

Chez l'être humain et l'animal

Composition de la membrane de coquille d'œuf ou ESM (Ruff et al., 2009, Aguirre et al., 2017, León-López et al., 2019, Shi et al., 2021) :

L'ESM permet les **échanges gazeux** et **protège l'embryon** de poussin tout comme la membrane amniotique humaine pour le fœtus humain et joue un rôle clé dans la **minéralisation de la coquille d'œuf**, qui prend moins de 24 h et constituer le processus de minéralisation le plus rapide jamais identifié. En médecine chinoise, l'ESM a été nommé "tissu phénique" et est fréquemment utilisé pour traiter les ulcères chroniques et les fractures osseuses depuis de nombreux siècles.

La coquille d'œuf, comprenant l'ESM, est une structure calcaire qui représente environ 10 % du poids de l'œuf, constituée majoritairement de **carbonate de calcium** (CaCO_3) (95%) et d'une **matrice organique extracellulaire** composée de **protéines**, **glycoprotéines** et **protéoglycanes** (3,5 %) [1,2]. L'ESM est le composant le plus **interne** de la coquille d'œuf, situé entre la couche mammillaire (en surface de la membrane coquillière externe) et le blanc d'œuf (ou albumine). L'ESM est divisé en **trois couches** : la membrane de la coque externe, la membrane de la coque interne et la membrane limitante avec une disposition en spirale de ces trois couches.

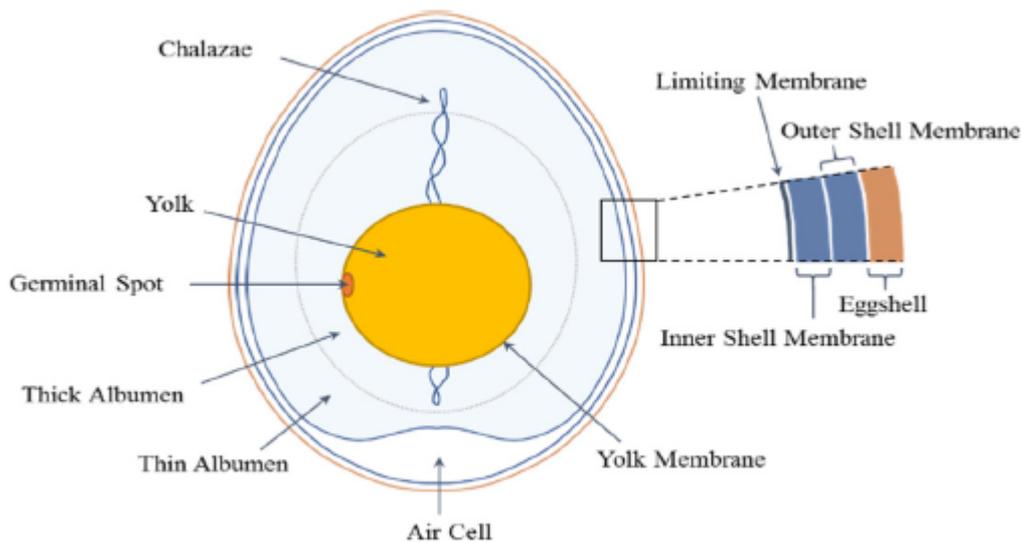


Illustration issue de la publication de Shi et al., 2021, en accès libre.

Remarques : La membrane de la coque externe représente la couche la plus externe de l'ESM et facilite l'attachement étroit à la coquille d'œuf. La couche de coque externe est également la plus épaisse des trois couches, avec une épaisseur d'environ 50 à 70 μm [1,10]. Les fibres des couches interne et externe s'entrelacent entre elles, sauf dans la cellule aérique. La membrane limitante une mince structure qui recouvre directement le blanc d'œuf. En raison de la présence d'un grand nombre de cônes fibreux d'attache à la couche mamillaire, la membrane de la coque externe est plus rugueuse que la membrane de la coque interne. De plus, les fibres dans les trois couches de l'ESM varient en diamètre, décroissant de l'extérieur vers l'intérieur.

L'ESM se compose :

- en grande partie de protéines fibreuses comme le **collagène** (essentiel à la **force** et à l'**élasticité** du **cartilage**) principalement de type **I, V et X**, et l'**élastine** (ainsi qu'ostéoprotéine et siloprotéine), formant la **matrice extracellulaire**. Les membranes interne et externe de l'ESM sont composées de fibres de protéines entrelacées en un maillage dont les fibres sont encapsulées dans un manteau continu de **protéoglycanes** et d'autres **macromolécules** (Dale et al., 2007). Ceux-ci comprennent en outre des **glycosaminoglycanes** (cf. plus bas ; ils sont sulfatés la plupart du temps) et des **hexosamines** (glucosamine, galactosamine, hexoses et le fucose (Sandson et al., 2009) ainsi que l'acide sialique (monosaccharide qui contrôle la demi-vie des glycoprotéines). Cette structure unique en filet fibreux permet le bon déroulement du processus de minéralisation de la coquille d'œuf de la surface extérieure de l'ESM tout en préservant le blanc d'œuf de la minéralisation.

Remarque : Le **collagène** est la protéine la plus importante produite par le corps humain, il est principalement formé par l'acide aminé glycine (33%), la proline et l'hydroxyproline (22%) (à savoir la structure primaire) dans une hélice triple formée de trois chaînes α (Sorushanova et al., 2019). Chaque chaîne alpha est composée de 1014 acides aminés environ avec un poids moléculaire d'environ 100 kDa. Ces chaînes sont enroulées dans une hélice gauche à trois acides aminés (structure secondaire). Les chaînes sont enroulées l'une autour de l'autre en une triple hélice pour former une structure rigide (structure tertiaire). La super hélice représente la structure de base du collagène (structure quaternaire) (Gelse K. et al., 2003). Cette structure de collagène est très stable en raison des liaisons hydrogène intramoléculaires sur la glycine entre les chaînes adjacentes. La molécule de collagène est formée de trois régions hélicoïdales et de deux régions non hélicoïdales (à chaque extrémité de la structure en hélice) avec un poids moléculaire d'environ 300 kDa, 280 nm de longueur et 1,4 nm de diamètre (Schrieber et al., 2007).

