



Effets thérapeutiques et anti-inflammatoires de la cryothérapie dans les rhumatismes inflammatoires

Xavier Guillot

► To cite this version:

Xavier Guillot. Effets thérapeutiques et anti-inflammatoires de la cryothérapie dans les rhumatismes inflammatoires. Santé. Université de Franche-Comté, 2016. Français. NNT : 2016BESA3009 . tel-01562112

HAL Id: tel-01562112

<https://theses.hal.science/tel-01562112>

Submitted on 13 Jul 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE
en vue de l'obtention du titre de docteur

Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Présentée et soutenue publiquement par
Xavier Guillot
Le 20 décembre 2016

Effets thérapeutiques et anti-inflammatoires de la cryothérapie dans les rhumatismes inflammatoires.

Membres du jury :

Pr. Nicolas TORDI , Université de Bourgogne Franche-Comté STAPS
Pr. Daniel WENDLING, Université de Bourgogne Franche-Comté
Pr. Benoît DUGUÉ, Université de Poitier, Faculté des sciences de sport
Pr. Giuseppe BANFI, Università degli studi di Milano
Pr. Thao PHAM, Université d'Aix-Marseille
Dr Laurent Mourot Directeur de l'UFR Sport à Besançon

Directeur de thèse
Codirecteur de thèse
Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Codirecteur de thèse

Direction :

-Pr Nicolas Tordi (UPFR STAPS, PEPITE EA4267, EPSI, FHU INCREASE, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France. nicolas.tordi@univ-fcomte.fr).

-Pr Daniel Wendling (Service de rhumatologie, Hôpital Jean Minjoz et EA4266, F-25000 Besançon, France. dwendling@chu-besancon.fr).

-Dr Laurent Mourot (EA3920, Marqueurs pronostiques et facteurs de régulation des pathologies cardiaques et vasculaires, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France. Laurent.mourot@univ-fcomte.fr).

Rapporteurs :

-Pr Tao Pham (APHM, hôpital Sainte-Marguerite, service de rhumatologie, 270 Bd Ste Marguerite, 13009 Marseille, France. Thao.PHAM@ap-hm.fr).
+33 04 91 74 63 21.

-Pr Giuseppe Banfi (Laboratory of Experimental Biochemistry and Molecular Biology, IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi, Via Riccardo Galeazzi, 4, 20161, Milan, Italy. banfi.giuseppe@fondazione-sanraffaele.it).
+39.02.66214829 +393487149044.

Jury :

-Pr Nicolas Tordi (UPFR STAPS, FDE EA4267, FHU INCREASE, CIC-IT, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France. nicolas.tordi@univ-fcomte.fr. Directeur UPFR des Sports. 31 chemin de l'épithaphe 25000 Besançon. Tel +33 (0)3 81 66 67 44 / Plateforme EPSI - Bâtiment Socrate. 19 rue A Paré 25000 Besançon. Tel +33 (0)3 63 08 23 23).

-Pr Daniel Wendling (Hôpital Jean Minjoz, service de rhumatologie et EA4266, boulevard Fleming, 25030, Besançon Cedex, dwendling@chu-besancon.fr, +33 (0)3 81 66 82 41).

-Pr Benoît Dugué (EA6314 "Mobilité Vieillissement Exercice", Faculté des sciences du sport, Université de Poitiers, Poitiers, France. benoit.dugue@univ-poitiers.fr, +33 (0)5 49 45 40 40).

-Pr Tao Pham (APHM, hôpital Sainte-Marguerite, service de rhumatologie, 270 Bd Ste Marguerite, 13009 Marseille, France. Thao.PHAM@ap-hm.fr).
+33 04 91 74 63 21.

-Pr Giuseppe Banfi (Laboratory of Experimental Biochemistry and Molecular Biology, IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi, Via Riccardo Galeazzi, 4, 20161, Milan, Italy. banfi.giuseppe@fondazione-sanraffaele.it).
+39.02.66214829 +393487149044.

Comité de pilotage :

-Pr Benoît Dugué (EA6314 "Mobilité Vieillissement Exercice", Faculty of Sport Sciences, University of Poitiers, Poitiers, France. benoit.dugue@univ-poitiers.fr).

-Pr Jean Francis Maillefert (Service de rhumatologie, hôpital du Bocage, CHU de Dijon, 14, rue Gaffarel, 21000 Dijon, France; Inserm1093, université de Bourgogne, 21000 Dijon, France. jean-francis.maillefert@chu-dijon.fr).

Remerciements :

- Au Pr Nicolas Tordi, pour avoir accepté de superviser cette thèse, pour votre soutien constant et votre ouverture d'esprit. Cette rencontre entre rhumatologie et sciences du sport autour de la thématique du froid a donné lieu à des interactions très riches et constructives, permettant l'émergence d'un nouvel axe de recherche au sein du CHU et de l'université. Vous avez permis l'aboutissement de ce projet trans-disciplinaire et favorisé le développement de nouvelles collaborations locales, nationales et internationales. Je vous remercie pour cette belle expérience scientifique et humaine qui donnera lieu je l'espère à de nouvelles interactions dans le futur.

- Au Pr Daniel Wendling, pour m'avoir fait confiance pour occuper le poste de praticien hospitalier dans votre service et m'avoir permis de me lancer dans l'aventure d'une thèse de science. Ces cinq années de collaboration auront été extrêmement enrichissantes sur le plan professionnel, scientifique et humain et m'ont permis de m'approprier la rhumatologie dans ses multiples dimensions. Dans votre service comme en dehors, vous parvenez à concilier et à transmettre l'excellence clinique et scientifique ainsi qu'une passion communicative pour la rhumatologie sous toutes ses formes. Vous vous donnez sans compter pour les étudiants, les internes, les patients et pour la rhumatologie française en général. J'ai beaucoup appris et progressé à votre contact et vous remercie pour tout ce que vous m'avez apporté.

- Au Pr Céline Demougeot, je vous remercie de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire, pour un projet qui pouvait sembler un peu aléatoire au départ. J'ai beaucoup apprécié votre dynamisme, votre gentillesse, votre droiture et votre rigueur scientifique sans faille. La partie animale de ce travail doit énormément à votre expertise dans le domaine. Par votre esprit d'ouverture vous avez favorisé à Besançon,

aux côtés de Clément Prati, les interactions entre les mondes scientifique et médical autour de nombreux projets, dont celui-ci.

- Au Pr Benoît Dugué, pour vos conseils avisés sur un sujet que vous connaissez bien. Merci d'avoir accepté de faire partie du comité de pilotage. Votre expertise dans les domaines de la cryothérapie et de la physiologie du sport apportera des éclairages précieux lors de la soutenance de ma thèse. Je serai très heureux de pouvoir vous compter parmi les membres de mon jury, avec des projets de collaboration prometteurs qui se profilent déjà autour de la thématique (analyse métabolomique sur le liquide articulaire).

