

EFFET DE L'EXTRAIT D'OLIVE RICHE EN POLYPHÉNOLS, OLIVIE RICHE, SUR L'INFLAMMATION ET LA DOULEUR CHEZ LES PATIENTS SOUFFRANT D'ARTHRITE RHUMATOÏDE: UNE ÉTUDE CLINIQUE RANDOMISÉE EN DOUBLE AVEUGLE CONTRE PLACEBO D'UNE DURÉE DE 8 SEMAINES

Ghanam Jamal^a, Cresteil Thierry^b, Benlemlih M.^a

^a Biotechnology Laboratory, Faculty of Science Dhar El Mahraz, P.O. Box 1796, Atlas-Fez, University Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fez, Morocco.

Résumé

Objectifs: les polyphénols d'olive sont connus comme agents anti-inflammatoires naturels. Le but de l'essai clinique était de déterminer l'effet thérapeutique d'un extrait d'olive riche en polyphénols sur le processus inflammatoire et l'intensité de la douleur chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde (AR).

Méthodes: il s'agit d'un essai clinique randomisé en double aveugle contre placebo. Un total de 90 patients atteints d'AR ont été répartis en deux groupes de manière aléatoire; dans le groupe traité, les participants ont reçu une dose quotidienne de 3 g d'extrait d'olive Olivie Riche (6 gélules, 500 mg chacune) pendant 8 semaines, tandis que les patients du groupe placebo ont reçu des gélules de maltodextrine. Les analyses en laboratoire, les réponses aux questionnaires, l'intensité de la douleur, et les biomarqueurs inflammatoires ont été déterminés au début de l'étude ainsi qu'à la fin. Des médecins ont évalué les effets négatifs potentiels de l'extrait d'olive pendant toute la durée de l'étude.

Résultats: une diminution significative du score de la maladie à la fin de l'étude dans le groupe traité ($P < 0,0001$). En comparaison avec le groupe placebo, les biomarqueurs inflammatoires ont diminué de manière significative chez les participants traités ($P < 0,0001$). Les améliorations relevées dans le groupe traité par rapport au début de l'étude étaient: -1,37 mg/L (IC -2,71 à -1,57 mg/L), -2,14 pg/mL (IC -2,71 à -1,57), -1,046 pg/mL (IC -1,50 à -0,59) et -1795 pg/mL (IC -2283 à -1308) pour hs-CRP, IL-6, TNF- α et PGE₂ respectivement. Le soulagement de la douleur a augmenté de manière significative ($P < 0,0001$) après 8 semaines de supplémentation avec l'extrait d'olive Olivie Riche.

Conclusion: les résultats obtenus après 2 mois d'essai clinique démontrent pour la première fois l'effet thérapeutique potentiel de l'extrait d'olive Olivie Riche contenant une teneur élevée en polyphénols (OLF) contre l'inflammation et la douleur qu'elle entraîne en cas d'arthrite rhumatoïde (AR).

Il est à noter que ces gélules végétales Olivie Riche / Olivie Force sont produites à partir d'oliviers plantés au milieu d'un désert rocailleux du Maroc, sans pollution, exempt d'activité industrielle, un environnement très rude où les températures atteignent 52 °C, où il n'y a presque pas de pluie, et où les racines n'ont pas d'espace où croître en raison des roches massives (calcaire et silex) à fleur de sol. Par conséquent, ces oliviers stressent et pensent qu'ils vont mourir. Ils déclenchent ainsi un mécanisme de survie où ils produisent des quantités anormalement élevées d'antioxydants (polyphénols) pour se défendre. Les antioxydants sont ensuite recueillis 100% naturellement à partir des feuilles de ces arbres, des jeunes branches, et des olives de ces arbres du désert (voir www.olivie.ma).

Mots clés : arthrite rhumatoïde ; extrait d'olive ; biomarqueurs inflammatoires ; intensité de la douleur ; essai clinique aléatoire.

INTRODUCTION

L'arthrite rhumatoïde (AR) est une maladie inflammatoire auto-immune chronique responsable de la destruction des articulations qui contribue à une détérioration fonctionnelle. L'AR reste la maladie des articulations la plus courante, touchant 0,5-1% de la population mondiale (Helmick *et al.*, 2008; Erikson *et al.* 2013). Plusieurs facteurs sont impliqués dans le déclenchement de la maladie: le tabac (Ruiz-Esquivel et Sanmarti, 2012; Glossop *et al.* 2006; Mathey *et al.*, 2002), le microbiome (Wu *et al.*, 2010), les facteurs hormonaux (Berglin *et al.*, 2010), les antécédents génétiques et les facteurs environnementaux (Packard *et al.*, 2011; Landre-Beauvais, 1800). Schématiquement, on peut diviser la physiopathologie de l'AR en 3 phases: (1) la phase d'initiation, (2) l'inflammation de la membrane synoviale (synovite) et (3) la destruction de l'articulation due à la prolifération pseudo-tumorale des cellules synoviales sous l'action des cytokines. En fait, l'inflammation synoviale chronique est la marque de l'AR qui implique des interactions complexes entre les lymphocytes T et B, les macrophages et les synoviocytes semblables aux fibroblastes, incluant un réseau de cytokines, chimiokines et autres molécules (Smolen et Redlich, 2014; Boissier *et al.*, 2012; Firestein, 2003). Dans l'AR, il y a un déséquilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires. Par exemple, le facteur nucléaire kappa β (NF- κ) est activé dans les cellules inflammatoires du synovium et induit l'expression des cytokines, y compris le facteur alpha de nécrose tumorale (TNF- α), l'interleukine-1 (IL-1 β), IL-6, IL-15, IL-18, mais aussi la métalloprotéinase (MMP-1) et les petites molécules de destruction cartilagineuse comme la prostaglandine E₂ (PGE) et l'oxyde nitrique (Killeen *et al.*, 2014; Tak *et al.*, 2001). Ces biomarqueurs inflammatoires sont présents en fortes concentrations dans le liquide synovial et le sérum des patients atteints d'AR, ce qui se manifeste cliniquement en gonflements, douleurs et destruction du tissu. Ces quelques dernières années, le blocage du réseau de cytokines

a pris une part importante dans la gestion clinique de l'AR, surtout dans l'inhibition des TNF- α , IL-6 et IL-1 produits (Smolen, 2014; Smolen *et al.*, 2012). Les molécules utiles au blocage de ces cytokines sont la plupart du temps des anticorps monoclonaux ou des protéines recombinantes (par ex. infliximab, Etanercept) (Smolen *et al.*, 2012; Strand *et al.*, 2007). Malgré leur utilisation clinique simple, ces substances ont eu quelques effets inattendus (y compris efficacité, toxicité et même pharmacodynamie), par ex. les effets catastrophiques de la première administration à des humains de TGN1412 (Strand *et al.*, 2007).

Outre l'arsenal thérapeutique existant pour l'AR, les produits naturels représentent une source de traitements innovateurs qui pourraient révolutionner la gestion des maladies inflammatoires. Salminen *et al.* (2002) ont signalé que 33 à 75% des patients atteints d'AR croyaient à des thérapies alternatives complémentaires, comme le régime alimentaire qui peut retarder les symptômes (Cernadas *et al.*, 2014). Dans ce sens, de nombreux essais cliniques ont élucidé l'efficacité des polyphénols d'olive, composants principaux du régime méditerranéen, sur des maladies inflammatoires chroniques, y compris l'AR (McKellar *et al.*, 2007; Sköldstam *et al.*, 2003) et la maladie coronaire stable (ou angine de poitrine) (Estruch, 2010; Fito *et al.*, 2007; Estruch *et al.*, 2006). L'adoption du régime méditerranéen a diminué l'activité inflammatoire, augmenté la fonction physique et amélioré la vitalité des patients atteints d'AR. L'hydroxytyrosol (3,4-DHPEA) est un des polyphénols les mieux étudiés de l'olive pour ses propriétés anti-inflammatoires et nombreuses activités pharmacologiques qui permettent de penser à une potentielle utilisation pour le développement d'une alimentation fonctionnelle (Hu *et al.*, 2014). En réalité, l'hydroxytyrosol, le tyrosol (p-HPEA) et l'oleuropéine (3,4-DHPEA-EA) exercent *in vitro* des effets inhibiteurs sur la PGE₂, LTB₄, TNF- α , IL-6, IL-1 et la protéine réactive très sensible (hs-CRP) (Camargo *et al.*,

2014; Richard *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2009). Beauchamp *et al.* (2005) ont signalé que l'effet anti-inflammatoire de l'oleocanthal était semblable à celui de l'ibuprofène (anti-inflammatoire non stéroïdien : AINS).