Remarque : L'**élastine** est une protéine essentielle à la santé de la peau, du système cardiovasculaire, du cartilage et de la colonne vertébrale. Comme son nom l'indique, l'élastine donne aux tissus leur tension élastique et leur capacité à reprendre leur forme après étirement. La desmosine et isodesmosine - deux acides aminés peu connus - sont responsables des propriétés élastiques et caoutchouteuses de l'élastine (en réticulant ses fibres entre elles).

Remarque : Les **protéoglycanes** contenus dans l'ESM seraient comparable aux macromolécules trouvées dans le corps humain et animal et sont utilisées pour soutenir la réparation des tissus (Jenson et al., 2015). Ce sont des molécules glycosylées où un ou plusieurs glycosaminoglycanes spécifiques (GAG) et/ou des oligosaccharides à liaison N- ou O- sont attachés à une protéine centrale.

- d'**acides aminés essentiels** (dont la **proline** est majoritaire) et notamment soufrés pour les CREMPS, riches en cystine et en ponts disulfides (et il est bien connu que le **soufre** joue un rôle très important dans la **nutrition** et dans le **maintien** de la **matrice cartilagineuse**) La proline et l'hydroxyproline (acide aminé non essentiel dérivé de la proline) sont importants dans la synthèse du collagène et des protéines du corps entier. Les sources orales de ces acides aminés non essentiels peuvent avoir un impact sur certains processus métaboliques et physiologiques, notamment articulaires.
- des **polysaccharides** bioactifs ayant montré une action sur les problèmes articulaires tels que les **glycosaminoglycanes ou GAG (acide hyaluronique** (en quantité importante et GAG majoritaire de l'ESM), **chondroïtine & dermatane & glucosamine & heparan sulfate**, etc.). Entre autres rôles, les glycosaminoglycanes **influencent la biominéralisation** (Liu et al., 2016).

Remarque : Le **sulfate de chondroïtine/glucosamine** est un glycosaminoglycane sulfaté (GAG) composé d'une chaîne de sucres (N-acétylgalactosamine / N-acétylglucosamine) et d'acide uronique (ou glucuronique, ou iduronique). On le trouve généralement attaché aux protéines, formant des protéoglycanes. Le sulfate de chondroïtine/glucosamine est un composant structurel majeur du cartilage :

- Il fournit une grande partie de sa résistance à la compression : il permet de maintenir la pression osmotique en absorbant l'eau, aidant ainsi à hydrater le cartilage et à limiter sa fissuration. Il contribue aussi à la flexibilité et à l'élasticité de l'os.
- Il sert d'agent chondroprotecteur en protégeant le cartilage contre les réactions enzymatiques et contre les dommages imputés aux radicaux libres (dont le monoxyde d'azote relargué par les chondrocytes).
- Il agit comme un substrat pour la biosynthèse des chaînes de glycosaminoglycane (GAG) puis pour la production d'aggrécane, principal protéoglycane utilisé par les chondrocytes pour construire la matrice extracellulaire cartilagineuse (MEC).
- Il exerce également des effets anti-inflammatoires et anti-cataboliques grâce à l'inhibition de l'activité de liaison du facteur nucléaire κB (NF- κB) (Comblain et al., 2016).

Remarque : Les **glycosaminoglycanes** (GAG) sont des polysaccharides anioniques composé d'unités disaccharidiques d'hexosamine (glucosamine ou galactosamine). Les glycosaminoglycanes sont indispensables au maintien d'un cartilage et d'une synovie sains.

- D'autres protéines responsables de la **minéralisation** de la coquille d'œuf.
- de protéines impliquées dans la **cascade anti-inflammatoire** et dans les capacités d'**activation/régulation du système immunitaire** de la membrane de coquille d'œuf (lysozyme, ovotransferrine, ovocléidine-17 et ovocléidine-116, ovocalyxine 36). On sépare les protéines de **blanc d'œuf** (à savoir ovotransferrine, lysozyme) et les protéines de la **matrice extracellulaire de la coquille d'œuf** (à savoir l'ovocalyxine-36).

- la **lysyl-oxydase**, enzyme cuivre-dépendante qui joue un rôle essentiel dans la fabrication de la matrice du tissu conjonctif en réticulant entre elles les protéines de la matrice extracellulaire, à savoir le collagène et l'élastine. Elle fait l'objet de nombreuses études en cancérologie car la stimulation de sa synthèse par les cellules tumorales peut favoriser les métastases de la tumeur initiale, la rendant maligne et agressive.
- La **β -N-acétylglucosaminidase**, une enzyme dont les multiples rôles sont actuellement étudiés en alimentation, en énergétique et en industrie pharmaceutique.

Table 1. Main chemical components of the eggshell membrane and their functions.

Main Components	Major Biochemical Functions
Collagens	<ul style="list-style-type: none"> - Optimum mechanical strength [23] - Thermal stability [23] - Wound healing [24] - Osteocompatibility [25] - Anchorage to nanohydroxyapatite [25] - Biomineralization [26]
Osteopontin	<ul style="list-style-type: none"> - Affinity binding for hydroxyapatite and osteoblasts [27,28] - Inhibitor of mineralization [28] - Modulation of osteoclast differentiation [29] - Recruitment of macrophages [30] - Regulation of cytokine production [30] - Inhibition of vascular calcification [30] - Regulation of apatite crystal size and growth [31] - Tissue remodeling [32]
Fibronectin	<ul style="list-style-type: none"> - Promotion of cell adhesion [33] - Improving cell growth, migration, and differentiation [33] - Wound healing [34]
Keratin	<ul style="list-style-type: none"> - Self-Assembly [35] - Promotion of cell adhesion [36]
Cysteine-rich eggshell membrane proteins (CREMPs)	<ul style="list-style-type: none"> - Wound healing [24]
Histones	<ul style="list-style-type: none"> - Chromatin folding and compaction [37] - Potent antimicrobial properties [38]
Avian beta defensins	<ul style="list-style-type: none"> - Promotion of innate defense system [39] - Reinforcement of the antimicrobial defenses associated with the ESM [40]
Ovocalycin-36	<ul style="list-style-type: none"> - Potent antimicrobial properties [41] - Positive immune-modulating effects [42]
Apolipoproteins	<ul style="list-style-type: none"> - Binding and transport of lipids [43]
Protocadherin	<ul style="list-style-type: none"> - Adhesion and differentiation functions [44]
Chondroitin sulfate	<ul style="list-style-type: none"> - Formation of porous hydrated gels [45] - Immuno-inhibition property for articular cartilage repair [46] - Binding Ca^{2+} [47] - Molecules' migration through the matrix [48]
Hyaluronic acid	<ul style="list-style-type: none"> - Water-retaining property [49] - Improving angiogenesis and tissue morphogenesis [50]

Tableau de synthèse issu de la publication de Shi et al., 2021, en accès libre.

