al.* (2000) ont montré que lorsque des chondrocytes du lapin ont été soumis à un stress oxydatif (ROS), la VE a réduit le catabolisme du collagène en empêchant l'oxydation des protéines par les produits de la peroxydation lipidique. Ainsi, la VE a augmenté la synthèse des GAG tout en réduisant la synthèse des glycolipides. En outre, Watkins et *al.* (1996) ont montré que l'incubation des chondrocytes du poulet, soumis à un stress oxydatif (Fer), avec de la VE préserve leurs capacités de synthèse du collagène. Cependant dans notre étude, l'effet de la VE a été plus marqué sur le côté latéral du condyle fémoral, qui est moins exposé aux contraintes mécaniques lors d'arthrose par comparaison au condyle médial. Conséquemment, l'efficacité de la VE pour préserver le cartilage articulaire chez le chien avec arthrose reste limitée.

Durant la période expérimentale de 56 jours, le traitement avec le VE n'a pas montré d'effets positifs sur les lésions histologiques de la membrane synoviale. Suite à la

création d'arthrose par section du LCC chez le chien, les modifications histologiques de la membrane synoviale sont très précoces ; après 1 à 2 semaines on constate une augmentation de la vascularisation et du nombre de couches cellulaires de la membrane synoviale, un développement des villosités synoviales et une infiltration leucocytaire du tissu sous-synovial (Johnson et Johnson, 1993). De même, le traitement avec la VE n'a pas réduit les lésions macroscopiques au niveau du cartilage articulaire, et le processus d'ostéophytose. Ces résultats sont en corrélation avec l'étude de Wluka et *al.* (2002) qui a montré que 500 UI de VE, sur une période de 2 ans, chez des patients avec arthrose, n'a pas donné d'effets sur la perte en volume du cartilage articulaire et sur la progression de l'arthrose. Ainsi l'effet de la VE reste faible sur la restauration du cartilage articulaire et la membrane synoviale, les deux unités anatomiques les plus incriminées dans la progression de l'arthrose.

Les présents résultats démontrent pour la première fois, qu'une forte dose de VE alimentaire chez le chien avec arthrose est à l'origine d'une diminution des concentrations synoviales des marqueurs de l'inflammation et d'une amélioration des signes de la douleur. Cependant cet effet reste faible sur la restauration et la préservation des structures anatomiques impliquées dans l'évolution de l'arthrose. Ainsi les actions pharmacodynamiques de la VE engendrées au niveau de l'articulation arthrosique, pourront être améliorées par une association avec d'autres substances capables de protéger les structures anatomiques impliquées dans l'arthrose, contre l'effet des MMPs, comme les TIMP (Kuroki et *al.*, 2003) même si aucun produit n'est officiellement homologué avec cette cible, mais la doxycycline (Nganvongpanit et *al.*, 2009) est reconnue comme telle, les insaponifiables d'avocat / soja (Boileau et *al.*, 2009), la *Brachytemma calycinum* D don (Boileau et *al.*, 2010) et les agonistes de récepteurs EP2 de PGE2 comme le butaprost (Sato et *al.*, 2011) ou encore un inhibiteur de la résorption osseuse à propriété analgésique comme le tiludronate (Moreau et *al.*,

2011) ou autre bisphosphonate. Il reste à vérifier la compatibilité médicamenteuse suite à l'association de la VE avec ces substances. L'association de VE à de tels structuro-modulateurs est donc source d'espoirs pour diminuer le développement des lésions et par ailleurs, les effets anti-inflammatoires démontrés dans notre étude laisse à penser que l'utilisation de hautes doses de VE dans l'arthrose canine serait susceptible de diminuer le recours systématique à des composés associés à un certain niveau d'effets secondaires comme les AINS.

Pour approfondir les investigations sur le rôle de la VE dans l'évolution de l'arthrose chez le chien, il apparaît que la détermination du stade d'arthrose où la VE pourrait donner des effets bénéfiques constitue une étape primordiale pour mieux illustrer les propriétés préventives ou curatives de cette vitamine. De même, l'évaluation de l'effet de la VE sur l'os sous-chondral pourrait apporter beaucoup plus d'informations pour mieux comprendre l'effet de cette vitamine sur tous les unités articulaires impliquées dans l'arthrose du chien. Ainsi, une étude histomorphométrique du cartilage calcifié et de l'os sous-chondral pourrait donner une évaluation plus objective sur l'inflammation et sur les scores lésionnels dans ces unités. La détermination de la concentration sérique des marqueurs de dégradation cartilagineuse pourrait donner une idée sur l'évolution dans le temps de l'effet thérapeutique de la VE sur l'arthrose et requerrait une étude de plus longue durée. De même, les mécanismes d'action de la VE sur les facteurs anaboliques / cataboliques impliqués dans l'évolution de l'arthrose devrait être approfondies afin de parvenir à une meilleure compréhension de l'action de la VE sur les voies d'initiation de l'évolution de cette maladie chez chien.

Notre étude présente des limites surtout au niveau du protocole expérimental et ceci malgré l'utilisation d'une large gamme des paramètres biochimiques, orthopédiques et lésionnels. En effet, la durée de l'expérimentation de 8 semaines est courte, comparée à l'évolution chronique de l'arthrose chez le chien, et l'utilisation d'un nombre limité de

chien ($n \leq 8$) par groupe. Ainsi, une expérimentation de longue durée, avec un nombre plus élevé d'animaux offrirait plus d'informations sur les effets potentiels de la VE contre le développement à long terme de l'arthrose chez le chien. En effet, chez l'homme une étude a été faite pour évaluer l'effet d'un nutraceutique, la glucosamine sulphate, sur l'arthrose et pour cela 212 patients atteints d'arthrose de genou ont participé dans cette étude sur une durée de 3 ans (Reginster et *al.*, 2001).