Bien que les résultats *in vitro* puissent être le premier maillon de la chaîne des modifications du produit naturel en produit pharmaceutique basé sur une molécule synthétique, nous avons besoin de plus de résultats d'essai clinique. Nous présentons donc ici les résultats d'un essai clinique randomisé concernant les effets de la supplémentation d'un extrait d'olive sur les biomarqueurs inflammatoires, l'intensité de la douleur et l'activité de la maladie de patients marocains atteints d'AR.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Sujets

Parmi les patients adressés à la clinique de rhumatologie ESSEHA de Casablanca, Maroc, des hommes et des femmes ont été choisis entre octobre 2012 et avril 2013. Pour faire partie de l'étude en cours, les sujets devaient souffrir d'arthrite rhumatoïde diagnostiquée depuis au moins un an selon les critères du Collège Américain de Rhumatologie (ACR) et la Ligue Européenne Contre les Rhumatismes (EULAR) (Aletaha *et al.*, 2010). L'étude a été dûment expliquée aux participants volontaires. Pour être sélectionné, il fallait remplir les conditions suivantes : avoir entre 20 et 80 ans, ne pas être enceinte, ne pas allaiter, ne pas prendre de contraceptif, être non-fumeur, ne pas avoir été diagnostiqué porteur du syndrome métabolique tel que défini dans le tableau III du Traitement de l'Adulte, ne pas avoir de problèmes inflammatoires, ne pas recevoir d'AINS et/ou d'inhibiteurs de cytokines, ne pas avoir un taux leucocytaire $\leq 3.5 \times 10^9/L$, un taux de créatinine ≥ 2.0 mg/dl, et des taux d'aspartate aminotransférase (AST) 2,5 fois supérieur à la limite supérieure de la normale. Les critères d'exclusion comprenaient aussi la consommation d'antioxydants provenant

de l'olive ou d'autres compléments alimentaires contenant des antioxydants moins de trois semaines avant l'intervention, les antécédents d'allergie ou l'intolérance aux produits contenant de l'olive. Pour être enrôlés dans cette étude, tous les participants volontaires devaient donner leur consentement écrit en toute connaissance de cause.

Descriptif de l'étude et intervention

L'étude en cours a été conçue avec les caractéristiques suivantes : double-aveugle, mode aléatoire et contrôlé placebo. Les participants choisis ont été répartis au hasard, selon une séquence aléatoire, en deux groupes : un groupe recevant OLIVIE RICHE (OLF), l'autre recevant le placebo. Les chercheurs, les participants et le personnel clinique n'avaient pas accès aux codes de traitement de chaque groupe. Les candidats avaient été invités à se présenter à la clinique, après une nuit de jeûne d'au moins douze heures, pour y subir une visite médicale de dépistage des articulations douloureuses et gonflées. Fondamentalement, l'examen incluait leur adhésion au Régime Méditerranéen selon le questionnaire modifié d'Estruch *et al.* (2006) (appendice table 1), l'évaluation d'exercice physique selon le Questionnaire International d'Activité Physique (l'exercice physique étant subdivisé en : élevé, moyen ou bas). Il était demandé aux participants de garder leur régime habituel durant la période de l'étude et d'éviter la consommation de produits contenant de l'olive (y compris huile d'olive et olive de table) et de nutriments à taux élevés d'acides gras polyinsaturés n-3 (PUFA) présents par exemple dans le poisson et d'éviter également aromates et produits connus pour leur capacité à altérer l'état inflammatoire et la fonction immunitaire (à savoir des compléments antioxydants et probiotiques). Les changements diététiques ont été enregistrés pendant les 3 premiers jours de régime, puis à 4 et 8 semaines après le traitement ou le placebo. Les participants ont reçu les explications nécessaires sur la façon

d'estimer leur prise de nourriture et d'enregistrer ces estimations. Des mesures anthropométriques, la prise de la pression sanguine et le prélèvement à

jeun d'un échantillon de 8 ml de sang veineux ont été réalisés chez chaque participant. Ces examens et mesures furent répétés après 8 semaines.

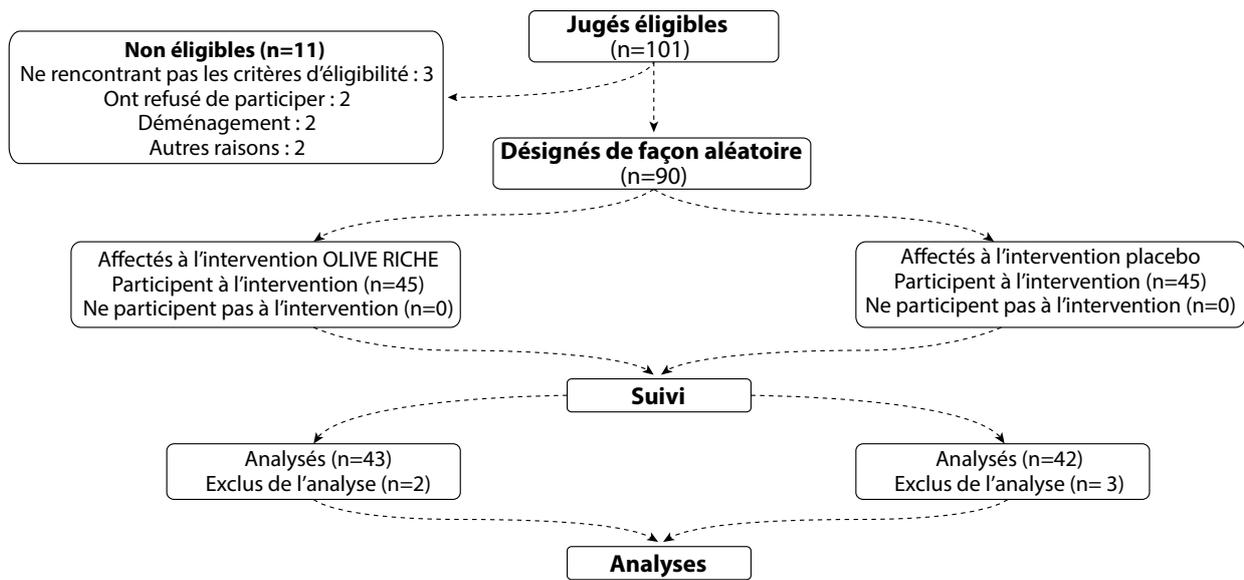


Figure 1. Diagramme de flux (organigramme) de l'étude.

Pendant l'étude, tous les participants et chercheurs avaient un accès libre et continu à une clinique pour conseils et consultations.

Les participants qui remplissaient tous les critères de sélection avaient reçu des gélules de 500 mg (identiques pour le complément et le placebo). Les participants recevaient aussi des instructions concernant la prise et le stockage des gélules. On a demandé aux patients de prendre 6 gélules par jour avant chaque repas et on les a contactés toutes les semaines pour contrôler la prise du complément. L'extrait aqueux d'olive ((OLF : Olivie Riche/Olivie Force)) et l'excipient maltodextrine étaient enfermés dans des gélules molles de gélatine soluble. Les gélules placebo contenaient uniquement de la maltodextrine. L'OLF provenait de l'olivier (fruits et feuilles) en utilisant un procédé d'extraction purement physique.

Il est à noter que ces gélules végétales Olivie Riche/Olivie Force sont produites à partir d'oliviers plantés au milieu d'un désert rocailleux du Maroc, sans pollution, exempt d'activité industrielle, un environnement très rude où les températures atteignent 52 ° C, où il n'y a presque pas de pluie, et où les racines n'ont pas d'espace où croître en raison des roches massives (calcaire et silex) à fleur de sol. Par conséquent, ces oliviers stressent et pensent qu'ils vont mourir. Ils déclenchent ainsi un mécanisme de survie où ils produisent des quantités anormalement élevées d'antioxydants (polyphénols) pour se défendre. Le nom de ces gélules végétales est Olivie Force au Maroc et Olivie Riche en Belgique et France. Pour plus d'informations : www.olivie.ma ou www.naturamedicatrix.fr. Le tableau un illustre les composants principaux de l'extrait d'olive (OLF).