On dénombre ainsi environ **200 constituants protéiques** de l'**articulation**, lui permettant de remplir ses fonctions. L'œuf peut donc être présenté comme un **aliment fonctionnel essentiel** permettant de renforcer le **cartilage** et le **liquide synovial**.

On comprend toutefois aisément que la teneur élevée en composants bioactifs de l'ESM ainsi que ses propriétés de rétention d'humidité et de biodégradabilité lui donnent un grand nombre de potentialités cliniques, cosmétiques, nutraceutiques et en nanotechnologies.

Pathogénie de l'arthrose (Ruff et al., 2015 et 2018)

Le cartilage se compose principalement de **matrice extracellulaire**, un réseau composite de **protéines** comme le collagène de type II. Ces protéines interagissent avec des **polysaccharides** négativement chargés comme l'acide hyaluronique et le sulfate de chondroïtine, tous ces composés étant synthétisés et sécrétés par les chondrocytes.

Lors du renouvellement normal du cartilage dans une articulation saine, la matrice extracellulaire se renouvelle à la même vitesse où elle est détruite, assurant ainsi le renouvellement continu de ce tissu d'amortissement articulaire jouent un rôle essentiel. Cependant, lors d'arthrose, on assiste à un déséquilibre du renouvellement du cartilage ou la destruction progresse plus vite que la synthèse car cette dernière n'arrive plus à suivre le rythme. On assiste donc à une **perte de l'intégrité structurale du cartilage articulaire** qui, couplée au **stress biomécaniques de l'articulation**, conduit à une inflammation chronique et à une destruction irréversible de l'articulation. Ces **produits de dégradation du cartilage** peuvent être mesurés dans le sang et dans l'urine.

Parmi ces biomarqueurs, le **télopeptide réticulé C-terminal du collagène de type II (CTX-II)**, un marqueur de la dégradation du cartilage, a montré un grand potentiel diagnostique. Il a été corrélé avec à la fois l'**incidence** et la **progression de l'arthrose** dans plusieurs essais cliniques et est prédictif de la progression radiographique de l'arthrose dans deux études longitudinales de cinq ans, ainsi que par IRM. Les concentrations urinaires en CTX-II (uCTX-II) sont considérablement élevées chez les personnes atteintes de maladies des articulations comme l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde.

Remarque : Elles sont également augmentées dans certains autres sous-ensembles sains de la population. Par exemple, Les niveaux d'uCTX-II chez les enfants en pleine croissance sont environ 50 fois plus élevés que celui des adultes. Il a été démontré que les niveaux d'uCTX-II augmentent également en raison d'un exercice intense et à fort impact articulaire chez les athlètes d'endurance en bonne santé d'âge universitaire, tels que les coureurs de fond, d'environ 85 % par rapport à l'âge et au poids de la population-contrôles, mais n'étaient pas significativement élevés dans les groupes d'athlètes d'endurance à faible impact articulaire comme les nageurs et les rameurs. En outre, le taux d'uCTX-II était environ deux fois plus élevé chez les femmes ménopausées que chez les femmes préménopausées du même âge et modérément élevé (environ 25 %) chez les personnes en surpoids (IMC > 25kg/m²) par rapport aux patients-contrôles de poids normaux (IMC inférieur à 25 kg/m²).

En plus de l'**interaction directe avec le système immunitaire** *via* le sang ou les tissus articulaires inflammés, il existe un **deuxième mécanisme immunomodulateur impliqué**. En effet, 50 % des patients arthrosiques présentent des auto-anticorps contre le collagène de type II et ces fragments autologues ainsi que d'autres fragments dérivés du cartilage sont considérés comme un facteur causal majeur de la destruction immunitaire du cartilage, qui caractérise la progression de l'arthrose. La composante immunitaire de l'arthrose comprend la prolifération de lymphocytes T spécifiques de ces antigènes, une infiltration de la membrane synoviale et la production locale subséquente de cytokines pro-inflammatoires dont IL-1 β et TNF- α entre autres. L'arthrose induite par le collagène (= CIA) est un modèle animal validé de polyarthrite rhumatoïde : il entraîne la prolifération des lymphocytes T spécifiques de l'antigène collagénique, ce qui reflète étroitement ce qui se passe lors l'arthrose.

Ce modèle de CIA chez le rat a été utilisé pour valider un système de régulation immunitaire connu sous le nom de « **tolérance orale** ». La tolérance orale désigne la diminution progressive de la réponse immunitaire périphérique (= tolérance) qui résulte de l'exposition répétée du système immunitaire de la muqueuse intestinale à des antigènes protéiques ingérés. La tolérance orale à ces peptides immunogènes qui sont ingérés de façon répétée serait permise par cette « surveillance » effectuée par le tissu lymphoïde associé à l'intestin, un moyen pour le corps d'éviter une activation inappropriée ou inutile du système immunitaire contre des protéines normalement consommées dans le régime alimentaire normal. On pense que ce comportement tolérogène se produit *via* la présentation de ces peptides par les cellules présentatrices d'antigènes (venus du tissu lymphoïde associé à l'intestin) aux lymphocytes T circulants, les amenant à se transformer en lymphocytes T régulateurs (ou LT_{reg}). Lors de leur retour dans la circulation générale, Les LT_{reg} vont produire une proportion plus élevée de **cytokines anti-inflammatoires générales** (IL-4, IL-10 et TGF- β), **supprimant la réaction auto-immune locale**, et ce de façon indépendante du type d'antigène rencontré.

Mode d'action :

- 1) Les études *in vivo* et *in vitro* (chez le rat) (reviewées par Ruff et al., 2014, 2015 et 2018)

Comme pour chaque principe actif, il faut d'abord passer par une étape dite de « **proof of concept** » pour laquelle on dispose de plusieurs études *in vitro* et *in vivo* (chez le rat) recensées ici :

Le NEM® affecte la **transduction du signal de douleur en réduisant la prostaglandine E2 (PGE2)** dans un modèle d'arthrose chez le rat. On sait que la synthèse de PGE2 est à son tour amplifiée par une enzyme inductible, la cyclooxygénase-2 (COX-2), qui est induite par (et sensible aux) cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines pro inflammatoire entraînent à leur tour une **hypersensibilisation de la perception de la douleur** (ou nociception).