- Au Pr Thao Pham, rapporteur et membre du jury. Merci d'avoir accepté notre invitation et de venir apporter votre expertise reconnue dans le domaine des rhumatismes inflammatoires. Votre expérience de la cryothérapie corps entier dans la spondyloarthrite donnera lieu à des échanges très instructifs sur le sujet. Je serai très honoré de pouvoir vous compter parmi les membres de mon jury.

- Au Pr Giuseppe Banfi, pour avoir accepté d'être rapporteur et de faire partie du jury. Merci de faire le long déplacement depuis Milan pour apporter votre précieuse expertise dans les domaines de la physiologie et de la médecine du sport, en français qui plus est.

- Au Pr Jean-Francis Maillefert, pour avoir accepté de faire partie du comité de pilotage et suivi le projet aux différentes étapes de son développement, dans la continuité d'une collaboration et d'une amitié anciennes entre nos deux services.

- A l'ensemble du personnel du service de rhumatologie : à mon collègue Clément Prati, aux chefs de clinique Marie Godfrin-Valnet et Frank Verhoeven, aux différentes générations d'internes que j'ai – déjà - côtoyées, aux infirmières et aides soignants, kinésithérapeutes, aux secrétaires. Vous avez tous été diversement mis à contribution

pour les études CDRI et ALGGAR et avez favorisé leur bon déroulement. Merci pour votre compétence, votre dévouement et pour cette ambiance de convivialité si importante pour le bon fonctionnement d'un service.

- Au Dr Hélène Martin pour ta disponibilité et ta rigueur. Ton aide précieuse a permis de mettre au point certaines techniques nouvelles dans le laboratoire (culture de rotules, PCR et Western Blot sur les pattes arrières des rats AIA) sans lesquelles ce travail n'aurait pas eu la même valeur scientifique.

- A tous les membres de l'EA 4267 et des unités de recherche connexes au sein de l'UFR SMP, croisés tout au long de ma thèse: Perle Totoson, Laurent Mourot, Katy Maguin-Gaté, Johnny Moretto, Maude Nappey, Hervé Reyssie, Alexandre Bonnet, Catherine Capitan ... qui m'ont assisté à différentes étapes du projet. Traiter des rats non anesthésiés par du froid et en étudier les effets in vivo pouvait sembler une gageure au départ, mais les difficultés - bien réelles - ont toutes pu être surmontées grâce à vos diverses compétences, à votre aide et à votre esprit d'équipe. Travailler avec vous aura été pour moi un réel plaisir et un grand enrichissement.

- Au Dr Lionel Pazart du CIC-IT pour votre soutien méthodologique, vos conseils avisés, et pour votre rôle important lors des recherches de financements. A Stéphanie Py pour sa participation aux expériences de PCR.

- Au Pr Philippe Saas et à Caroline Laheurte, de l'EFS de Bourgogne-Franche-Comté, qui ont accepté de collaborer avec nous pour les dosages de cytokines dans le liquide articulaire des patients. Merci pour votre accueil, votre compétence et votre réactivité.

- A la FHU INCREASE, qui a labélisé le projet et nous a aidés notamment pour les demandes de financement, avec le soutien méthodologique d'Emilie Gaiffe. Une partie des expériences de PCR chez le rat a également été financée grâce à son soutien.

- A la DRCI, qui a soutenu les études CDRI et ALGGAR et s'est portée garante de leur bon déroulement sur les plans méthodologique, éthique et juridique. Les interactions avec Elise Robert, Sophie Depierre et Nour Sayed ont permis de trouver les financements et de mener à leur terme nos projets sur la cryothérapie chez l'homme.
- Aux patients, qui se sont prêtés de bonne grâce aux études CDRI et ALGGAR, dans le souci d'aider à améliorer la compréhension et la prise en charge des rhumatismes inflammatoires.
- A Susana Domenech qui a accepté de me recevoir dans son laboratoire de Florianopolis pour monter des collaborations prometteuses autour de notre thématique de recherche, à Daniele Peres qui a jeté un pont entre nos deux continents en venant faire un doctorat à Besançon. L'amitié franco-brésilienne entre nos deux équipes devrait se traduire par de beaux projets dans les années à venir.
- Au Pr Françoise Debiais, au Dr Isabelle Azaïs et au service de rhumatologie du CHU de Poitiers pour m'avoir inculqué la rigueur clinique, l'humilité et l'esprit critique, toujours dans le respect du patient, lors de mes années d'internat.
- Au Pr Marie-Christophe Boissier, au service de rhumatologie de l'hôpital Avicenne et au laboratoire UMR 1125 de l'université Paris 13 pour m'avoir accueilli comme chef de clinique et étudiant en master II, et pour m'avoir transmis les virus de la recherche et de l'écriture scientifique.
- A mes parents, mes sœurs, mon grand-père, mes cousines, mes amis bordelais, rochelais et parisiens pour leur fidélité et leur soutien indéfectible.
- ...et aux rats arthritiques, réticents de prime abord, qui se sont progressivement laissés apprivoiser et convertir aux bienfaits de la cryothérapie...

Table des matières:

I-	INTRODUCTION.....	page 9.
II-	ETAT DE L'ART (<u>Article 1.</u> [22] - §XIIA.).....	page 11.
III-	OBJECTIFS.....	page 20.
IV-	EFFETS DE DEUX APPLICATIONS LOCALES DE FROID SUR L'HYPERSIGNAL DOPPLER SYNOVIAL DANS L'ARTHRITE DE GENOU (Etude CDRI – <u>Article 2.</u> §XIIA., sous presse).....	page 21.
V-	EFFETS DE DEUX APPLICATIONS LOCALES DE FROID SUR LES TAUX DE CYTOKINES INTRA-ARTICULAIRES (Etude ALGGAR – EULAR 2016. §XIIB. et futur <u>article 4.</u>).....	page 41.
VI-	EFFETS DE L'HYPOTHERMIE TISSULAIRE PONCTUELLE SUR L'INFLAMMATION SYNOVIALE IN VITRO DANS L'ARTHRITE A L'ADJUVANT (<u>Article 3.</u> §XIIA., révision en cours).....	page 55.
VII-	EFFETS DE LA CRYOTHERAPIE LOCALE APPLIQUEE PENDANT 14 JOURS IN VIVO DANS L'ARTHRITE A L'ADJUVANT (<u>Article 3.</u> §XIIA., révision en cours).....	page 61.
VIII-	DISCUSSION GLOBALE.....	page 82.
IX-	CONCLUSION GLOBALE ET PERSPECTIVES.....	page 87.
X-	REFERENCES.....	page 90.
XI-	ABREVIATIONS.....	page 97.
XII-	ANNEXES.....	page 98.
	A. Articles.....	page 98.
	- <u>Article 1.</u>	page 99.
	- <u>Article 2.</u>	page 113.
	- <u>Article 3.</u>	page 120.
	B. Communications et posters	
	2016.....	page 154.
	- <u>EULAR 2016.</u>	page 154.
	- <u>ACR 2016.</u>	page 158.