Les méthodes utilisées dans notre étude mettant en évidence les effets anti-inflammatoire de la VE pourront être complétées en utilisant des techniques d'imageries médicales. La scintigraphie nucléaire au technétium 99, permet chez des chiens ayant une synovite aiguë, de détecter les changements inflammatoires liés à la synovite (Canapp et *al.*, 1999 ; Schwarz et *al.*, 2004). Ainsi, cette technique pourrait être utilisée pour détecter d'une façon précoce les changements inflammatoires au niveau des unités anatomiques impliquées dans l'évolution de l'arthrose du grasset chez le chien, et ceci pour déterminer à quel stade de l'arthrose la VE pourrait donner ses effets bénéfiques. Dans le même cadre, l'imagerie par résonance magnétique (IRM), une technique non invasive, pourrait être utilisée pour évaluer les changements articulaires précoce consécutifs à l'arthrose. Elle permet d'obtenir une image tridimensionnelle avec une visualisation précise et simultanée de toute l'articulation (cartilage, os sous chondral et membrane synoviale) permettant une analyse qualitative et quantitative (d'Anjou et *al.*, 2008). L'IRM a été utilisée chez le chien avec arthrose induite chirurgicalement par section du LCC, pour visualiser la dégénérescence précoce du cartilage articulaire et l'évolution de l'arthrose, de détecter l'œdème de la moelle osseuse et l'épanchement synovial (Libicher et *al.*, 2005). Elle permet de détecter les changements au niveau de l'os sous-chondral 2 semaines après la création d'arthrose par section du LCC chez le chien (Baird et *al.*, 1998). L'inconvénient majeur de ces deux techniques, scintigraphie nucléaire et IRM, reste le coût important et le degré d'expertise du personnel technique.

L'OCT (*Optical Coherence Tomography*) permet de connaître les propriétés histologiques du cartilage. Monté sur un arthroscope, cet instrument permet chez l'homme de détecter des lésions précoces ; comme la visualisation à l'échelle microscopique de fibrillations, de zones de fibrose, de variations d'épaisseur du cartilage ou encore de remaniement de l'os sous-chondral (Herrmann et *al.*, 1999). Cette technique a été utilisée chez le chien pour évaluer les lésions histologiques des ménisques lors d'arthropathies (Guo et *al.*, 2009). L'histomorphométrie pourrait être utilisée pour évaluer l'effet anti-inflammatoire de la VE sur l'arthrose, c'est une technique d'analyse quantitative des coupes histologiques réalisées à partir de biopsies osseuses prélevées au niveau de l'articulation arthrosique. C'est une évaluation plus objective que l'histologie descriptive car elle permet d'évaluer avec une excellente résolution spatiale (échelle du micron) la perte de substance du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral chez le chien arthrosique (Myers et *al.*, 1999 ; Edinger et *al.*, 2000 ; Boileau et *al.*, 2009 ; Moreau et *al.*, 2011). Cependant, cette technique nécessite du matériel sophistiqué et une reconstruction 3D préalable à partir des coupes réalisés. D'autres marqueurs de la dégradation de la MEC peuvent être utiles aussi pour mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire de la VE. Les protéines COMP (*Cartilage Oligomeric Matrix Proteins*), constituants non collagéniques de la MEC, représentent des marqueurs synoviaux et sériques pour évaluer l'ampleur de la destruction de la MEC chez des personnes souffrants d'arthrose (Clark et *al.*, 1999). En effet, il y a une corrélation entre la concentration sérique de COMP et l'intensité de la synovite chez le chien (Misumi et *al.*, 2002). Le traitement des chiens arthrosiques avec des GAGs phosphatées a permis de réduire la concentration sérique de COMP et la boiterie (Fujiki et *al.*, 2007).

Dans notre étude, l'évaluation de l'effet anti-hyperalgésique de la VE a été basée essentiellement sur des méthodes subjectives (VAS et NRS) dont l'interprétation

dépend de l'expérience du praticien. Ainsi, cette évaluation pourrait être améliorée en utilisant des méthodes permettant de recueillir des données objectives. La plaque de force, technique cinétique largement utilisée en expérimentation orthopédique chez le chien, permet d'obtenir une évaluation non invasive dynamique, objective et quantitative des forces exercées entre le pied et le tapis durant la phase d'appui de l'animal (DeCamp, 1997 ; Oosterlinck *et al.*, 2011). Chez un chien présentant une douleur articulaire, l'amplitude des pics de forces d'appui est réduite car l'intensité des forces est significativement réduite. Cette technique a été utilisée dans plusieurs expérimentations chez des chiens arthrosiques pour tester l'efficacité analgésique / anti-hyperalgésique des substances utilisées (Moreau *et al.*, 2007 ; Boileau *et al.*, 2010 ; Gupta *et al.*, 2011 ; Moreau *et al.*, 2011). Dans une autre étude cette technique a été utilisée en association avec la concentration sérique du cortisol pour évaluer la douleur chez des chiens ayant une synovite aiguë (Feldsein *et al.*, 2010). Autre méthode qui pourrait être utilisée pour évaluer l'effet anti-hyperalgésique de la VE, la goniométrie, permet de mesurer l'amplitude articulaire des différentes articulations du corps sur un animal statique et ainsi donner une idée objective sur la douleur chez un chien arthrosique. Les différentes études montrent que cette technique est fiable et reproductible, cependant, les repères anatomiques doivent impérativement être bien déterminés pour standardiser les mesures (Dahlberget *et al.*, 2005 ; Imhoff *et al.*, 2011).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Dans l'état actuel des connaissances de la physiopathologie de l'arthrose chez le chien, et les substances utilisées pour la gestion de cette affection orthopédique, il est fortement indiqué d'encourager l'emploi des substances dont l'efficacité est associée à leur grande sécurité d'emploi. Notre étude est, à notre connaissance, la première à investiguer les effets d'une forte dose en VE alimentaire sur l'inflammation et les douleurs arthrosiques chez le chien, après la création d'arthrose par section du ligament croisé crânial. Cette supplémentation vitaminique, à un stade précoce de l'apparition de l'arthrose, est à l'origine d'une diminution des concentrations synoviales de marqueurs de l'inflammation (PGE2 et NOx), et d'une tendance à l'amélioration des signes de la douleur associés à l'évolution de l'arthrose. Cependant, la VE n'a pas donné d'effets positifs sur la restauration des structures anatomiques, du cartilage et de la membrane synoviale, impliquées dans l'arthrose. Ainsi, la VE par ces effets sur les marqueurs de l'inflammation et l'amélioration des signes de la douleur arthrosique, pourrait être indiquée dans le traitement d'arthrose chez le chien en association avec d'autres substances structuro-modulatrices.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abramson SB, Attur M, Yazici Y. Prospects for disease modification in osteoarthritis. *Nature Clinical Practice Rheumatology* 2006;2(6):304-312.