Le NEM® inhibe modérément l'enzyme 5-lipoxygénase (5-LOX) *in vitro* sans inhiber la COX-1 ou COX-2 de façon mesurables (non publié). Les **leucotriènes** sont produits via la conversion en 5-LOX de l'acide arachidonique (situé à la surface des cellules) et il a été démontré qu'ils jouent un rôle important dans la **nociception chronique et inflammatoire**. L'un de ces médiateurs lipidiques pro-inflammatoires, le leucotriène B4, s'est révélé significativement réduit par la prise de NEM® dans un modèle d'arthrose chez le rat.

L'ESM hydrolysé soluble facilite l'**adhésion des fibroblastes *in vitro***, ce qui est un effet bénéfique propice à la **réparation du tissu conjonctif** (Ohto-Fujita et al., 2011).

L'ESM réduit ainsi l'expression de diverses **cytokines pro-inflammatoires**, y compris les principaux médiateurs de l'inflammation, l'interleukine-1 bêta (IL-1β), l'interleukine 2 (IL-2) (Dale et al., 2007) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α), tous deux *in vitro* et *in vivo* (chez le rat). Or, on sait que le TNF-α joue un rôle important dans les processus inflammatoires arthrosiques *in vitro* (Benson et al., 2012).

En parallèle de l'accumulation de ces données expérimentales de laboratoire, un certain nombre d'essais cliniques étaient déjà disponibles chez l'homme et le chien à cette époque et venaient confirmer l'intérêt clinique de l'ESM dans la prise en charge de l'arthrose (cf. document dédié). On se doutait alors que la **diminution démontrée *in vitro* de l'expression des cytokines pro-inflammatoires par l'ESM** devait avoir comme effet clinique subséquent la **réduction de la raideur et la douleur articulaires**, ce qui impliquait de toute évidence que l'environnement inflammatoire de l'articulation avait bien diminué. Pourtant, on n'était pas encore en mesure d'identifier le(s) **mécanisme(s) physiopathologique(s)** que l'ESM était visiblement en capacité d'améliorer. Autrement dit, on n'arrivait pas encore à élucider le **lien** entre les données acquises *in vitro* et *in vivo* (chez le rat seulement) à ces résultats cliniques observés chez le chien et l'homme.

Il a fallu attendre l'arrivée en 2018 des données de l'étude de Aguirre et al. dans laquelle l'ESM OVOPET® a montré une **diminution de la concentration plasmatique en NO** (oxyde nitrique, marqueurs de stress oxydatif articulaire, cf. plus haut) chez des chiens supplémentés, **toutefois en limite de significativité**. Cependant, dans cette même étude, on a corrélé la diminution de la concentration plasmatique en NO avec l'amélioration de l'aspect échographique de l'articulation de la hanche, indiquant un effet anti-inflammatoire. Il s'agissait de la première étude tentant de corrélérer un **mécanisme biologique** à des **effets cliniques *in vivo*** chez le chien et elle ouvrait la porte à de nouveaux travaux de recherche, nécessaires pour identifier de manière moins un certain les mécanismes sous-tendant l'effet clinique de l'ESM lors d'arthrose. Le dosage de certains biomarqueurs, comme les fragments de collagène de type II (de Sousa et al., 2017) vis-à-vis desquels on mettait à cette époque en évidence le rôle des anticorps anti-collagène de type II chez les patients arthrosiques, étaient alors pressentie comme une voie d'obtention de la réponse à cette problématique.

2) La prise du dosage des biomarqueurs plasmatiques de l'arthrose (Muller et al., 2019) :

Chez l'homme, on avait déjà quelques éléments de réponse. Une étude menée par Garner et al., 2011 évaluait les biomarqueurs sériques potentiels de l'arthrose spontanée chez l'homme et le chien (protéine n°1 de chimiotactisme pour les monocytes, IL-8, protéine de chimiotactisme dérivée des kératinocytes, MMP-2 et MMP-3). Les auteurs ont conclu que **l'évaluation de ces biomarqueurs** (en tant qu'indicateurs de la présence d'arthrose) dans le sérum était **moins informative** que leurs concentrations prises cette fois dans le **liquide synovial** (beaucoup moins facile à réaliser en routine et notamment puisqu'il faudrait la répéter, pour en suivre l'évolution naturelle ou valider/invalider la réponse à un traitement).

Toutefois, si on ne pouvait pas clairement utiliser ses biomarqueurs pour du diagnostic précoce, il semblait pourtant possible de suivre **l'évolution de la concentration plasmatique en ces biomarqueurs** en espérant la **corrélérer avec l'évolution clinique de l'arthrose**. Aucune étude n'avait non plus évalué **l'effet d'un traitement** (analgésique ou anti-inflammatoire ou l'ESM) **sur le profil des biomarqueurs de l'arthrose** chez l'homme et le chien.

En 2015, une étude de Yong et al. sur un modèle expérimental d'arthrose chez le rat supplémenté en ESM (contre placebo) a mis en évidence une **diminution de la concentration sérique en NO, IL-1β, IL-6, PGE2, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, LTB4 et CRP ultrasensible par rapport au contrôle**. Le volume du cartilage rotulien avait également augmenté de manière

significative dans le groupe contrôle alors que le groupe de rats supplémentés en NEM® montrait une diminution du volume du cartilage rotulien, de celui de la membrane synoviale (= pannus synovial) et de la transformation en tissu fibreux (marqueur de progression histopathologique de la maladie arthrosique). Même si les concentrations en ESM utilisés étaient très largement supérieures à celles qu'on a l'habitude utilisée chez l'homme et le chien, cette étude mettait en évidence un **effet anti-arthrosique de l'ESM** sur la base d'une diminution de la concentration en biomarqueurs inflammatoires spécifiques. Pourtant, cette étude ne fournissait pas de renseignement clinique que l'on aurait pu mettre en parallèle de cette diminution des marqueurs inflammatoires.