I- INTRODUCTION.

Les rhumatismes inflammatoires, notamment la polyarthrite rhumatoïde (PR), représentent une cause de morbidité, de handicap et de mortalité non négligeable, liée notamment à une inflammation synoviale et systémique médiée par un réseau de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-17) [1,2]. Ces dernières favorisent la néoangiogénèse médiée par des facteurs de croissance endothéliaux comme le vascular endothelial growth factor (VEGF), la résorption osseuse médiée par des agents tels que RANK-ligand ainsi qu'une morbidité et une mortalité cardio-vasculaires accrues [3–5]. Ces cytokines sont synthétisées par les monocytes, macrophages, synoviocytes intra-articulaires sous l'influence de facteurs de transcription-clés tels que Nuclear Factor-kappa B (NF-kB) qui induisent également une cascade enzymatique pro-inflammatoire (métalloprotéinases, collagénases, hyaluronidases, cyclo-oxygénase-2 (COX-2) [6,7]. La synthèse de cytokines et l'évolution naturelle de la maladie sont sous la dépendance de sous-population différenciées de lymphocytes T CD4⁺ helper (Th). Initialement, la polyarthrite rhumatoïde était considérée comme résultant d'un déséquilibre entre les populations Th-1 (productrices d'interféron gamma) [8] et Th-2 (productrices d'IL-4 et d'IL-10). L'antagonisation ciblée du TNF- α a ainsi marqué une étape cruciale dans la prise en charge thérapeutique de la PR, mais également des spondyloarthrites, permettant d'envisager une rémission clinique, biologique et un blocage des destructions articulaires [9]. Plus récemment a été individualisée une sous-population de lymphocytes T produisant de l'IL-17 (sous-population Th-17) [10,11] sous l'influence de l'IL-6 [12,13]. Il a été montré que la balance Th-17/ lymphocytes T régulateurs (T-reg) joue un rôle fondamental [14] dans le déclenchement, l'évolution, la chronicisation, le potentiel de destruction articulaire de la polyarthrite rhumatoïde, de la spondyloarthrite, mais aussi de modèles murins d'arthrite non auto-immuns tels que l'arthrite à l'adjuvant (AIA) ou auto-immuns comme l'arthrite au collagène (CIA), par des mécanismes largement indépendants des voies Th-1 et

de celle du TNF- α [15–18]. Outre les traitements biologiques ciblés, les patients atteints de rhumatismes inflammatoires chroniques utilisent également des traitements anti-inflammatoires à visée adjuvante tels que les corticoïdes et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), pouvant être responsables d'une morbidité et d'une mortalité non négligeables sur les plans cardio-vasculaire [19], digestif, osseux ou rénal notamment chez des patients âgés, polymédiqués ou fragiles.

Dans ce contexte, la cryothérapie (traitement par le froid) est utilisée de manière large et empirique en rhumatologie depuis Hippocrate à visée antalgique, anti-oedémateuse, myorelaxante [20]. La cryothérapie est notamment utilisée fréquemment en tant que traitement adjuvant dans les rhumatismes inflammatoires en poussée tels que la polyarthrite rhumatoïde, les spondyloarthrites ou les arthropathies microcristallines, avec un faible niveau de preuve d'efficacité [21], lié notamment à un manque de standardisation des protocoles thérapeutiques (agent physique, température, durée et périodicité d'application, traitements associés, indications, critères d'évaluation...) [22]. On distingue cryothérapie locale et corps entier, cette dernière n'ayant pas démontré une efficacité supérieure [22,23]. Il s'agit de traitements bien tolérés, souvent peu onéreux (application de glace) qui pourraient notamment présenter un intérêt en tant que traitements adjuvants chez les patients âgés et fragiles. La cryothérapie pourrait ainsi représenter une alternative ou permettre une épargne en traitements corticoïdes et anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), responsables d'une morbidité et d'une mortalité croissante chez des patients arthritiques présentant déjà un sur-risque cardio-vasculaire [5].

II- ETAT DE L'ART (**Article 1.** [22] - § XII A. - page 99).

A. Données sur la cryothérapie chez l'homme.

On distingue la cryothérapie locale (gaz froid, glace) et la cryothérapie corps entier (chambres cryogéniques, immersion en eau froide,...).

Les données sur la cryothérapie présentent souvent des biais méthodologiques (traitements médicamenteux et/ou kinésithérapie associés [24], absence de standardisation et diversité des protocoles de cryothérapie (température, agent physique, durée d'application, périodicité, nombre d'application), critères d'évaluation choisis, faible qualité méthodologique, absence de groupes contrôles exploitables.

Dans une revue systématique de la littérature, en poolant les données de six études portant sur 257 patients PR [23,25–29], nous avons montré que la cryothérapie locale ou corps entier appliquée deux fois par jour pendant 7 à 15 jours (soit 14 à 20 applications) permettait une diminution de 2 points de l'EVA douleur et d'environ 0,5 point du score d'activité DAS28 [22] (**Article 1. §XIIA – page 99**). A noter que la cryothérapie locale (parfois appliquée simultanément sur plusieurs articulations) montrait des effets taille intra-classe (avant/après traitement) significativement supérieurs à ceux obtenus avec la cryothérapie corps entier sur l'EVA douleur (différence d'environ un point en faveur de la cryothérapie locale) et le score d'activité DAS28 (différence d'environ 0,3 point en faveur de la cryothérapie locale) en regroupant les données de ces 6 études non contrôlées (**Fig. 1**).