Adaramoye OA, Akinloye O, Olatunji IK. Trace elements and Vitamin E status in Nigerian patients with prostate cancer. *African Health Sciences* 2010;10(1):2-8.

Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme* 2007;74:636-643.

Aigner T, Kurz B, Fukui N, Sandell L. Roles of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2002;14:578-84.

Allan DA. Structure and physiology of joints and their relationship to repetitive strain injuries. *Clin Ortho* 1998;351:32-8.

Amin A, Dave M, Attur M, Abramson SB. Cox-2, NO and cartilage damage and repair. *Curr Rheumatol Rep* 2000;2:447-53.

Arner EC, Hughes CE, Decicco CP, Caterson B, and Tortorella MD. Cytokine-induced cartilage proteoglycan degradation is mediated by aggrecanase. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6:214-228.

Aziz A, Stocker A. Vitamin E : non-antioxydant roles. *Progress in Lipid Research* 2000;39: 231-255.

Baird DK, Hathcock JT, Kincaid SA, Rumph PF, Kammermann J, Widmer WR, Visco D, Sweet D. Low-field magnetic resonance imaging of early subchondral cyst-like lesions in induced cranial cruciate ligament deficient dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 1998;39:167-173.

Barneveld A, Van Weeren PR. Early changes in the distal intertarsal joint of Dutch Warmblood foals and the influence of exercise on bone density in the third tarsal bone. *Equine Vet J Suppl* 1999;31:67-73.

Beale BS. Orthopedic Problems in Geriatric Dogs and Cats. *Vet Clin Small Anim* 2005;35: 655-674.

Benton HP, Vasseur PB, Broderick-Villa GA, Koolpe M. Effect of carprofen on sulphated glycosaminoglycan metabolism, protein synthesis, and prostaglandin release by cultured osteoarthritic canine chondrocytes. *American Journal of Veterinary Research* 1997;58:286-292.

Berenbaum F. Anatomopathologie et pathogénie de l'arthrose. *Rev. Rhum* 2000;67:119-25.

Bhosale MA, Richardson BJ. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British Medical Bulletin* 2008:1-19.

Bierer TL, Bui LM. Improvement of arthritic signs in dogs fed green-lipped mussel (*Perna canaliculus*). *J Nutr* 2002;132(6):1634S-1636S.

Black J, Shadle CA, Parsons JR, et al. Articular cartilage preservation and storage. II. Mechanical indentation testing of viable, stored articular cartilage. *Arthritis Rheum* 1979; 22(10):1102-8.

Blanco Garcia FJ. Catabolic events in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 1999; 7:308-9.

Blankenhorn G. Clinical effectiveness of Spondyvit (vitamin E) in activated arthroses. A multicenter placebo-controlled double-blind study. *Z Orthop* 1986;124(3):340-343.

Blois SL, Allen DG, Wood RD, Conlon PD. Effects of aspirin, carprofen, deracoxib, and meloxicam on platelet function and systemic prostaglandin concentrations in healthy dogs. *J Vet Res* 2010;71:349-358.

Boileau C, Martel-Pelletier J, Caron J, Pare F, Troncy E, Moreau M, Pelletier JP: Oral treatment with a *Brachystemma calycinum* D don plant extract reduces disease symptoms and the development of cartilage lesions in experimental dog osteoarthritis: inhibition of protease-activated receptor 2. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1179-1184.

Boileau C, Pelletier MJ, Caron J, Msika P, Guillou GB, Baudouin C, and Pelletier JP. Protective effects of total fraction of avocado/soybean unsaponifiables on the structural changes in experimental dog osteoarthritis: inhibition of nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-13. *Arthritis Research & Therapy* 2009;11(2):1-9.

Borel P, Mekki N, Boirie Y, Partier A, Grolier P, Alexandre-gouabau MC, Beaufrere B, Armand M, Lairon D, Azais-braesco V. Postprandial chylomicron and plasma vitamin E responses in healthy older subjects compared with younger ones. *Eur J Clin Invest* 1997;27: 812-21.

Brand C, Snaddon J, Bailey M, Cicuttini F : Vitamin E is ineffective for symptomatic relief of knee osteoarthritis: a six month double blind, randomised, placebo controlled study. *Ann Rheum Dis* 2001;60:946-949.

Budsberg SC. Outcome assessment in clinical trials involving medical management of osteoarthritis in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1997;27:815-823.

Burr DB. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthrosis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12SupplA:S20-30.

Calvis DF, Ladu S, Hironaka K, Factor VM and Thorgeirsson SS. Vitamin E down-modulates iNOS and NADPH oxidase in c-Myc/TGF- α transgenic mouse model of liver cancer. *Journal of Hepatology* 2004;41:815-822.