L'étude de Muller et al. s'en est chargée en 2019 chez le **chien** : elle a comparé l'évolution du profil en biomarqueurs inflammatoires (détaillé ci-dessous) de deux populations de chiens, l'une recevant notamment 500mg d'ESM par jour pendant 12 semaines et l'autre non, dans une étude prospective randomisée en double aveugle contre placebo. A part l'**IL-2** (pour laquelle on observe une **diminution significative**, quoique numériquement faible, dans le groupe traité), il s'avère que l'IL-6 et l'IL-8, les deux autres interleukines principales de l'inflammation, ainsi que la CRP (protéine aigüe de l'inflammation), les S100A12 (molécules endogènes libérées suite à des lésions tissulaires et significativement surexprimées chez les patients arthrosiques (Wang et al., 2013) et en NMH (un métabolite majeur de l'histamine, qui est libéré lors de la dégranulation des mastocytes) n'ont pas vu leur concentration plasmatique diminuer de façon significative.

N.B. 2 : On n'est pas en mesure de connaître l'intensité de l'amélioration clinique que peut engendrer cette faible évolution numérique de l'IL-2. En d'autres termes, on ne sait pas corrélérer l'amplitude de l'évolution de l'IL2 à une amplitude d'évolution clinique en parallèle : une faible évolution de l'IL2 permet-elle malgré tout une amélioration clinique significative ou non ?

N.B. 2 : L'étude de Muller et al., 2019, présente toutefois certains biais. Le premier est d'avoir exclu l'entière des patients présentant, en plus de l'arthrose, une comorbidité inflammatoire, ce qui exclut un grand nombre de cas de la vie courante où l'arthrose est associée à d'autres affections inflammatoires, diminuant de ce fait la représentativité de cette étude. De plus, cette étude n'a pas étudié l'effet de l'environnement et du régime alimentaire, entre autres, ces derniers ayant pu influencer le profil inflammatoire.

Remarque : Les concentrations synoviales en certaines cytokines, comme l'**IL-6**, ont été corrélées à des effets cataboliques sur le cartilage en raison de la régulation positive des MMP (cf. plus haut) qu'elle entraîne (Kapoor et al., 2011). On pense que la diminution de ces cytokines inflammatoires (IL-6) et immunorégulatrices (telles que l'IL-2), pourrait réduire la destruction du cartilage et donc la progression de l'OA (Goldring et al., 2004).

Remarque : Le **TNF- α** est une cytokine responsable de la stimulation de la production de PGE2, qui, dans le liquide synovial, entraîne une augmentation de la destruction du cartilage et de la réponse inflammatoire chez les patients atteints d'arthrose (Kapoor et al., 2011). Le TNF- α joue un rôle bien établi dans la destruction tissulaire lors de polyarthrite rhumatoïde et d'arthrose, et contribue à la douleur (Goldring, 2004). Une étude *in vitro* réalisée par Benson et coll. (2012) ont montré que l'ajout d'ESM réduisait les concentrations de TNF- α , indiquant la capacité anti-inflammatoire de la supplémentation en ESM.

Remarque : Dans une étude de Nakashima et al. (2012), il a été démontré qu'une expression accrue de **S100A12** pourrait contribuer à la progression de l'arthrose en augmentant la MMP-13 et le facteur de croissance endothélial (VEGF). Par conséquent, en diminuant les S100A12, on pourrait réduire la progression de l'arthrose en raison des effets médiateurs des S100A12 dans les voies inflammatoires, bien que cette association reste à prouver chez le chien.

Remarque : Chez l'homme, le **NMH** a été utilisé comme biomarqueur de l'inflammation et de la douleur secondaires à des réactions allergiques (Moreno et al., 1995). Dès lors, on pourrait spéculer qu'une réduction du NMH pourrait suivre une diminution de douleur. Cependant, actuellement (à la connaissance de l'auteur), il existe aucune recherche disponible sur le NMH associé à l'arthrose et l'inflammation chez le chien.

Remarque : Une étude de Gruen et al., 2017 a évalué le profil cytokinique inflammatoire chez les chats présentant de l'arthrose et a montré des corrélations positives entre les concentrations sériques en l'IL-2, IL-4, IL-8 et TNF- α et des preuves radiographiques de la progression de la maladie arthrosique et de la douleur. Aucune donnée de ce type n'est disponible chez le chien. Par conséquent, les recherches devraient se concentrer sur les différences entre les chiens en bonne santé et les chiens atteints d'arthrose, sur l'évolution des cytokines et autres biomarqueurs inflammatoires au fil de l'évolution de la maladie et sur la corrélation entre l'évolution des biomarqueurs sériques est celle des scores de douleur ou de mobilité.

Cette étude a donc montré qu'il n'était **pas possible** à l'heure actuelle **d'expliquer l'effet de l'ESM sur l'évolution de l'arthrose par le seul suivi du profil en biomarqueurs inflammatoires**. En outre, on manquait de données permettant de comprendre la signification clinique des diminutions de la concentration plasmatique en cytokines et autres biomarqueurs de l'inflammation.

Il a donc fallu développer une autre théorie.

3) La piste de la tolérance orale.

C'est l'équipe de Ruff et al. qui oriente la résolution de cette problématique en 2019. Dans leurs études, le NEM® a démontré une **réduction** de la **concentration urinaire en CTX-II** dans des modèles d'arthrose induite chez le rat et d'arthrose naturelle chez le chien. Cette réduction, qui est même descendue en-dessous du niveau de base, permet d'obtenir un **effet chondroprotecteur** attesté par histopathologie et arthrographie chez le rat (Sim et al., 2015). Dans ces études, le NEM® **supprime la déformation du cartilage** et **préserve le volume de cartilage** par rapport aux patients arthrosiques non traités. Au moins une partie de cette chondroprotection pourrait résulter de son effet sur le CTX-II ; cependant, les taux sériques en **métalloprotéinases matricielles** (MMP-2 et -9), connues pour dégrader le cartilage, ont **également été considérablement réduits** : le CTX-II n'est donc **pas le seul levier mécanistique impliqué**.

Autre observation troublante : dans une étude menée sur le modèle de CIA chez le rat (cf. plus haut), le NEM® s'est avéré **activer le NF-κB in vitro** : il s'agit d'un facteur de transcription impliqué dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire ; or, ce dernier est généralement **augmenté** de façon dérégulée lors de plusieurs phénomènes inflammatoires pathologiques, en activant notamment les MMP mentionnées plus haut. Il semble donc contre-intuitif que le NEM®, en activant le NF-κB plutôt qu'en l'inhibant comment on pourrait le vouloir de prime abord, puisse quand même contribuer à son efficacité *in vivo*. Pourtant, dans une étude ultérieure sur le **même** modèle, une supplémentation orale en NEM® a considérablement **diminué** (avec preuve histopathologique) l'**œdème** d'origine inflammatoire et les **lésions cartilagineuses** ainsi que l'**épaississement de la membrane synoviale** (= pannus synovial) et la **résorption osseuse péri-articulaire**.