Fig. 1. Effets taille intra- et inter-classes de la cryothérapie locale et corps entier sur l'EVA douleur et le DAS28

Fig. 1a. Effet taille avant/après cryothérapie locale (EVA douleur /100)

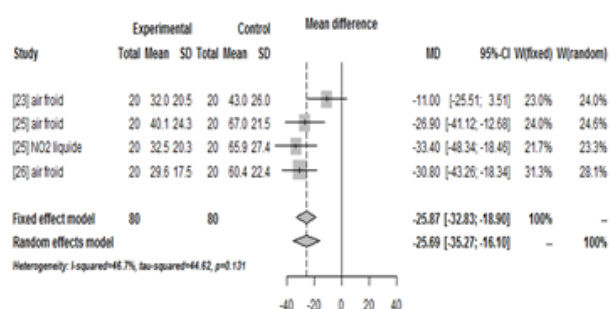


Fig. 1b. Effet taille avant/après cryothérapie locale (DAS28)

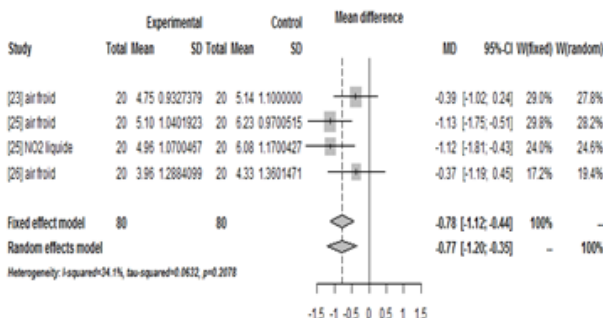


Fig. 1c. Effet taille avant/après cryothérapie corps entier (EVA douleur /100)

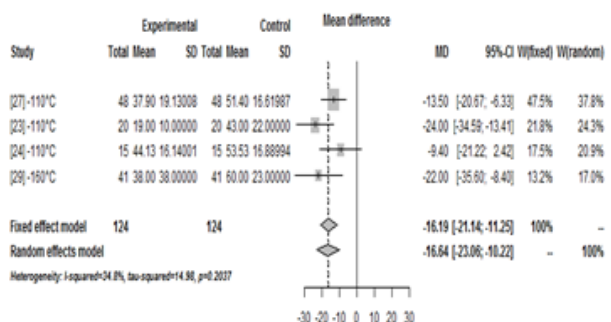


Fig. 1d. Effet taille avant/après cryothérapie corps entier (DAS28)

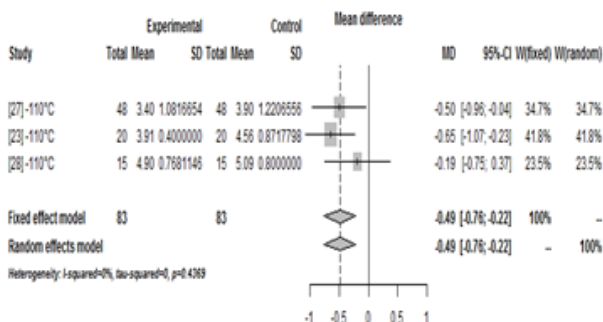


Fig. 1e. Effet taille de la cryothérapie locale versus corps entier (EVA douleur /100)

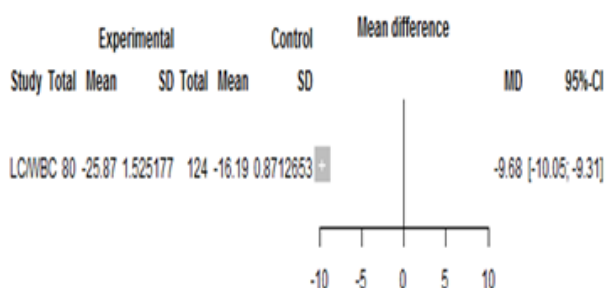
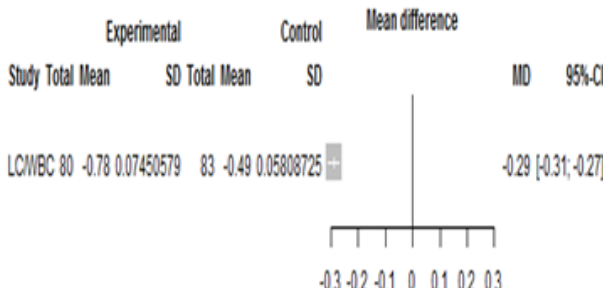


Fig. 1f. Effet taille de la cryothérapie locale versus corps entier (DAS28)



En poolant les données de 6 études non contrôlées (257 patients PR, deux applications par jour pendant 7 à 15 jours soit 14-20 applications, l'évolution moyenne de l'EVA douleur et du DAS28 avant/après cryothérapie locale (EVA douleur/100 - Fig. 1a. et DAS28 - Fig. 1b.) ou corps entier (EVA douleur/100 - Fig. 1c. et DAS28 - Fig. 1d.) a été calculée (effets taille intra-classe). Les différences moyennes entre cryothérapie locale et corps entier (LC/WBC avec la cryothérapie corps entier prise comme référence) ont ensuite été calculées (effets taille inter-classe) et montraient une différence significative en faveur de la cryothérapie locale (EVA douleur/100 - Fig. 1d. et DAS28 - Fig. 1e.). Résultats exprimés par des différences pondérées moyennes $\pm$ IC 95%. Calcul réalisés avec le logiciel R® (packages meta, rmeta et grid). LC : cryothérapie locale. WBC : cryothérapie corps entier.

Cet effet thérapeutique pourrait être lié aux propriétés anti-inflammatoires de l'hypothermie tissulaire – notamment intra-articulaire - induite par la cryothérapie.

En effet, il a été démontré que l'application de glace pendant 30 minutes sur un genou arthritique permettait d'abaisser la température intra-articulaire à 30°C pendant environ deux heures [30]. Cette gamme de température correspond à l'hypothermie tissulaire modérée, qui a montré des effets thérapeutiques, notamment par une inhibition NF-kB dépendante de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α notamment) dans des pathologies telles que l'ischémie cérébrale [31]. L'hypothermie tissulaire inhibe également le métabolisme d'enzymes telles que les métallo-protéinases [32], les collagénases [33] ou la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) [34], a démontré des effets anti-oxydants [35–37], un effet répresseur sur la formation de l'infiltrat cellulaire inflammatoire par inhibition de l'expression de molécules d'adhésion telles que ICAM-1 [38,39], un effet activateur du système nerveux parasympathique par augmentation des taux de noradrénaline [40,41].