Canapp SO, McLaughlin RM , Hoskinson JJ, Roush JK, Butine MD. Scintigraphic Evaluation of Dogs with Acute Synovitis after Treatment with Glucosamine Hydrochlorid and Chondroitin Sulfate. *American Journal of Veterinary Research* 1999;60(12):1552-1557.

Chan JM, Stampfer MJ, Ma J, Rimm BE, Willett CW, Giovannucci LE. Supplemental vitamin E intake and prostate cancer risk in a large cohort of men in the United States. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 1999;8:893-899.

Chan PS, Caron JP, Rosa GJM and Orth MW. Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E2 in articular cartilage explants. *Osteoarthritis and Cartilage* 2005;13:387-394.

Chan AC, Wagner M, Kennedy C, Chen E, Lanuville O, Mezl VA, Tran K, and Choy PC. Vitamin E up-regulates arachidonic acid release and phospholipase A2 in megakaryocytes. *Mol. Cell. Biochem* 1998;18:153–159.(a)

Chan AC, Wagner M, Kennedy C, Mroske C, Proulx P, Laneuville O, Tran K, and Choy P. C. Vitamin E up-regulates phospholipase A2, arachidonic acid release and cyclooxygenase in endothelial cells. *Akt Ernahr Med* 1998;23:1–8.(b)

Chandra V, Jasti J, Kaur P, Betzel Ch, Srinivasan A and Singh TP. First Structural Evidence of a Specific Inhibition of Phospholipase A2 by α -Tocopherol (Vitamin E) and its Implications in Inflammation: Crystal Structure of the Complex Formed Between Phospholipase A2 and α -Tocopherol at 1.8 Å Resolution. *J Mol Biol* 2002;320:215–222.

Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993 ;49:481-493.

Chevalier X et Richette P : Cartilage articulaire normal : anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement, EMC-Rhumatologie Orthopédie 2005;(2):41–58

Chevalier X. Upregulation of enzymatic activity by interleukin-1 in osteoarthritis. *Biomed Pharmacother* 1997;51:58–62.

Clark AG, Jordan JM, Vilim V, et al. Serum cartilage oligomeric matrix protein reflects osteoarthritis presence and severity. *Arthritis Rheum* 1999;42:2356-2364.

Clarke MW, Burnett JR, Croft KD. Vitamin E in human health and disease. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2008;45(5):417–450.

Corvol MT. The chondrocyte: from cell aging to osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 2000;67: 557–60.

Curtis CL, Rees SG, Cramp J, Flannery CR, Hugues CE, Little CB, Williams R, Wilson C, Dent CM, Harwood JL, Caterson B. Effects of n-3 fatty acids on cartilage metabolism. *Proc Nutr Soc* 2002;61(3):381-389.

Cuvelier C, Dotreppe O, Istasse L. Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Ann Méd Vét* 2003;147:315-324.(a)

Cuvelier C, Dotreppe O, Istasse L. Vitamine E : état des connaissances chez les carnivores domestiques. Métabolisme, besoins et apports. *Ann Méd Vét* 2003;147:367-382.(b).

Dahlberg J, Fitch G, Evans RB, McClure SR, Conzemius M. The evaluation of extracorporeal shockwave therapy in naturally occurring osteoarthritis of the stifle joint in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2005;18(3):147-52.

Damiano J, Bardin T. Liquide synovial normal et pathologique. *EMC-Podologie* 2005;1:65–79.

- d'Anjou MA, Moreau M, Troncy E, Martel-Pelletier J, Abram F, Raynauld JP, Pelletier JP. Osteophytosis, Subchondral Bone Sclerosis, Joint Effusion and Soft Tissue Thickening in Canine Experimental Stifle Osteoarthritis: Comparison Between 1.5T Magnetic Resonance Imaging and Computed Radiography. *Veterinary Surgery* 2008;37:166–177.
- Dawson ME, Schell AM, Filion DL. The electrodermal system. In: Cacioppo JT, Tassinary LG, Berntson GG, editors. *Handbook of psychophysiology*. Cambridge: Cambridge University Press 2007.159–81.
- De Leval X, Delarge J, Somers F, De Tullio P, Henrotin Y, Pirotte B, Dogne JM. Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition. *Current Medical Chemistry* 2000 ;7:1041–1062.
- DeCamp CE. Kinetic and kinematic gait analysis and assessment of lameness in the dogs. *Veterinary clinics of North America. Small Animal Practice* 1997;27:825-840.
- Del Carlo M, Loeser RF. Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species. *Arthritis Rheum* 2002;46:394–403.
- Desrumaux C, Deckert V, Athias A, Masson D, Lizard G, Palleau V, Gambert P, Lagrost L. Plasma phospholipid transfer protein prevents vascular endothelium dysfunction by delivering a-tocopherol to endothelial cells. *The FASEB Journal* 1999;13:883–892.
- Devaraj S, Jialal I. Alpha-tocopherol decreases interleukin-1 beta release from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19 (4):1125–1133.
- Dick IE, Brochu RM, Purohit Y, et al. Sodium channel blockade may contribute to the analgesic efficacy of antidepressants. *J Pain* 2007;8:315–24.
- Ding M, Odgaard A, Hvid I. Changes in the three-dimensional microstructure of human tibial cancellous bone in early osteoarthritis. *J Bone Joint Surg Br* 2003;85(6):906-912.
- Dossin O, Trumel C, Arnaud JP. Effect of ketoprofen on hemostasis in healthy dogs. *J Vet Intern Med* 1998;12:226.
- Dougados M. Sodium Hyaluronate Therapy in Osteoarthritis: Arguments for a Potential Beneficial Structural Effects. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2000;30(2):19-25.
- Dowthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, Evans DJ, Haughton L, Bayram Z, Boyer S, Thomson B, Wolfe MS, Archer CW. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci* 2004;29:889–97.
- Edinger DT, Hayashi K, Hongyu Y, Markel MD, Manley PA. Histomorphometric analysis of the proximal portion of the femur in dogs with osteoarthritis. *Am J Vet Res* 2000;61(10):1267-72.
- Feldsein JD, Wilke VL, Evans RB, Conzemius MG. Serum cortisol concentration and force plate analysis in the assessment of pain associated with sodium urate-induced acute synovitis in dogs. *Am J Vet Res* 2010;71(8):940-5.