Paramètres	Valeur moyenne (g/100g)
Solides totaux	97.96 ± 7.83
Volatiles totaux (minéraux)	12.9 ± 0.7
Lipides totaux	<1
Polyphénols totaux	15.98 ± 1.9
Hydroxytyrosol	2.09 ± 0.14

Tableau 1. Composants principaux de l'extrait d'olive (OLF) exprimés en pourcentage (g/100g). Ecart moyen +/- standard.

Mesures de laboratoire

On a réalisé des mesures anthropométriques à l'aide d'échelles calibrées et d'un stadiomètre mural avec une précision de 0,1 cm; on a mesuré la tension systolique et diastolique à l'aide d'un oscillomètre semi-automatique (Boso Medicus smart Semi automatic Blood Pressure Monitor, Allemagne). On a récolté des échantillons de sang dans des tubes EDTA et SST. Les échantillons d'érythrocytes, de plasma, de sérum et d'urine ont été placés dans des micro-tubes de 1 ml et stockés à -80° en attendant l'analyse. L'évaluation de l'énergie, de la prise de nutriments et des régimes des participants a été réalisée par le logiciel Nutritionist 4.3 (First Databank, Hearst Corp. San Bruno, CA). On a utilisé les tests ELISA à haute sensibilité (DIA, Belgique) pour quantifier la PGE₂, les leucotriènes B₄ (LTB₄), TNF-α et les cytokines IL-1 et IL-6 dans le sérum selon les directives du fabricant. Le niveau de hs-CRP du sérum a été déterminé par essai Turbidometric et des kits commerciaux à une longueur d'ondes de 500 nm (...). On a mesuré l'indication clinique de l'activité de la maladie et les paramètres de laboratoire des participants au début et à la fin de l'étude selon les méthodes internes des laboratoires cliniques ESSEHA.

L'hydroxytyrosol urinaire a été quantifié par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) comme marqueur de la prise d'OLF. En bref, l'hydroxytyrosol a été extrait de l'urine acidifiée (acide chlorhydrique, 0,6 N de concentration finale) comme décrit auparavant (Visioli *et al.*, 2000) et analysé dans un appareil chromatographique Shimadzu équipé d'une colonne C18 à phase inversée (250 mm L. X 4,6 mm I.D., 5 μm).

L'intensité de la douleur a été évaluée au départ, après 4 et 8 semaines (fin de l'étude) en utilisant une échelle visuelle analogique (VAS) selon le protocole défini par DeLoach *et al.* (1998). On a demandé aux participants d'indiquer l'intensité de la douleur en cochant une ligne de 100 mm, 0 = pas de douleur et 100 = douleur violente. Le soulagement de la douleur a été évalué en utilisant une échelle d'évaluation verbale à 5 points (VRS) où 0 = aucun soulagement, 1 = un petit soulagement, 2 = un soulagement significatif, 3 = un grand soulagement,

et 4 = soulagement complet. Le score d'activité de la maladie (DAS28) a été déterminé selon le EULAR (Wells *et al.*, 2009), basé sur le nombre d'articulations fragiles et gonflées (TJC et SJC), le sérum, la concentration hs-CRP et le résultat de la Santé Globale (GH) évalué par le patient sur une VAS de 10 cm. Le DAS28 a été calculé comme suit:

$$\text{DAS28(CRP)} = \{0,56\sqrt{\text{TC}}\} + \{0,28\sqrt{\text{SC}}\} + \{0,36\text{Ln}(\text{CRP}+1)\} + \{0,014(\text{GH})\}$$

Les docteurs ont évalué les effets contraires potentiels de l'administration d'OLF pendant la durée de l'étude, y compris les symptômes dans la bouche, les troubles digestifs, le rassasiement et la réponse allergique de la peau et d'autres symptômes reliés à l'intervention. Pour finir, l'évaluation de la satisfaction totale en réponse au traitement (GAST) (y compris l'anxiété) a été réalisée en utilisant une échelle catégorique à 5 points (0 = médiocre, 1 = passable, 2 = bon, 3 = très bon, et 4 = excellent). L'étude actuelle a été réalisée selon les directives approuvées par la Déclaration d'Helsinki.

Analyse statistique

Les données ont été analysées statistiquement en utilisant un GraphPadPrism version 5.00 (GraphPadInc, San Diego, Californie). Pour les caractéristiques de départ, les variables continues sont exprimées comme écart moyen +/- standard (SD) et les variables catégoriques comme fréquences (pourcent). Pour les biomarqueurs inflammatoires, l'intensité de la douleur et son soulagement, les valeurs moyennes sont exprimées avec des intervalles de confiance de 95% (CIs). La répartition normale des données a été contrôlée en utilisant le test Kolmogorov-Smirnov. La différence entre la caractéristique des groupes de départ a été réalisée par le test *t* indépendant, par le test U Mann-Whitney, et le test χ² respectivement pour les données normalement continues, les données non normalement continues et les données catégoriques. Le test *t* indépendant a aussi été utilisé pour comparer les changements moyens du début à la fin de l'étude (8 semaines) entre les groupes OLF et placebo. Les résultats avec des valeurs P bilatérales de <0,05 ont été considérés comme statistiquement significatifs.

RÉSULTATS

101 patients éligibles ont été enrôlés, et 11 ont été exclus de l'étude pour plusieurs raisons (figure 1). 5 participants ont été retirés de l'analyse (2 dans le groupe OLF et 3 dans le groupe placebo) parce qu'ils étaient incapables de suivre le protocole de l'étude. Une bonne conformité a été observée dans le groupe OLF (95,55%) et dans le groupe placebo (93,33%) sans que l'on observe de facteur défavorable à l'étude. L'hydroxytyrosol urinaire déterminé comme biomarqueur de conformité a

été quantifié par HPLC. Les résultats pointés dans le graphe de la figure 2 illustrent les changements à partir des périodes d'avant l'intervention pour les groupes placebo et OLF (à 4 semaines et à la fin de l'étude). La concentration d'hydroxytyrosol déterminée dans l'urine des participants du groupe OLF était significativement différente ($P < 0,0001$) de celle du groupe placebo. Toutefois, il faut noter que les données de la littérature sur l'absorption des phénols d'olive, le métabolisme et l'excrétion ne sont pas en accord (Covas *et al.*, 2006; Visioli *et al.*, 2003).

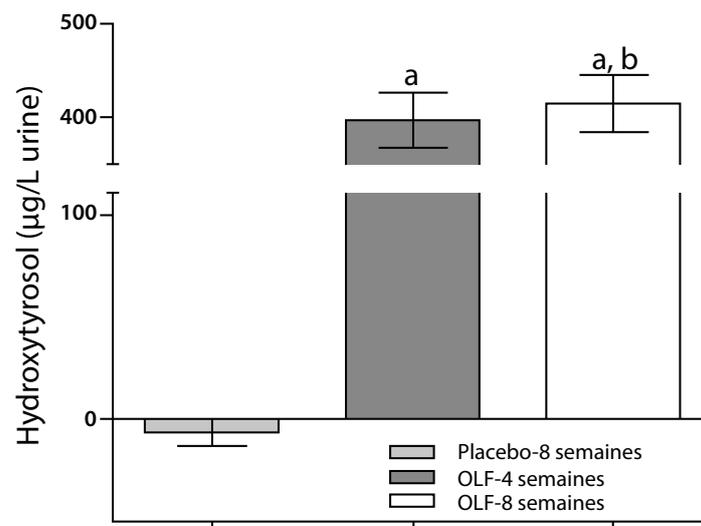


Figure 2. Changement à partir du début dans l'excrétion de l'hydroxytyrosol urinaire. Moyenne avec 95% de CI. a) $P < 0,0001$, entre le groupe OLF à 4 et 8 semaines; b) $P = 0,003$ entre le groupe OLF à 4 et 8 semaines.

Le tableau 2 montre les caractéristiques de départ des 90 participants qui ont été mis au hasard dans les groupes OLF et placebo. L'analyse statistique ne révèle aucune différence entre les deux groupes en ce qui concerne les caractéristiques de départ, y compris le degré d'adhésion au régime méditerranéen ($p = 0,296$).