Concernant les effets anti-inflammatoires systémiques de la cryothérapie chez les patients atteints de rhumatismes inflammatoires, les données sont rares. Dans un essai contrôlé randomisé portant sur 55 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR), la cryothérapie locale par glace ou gaz froid (appliquée simultanément sur 5 articulations) ou la cryothérapie corps entier à -60°C appliquées deux à trois fois par jour pendant 7 jours faisaient diminuer les taux sériques d'IL-6 une heure après la dernière application chez les patients non traités par corticoïdes [42]. En revanche, la cryothérapie corps entier à -110°C faisait augmenter les taux sériques d'IL-6 chez les patients PR sans corticothérapie, suggérant que la cryothérapie pourrait avoir un effet pro-inflammatoire au-delà d'un certain seuil de température. Chez les patients sous corticoïdes, il n'était pas observé d'effet de la cryothérapie sur les taux circulants d'IL-6. Dans une autre étude, l'application de gaz froid deux fois par jour pendant 10 jours permettait une diminution significative des taux sériques de TNF- α mais sans effet

sur les taux d'IL-6 [25]. La cryothérapie corps entier faisait également baisser les taux sériques d'IL-1 β et de TNF- α chez 10 patients atteints de rhumatismes inflammatoires chroniques [43]. Dans une étude contrôlée, la cryothérapie corps entier (-140°C une fois par jour pendant 4 semaines) faisait significativement diminuer les taux sanguins d'histamine chez 20 patients PR [44]. La cryothérapie corps entier (-120°C appliquée 10 fois) faisait également diminuer le taux de CRP chez 13 patients PR dans une autre étude contrôlée [45].

La cryothérapie locale a également montré des effets thérapeutiques dans d'autres types de rhumatismes inflammatoires tels que la goutte : l'application de glace (30 minutes 4 fois par jour pendant 7 jours associée à une corticothérapie et à de la colchicine permettait une diminution significativement plus importante de l'EVA douleur comparativement au groupe contrôle colchicine + corticothérapie et faisait diminuer significativement le nombre de leucocytes dans le liquide articulaire [46]. Concernant les spondyloarthrites, les données sont plus éparses mais la cryothérapie corps entier pourrait avoir des effets sur l'EVA douleur, les mobilités rachidiennes et le BASDAI [47].

La cryothérapie est également en cours d'évaluation dans d'autres pathologies rhumatologiques. Dans la fibromyalgie, la cryothérapie corps entier semble avoir des effets sur la qualité de vie [48] et sur le phénotype des lymphocytes T circulants [49]. Dans la gonarthrose, l'application de glace et les « massages froids » pourraient avoir un effet favorable sur la l'œdème du genou et la fonction quadricipitale [50]. La cryothérapie locale gazeuse hyperbare au CO₂ abaissait significativement l'EVA douleur au bout d'une moyenne de 5 applications de 30-90 secondes dans une population gériatrique souffrant de diverses affections rhumatologiques (arthrose, tendinopathies, arthropathies microcristallines) [51]. La cryothérapie locale pourrait améliorer la douleur et les amplitudes articulaires dans la capsulite rétractile [52] et le conflit glénoïdien postéro-supérieur [53]. La cryothérapie corps entier semble favoriser la récupération musculaire post-exercice physique [54], avec une

diminution des taux sanguins de CRP, d'IL-1 β et une augmentation des taux d'IL-1RA [55].

L'immersion en eau froide post-exercice physique a un effet favorable sur les crampes musculaires à 24 heures [56]. La cryothérapie locale a également des effets bénéfiques sur la douleur post-opératoire [57,58].

L'évaluation de l'efficacité clinique et de l'effet anti-inflammatoire de la cryothérapie dans les études actuellement disponibles manque globalement d'outils de mesure validés. Dans ce contexte, l'échographie Doppler articulaire pourrait représenter un outil d'évaluation et de suivi en permettant notamment de mesurer l'évolution de l'inflammation synoviale avant / après application de froid.

B. Intérêt de l'échographie articulaire dans l'évaluation et le suivi des rhumatismes inflammatoires.

En effet, l'échographie-Doppler est utilisée de manière croissante en rhumatologie pour évaluer l'inflammation et l'hypervascularisation synoviales avec des scores validés et une bonne corrélation avec l'inflammation histologique [59,60], l'activité du rhumatisme [61,62], la survenue d'érosions articulaires [61,63]. Cette technique permet notamment la détection précoce de synovites infra-cliniques, d'érosions pré-radiographiques et un suivi de l'inflammation synoviale sous traitement. Des scores semi-quantitatifs validés ont été mis au point pour évaluer l'épaississement synovial et l'hypersignal Doppler [61,63,64] (**Table. 1.**).

Table 1. Score échographique semi-quantitatif de Szkudlarek

	Score Doppler	Score de synovite (mode B)
0	Pas d'hypersignal intra-articulaire	Pas d'épaississement hypoéchogène de la synoviale
1	≤3 hypersignaux isolés OU 2 hypersignaux isolés et un hypersignal confluent OU 2 hypersignaux confluents	Fine ligne hypoéchogène ou anéchogène en-deçà de la limite de la capsule articulaire
2	Hypersignaux > Grade 2 et < 50% surface articulaire	Bombement de la capsule dans le prolongement des surfaces osseuses limitant l'articulation
3	Hypersignaux ≥ 50% surface articulaire	Distension convexe de l'articulation au-delà des surfaces osseuses articulaires

Dans une étude portant sur 37 patients avec arthrites non infectieuses de genoux (dont 30 PR) comparés à 69 patients souffrant de gonarthroses, l'utilisation d'un score semi-quantitatif en Doppler couleur permettait de différencier les arthrites inflammatoires ou mécaniques (gold standard : formule cellulaire sur le liquide de ponction articulaire, courbe ROC AUC : 0,787, Mann Whitney $p < 0,001$) [65]. Par ailleurs, un score semi-quantitatif échographique et Doppler mesuré sur 6 articulations diminuait après 3 mois de traitement anti-TNF chez 68 patients atteints de PR, et était positivement corrélé à l'activité de la maladie mesurée par le DAS-28 [66]. Dans l'arthrose de genou, après injection intra-articulaire de méthylprednisolone, le score Doppler diminuait chez 13 patients sur 35 et la diminution du score Doppler était associée à une réduction plus importante de l'EVA douleur [67]. Les scores Doppler semi-quantitatifs sont par ailleurs des méthodes reproductibles. Chez 10 patients PR évalués sur 16 articulations, les coefficients kappa de reproductibilité atteignaient 0,83 pour la reproductibilité inter-observateur et 0,97 pour la reproductibilité intra-