Fernandes JC, Pelletier JM and Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis Pathophysiology. *Biorheology* 2002;39:237–246.

Freemont AJ, Byers RJ, Taiwo YO. and Hoyland JA. In Situ Zymographic Localization of Type II Collagen Degrading Activity in Osteoarthritic Human Articular Cartilage. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1999;58(6):357-365.

Frisbie D, Cross M, McIlwraith C. A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee *Vet. Comp Orthop Traumatol* 2006;19(3):142-146

Frost HM. Perspectives: a biomechanical model of the pathogenesis of arthroses. *Anat Rec* 1994;240(1):19-31.

Fujiki M, Shineha J, Yamanokuchi K, Misumi K, Sakamoto H. Effects of treatment with polysulfated glycosaminoglycan on serum cartilage oligomeric matrix protein and C-reactive protein concentrations, serum matrix metalloproteinase-2 and -9 activities, and lameness in dogs with osteoarthritis. *Am J Vet Res* 2007;68(8):827-33.

Genevois JP. Arthrose : Etiopathogénie, physiopathologie, actualités thérapeutiques. *Bull Soc Vét Prat De France* 2005(1):23-32.

Gey KF, Puska P, Jordan P, Moser UK. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr* 1991; 53:326S-34S.

Goetz P. Phytothérapie de l'arthrose : Effets pharmacologiques et cliniques d'insaponifiables, anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente (AASAL). *Phytothérapie*. 2005;5:208-210.

Goggs R, Carter SD, Tanzil GS, Shakibaei M, Mobasher A. Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis. *Vet J* 2003;166:140–58.

Goldring MB. Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines in this disorder. *Curr Rheumatol Rep* 2000;2:459–65.

Guo S, Sun J, Pozzi A, Ling HY, Wu L, Liu L, Xie H. 3D polarization-sensitive optical coherence tomography of canine meniscus based on a 2D high-fill-factor microelectromechanical Mirror. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2009;2009:1445-8.

Gupta RC, Canerdy TD, Lindley J, Konemann M, Minniear J, Carroll BA, Hendrick C, Goad JT, Rohde K, Doss R, Bagchi M, Bagchi D. Comparative therapeutic efficacy and safety of type-II collagen (uc-II), glucosamine and chondroitin in arthritic dogs: pain evaluation by ground force plate. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2011:1-8

Haflah NH, Jaarin K, Abdullah S, Omar M. Palm vitamin E and glucosamine sulphate in the treatment of osteoarthritis of the knee. *Saudi Med J* 2009;30(11):1432-8.

Hamerman D. The biology of osteoarthritis. *N Engl J Med* 1989;320:1322–30.

Hattori S, Hattori Y, Barba N, Kasai K, Shimoda S. Pentamethyl hydroxychromone, vitamin E derivative, inhibits induction of nitric oxide synthase by bacterial lipopolysaccharide. *Biochem Mol Biol Int* 1995;35:177-183.

Hauselmann HJ. Nutraceuticals for Osteoarthritis. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology* 2001;15(4):595-607.

Hayes AJ, Dowthwaite GP, Webster SV, Archer CW. The distribution of Notch receptors and their ligands during articular cartilage development. *J Anat* 2003;202:495-502.

Hedbom E and Häuselmann HJ. Molecular Aspects of Pathogenesis in Osteoarthritis: the role of inflammation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2002;59:45-53.

Henrotin Y, Labasse A, Zheng SX, et al. Effects of three avocado-soybean unsaponifiable mixtures on human articular chondrocyte metabolism. *Arthritis Rheum* 1996;39:S226.

Henrotin Y, Sanchez C, Balligand M. Pharmaceutical and nutraceutical management of canine osteoarthritis: Present and future perspectives. *Vet J* 2005;170(1):113-123.

Herrmann JM, Pitris C, Bouma BE, Boppart SA, Jesser CA, Stamper DL, Fujimoto JG, Brezinski ME. High resolution imaging of normal and osteoarthritic cartilage with optical coherence tomography. *J Rheumatol* 1999;26(3):627-635.

Imhoff DJ, Gordon-Evans WJ, Evans RB, Johnson AL, Griffon DJ, Swanson KS. Evaluation of S-adenosyl l-methionine in a double-blinded, randomized, placebo-controlled, clinical trial for treatment of presumptive osteoarthritis in the dog. *Vet Surg* 2011;40(2):228-32.

Impellizeri JA, Tetrick MA, Muir P. Effect of weight reduction on clinical signs of lameness in dogs with hip osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc* 2000;216:1089-1091.

Innes JF, Clayton J, Lascelles BDX. Review of the safety and efficacy of long-term NSAID use in the treatment of canine osteoarthritis. *Veterinary Record* 2010;166:226-230.

Jacquet A, Girodet PO, Pariente A, Forest K, Mallet L, Moore N. Phytalgic®, a food supplement, vs placebo in patients with osteoarthritis of the knee or hip: a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial. *Arthritis Research & Therapy* 2009;11(6):1-9.

Jewell DE, Tool PW, Wedekind KJ, Zicker SC. Effect of increasing dietary antioxidants on concentrations of vitamin E and total alkenals in serum of dogs and cats. *Vet Ther* 2000;1: 264-272.