Les résultats des questionnaires sur l'alimentation représentés dans le tableau 3 montrent qu'il n'y avait pas de différence significative dans l'apport alimentaire au début et après 8 semaines de supplémentation d'OLF et de placebo. Le résultat du tableau 3 montre aussi que la prise de PUFA est restée constante (valeur P de 0,611 à 0,741 pour groupes OLF et placebo), puisque la présence d'une quantité de PUFA peut être utile pour le traitement de l'inflammation dans l'AR (Park *et al.*, 2013). Nous avons aussi indiqué dans le tableau 3 les changements de poids chez les participants, et n'avons observé aucune différence significative pendant la durée de

l'étude pour les groupes OLF ($P = 0,976$) et placebo ($P = 0,759$). Ceci est approprié à cette étude puisque le tissu adipeux est un organe endocrinien qui sécrète des cytokines inflammatoires (Lu *et al.*, 2014). En général on a maintenu constant le niveau des apports de macronutriments pendant la durée de l'étude ce qui ne pouvait pas modifier la réponse inflammatoire et les biomarqueurs du niveau d'inflammation dans le sérum du patient. Néanmoins, la dernière semaine de l'étude d'intervention, on a noté chez 2 participants du groupe placebo une différence significative dans l'apport de MUFA (acide oléique), due à une consommation excessive d'huile d'olive (forte teneur en acide oléique (MUFA)) dont on a pensé qu'elle n'influençait pas les résultats de l'étude. En effet, tous les participants respectaient le régime quotidien recommandé par les chercheurs pour l'étude en évitant la consommation de produits de l'olive et de quelques autres produits connus pour avoir des effets anti-inflammatoires.

Paramètres	Groupe OLF (n=45)	Groupe placebo (n=45)	Valeur P ^a
Âge	53.27 ± 1.61	55.73 ± 1.97	0.346
Féminin, n (%)	42 (93.33)	41 (91.11)	0.915
Poids (kg)	67.15 ± 3.86	67.65 ± 3.99	0.944
IMC (kg/m ²)	28.17 ± 1.662	27.83 ± 1.815	0.851
Durée de la maladie (années)	6.67 ± 0.421	7.50 ± 0.563	0.366
Antécédents médicaux, n (%)	19 (40.00)	15 (33.33)	0.106
Antécédents familiaux, n (%)	9 (20.00)	10 (22.22)	0.698
Habitudes d'exercices physiques, n (%)	14 (31.11)	13 (28.88)	0.788
Habitudes de consommation d'alcool, n (%)	4 (8.88)	2 (4.44)	0.293
-Score du régime méditerranéen	2.05 ± 0.15	2.40 ± 0.20	0.296
-DAS28	3.374 ± 0.6625	3.392 ± 0.7132	0.940
-Pain VAS (0-100mm)	75,51 ± 9,814	76.65 ± 10.12	0.741

Tableau 2. Caractéristiques de base des participants. La valeur est exprimée comme écart type moyen +/- standard ou en pourcentage. ^aValeur P (<0,05) au test-t indépendant ou au test Mann-Whitney.

Paramètres	Groupe OLF (n=45)	Groupe placebo (n=45)
Énergie (cal)		
Début	1695.00 ± 219,80	1729.00 ± 100.7
8 semaines	1702.00 ± 225,30	1685.00 ± 318.6
Valeur Pa	0.576	0.745
Graisse (g)		
Début	65.90 ± 11.04	68.23 ± 14.37
8 semaines	69.07 ± 12.35	70.40 ± 14.35
Valeur Pa	0.547	0.780
PUFA (g)		
Début	13.23 ± 1.41	12.90 ± 1.33
8 semaines	13.73 ± 2.89	13.07 ± 1.91
Valeur Pa	0.611	0.741
MUFA (g)		
Début	20.57 ± 1.85	20.07 ± 1.77
8 semaines	21.57 ± 2.09	21.57 ± 1.62
Valeur Pa	0.110	0.045
SFA		
Début	13.73 ± 1.49	13.73 ± 2.07
8 semaines	14.23 ± 1.63	13.57 ± 2.09
Valeur Pa	0.415	0.849
Poids (kg)		
Début	67.15 ± 3.86	67.65 ± 3.99
8 semaines	67.31 ± 3.87	69.31 ± 3.46
Valeur Pa	0.976	0.759

Tableau 3. Changement dans l'apport d'énergie et de macronutriments au début et à la fin de l'étude pour les 2 groupes d'étude. Les données sont exprimées comme écart moyen +/- standard. PUFA, acides gras polyinsaturés; MUFA, acides gras mono-insaturés; SFA, acides gras saturés. a test t de Student (p<0,05).

L'arthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune inflammatoire chronique caractérisée par un gonflement des articulations, la fragilité de l'articulation et la destruction des articulations synoviales. Conséquences cliniques: douleurs, sensation de chaleur, rougeurs et perte de fonctionnement. On croit que l'inflammation de la membrane synoviale est la cause principale des conséquences de l'AR. Une forte concentration des marqueurs de l'inflammation, tels les cytokines (IL-6, IL-1, TNF- α) et hs-CRP corrèle avec la propension à la destruction de l'articulation dans l'AR.

Les graphes de la figure 2 montrent les changements à partir des valeurs de départ dans les biomarqueurs inflammatoires IL-6, IL-1, TNF- α , et les concentrations hs-CRP dans les deux groupes. La concentration CRP diminuait de façon significative chez les participants qui avaient reçu de l'OLF après 4 (P=0,014) et 8 semaines (P<0,0001) par rapport aux participants du groupe placebo. Le changement moyen des niveaux de hs-CRP était -0,55 (CI, -0,92 à -0,18) et -1,37 mg/L (CI, -2,71 à 1,57 mg/L) après respectivement 4 et 8 semaines.