observateur après entraînement sur un atlas d'images présentant les différents grades de scores Doppler [68]. Les scores échographiques et Doppler sont moins standardisés pour les grosses articulations telles que le genou, notamment du fait de l'absence de scores IRM validés pouvant être utilisés comme gold standards. Le score SOLAR a récemment été proposé pour évaluer de manière semi-quantitative les scores Doppler et de synovite sur les grosses articulations (genoux, coudes, hanches, épaules). Pour le genou, le score est la somme des scores semi-quantitatifs (0-3) sur 4 plans longitudinaux (supra-patellaire, postérieur, latéral et médial – pour le Doppler infra-patellaire en plus). Ce score diminuait significativement sous biothérapie et disease modifying anti rheumatic drugs (DMARDs) à 3, 6 et 12 mois de traitement chez 132 patients PR avec synovites de genoux. Le score de synovite diminuait de 5,2/12 à 2,2/12 au bout d'un an ($p < 0,001$) et le score Doppler de 4/15 à 1,3/15 ($p < 0,001$). La reproductibilité inter-observateur (coefficients kappa) pour les grosses articulations évaluée sur 20 images échographiques enregistrées était de 0,45 pour le score de synovite, 0,59 pour le score Doppler. Le coefficient kappa intra-observateur était de 0,7 pour le score Doppler au genou [69]. Dans une autre étude portant sur le score Doppler semi-quantitatif, les clips vidéos de 41 articulations de patients arthritiques (dont 22 genoux, 7 poignets, 3 chevilles), et 58 articulations de contrôles sains étaient scorés en aveugle du diagnostic par plusieurs échographistes. Le kappa intra-observateur était de 0,72 et inter-observateur de 0,57 pour le score semi-quantitatif (0-3) [70]. Cet outil a déjà été utilisé pour évaluer les effets de la cryothérapie dans des études préliminaires (§II.C. ci-après).

C. Effets de la cryothérapie sur l'hypersignal Doppler intra-articulaire.

Chez 13 patients PR, l'application de poches de glaces sur des poignets synovitiques pendant 20 minutes faisait baisser l'activité Doppler juste après l'application selon un score semi-quantitatif de 0 à 3 chez 7 patients sur 13 [71]. L'application d'un gel réfrigéré pendant 20 minutes sur les poignets de 25 patients PR faisait baisser significativement le nombre de

pixels d'activité Doppler juste après l'application et encore 5 minutes après celle-ci [72]. L'application de glace ou l'immersion en eau glacée faisait également baisser légèrement mais significativement le nombre de pixels sur 29 poignets de patients PR [73]. Dans une autre étude, au contraire, l'application d'air froid à -30°C pendant 3 minutes augmentait significativement le nombre de pixels Doppler 5 et 10 minutes après l'application [72]. Ceci suggère que la cryothérapie gazeuse pourrait avoir un effet pro-inflammatoire transitoire, possiblement lié à une vasodilatation réactionnelle à l'effet vaso-constricteur initial. Les résultats de l'étude CDRI ont montré que la cryothérapie locale par glace (30 minutes) ou CO₂ hyperbare (2 minutes) appliquée deux fois sur 24 heures sur des genoux arthritiques permettait une diminution significative du score Doppler et de l'EVA douleur [74] (**Article 2. Page 113**). Les effets de la cryothérapie locale sur l'hypersignal Doppler, reflet de l'inflammation synoviale, restent cependant à confirmer sur des séries plus importantes et sur des durées d'observation plus longues. L'hypersignal Doppler est ainsi un bon reflet de l'inflammation synoviale, et pourrait être un outil indirect pour visualiser les effets anti-inflammatoires synoviaux de la cryothérapie. Cependant, les effets de la cryothérapie sur l'inflammation biologique intra-articulaire n'ont jamais été étudiés. Les données existantes sur les effets anti-inflammatoires de l'hypothermie tissulaire modérée permettent toutefois d'émettre certaines hypothèses mécanistiques.

D. Mécanismes anti-inflammatoires biologiques de l'hypothermie tissulaire.

En effet, il a été montré dans la polyarthrite rhumatoïde que l'application de glace pendant 30 minutes sur un genou arthritique permettait de réduire la température intra-articulaire à 30°C pendant 2 heures [75], ce qui correspond à la définition de l'hypothermie tissulaire modérée. Par analogie avec cette dernière, la cryothérapie locale pourrait ainsi inhiber des molécules-clés de l'inflammation synoviale, par blocage de la voie de transduction intra-cellulaire NF- κ B (impliquée dans la régulation de la transcription des gènes codant pour les cytokines pro-

inflammatoires) et en inhibant le métabolisme d'enzymes telles que la cyclo-oxygénase 2 (COX-2), comme cela avait été montré dans un modèle de culture d'une lignée de cellules endothéliales humaines (HUVEC) [34]. In vitro, dans un modèle de culture de fibroblastes de patients PR, l'hypothermie tissulaire modérée induisait une diminution significative du métabolisme enzymatique des collagénases à 33°C versus 37°C [33]. De même, dans un modèle de culture d'une lignée de cellules rétinienne, la culture à 34°C induisait une diminution significative de l'expression de Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), facteur de croissance impliqué dans la néoangiogénèse synoviale de la PR [76]. Dans un modèle de culture d'une lignée de cellules gliales stimulées par du LPS, l'hypothermie à 33°C inhibait significativement les synthèses d'IL-6 et de NO [77]. Ces données *in vitro* parcellaires ne permettent que d'émettre des hypothèses sur les mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans l'effet anti-inflammatoire de la cryothérapie, par analogie avec l'hypothermie tissulaire modérée. Des études *in vivo* sur des modèles murins d'arthrite pourraient permettre de mieux préciser ces mécanismes. Cependant, il n'existe actuellement que peu de données sur les effets cliniques et biologiques de la cryothérapie dans les modèles animaux d'arthrite.

E. Données sur la cryothérapie dans les modèles animaux d'arthrite.

Dans une étude récente, dans le modèle d'arthrite à l'adjuvant (AIA) mono-articulaire, l'exposition au froid (température ambiante de 10°C une heure par jour pendant deux semaines) augmentait la nociception TRPA-1 dépendante et le flux sanguin intra-articulaire par comparaison aux rats maintenus à la température habituelle de la pièce (22-23°C) [78]. Concernant la cryothérapie proprement dite, dans l'arthrite au zymosan chez le lapin, l'application de glace permettait une diminution non significative de l'infiltrat cellulaire et de l'hyperplasie synoviaux aux pattes arrières [79]. La cryothérapie corps entier augmentait les taux circulants d'histamine dans le modèle d'arthrite à l'adjuvant [80].

III- OBJECTIFS.

L'objectif de ce travail est d'évaluer et de quantifier les effets thérapeutiques et anti-inflammatoires de la cryothérapie locale dans les rhumatismes inflammatoires.

Dans un premier temps, nous avons étudié les effets à court terme de la cryothérapie locale (deux applications sur 24h) chez l'homme. Les critères d'évaluation principaux étaient l'évolution du score Doppler semi-quantitatif synovial (étude CDRI – **Article 2. §XIIA. – page 113**) et des taux intra-articulaires d'interleukine 6 (IL-6) (**Etude ALGGAR – Abstract et poster EULAR 2016. §XIIB. – page 156**, dernières inclusions de patients en cours, futur **Article 4.**).