Jiang Q, Yin X, Lill MA, Danielson ML, Freiser H, Huang J. Long-chain carboxychromanols, metabolites of vitamin E, are potent inhibitors of cyclooxygenases. *PNAS* 2008;105(51):20464-20469.

Johnson JM. and Johnson AL. Cranial Cruciate Ligament Rupture: Pathogenesis, Diagnosis and Postoperative Rehabilitation. *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 1993;23:717-733.

- Johnston S. Joint anatomy, physiology, and pathobiology *Vet Clin. North Am Small Anim Pract* 1997;27(4):699-723.
- Johnston SA, Leib MS, Forrester SD, Marini M. The effect of misoprostol on aspirin-induced gastroduodenal lesions in dogs. *J Vet Intern Med* 1995;9(1):32-38.
- Johnston SA, McLaughlin RM, Budsberg SC. Nonsurgical Management of Osteoarthritis in Dogs. *Vet Clin Small Anim* 2008;38:1449-1470.
- Jordan KM, Arden NK, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma JW, Dieppe P, Gunther K, Hauselmann H, Herrero-Beaumont G, Kaklamanis P, et al. EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis* 2003;62:1145-1155.
- Jouzeau JY, Daouphars M, Benani A, Netter P. Pharmacologie et classification des inhibiteurs de la cyclooxygénase. *Gastroenterol Clin Biol* 2004;28:C7-C17.
- Jovanovic DV, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, et al. In vivo dual inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase by ML-3000 reduces the progression of experimental osteoarthritis: suppression of collagenase 1 and interleukin-1 β synthesis. *Arthritis Rheum* 2001; 44:2320-30.
- Kamm JL, Nixon AJ, and Witte TH. Cytokine and catabolic enzyme expression in synovium, synovial fluid and articular cartilage of naturally osteoarthritic equine carpi *Equine vet J* 2010;42(8):693-699.
- Kapoor M, Pelletier JM, Lajeunesse D, Pelletier JP, and Fahmi H. role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:33-42.
- Kealy RD, Lawler DF, Ballam JM, Lust G, Biery DN, Smith GK, Mantz S. Evaluation of the effect of limited food consumption on radiographic evidence of osteoarthritis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2000;217:1678-1680.
- Kidd BL, Langford RM, Wodehouse T. Arthritis and pain. Current approaches in the treatment of arthritic pain. *Arthritis Res Ther* 2007;9:1-7.
- Kirker-Head CA, Chandna VK, Agarwal RK, et al. Concentrations of substance P and prostaglandin E2 in synovial fluid of normal and abnormal joints of horses. *Am J Vet Res* 2000;61:714-718.
- Kirsh AV, Hayes BR, Mayne TS, Chatterjee N, Subar FA, Dixon LB, Albanes D, Andriole AD, Peters U. Supplemental and dietary vitamin E, beta-carotene, and vitamin C intakes and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:245-254.
- Kuroki K, Cook JL, Kreeger JM, Tomlinson JL. The effects of TIMP-1 and -2 on canine chondrocytes cultured in three-dimensional agarose culture system. *Osteoarthritis and Cartilage* 2003;11:625-635.
- Kurtz B, Jost B, Schunke M. Dietary Vitamins and Selenium Diminish the Development of Mechanically Induced Osteoarthrosis and Increase the Expression of Antioxydative Enzymes in the Knee Joint of STR/1N Mice. *Osteoarthritis and Cartilage* 2001;10:255-267.

Laadhar L, Zitouni M, Kalle-Sellam M, Mahjoub M, Sellami S, Makni S. Physiopathologie de l'arthrose. Du cartilage normal au cartilage arthrosique : facteurs de prédisposition et mécanismes inflammatoires. *La Revue de médecine interne* 2007;28:531-536.

Le Blaye I. Pathogénie de l'arthrose. *Le Point Vétérinaire* 2004,35,251, Publi-rédactionnel / Supplément *Le Point Vétérinaire*.

Lee JV, Kim JH, Lee WG, Han TS, Cho K, Han HJ, Kang SS, Kim G, Choi SH. Scintigraphic evaluation of TPLO and CTWO in canine osteoarthritis. *In Vivo* 2007;21(5): 855-9.

Leger CL. La vitamine E : état actuel des connaissances, rôle dans la prévention cardiovasculaire, biodisponibilité. *Oléagineux Corps Gras Lipides* 2000;7(3):258-265.

Lemke KA, Runyon CL, Horney BS. Effects of preoperative administration of ketoprofen on whole blood platelet aggregation, buccal mucosal bleeding time, and hematologic indices in dogs undergoing elective ovariohysterectomy. *J Am Vet Med Assoc* 2002;220(12):1818-1822.

Li B, Marshall D, Roe M, Aspden RM. The electron microscope appearance of the subchondral bone plate in the human femoral head in osteoarthritis and osteoporosis. *J Anat* 1999;195:101-110.

Libicher M, Ivancic M, Hoffmann V and Wenz W. Early Changes in Experimental Osteoarthritis using the Pond-Nuki Dog Model: Technical Procedure and Initial Results of in vivo Imaging. *European Radiology* 2005;15:390-394.

Link P, Dreher R. D-Alpha-Tocopherol acetat versus Diclofenac-Na in der Therapie der aktivierten Arthrose. *Dtsch Ärztemagazin* 1990;22:48-52.

Lotz M. Cytokines in cartilage injury and repair. *Clin Orthop Relat Res* 2001;(391 Suppl): S108-15.

Lotz M. The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheum Dis Clin North Am* 1999;25:269-82.

Machtley I, Ouaknine L. Tocopherol in Osteoarthritis : a controlled pilot study. *J Am Geriatr Soc* 1978;26(7):328-330.

MacNaughton SM. Acetaminophen toxicosis in a Dalmatian. *Can Vet J* 2003;44:142-144

Mallein-gerin F, Van Der Rest M. La culture du chondrocytes : outils d'analyse de la différenciation et de l'organisation moléculaire du cartilage. *Médecine/sciences* 1996;12: 1087-96.