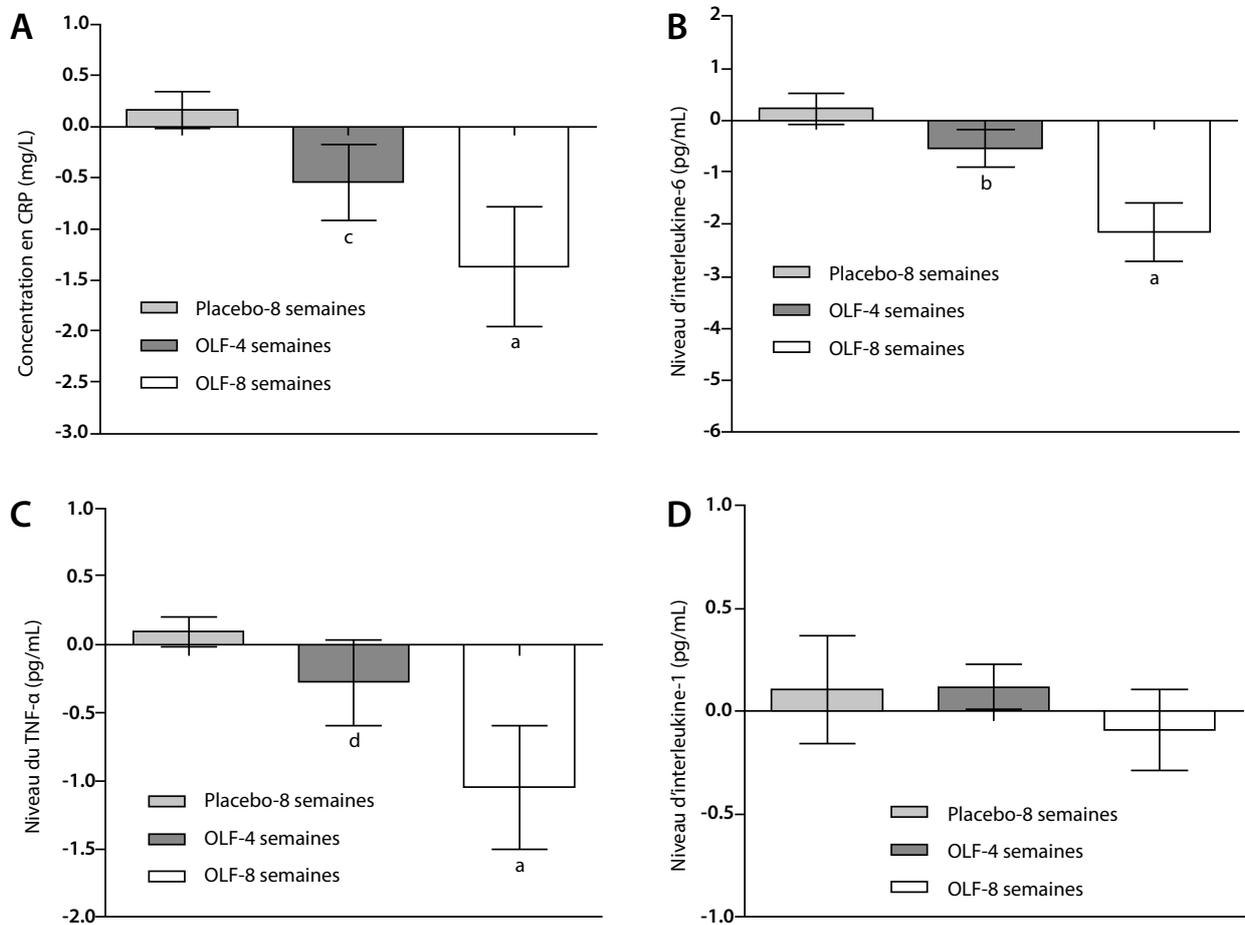


Figure 3. Changement du niveau de départ des biomarqueurs inflammatoires dans les groupes d'étude (a) hs-CRP, (b) IL-6, (c) TNF- α , et (d) IL-1. Les barres d'erreur sont 95% CIs. ^a(P<0,0001), ^b(P=0,014), ^c(P=0,009), et ^d(P=0,0247).

On a aussi observé une diminution significative dans les niveaux plasmatiques d'IL-6 et TNF- α (P<0,0001). Les changements ajustés entre les groupes étaient -2,14 pg/mL (CI, -2,71 à -1,57) et -1,046 pg/mL (CI, -1,50 à -0,59) pour l'IL-

6 et le TNF- α respectivement à la fin de l'étude. Néanmoins, on n'a observé aucune différence significative par rapport au début (valeur P de 0,929 et 0,206 à 4 et 8 semaines) pour les concentrations d'IL-1. La diminution significative d'IL-6

plasmatique peut entraîner une stabilisation de l'IL-1 circulant, ce qui peut expliquer les résultats de la figure 3d. D'autre part, l'AR s'accompagne souvent de douleurs chroniques très fortes.

Les graphes de la figure 4 résument les changements dans l'intensité et le soulagement de la douleur depuis le départ dans les groupes OLF et placebo.

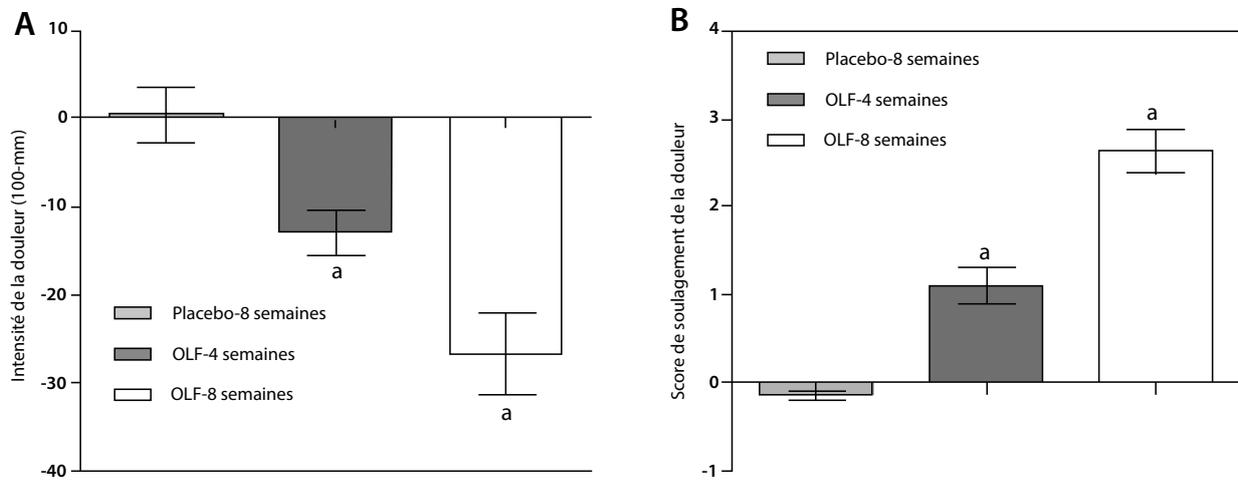


Figure 4. Changement depuis le début dans les scores de l'intensité de la douleur (a) et du soulagement de la douleur (b). Moyenne avec 95% CIs. Les astérisques indiquent la différence significative entre les groupes OLF et placebo, ^a($p < 0,0001$).

Une diminution significative ($P < 0,0001$) dans le score d'intensité de la douleur a été enregistrée dans le groupe OLF comparé au groupe placebo. L'évaluation de l'intensité de la douleur après intervention montre une diminution de $-12,94 \pm 4,970$ (CI, $-15,50$ à $-10,139$) après 4 semaines et $-26,71 \pm 9,29$ (CI, $-31,49$ à $-21,93$) à la fin de l'essai. L'intensité de la douleur (échelle de douleur 100-mm) diminue donc de $75,51 \pm 9,81$ à $48,80 \pm 4,16$ après 8 semaines de prise d'OLF. Une tendance similaire à la réponse à l'intensité de la douleur a été observée pour le score de soulagement. Les participants du groupe OLF avaient des scores de soulagement de la douleur significativement élevés comparés à ceux du groupe placebo ($P < 0,0001$), même après seulement 4 semaines d'intervention. Le score de soulagement de la douleur a augmenté de $2,61 \pm 0,48$ (CI, $2,37$ à $2,85$), ce qui correspond à une valeur moyenne de $3,26 \pm 0,66$ (CI, $2,92$ à $3,60$) dans le VRS 5-point après 8 semaines d'administration d'OLF. Nous devrions souligner que 30% des participants du groupe OLF ont déclaré un grand soulagement de la douleur (score de soulagement de la douleur

≥ 3) alors que les autres membres du groupe OLF ont senti un soulagement significatif de la douleur (score de soulagement de la douleur ≥ 2) à la fin de l'étude.

De la même façon, on a noté des différences significatives entre les groupes OLF et placebo ($p < 0,0001$) pour les scores DAS28. Les patients du groupe OLF avec une AR active au départ (score DAS28 $\geq 3,2$) ont montré une bonne réponse thérapeutique (diminution de DAS28 de 1,23). Le score DAS enregistré à la fin de l'essai pour le groupe OLF était de $2,23 \pm 0,40$, signalant une rémission de l'AR ($\leq 2,6$). La figure 5 résume aussi l'évaluation globale de la satisfaction en réponse au traitement, y compris en ce qui concerne l'anxiété du patient. Les participants qui avaient été placés dans le groupe OLF avaient un score de satisfaction de $3,206 \pm 0,53$ (correspondant à très bien dans l'échelle à 5 points), comparé à celui du groupe placebo. Un tel degré de satisfaction corrèle avec une diminution significative du niveau des biomarqueurs inflammatoires et une augmentation du score de soulagement de la douleur et des DAS.