Pour expliquer ce **paradoxe apparent**, on revient au mécanisme supposé de tolérance orale : la supplémentation orale en NEM® (contenant les collagène types I, V et X), en augmentant la **tolérance orale, améliorerait la tolérance du système immunitaire aux composants du cartilage**, en particulier le **collagène de type II**. Ce mécanisme permettrait donc d'expliquer la diminution progressive de la synthèse de CTX-II (ainsi que des **autres** biomarqueurs asthmatiques de l'arthrose) de façon plus certaine qu'un effet anti-inflammatoire localisé directement sur l'articulation (que l'on a depuis le départ du mal à corréliser avec une diminution franche de la concentration en interleukines circulantes, en se rappelant qu'elles sont imparfaitement corrélées à la concentration en interleukines au niveau local).

L'augmentation de la tolérance orale est donc le mécanisme actuellement retenu pour faire le lien entre les observations obtenues in vitro et in vivo chez le rat et les effets cliniques rapportés.

Le tendon

Le **tendon** est composé de **collagène de type I** qui, en combinaison avec les glycoprotéines et les protéoglycanes forment une matrice essentielle au bon fonctionnement des articulations. Le tendon est responsable de transmettre les forces contractiles pour générer le mouvement et donner sa stabilité à l'articulation : ainsi, le tendon doit être solide et avec une rigidité linéaire qui lui permet de supporter de fortes tensions.

En plus des changements sur le couple muscle-tendon, les altérations des propriétés tendineuses contribuent également à la **faiblesse musculaire** et à la **perte de mobilité avec l'âge**. De plus, il est bien connu que la **synthèse des constituants tissulaires diminue avec l'âge**, c'est pourquoi une **alimentation équilibrée** joue un rôle très important. L'utilisation de suppléments nutritionnels comme l'ESM peut en partie **couvrir** ou **renforcer** ces **apports nutritionnels requis**.

La membrane de coquille d'œuf peut être utilisée comme **source de soufre** en raison du nombre de liaisons disulfure et de soufre acides aminés qui ont été quantifiés. On sait que le besoin en soufre augmente lors de la **récupération** après des **exercices physiques intensifs**, c'est pourquoi l'utilisation de composés tels que le MSM (méthyl-sulfonyl-méthane) et l'ESM dans les formulations a suscité un grand intérêt. La membrane de la coquille de l'œuf est très riche en **acides aminés soufrés** (AAS) et peut être une source de supplémentation alternative pour les **athlètes**.

Le disque intervertébral (Shaw et al., 2017)

Les composants de la membrane de coquille d'œuf (notamment les chondroprotecteurs) limitent la déshydratation du disque intervertébral et réduisent ainsi le risque de fissuration de ce dernier.

Le tube digestif (Shi et al., 2021, Yang et al., 2022, Jia et al., 2022)

Cette revue rassemble les dernières connaissances publiées sur les propriétés bénéfiques de l'ESM dans diverses maladies liées au tube digestif.

Dans un modèle murin de colite induite par le sulfate de sodium dextran, la poudre d'ESM a **diminué** significativement **l'indice d'activité de la maladie**. Il a été démontré qu'elle **réduisait l'inflammation intestinale** en **facilitant la restauration de l'intégrité de l'épithélium** et en **atténuant les effets de la dysbiose microbienne**.

Dans une étude *in vitro*, l'ESM a **inhibé la production de cytokines inflammatoires** induites par les lipopolysaccharides tout en **améliorant la prolifération des cellules Caco-2** en stimulant spécifiquement leurs facteurs de croissance. Ces effets ont été attribués à une augmentation significative de l'expression des gènes des médiateurs inflammatoires, de la prolifération des cellules épithéliales intestinales, des facteurs liés à la restitution (ou RRF) et des peptides antimicrobiens.

En **augmentant la diversité des bactéries de la flore intestinale** et en **réduisant le nombre de bactéries pathogènes** telles que *Enterobacteriaceae* et *E. coli*, l'ESM joue un rôle essentiel dans la **limitation de la dysbiose**. Il a également été rapporté que l'ESM **régule la prolifération des cellules lymphocytes T helpers 17** en inhibant la prolifération de bactéries filamenteuses segmentées.

Rappel : Les lymphocytes Th17 participent au niveau épithélial à la défense contre les bactéries extracellulaires, notamment *Klebsiella pneumoniae* [1]. Cependant, des réponses Th17 dérégulées sont également associées à des maladies auto-immunes, dont la sclérose en plaques, le psoriasis et la maladie de Crohn.

Une supplémentation en ESM chez des souris nourries avec un régime riche en graisses a permis de **diminuer la concentration plasmatique en triglycérides et en cholestérol total** en **modifiant l'expression des gènes du métabolisme des lipides** et en **modifiant la composition du microbiote intestinal**.

L'ESM a efficacement **réprimé la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-8** *in vitro* et **atténué *in vivo* les signes de colite** induits par le sulfate de sodium dextran chez le rat.

L'ESM peut **soulager l'inflammation** dans un modèle de **colite** chez la souris via le voie médiée par l'**IL-6** et favorise l'apoptose des lymphocytes T pour **restaurer l'homéostasie immunitaire de l'intestin**.