Martel-Pelletier J, Di Battista J, Lajeunesse D. Biochemical factors in joint articular tissue degradation osteoarthritis. In: Reginster JY, Pelletier JP, Pelletier JM, Henrotin Y, editors. *Osteoarthritis clinical and experimental aspects*. Heidelberg: Springer 1999.p.156-87(éd).

Martel-Pelletier J. Pathophysiology of Osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6:374-376.

- Mathews KA. Neuropathic Pain in Dogs and Cats: If Only They Could Tell Us If They Hurt *Vet Clin Small Anim* 2008;38:1365–1414
- Mcalindon T, Felson DT. Nutrition: risk factors for osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1997;56: 397-400.
- McCarthy G, O'Donovan J, Jones B, et al. Randomised double-blind, positive controlled trial to assess the efficacy of glucosamine/chondroitin sulfate for the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet J* 2007;174:54–61.
- McIlwraith CW. Disease processes of synovial membrane, fibrous capsule, ligaments, and articular cartilage. in *AAEP proceedings* 2001;47:142-156.
- McIlwraith CW. Diseases of joints, tendons, ligaments, and related structures, in *Adam's lameness in horses*. T S Stashak Editor 2002;459-469.
- McLaughlin R. Management of chronic osteoarthritic pain. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 2000;30:933-949.
- McPhail CM, Lappin MR, Meyer DJ, Smith SG, Webster CR, Armstrong PJ. Hepatocellular toxicosis associated with administration of carprofen in 21 dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 212(12):1895-1901.
- Misumi K, Vilim V, Carter SD, et al. Concentrations of cartilage oligomeric matrix protein in dogs with naturally developing and experimentally induced arthropathy. *Am J Vet Res* 2002;63:598–603.
- Moreau M, Dupuis J, Bonneau NH, et al. Clinical evaluation of a nutraceutical, carprofen and meloxicam for the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet Rec* 2003;152:323–9.
- Moreau M, Lussier B, Doucet M, Vincent G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Efficacy of licofelone in dogs with clinical osteoarthritis. *Vet Rec* 2007;160(17):584-8.
- Moreau M, Rialland P, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Boileau C, Caron J, Frank D, Lussier B, Del Castillo JRE, Beauchamp G, Gauvin D, Bertaim T, Thibaud D, Troncy E. Tiludronate treatment improves structural changes and symptoms of osteoarthritis in the canine anterior cruciate ligament model. *Arthritis Research Therapy* 2011;13(3):R98.
- Morris JG, Rogers QR. Assessment of the nutritional adequacy of pet foods through the life cycle. *Journal of Nutrition* 1994;124:2520S-2534S.
- Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *BioEssays* 2005,17,1039-1048.
- Muir H. Proteoglycans as organizers of the intercellular matrix. *Biochem Soc Trans* 1983;11 :613-22.
- Myers SL, Brandt KD, Burr DB, O'Connor BL, Albrecht M. Effects of a bisphosphonate on bone histomorphometry and dynamics in the canine cruciate deficiency model of osteoarthritis. *J Rheumatol* 1999;26:2645-2653.

Narita T, Tomizawa N, Sato R, et al. Effects of long-term oral administration of ketoprofen in clinically healthy beagle dogs. *J Vet Med Sci* 2005;67:847–853.

Neil K, Caron J, Orth M. The role of glucosamine and chondroitin sulfate in treatment for and prevention of osteoarthritis in animals. *J Am Vet Med Assoc* 2005;226(7):1079-1088.

Nganvongpanit K, Pothacharoen P, Suwankong N, Ong-Chai S, Kongtawelert P, The effect of doxycycline on canine hip osteoarthritis: design of a 6- months clinical trial. *J Vet Sci* 2009;10(3):239-247.

Norrdin RW, et al. Calcified cartilage morphometry and its relation to subchondral bone remodeling in equine arthrosis. *Bone* 1999;24(2):109-114.

Onyekwelu I, Goldring MB, Hidaka C. Chondrogenesis, Joint Formation, and Articular Cartilage Regeneration. *Journal of Cellular Biochemistry* 2009;107:383–392.

Oosterlinck M, Bosmans T, Gasthuys F, Polis I, Van Ryssen B, Dewulf J, Pille F. Accuracy of pressure plate kinetic asymmetry indices and their correlation with visual gait assessment scores in lame and nonlame dogs. *Am JVet Res* 2011;72(6):820-5.

Patel J, Matnor NA, Iyer A, Brown L. A regenerative antioxidant protocol of vitamin E and α -lipoic acid ameliorates cardiovascular and metabolic changes in fructose-fed rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011;9:1-8.

Patwari P, and al. Mannosamine Inhibits Aggrecanase-Mediated Changes in the Physical Properties and Biochemical Composition of Articular Cartilage. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000;374(1):79-85.

Pelletier JP, and Martel-Pelletier J. Rôle de l'Inflammation Synoviale, des Cytokines et de l'IGF-1 dans la Physiopathologie de l'Arthrose. *Revue de Rhumatologie* 1994;61:81-85.

Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* 2001;44: 1237–47.

Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Tardif G, Martel-Pelletier J. The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL1Ra synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 1996;4:77–84.

Pelletier JP, Mineau F, Raynauld JP, Woessner F, Gunja Smith Z, Martel-Pelletier J. Intraarticular injections with methylprednisolone acetate reduce osteoarthritic lesions in parallel with chondrocyte stromelysin synthesis in experimental osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 1994;37:414–423.

Pepin SR, et al. A Comparative Analysis of 7.0-Tesla Magnetic Resonance Imaging and Histology Measurements of Knee Articular Cartilage in a Canine Posterolateral Knee Injury Model : A Preliminary Analysis. *Am J Sports Med* 2009(37)Supplement1,119-125.