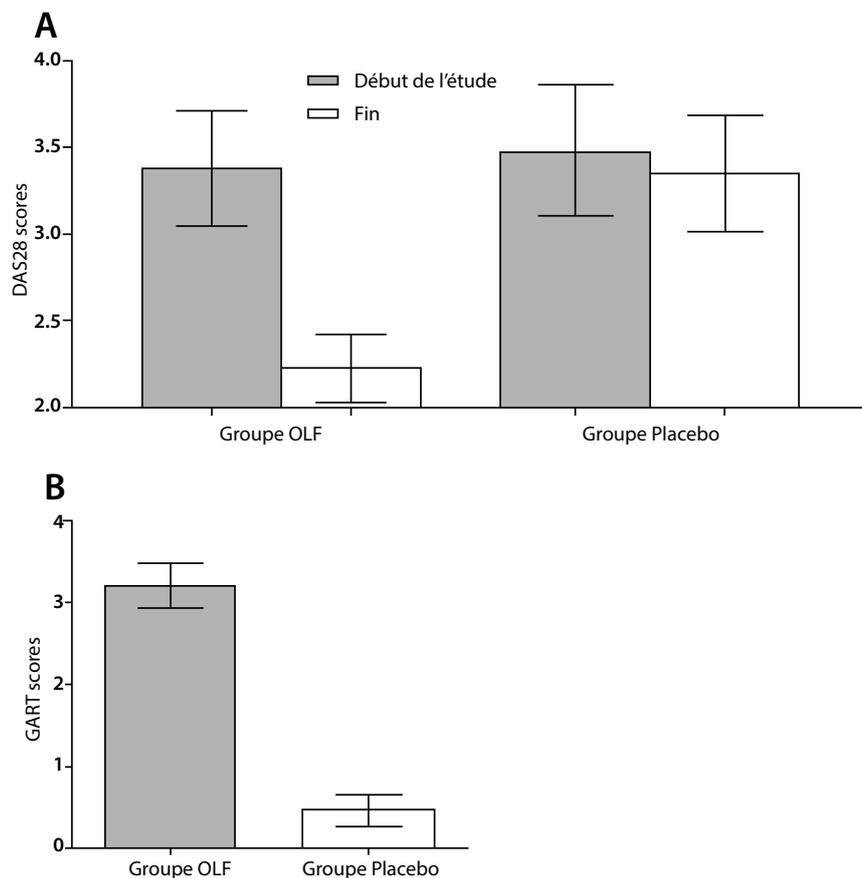


Figure 5. Effet de la supplémentation d'extrait d'olive sur les scores DAS28 (A) et GART (B). Moyenne avec 95% CIs. ^aP<0,0001 vs groupes placebo et groupe OLF au départ.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Des patients atteints d'AR chronique (selon le ACR/ELUAR) ont été affectés à un traitement par un extrait aqueux d'olive pendant 8 semaines, recevant une dose quotidienne de 3 g d'extrait d'olive (6 gélules, 500 mg chacune). On n'a observé aucune fluctuation de signe défavorable, ni des paramètres de laboratoires pendant l'étude et 3 semaines après l'intervention (données non publiées). Les résultats obtenus après 2 mois d'essai clinique démontrent pour la première fois l'efficacité thérapeutique potentielle d'un extrait d'olive riche en polyphénols (OLF) contre l'inflammation dans l'AR. Les 8 semaines d'administration d'OLF ont donc réduit le niveau de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, mais pas significatif pour IL-1), la concentration de hs-CRP et l'intensité de la douleur. Pendant la progression de l'AR, on note un afflux de cellules inflammatoires dans la membrane synoviale (transformée en tissu autonome, pannus)

où l'inflammation chronique a lieu entraînant des dégâts au cartilage et la destruction des os (due aux ostéoclastes). Pris ensemble, le processus inflammatoire et la différenciation des ostéoclastes étaient la conséquence de l'activation des cytokines, surtout le TNF- α , IL-6, IL-1 et d'autres médiateurs d'inflammation tels les eicosanoïdes (surtout PGE₂ et LTB₄) (Smoklen et Redluch, 2014; Boissier *et al.*, 2012). L'inhibition de la surproduction de cytokines inflammatoires est donc le but principal des agents anti-inflammatoires, y compris les glucocorticoïdes et les AINS. Smolen et Redlich (2014) ont rapporté que l'inhibition de la production du TNF- α et d'IL-6 semble être plus importante pour prédire l'inflammation, tandis que l'inhibition de l'IL-1 semble être secondaire. Les résultats obtenus montrent que la supplémentation d'un extrait riche en polyphénols (15% des polyphénols totaux et 2% d'hydroxytyrosol) contribue à la réduction du TNF- α , de l'IL-6, du hs-CRP, de la PGE₂, et du

LTB₄ (figure 6) chez les patients atteints d'AR. Il se peut que ce résultat soit une conséquence directe des polyphénols d'OLF (surtout l'hydroxytyrosol) qui agissent directement sur l'ADN pour réduire

l'expression des médiateurs inflammatoires ou inhiber leurs voies de biosynthèse à travers un mécanisme similaire à celui des glucocorticoïdes et/ou des AINS.

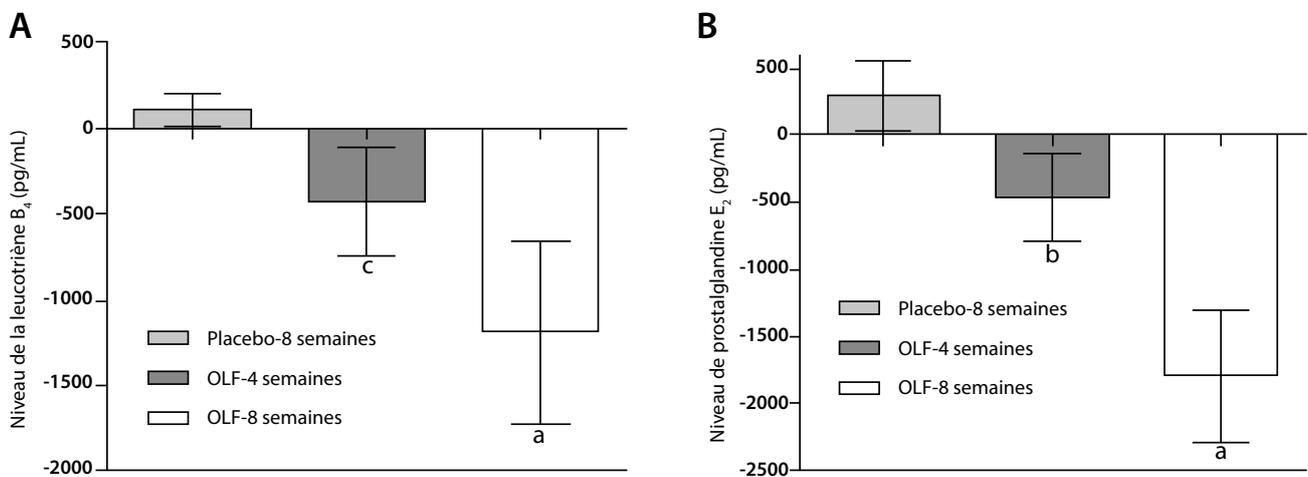


Figure 6. Changement depuis le point de départ des niveaux de leucotriène B₄ (A) et de prostaglandine E₂ (B). Moyenne avec 95% CI. ^aP<0,0001 vs groupe placebo; ^bP=0,0004 vs groupe placebo; ^cP= 0,0017 vs groupe placebo.

Dans ce sens, l'hydroxytyrosol inhibe l'expression de la cyclo-oxygénase induite (COX-2) (enzyme clé qui catalyse la biosynthèse de la PGE₂ à partir de l'acide arachidonique pendant le processus d'inflammation) et par conséquent, le niveau de PGE₂ dans les monocytes humains isolés (Rosignoli *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2009a; Lu *et al.*, 2005) et dans les macrophages murins (Richard *et al.*, 2011). On a observé un effet semblable sur la COX-2 et la PGE₂ *in vivo* quand les souris avec colite induite au DSS sont traitées avec de l'huile d'olive à forte teneur en hydroxytyrosol (Sanchez-Fidalgo *et al.*, 2011) ou par oleuropéine (Giner *et al.*, 2011). En outre, cet hydroxytyrosol pur ou contenu dans sa matrice naturelle (produits de l'olive tels des extraits aqueux et de l'huile d'olive) exerce un effet inhibiteur sur LTB₄, TNF- α , IL-6, IL-1 et hs-CRP (Camargo *et al.*, 2014; Richard *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2009a; Bitler *et al.*, 2005; Maiuri *et al.*, 2005). L'effet des polyphénols d'olive sur les marqueurs inflammatoires a été accentué chez les patients atteints d'une maladie coronarienne stable qui recevaient de l'huile d'olive dans des concentrations différentes (Fito *et*