Gut health	- Fine ESM powder	- Regulating the cell proliferation and restitution, improving energy metabolism as well as alleviating intestinal microbiota dysbiosis [81]
	- 8% ESM powder with corn starch and casein	- Altering lipid metabolism gene expression and gut microbiota composition [82]
	- ESM hydrolysate digested using a combination of Alcalase and Protease S	- Ameliorating intestinal inflammation induced by dextran sulfate sodium in mice [83]

Le rôle prometteur de L'ESM sur la dysbiose a été à nouveau étudié par l'équipe de Yang et al., 2022, qui a pris comme modèle d'étude les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), associées comme on le sait à des changements compositionnels et métaboliques au sein du microbiote intestinal. Le but de cette étude était de déterminer si la membrane alimentaire de la coquille d'œuf (ESM) améliorerait le taux de survie ou atténuait la dysbiose intestinale dans un modèle spontané de MICI obtenu chez des souris *knock-out* à l'interleukine-10. En effet, l'IL-10 est une cytokine régulatrice qui inhibe à la fois la présentation de l'antigène et la libération ultérieure de cytokines pro-inflammatoires : elle est proposée comme thérapie biologique anti-inflammatoire puissante dans la MICI. Les résultats (menés contre placebo) ont démontré que la supplémentation en ESM :

- **améliorait** considérablement **le taux de survie** et la **composition corporelle** des souris malades traitées.
- **augmentait** de manière significative la **diversité microbienne intestinale**, qui diminuait chez les souris malades non traitées :
 - Le rapport Firmicutes/Bacteroidetes a été rétabli à un niveau normal grâce à la supplémentation en ESM, ce qui suggère que l'ESM aide à **maintenir l'équilibre de la composition du microbiote intestinal**.
 - L'ESM a **augmenté l'abondance relative des bactéries commensales *Ruminococcus* et *Bacteroidales* S24-7** et a **réduit l'abondance de la bactérie pro-inflammatoire *Enterobacteriaceae***.

- De plus, la supplémentation en ESM a **favorisé la production de butyrate (acides gras volatiles propriétés bénéfiques) dans le contenu caecal** et a **régulé négativement l'expression de gènes pro-inflammatoires**, notamment l'IL-1 β et le Tnf- α dans le côlon de souris traitées, indiquant un effet anti-inflammatoire.

Ces résultats suggèrent que l'ESM peut être étudié comme supplément nutritionnel dans le cadre de la gestion de la MICI chez l'animal et l'homme.

On obtient de nouvelles données sur le rôle de l'ESM dans la **modulation du microbiote intestinal via la régulation des lymphocytes T helpers** en 2022 avec l'étude de Jia et al. qui choisit un modèle murin de cachexie. Le postulat de départ de l'étude est que l'interleukine 10 (IL-10) améliore également la cachexie en régulant négativement l'IL-6. Ici, l'équipe a utilisé un modèle de souris *knock-out* pour l'IL10 pour simuler une cachexie cancéreuse (ou liée à toute autre maladie chronique avancée) et étudier les effets de la membrane de la coquille d'œuf (ESM) sur les symptômes généraux de pré-cachexie, ce qui est particulièrement important pour le développement de traitements contre la cachexie. L'analyse de l'évolution clinique des souris ainsi que du microbiote intestinal a révélé (contre placebo) que la supplémentation en ESM :

- **améliorait la diversité microbienne et l'abondance du microbiote**, ce qui était statistiquement associée à une **baisse du degré d'inflammation** ($P < 0,05$).
- **augmentait le taux d'acides organiques totaux**, en particulier d'acides gras à chaîne courte tels que le butyrate (x 2 à 3 fois pour ce dernier), ce qui pourrait inhiber la production de lymphocytes Th1 et Th17. Il s'agit donc d'une **propriété bénéfique sur le métabolisme des lipides**.
- **améliorait les symptômes de la cachexie** (anorexie, rapport masse maigre/masse grasse, fonte des muscles squelettiques et réduction de la forme physique).
- **améliorait l'inflammation du côlon et des muscles squelettiques**.

Ces résultats donnent un aperçu du potentiel de l'ESM en tant que **complément alimentaire** pour la **prévention de la pré-cachexie** et de la **dysbiose**.

Process de fabrication (Ruff et al., 2009, Marimuthu et al., 2020)

Aux États-Unis seulement, on estime que 600 000 tonnes de coquilles d'œufs sont produites chaque année en tant que sous-produit de la filière avicole. L'élimination de ces coquilles d'œufs est un véritable fardeau environnemental et financier et, par conséquent, d'autres utilisations de cette ressource abondante et rentable issue des déchets de l'industrie alimentaire seraient d'un intérêt évident.

Il faut **séparer mécaniquement** et de façon précise (= sans laisser passer de bouts de coquille) la membrane de la coquille des œufs. Au cours de la première phase d'incubation de l'œuf, l'ESM est solidement associée à la couche mammillaire (*via* des points d'ancrage côniques) et il est difficile de les séparer par action mécanique. Cependant, cette connexion s'affaiblit au fur et à mesure de l'incubation.

La membrane d'œuf a un **faible indice de solubilité**, de 10 à 12 %. Pour la rendre la plus soluble possible, la membrane de l'œuf doit être **partiellement hydrolysée**. Le processus de fabrication NEM® a permis d'obtenir, dans une étude comparative, le profil nutritionnel le plus élevé par rapport aux autres procédés chimiques disponibles sur le marché.

Les marques d'ESM comme NEM® appliquent ensuite leur procédé de fabrication exclusif par mélange à sec pour produire une membrane de coquille d'œuf à **forte teneur en protéines** et la **teneur modérée en sulfate de glucosamine** (jusqu'à 1% du poids sec), **sulfate de chondroïtine** (jusqu'à 1 %), **acide hyaluronique** (jusqu'à 2 %) et **collagène** (type I, jusqu'à 5 %).

Table 2: Nutrient profile with respect to the process conditions

S.No	Sample	Protein (%)	Collagen (%)	Elastin (%)	Desmosine (%)	Isodesmosine (%)	Chondroitin sulfate (%)	Glycosaminoglycan (%)	Hyaluronic acid (%)
1	Microcore-NEMC™	96	17	27	16.2	10.8	28.83	20.15	5
2	Hydrolyzed or soluble EM(20%NaOH)	91	10	17	10.2	6.8	26.19	17.9	4
3	Hydrolyzed or soluble EM (5% Methanol + 20% NaOH)	64.5	8	12	7.2	4.8	20.73	18.18	3.5
4	Chemically refined EM (5% EDTA+5% Hexane+20% Alkali)	65	8	8	4.8	3.2	15.8	14.2	3.8
5	O ₃ EM (10%)	35	5	6	3.6	2.4	16.25	12.4	1.5

Plusieurs types d'ESM ont ainsi pu être testés sur le terrain. Ce tableau reprend les principales études fondatrices jusqu'en 2021, en y associant à chaque fois le type d'ESM utilisé :

Table 2. Applications of ESM and its corresponding preparation methods.