Poole AR, Kobayashi M, Yasuda T, et al. Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann Rheum* 2002;61(Suppl II):78–81.

Poole AR, et al. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop* 2001(391 Suppl):p.S26-33.

Ralphs JR, Benjamin M. The joint capsule: structure, composition, ageing and disease. *J Anat* 1994;184:503-509.

Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. The new collagenase, collagenase 3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest* 1996;97:2011-9.

Reginster JY, Deroisy R, Rovati LC, et al. Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomized, placebo- controlled clinical trial. *Lancet* 2001;357:251-256.

Reginster JY, Henrotin Y. Conception actuelle du traitement de l'arthrose. *Revue de la médecine générale* 2000;177:382-391.

Revell PA, Mayston V, Lalor P, MAPP P. The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterisation of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1988;47:300-307.

Roughley PJ. Articular cartilage and changes in arthritis Noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Res* 2001;3:342-347

Roush JK, Cross AR, Renberg WC, Dodd CE, Sixby KA, Fritsch DA, Allen TA, Jewell DE, Richardson DC, Leventhal PS, Hahn KA. Evaluation of the effects of dietary supplementation with fish oil omega-3 fatty acids on weight bearing in dogs with osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc* 2010;236(1):67-73.

Rupérez FJ, Martin D, Herrera E, Barbas, C. Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices. *Journal of Chromatography* 2001;935:45-69.

Ryan MC, Sandell LJ. Differential expression of a cysteine-rich domain in the amino-terminal propeptide of type II (cartilage) procollagen by alternative splicing of mRNA. *J Biol Chem* 1990;265:10334-9.

Sandell LJ. Reexpression of type IIA procollagen by adult articular chondrocytes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 1999;42:1443-50.

Sato T, Konomi K, Fujii R, Aono H, Aratani S, Yagishita N, Araya N, Yudoh K, Beppu M, Yamano Y, Nishioka K, and Nakajima T. Prostaglandin EP2 receptor signalling inhibits the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritic chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 2011;70:221-226.

Scherak O, Kolarz G, Schodl C, Blankenhorn G. High dosage vitamin E therapy in patients with activated arthrosis. *Z Rheumatol* 1990;49:369-373.[Article in German]

Schwarz T, Johnson VS, Voute L, Sullivan M. Bone scintigraphy in the investigation of occult lameness in the dog. *Journal of Small Animal Practice* 2004;45:232-237.

Shi S, Klotz U. Clinical use and pharmacological properties of selective COX-2 inhibitors. *Eur J Clin Pharmacol* 2008;64:233-252.

- Singh U, Jialal I. Anti-inflammatory Effects of α -Tocopherol. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1031:195–203.
- Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med* 1993;328:1444-1449.
- Stoop R, Buma P, Vanderkraan PM, Hollander AP, Billingham RC, Meijers TH, Poole AR, and Vandenberg WB. Type II Collagen Degradation in Articular Cartilage Fibrillation after Anterior Cruciate Ligament Transection in Rats. *Osteoarthritis and Cartilage* 2001;9(4):308-315.
- Sutipornpalangku W, Noppawan P, et al. Lipid peroxidation, glutathione, vitamin E, and antioxidant enzymes in synovial fluid from patients with osteoarthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases* 2009;12:324–328.
- Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol* 2007;170: 427-35.
- Thomas JT, Ayad S, Grant ME. Cartilage collagens: strategies for the study of their organisation and expression in the extracellular matrix. *Ann Rheum Dis* 1994;53:488–96.
- Tiku ML, Shah R, Allison GT. Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation. Possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis. *J Biol Chem* 2000;275(26):20069-76.
- Traber MG, Kayden HJ. Preferential incorporation of α -tocopherol vs γ -tocopherol in human lipoproteins. *Am J Clin Nutr* 1989;49:517-526.
- Traber MG, lane JC, Lagmay NR, Kayden HJ. Studies on the transfer of tocopherol between lipoproteins. *Lipids* 1992;27:657-663.
- Tran K, Wong JT, Lee E, Chan AC, and Choy PC. Vitamin E potentiates arachidonate release and phospholipase A2 activity in rat heart myoblastic cells. *Biochem J* 1996;319: 385–391.
- Urban JP. Present perspectives on cartilage and chondrocyte mechanobiology. *Biorheology* 2000;37:185–90.
- Van der Harst M, Bull S, Brama PA, Barneveld AB, van Weeren PR, van de LC. Nitrite and nitrotyrosine concentrations in articular cartilage, subchondral bone, and trabecular bone of normal juvenile, normal adult, and osteoarthritic adult equine metacarpophalangeal joints. *Journal of Rheumatology* 2006;33:1662–1667.
- Vander Kraan PM, Van den WB. Review; Osteophytes: relevance and biology. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:237-244.
- Vergne-Salle P, Grilo RM, Coyral D, Bertin P, Bonnet C, Coyral D, Perrot S et Trèves R. Douleurs en rhumatologie, aspects physiopathologiques, moyens d'évaluation, moyens thérapeutiques. *EMC-Rhumatologie Orthopédie* 2004;1:266–294.
- Wallace MS, Zawie DA, Garvey MS. Gastric ulceration in the dog secondary to the use of nonsteroidal anti- inflammatory drugs. *J of Am Anim Hosp Ass* 1990;26:467-470.

Watkins BA, Xu H, and Turek JJ, Linoleate impairs collagen synthesis in primary cultures of avian chondrocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996;212(2):153–159.

Wluka AE, Stuckey S, Brand C, Cicuttini FM. Supplementary vitamin E does not affect the loss of cartilage volume in knee osteoarthritis: A 2 year double blind randomized placebo controlled study. *J Rheumatol* 2002;29:2585-2591.