al., 2007; Estruch *et al.*, 2006). Les résultats de la présente étude sont en accord avec les recherches *in vitro* et *in vivo* (cf. littérature ci-dessus) suggérant l'efficacité thérapeutique de l'hydroxytyrosol et d'autres polyphénols OLF contre les inflammations dans l'AR. En outre, la diminution de la PGE₂, LTB₄, TNF- α , IL-6, IL-1 et de la concentration hs-CRP pourrait être la conséquence directe de l'inhibition de la COX-2. Toutefois, la répression du gène COX-2 entraîne la diminution de la production d'IL-6 et on signale une relation entre une augmentation du macrophage PGE₂ dépendant et le niveau d'IL-6 *in vitro* (Inoue *et al.*, 2002; Hinson *et al.*, 1996). A son tour, un des rôles biologiques connus de l'IL-6 est l'activation des protéines inflammatoires produites, ce qui peut expliquer la diminution du niveau de hs-CRP. Un mécanisme semblable a déjà été décrit pour les médicaments AINS. Néanmoins, les AINS (celecoxib®, rofecoxib®, diclofenac®) ont fait augmenter la production de TNF- α dans les cultures de membrane synoviale rhumatoïde (Rosignoli *et al.*, 2013; Page *et al.*, 2010), alors que nos résultats indiquent une diminution significative du TNF- α plasmatique. Cela pourrait être dû à une autre voie

de signalisation induite par l'hydroxytyrosol et/ou d'autres polyphénols OLF. En admettant cela, l'effet potentiel de l'hydroxytyrosol (et d'autres polyphénols d'olive) sur le NF- κ B a été expliqué auparavant par plusieurs auteurs. Le NF- κ B occupe une position centrale en amont dans le processus inflammatoire puisqu'il déclenche l'expression de plus de 150 gènes (Makarov, 2001). Parmi ceux-ci, ceux qui encodent les cytokines, le TNF- α , les IL-1 et IL-6 étudiés ici. L'hydroxytyrosol de l'extrait d'olive aqueux inhibe l'expression du NF- κ B65 et les auteurs suggèrent que cet effet inhibiteur pourrait être la cause de la diminution des cytokines dans les macrophages murins (Richard *et al.*, 2011). En outre, l'hydroxytyrosol supprime l'expression du NF- κ B dans le monocyte humain (TPH-1) et modifie sa translocation dans le noyau (Zhang *et al.*, 2009b). De plus, l'hydroxytyrosol diminue l'activité du NF- κ B dans les cellules endothéliales (Scoditti *et al.*, 2012) et neurales (St-Laurent-Thibault *et al.*, 2011). Il est donc plus que probable que l'extrait d'olive aqueux (OLF) exerce son effet anti-inflammatoire chez les patients atteints d'AR en diminuant l'expression du NF- κ B et/ou de l'enzyme COX-2.

D'autre part, une angiogenèse excessive résulte de la progression du processus inflammatoire dans la membrane synoviale et entraîne une prolifération des cellules du tissu pannus et une complication des symptômes de l'AR. La néo-vascularisation (angiogenèse) contribue beaucoup au développement et au maintien de l'inflammation dans l'AR (Semerano *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2001), et on a observé une corrélation entre la progression de l'AR et le niveau de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, le facteur pro-angiogénique le plus important) chez les patients souffrant d'AR (Lee *et al.*, 2001; Sone *et al.*, 2001). L'activation du VEGF et de l'angiopoietins-1 (Ang-1), autre facteur pro-angiogénique, est un mécanisme partagé et à cibles multiples, incluant le NF- κ B dépendant des cytokines (IL-1 β et TNF- α) et l'expression de la COX-2 (Scoditti *et al.*, 2012; Pettit *et al.*, 2001).

Nos données non encore publiées expliquent que l'hydroxytyrosol de l'olive (fruit) inhibe *in vitro* la réponse angiogénique des cellules endothéliales, en réprimant le VEGF (isoformes A, B, et C), l'expression des gènes Ang-1 et Ang-2. Cela correspond aux résultats des études précédentes (Scoditti *et al.*, 2012; Fortes *et al.*, 2012). Sinon, l'intensité de la douleur est connue depuis longtemps pour être la principale manifestation clinique du processus inflammatoire de l'AR. L'intensité de la douleur dans l'AR était associée à une augmentation du niveau de PGE₂ (Prochazkova *et al.*, 2009; Scher *et al.*, 2007; Kamei *et al.*, 2004) ce qui explique l'efficacité des AINS comme analgésiques. Beauchamp *et al.* (2005) ont signalé des résultats semblables pour l'oléocanthal (composant phénolique de l'huile d'olive). Il est probable que la diminution des marqueurs inflammatoires circulant, surtout au niveau des PGE₂, est la cause principale de la diminution de l'intensité de la douleur observée dans le groupe OLF.

En conclusion, les résultats de l'essai clinique semblent indiquer l'efficacité de l'extrait d'olive à forte teneur en polyphénols comme agent anti-inflammatoire chez les patients souffrant d'AR. La résolution du processus inflammatoire dans l'AR s'exerce à travers des mécanismes plausibles, y compris l'inhibition du NF- κ B dépendant des cytokines (IL-6 et TNF- α), la répression de la COX-2, du VEGF et de l'Ang-1. Les résultats nets sont la diminution de l'intensité de la douleur, du score d'activité de la maladie et la protection des articulations. Ceci fournit la preuve des effets pleiotropes de l'hydroxytyrosol sur l'inflammation, surtout quand il était transporté dans sa matrice naturelle. Malgré les objectifs divers, plus d'informations sont nécessaires en ce qui concerne l'activité anti-angiogénique de l'hydroxytyrosol dans la membrane synoviale qui pourrait représenter une cible future pour de nouveaux médicaments anti-inflammatoires basés sur la structure de l'hydroxytyrosol. En plus, l'effet potentiel des polyphénols de l'olive sur

la co-stimulation des cellules T et la diminution des cellules B doit être clarifié. Les découvertes actuelles correspondent à celles obtenues *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs études cliniques concernant les effets anti-inflammatoires des polyphénols de l'olive suggérant le rôle potentiel de ces composés naturels pour la conception d'aliments fonctionnels.

REFERENCES

- Aletaha D, Neogi T, Silman A, Funovits J, Felson D, Bingham III, CO, *et al.* *The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Classification Criteria for Rheumatoid Arthritis.* *Ann Rheum* 2010; 69: 1580-1588.
- Beauchamp GK, Russell SJK, Diane M, Jianming L, Jana P, Qiang H, *et al.* *Phytochemistry: Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil.* *Nature* 2005; 437: 45–46.
- Berglin E, Kokkonen H, Einarsdottir E, Agren A, Rantapää Dahlqvist S. *Influence of female hormonal factors, in relation to autoantibodies and genetic markers, on the development of rheumatoid arthritis in northern Sweden: a case-control study.* *Scand J Rheumatol* 2010; 39:454-60.
- Boissier MC, Semerano L, Challal S, Saidenberg-Kermanac'h N, Falgarone G. *Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction: a review.* *J Autoimmun* 2012; 39: 222–8.
- Camargo A, Rangel-Zuñiga O, Haro C, Meza-Miranda E, Peña-Orihuela P, Meneses M, *et al.* *Olive oil phenolic compounds decrease the postprandial inflammatory response by reducing postprandial plasma lipopolysaccharide levels.* *Food Chem* 2014; 162: 161-171.
- Bitler CM, Viale TM, Damaj B, Crea R. *Hydrolyzed Olive Vegetation Water in Mice Has Anti-Inflammatory Activity.* *J Nutr* 2005; 135: 1475-1479.
- Cernadas L, Rodríguez-Romero B, Carballo-Costa L. *Importance of nutritional treatment in the inflammatory process of rheumatoid arthritis patients; a review.* *Nutr Hosp* 2014; 29: 237–45.
- Covas MI, de la Torre K, Farre-Albaladejo M, Kaikkonen J, Fitò M, Lopez-Sabater C, *et al.* *Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in human.* *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 608–16.
- DeLoach LJ, Higgins MS, Caplan AB, Stiff JL. *The visual analog scale in the immediate postoperative period: intra subject variability and correlation with a numeric scale.* *Anesth Analg* 1998; 86: 102–106.
- Eriksson JK, Neovius M, Ernestam S, Lindblad S, Simard JF, Askling J. 2013. *Incidence of rheumatoid arthritis in Sweden: a nationwide population-based assessment of incidence, its determinants, and treatment penetration.* *Arthritis Care Res* 2013; 65: 870-878.
- Estruch R. *Anti-inflammatory effects of the Mediterranean diet: the experience of the PREDIMED study.* *Proc Nutr Soc* 2010; 69: 333–40.
- Estruch, R., Martinez-Gonzalez, M.A., Corella, D., Salas-Salvadó J, Ruiz-Gutiérrez V, Covas MI, *et al.* *Effects of a Mediterranean-Style Diet on Cardiovascular Risk Factors: A Randomized Trial.* *Ann Intern Med* 2006; 145: 1-11.
- Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III).* *JAMA* 2001; 285: 2486-2497.
- Firestein, G. *Evolving concepts of rheumatoid arthritis.* *Nature* 423, 356–361 (2003).
- Fitó M, Cladellas M, Torre R, Martí J, Muñoz D, Schröder H, *et al.* *Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: a randomized, crossover, controlled trial.* *Eur J Clin Nutr* 2007; 62: 570–574.
- Fortes C, García-Vilas J, Quesada A, Medina M. *Evaluation of the anti-angiogenic potential of*