Applications	Methods	Functions
Joint Health	- Partially hydrolyzed utilizing a gentle enzymatic process	- Improving recovery from exercise-induced joint pain and stiffness and also reduced the discomfort from stiffness [69]
	- ESM product suspended in 0.5% (w/v) methylcellulose in water	- Exhibiting beneficial effects on multiple indices of arthritis including inflammation, pannus, cartilage damage, bone resorption, and periosteal bone formation [118]
	- Fine ESM powder filled in gelatine capsules	- Promoting joint health and reducing pain and stiffness [71]
	- Soluble ESM treated by with aqueous 3-mercaptopropionic acid at 90 °C in presence of 10% (v/v) acetic acid	- Supporting growth, adhesion, and differentiation of human chondrocyte cells [73]
Wound healing	- Micronized ESM powder (<100 µm size)	- Improving wound closure through its structural ECM-like constituents that facilitated re-epithelialization [23] - Enhancing fibroblast and keratinocyte proliferation, myofibroblast differentiation, and regulation of the activity of various MMPs [76]
	- Round ESM patch with diameter of 5 mm	- Reducing healing time in patients with moderate to large traumatic tympanic membrane perforation [77]
	- ESM-chitosan blend film with 0.01 g ESM/mL 1% (w/v) chitosan solution	- Improving water resistance, wound fluid absorption, BSA absorption capacity, and antibacterial activity [94]

	- Incorporate AgNPs into ESM microfibers	- Accelerating wound healing with good biocompatibility [80]
	- Natural ESM	- Providing a scaffold for the fibroblast migration and reducing the lag phase for wound healing [119]
	- Copper-containing bioactive glass/ESM nanocomposites	- Enhancing angiogenesis-related gene expression as well as VEGF and HIF-1 α protein secretion of HUVECs [79]
Antimicrobial activity	- Dried ESMs with dimensions of 2 cm \times 3 cm functionalized only on one side with metal oxide or/and metal	- Antibacterial activity against <i>Escherichia coli</i> [93]
	- KR-12 peptide-containing hyaluronic acid immobilized fibrous ESM	- Good antibacterial activity against both Gram-negative and Gram-positive bacteria, including multi-drug-resistant bacteria [124]
Gut health	- Fine ESM powder	- Regulating the cell proliferation and restitution, improving energy metabolism as well as alleviating intestinal microbiota dysbiosis [81]
	- 8% ESM powder with corn starch and casein	- Altering lipid metabolism gene expression and gut microbiota composition [82]
	- ESM hydrolysate digested using a combination of Alcalase and Protease S	- Ameliorating intestinal inflammation induced by dextran sulfate sodium in mice [83]
Anti-inflammatory and antioxidant activity	- Micronized ESM powder (<100 μ m size)	- Displaying anti-inflammatory activities through NF- κ B in LPS-triggered human immune cells [86]
	- ESM dissolved in 2 N NaOH and 40% EtOH at 70 $^{\circ}$ C for 2 h	- Tyrosinase inhibiting and L-DOPA oxidizing activities [87]
	- ESM treated via in vitro digestion	- Regulating cytokine production in cultures of peripheral blood mononuclear cells and suppress tumor necrosis factor- α levels [85]
	- ESM fermented by lactic acid bacteria	- Inhibiting DPPH scavenging radical [89]
	- ESM dissolved in 1.25 M 3-mercaptopropionic acid and 10% acetic acid at 90 $^{\circ}$ C for 6 h and digested by 2% (<i>w/w</i>) pepsin at 37 $^{\circ}$ C for 4 h	- Inhibiting the H/R-induced and H ₂ O ₂ -challenged injury of cardiomyocytes and improving cardiac ischemia-reperfusion injury [125]
	- ESM treated by Na ₂ SO ₃ and alkaline protease	- ABTS scavenging activity and liposomal peroxidation inhibitory activity [91]
	- ESM hydrolysate digested using a combination of Alcalase and Protease S	- Cellular antioxidant activity and protecting intestinal epithelial cells against oxidative stress [68]

Tableau de synthèse issu de la publication de Shi et al., 2021, en accès libre.

CONCLUSION : L'utilisation de la supplémentation pour les problèmes articulaires a fait l'objet de nombreuses publications ces dernières années, comme thérapie préventive ou même comme traitement de maladies et de blessures articulaires. On découvre toutefois de plus en plus de champ d'action de l'ESM, à la fois en santé intestinale et en dermatologie mais également dans de nouvelles biothérapies (bio-reconstruction des ménisques du genou, bio-matériaux hybridés (notamment avec de la propolis) utilisables dans la gestion des plaies).

BIBLIOGRAPHIE :

Ruff et al., 2009 : *Eggshell membrane: a possible new natural therapeutic for joint and connective tissue disorders. Results from two open-label human clinical studies.*

Garner et al., 2011 : *Using animal models in osteoarthritis biomarker research.*

Ruff et al., 2014 : *Reduction of pro-inflammatory cytokines in rats following 7-day oral supplementation with a proprietary eggshell membrane-derived product.*

Ruff et al., 2015 : *Eggshell membrane hydrolyzates activate NF- κ B in vitro: possible implications for in vivo efficacy.*

Aguirre et al., 2017 : *Beneficial effects of oral supplementation with Ovodermin on human skin physiology: two pilot studies.*

Aguirre et al., 2018 : *The efficacy of Ovopet® in the treatment of hip dysplasia in dogs*

Ruff et al., 2018. : *Beneficial effects of natural eggshell membrane versus placebo in exercise-induced joint pain, stiffness, and cartilage turnover in healthy, postmenopausal women.*

León-López et al., 2019 : *Hydrolyzed collagen - Sources and applications.*

Muller et al., 2019 : *Placebo-controlled pilot study of the effects of an eggshell membrane-based supplement on mobility and serum biomarkers in dogs with osteoarthritis.*

Marimuthu et al., 2020 : *Bioactive molecule composition of Natural Egg Membrane Concentrate (NEMCTM) vs. Soluble Egg Membrane (SEM).*

Shi et al., 2021 : *Avian eggshell membrane as a novel biomaterial: a review.*

Jia et al., 2022 : *Eggshell membrane modulates gut microbiota to prevent murine pre-cachexia through suppression of T helper cell differentiation.*

Yang et al., 2022 : *Dietary eggshell membrane powder improves survival rate and ameliorates gut dysbiosis in Interleukin-10 knockout mice.*

Dr vét. Romain CRISTANTE