Nous avons également étudié *in vitro* les effets d'une l'hypothermie tissulaire modérée ponctuelle (30°C pendant 2 heures) sur les taux de cytokines pro-inflammatoires dans un modèle de culture de rotules de rats arthritiques (AIA).

Nous avons enfin mesuré *in vivo* les effets d'une cryothérapie locale appliquée de manière chronique (deux fois par jour pendant 14 jours [22]) sur l'évolution clinique de l'arthrite et sur les taux locaux et systémiques de cytokines pro-inflammatoires dans le modèle murin d'arthrite à l'adjuvant (AIA) – (**Article 3. §XIIA. – page 120**, révision en cours).

Chez l'homme et chez le rat, nous avons par ailleurs comparé deux techniques (glace versus gaz froid) afin d'essayer de définir la modalité d'application optimale.

IV- EFFETS DE DEUX APPLICATIONS LOCALES DE FROID SUR L'ACTIVITE
DOPPLER SYNOVIALE DANS L'ARTHRITE DE GENOU (**Etude CDRI -
Article 2. §XIIA. – page 113**).

Chez l'homme, nous avons évalué l'effet de deux applications de froid (glace ou CO2 pulsé) espacées de 8 heures sur l'hypersignal Doppler, la douleur et les taux de cytokines intra-articulaires.

A. Patients et Méthodes.

1. Inclusions.

L'étude CDRI (Cryothérapie et Doppler dans les Rhumatismes Inflammatoires) est une étude interventionnelle dans laquelle des patients avec arthrite de genou étaient randomisés pour recevoir deux applications de froid espacées de 8 heures selon une technique tirée au sort : pack froid (Thermogel® - Artsana, Asnières, France) pendant 30 minutes versus CO2 pulsé à -78°C et 50 bars (Cryo+® - Cryonic, Salins-les-bains, France) à -74°C pendant 2 minutes (**Fig. 2.**).

Figure 2. Schéma de l'étude CDRI et de l'étude ancillaire ALGGAR

Fig. 2a. Etude randomisée CDRI (Critère principal : score Doppler)

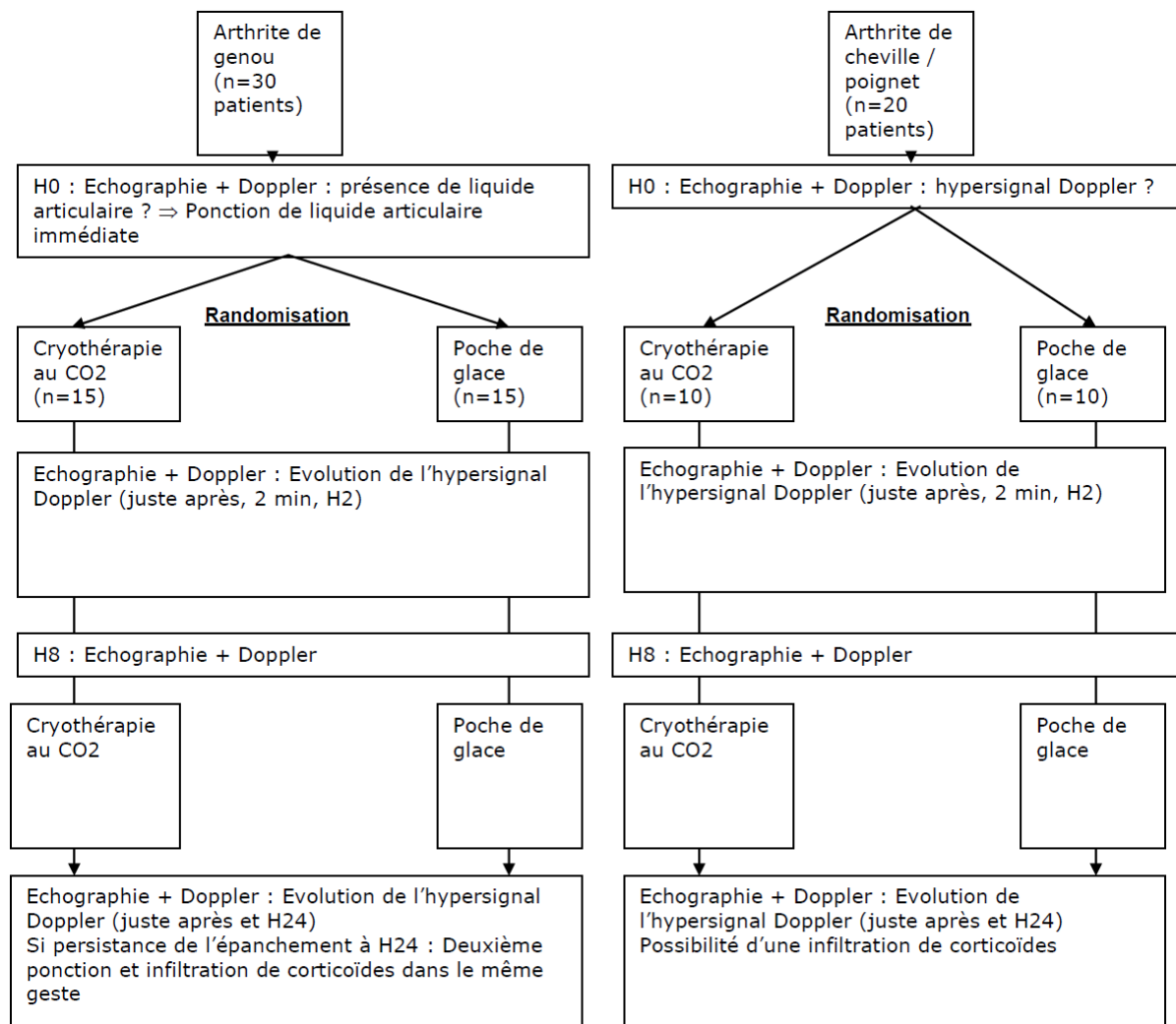
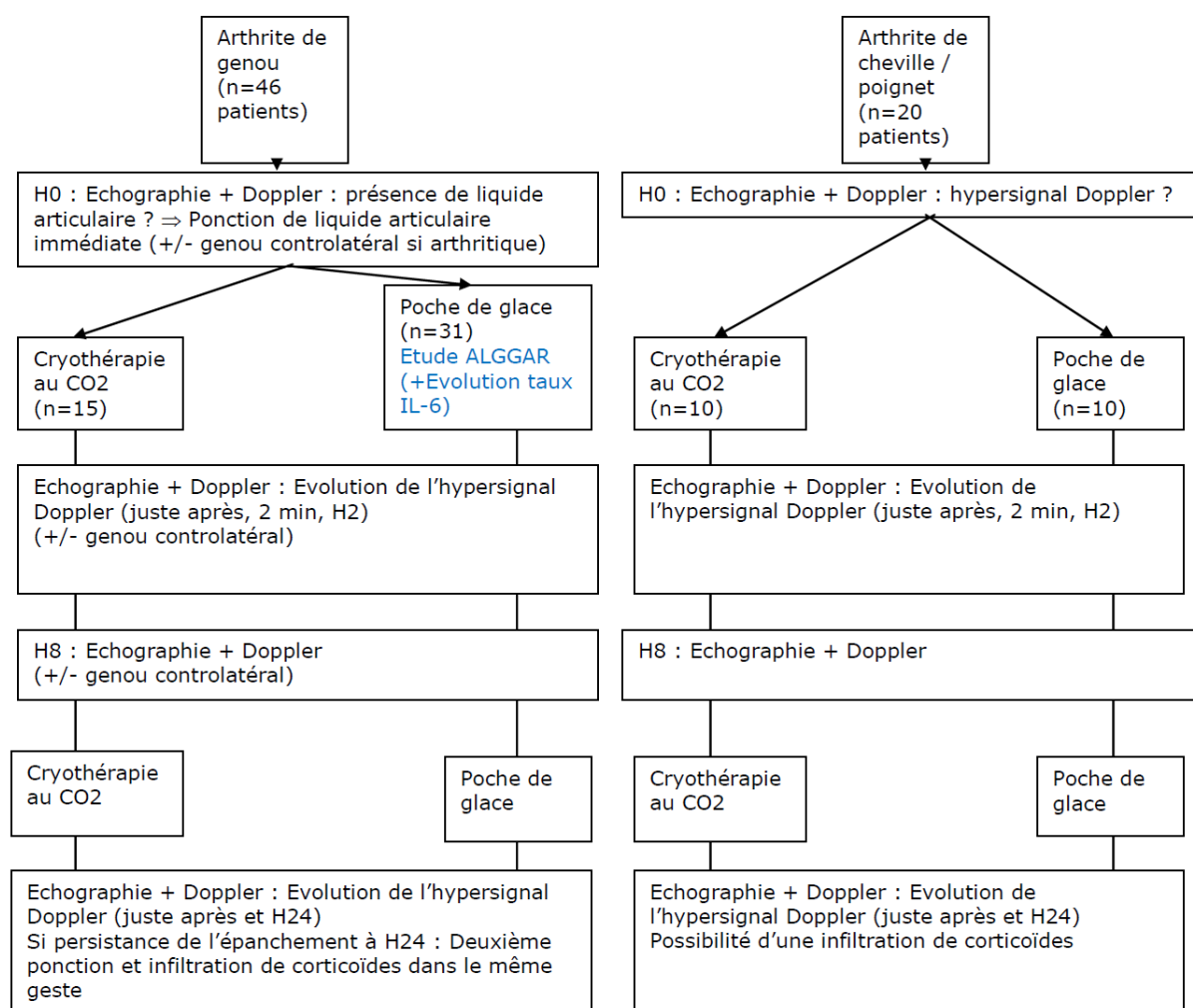