- hydroxytyrosol and tyrosol, two bio-active phenolic compounds of extra virgin olive oil, in endothelial cell cultures. *Food Chem* 2012; 134: 134–140.
- Giner E, Andújar I, Recio M, Ríos J, Cerdá-Nicolás J, Giner R. *Oleuropein ameliorates acute colitis in mice*. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 12882–92.
- Glossop JR, Dawes PT, Matthey DL. *Association between cigarette smoking and release of tumor necrosis factor alpha and its soluble receptors by peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45: 1223-1229.
- Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC, Gabriel S, Hirsch R, Kwoh CK, *et al*. *Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States*. Part I. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 15-25.
- Hinson R, Williams J, Shacter E. *Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2*. *Proc Natl Sci Acad* 1996; 93: 4885–4890.
- Hu T, He XWW, Jiang JGG, Xu XLL. *Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effects: a review*. *J Agric Food Chem* 2014; 62: 1449–55.
- Inoue H, Takamori M, Shimoyama Y, Ishibashi H, Yamamoto S, Koshihara Y. *Regulation by PGE₂ of the production of interleukin-6, macrophage colony stimulating factor, and vascular endothelial growth factor in human synovial fibroblasts*. *Br J Clin Pharmacol* 2002; 136: 287-295.
- Smolen JS, and Redlich K. *Rheumatoid arthritis*. In *Rose N & Mackay I (Eds): The Autoimmune Diseases (Fifth Edition)*; 2014. p. 511-523.
- Kamei D, Yamakawa K, Takegoshi Y, Mikami-Nakanishi M, Nakatani Y, Oh-Ishi S, *et al*. *Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin E synthase-1*. *J Biol Chem* 2004; 279: 33684-95.
- Killeen M, Linder M, Pontoniere P, Crea R. *NF- κ B signaling and chronic inflammatory diseases: exploring the potential of natural products to drive new therapeutic opportunities*. *Drug Discov Today* 2014; 19: 373-378.
- Landre-Beauvais AJ. *Doit-on admettre une nouvelle espèce de Goutte sous la denomination de Goutte, Asthenique Primitive?* An VIII, Paris, Brisson 1800.
- Lu Y, Wahl LM. *Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 through enhancement of NF-kappa β activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes*. *J Immunol* 2005; 175: 5423–9.
- Lu B, Hiraki L, Sparks JA, Malspeis S, Chen CY, Awosogba JA, *et al*. *Being overweight or obese and risk of developing rheumatoid arthritis among women: a prospective cohort study*. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 205-459.
- Maiuri M, Stefano D, Meglio P, Irace C, Savarese M, Sacchi R, *et al*. *Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2005; 371: 457-465.
- Makarov S. *NF-kappa β in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction*. *Arthritis Res* 2001; 3: 200–206.
- Matthey DL, Dawes PT, Clarke S, Fisher J, Brownfield A, Thomson W, *et al*. *Relationship among the HLA-DRB1 shared epitope smoking and rheumatoid factor production in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum* 2002; 47: 403-407.
- Packard CJ, Bezlyak V, McLean JS, Batty GD, Ford I, Burns H, *et al*. *Early life socioeconomic adversity is associated in adult life with chronic inflammation, carotid atherosclerosis, poorer lung function and decreased cognitive performance: a cross-sectional, population-based study*. *BMC Public Health* 2011; 11, 42.
- Page TH, Turner JJ, Brown AC, Timms EM, Inglis JJ, Brennan FM, *et al*. *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs increase TNF production in*

- rheumatoid synovial membrane cultures and whole blood. *J Immunol* 2010; 185: 3694–3701.
- Park Y, Lee A, Shim S-C, Lee J, Choe J-Y, Ahn H, et al. *Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in patients with rheumatoid arthritis: a 16-week randomized, double-blind, placebo- controlled, parallel-design multicenter study in Korea.* *J Nutr Biochem* 2013; 24: 1367–72.
- Pettit AR, Ji H, von Stechow D, Müller R, Goldring SR, Choi Y, et al. *TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis.* *Am J Pathol* 2001; 159: 1689–1699.
- Procházková M, Zanvit P, Doležal T, Prokešová L, Kršiak M. *Increased gene expression and production of spinal cyclooxygenase 1 and 2 during experimental osteoarthritis pain.* *Physiol Res* 2009; 58: 419–25.
- Richard N, Arnold S, Hoeller U, Kilpert C, Wertz K, Schwager J. *Hydroxytyrosol Is the Major Anti-Inflammatory Compound in Aqueous Olive Extracts and Impairs Cytokine and Chemokine Production in Macrophages.* *Planta Medica* 2011; 77: 1890–1897.
- Rosignoli P, Fuccelli R, Fabiani R, Servili M, Morozzi G. *Effect of olive oil phenols on the production of inflammatory mediators in freshly isolated human monocytes.* *J Nutr Biochem* 2013; 24: 1513–1519.
- Salminen E, Heikkilä S, Poussa T, Lagstrom H, Saario R, Salminen S, et al. *Female patients tend to alter their diet following the diagnosis of rheumatoid arthritis and breast cancer.* *Prev Med* 2002; 34: 529–35.
- Sánchez-Fidalgo S, Sánchez de Ibarra L, Cárdeno A, Alarcón de la Lastra C. *Influence of extra virgin olive oil diet enriched with hydroxytyrosol in a chronic DSS colitis model.* *Eur J Nutr* 2011; 51: 497–506.
- Scher J, Pillinger M, Abramson S. *Nitric oxide synthases and osteoarthritis.* *Curr Rheumatol Rep* 2007; 9: 9–15.
- Scoditti E, Calabriso N, Massaro M, Pellegrino M, Storelli C, Martines G, et al. *Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: a potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer.* *Arch Biochem Biophys* 2012; 527: 81–89.
- Semerano L, Clavel G, Assier E, Denys A, Boissier MC. *Blood vessels, a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis?* *Jt Bone Spine* 2011; 78: 118–123.
- Smolen J, Aletaha D, Redlich K. *The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data?* *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8: 235–43.
- St-Laurent-Thibault C, Arseneault M, Longpré F, Ramassamy C. *Tyrosol and hydroxytyrosol, two main components of olive oil, protect N2a cells against amyloid- β -induced toxicity. Involvement of the NF- κ B signaling.* *Curr Alzheimer Res* 2011; 8: 543–551.
- Strand V, Kimberly R, Isaacs J. *Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions.* *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 75–92.
- Ruiz-Esquivé V, Sanmartí R. *Tobacco and Other Environmental Risk Factors in Rheumatoid Arthritis.* *Reumatol Clin* 2012; 8: 342–350.
- Visioli F, Galli C, Bornet F, Mattei A, Patelli R, Galli G, et al. *Olive oil phenolics are dose- dependently absorbed in humans.* *FEBS Lett* 2000; 468:159–160.
- Visioli F, Galli C, Grande S, Colonnelli K, Patelli C, Galli G, et al. *Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration.* *J Nutr* 2003; 133: 2612–2615.
- Wells G, Becker JC, Teng J, Dougados M, Schiff M, Smolen J, et al. *Validation of the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and European League Against Rheumatism response criteria based on C-reactive protein against disease progression in patients with rheumatoid arthritis, and comparison with the DAS28 based on erythrocyte sedimentation rate.* *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 954–60.
- Wu HJ, Ivanov II, Darce J, Hattori K, Shima T,

Umesaki Y, et al. *Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells*. Immunity 2010; 32: 815-827.

Zhang X, Cao J, Jiang L, Zhong L. *Suppressive effects of hydroxytyrosol on oxidative stress and nuclear Factor-kappa β activation in THP-1 cells*. Biol Pharm Bull 2009a; 32: 578–582.

Zhang X, Cao J, Zhong L. *Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2009b; 379: 581–6.