Fig. 2b. Etude ancillaire ALGGAR (extension du groupe Glace pour évaluation des taux intra-articulaires d'IL-6)



Les patients inclus étaient âgés de 18 à 85 ans, hospitalisés dans le service de rhumatologie du CHRU de Besançon pour arthrite de genou non septique (polyarthrite rhumatoïde selon les critères ACR, spondyloarthrite selon les critères ASAS, goutte ou chondrocalcinose documentées par la mise en évidence de microcristaux sur l'examen microscopique du liquide articulaire), et un consentement éclairé avait été recueilli. Les patients n'avaient pas reçu de biothérapie ni de DMARD dans les 6 mois précédant l'inclusion. Les patients n'avaient pas reçu de traitement par cryothérapie locale dans le mois précédant l'inclusion. Les patients ne présentaient par ailleurs pas de contre-indication à la cryothérapie locale (mauvais état cutané ou trouble sensitif sur la zone d'application, vascularite, allergie ou urticaire au froid,

syndrome de Raynaud, hémoglobinurie paroxystique a frigore, drépanocytose, diabète déséquilibré, hypertension artérielle ou trouble du rythme décompensé). Le protocole CDRI a été accepté par le CPP Est-II le 6 septembre 2012 (numéro 12/664) et enregistré sur clinicaltrials.gov (NCT02573298).

2. Design et critères recueillis.

Après inclusion des patients et recueil des données cliniques et biologiques initiales, ils étaient randomisés dans un des deux bras de traitement (glace ou CO₂ appliqué deux fois). Une première échographie était réalisée à 9H00 pour vérifier la présence d'un épanchement intra-articulaire et d'au moins un point d'hypersignal Doppler sur le genou arthritique étudié. Le liquide articulaire était ensuite ponctionné pour analyse bactériologique, cytologique et une recherche de microcristaux. Une partie du liquide articulaire était également utilisée pour doser les cytokines intra-articulaires (IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-17, VEGF par cytométrie). L'échographie était ensuite recontrôlée 2 minutes puis deux heures après la première application de froid. Une deuxième application de froid, selon la modalité tirée au sort initialement, était réalisée à 17H00, après une cinquième échographie, à huit heures de la première application. L'échographie était ensuite renouvelée après cette seconde application de froid, puis le lendemain à 9H00 (24 heures après l'échographie initiale). Le design de l'étude CDRI est résumé dans la **Fig. 2a.** (page. 22.). A chaque échographie, outre les scores semi-quantitatifs Doppler et de synovite (**Table 1.**), la température cutanée en regard de la zone d'application et l'EVA douleur étaient recueillies. La température de la pièce était mesurée, avant l'installation des patients (initialement, à deux heures, à huit heures et à 24 heures). Les températures cutanée et ambiante étaient mesurées à l'aide d'un même thermomètre (sonde MLT409/A® Skin Temperature Probe, transducteur ML309 Thermistor Pod® - ADInstruments).

Le liquide articulaire était par ailleurs ponctionné après la première échographie (juste avant la première application de froid). Le lendemain, après la dernière échographie, le liquide articulaire était également ponctionné et une injection intra-articulaire de corticoïde (Triamcinolone - HEXATRIONE®) pouvait être réalisée dans le même temps en cas de persistance des douleurs, les derniers critères d'évaluation ayant alors été recueillis. En cas de biarthrite de genoux, le genou controlatéral non traité par cryothérapie était également utilisé comme contrôle pour l'étude du liquide articulaire. Le liquide articulaire prélevé était envoyé au laboratoire pour examen bactériologique, cytologique, recherche de microcristaux. Une partie était également envoyée à l'EFS de Bourgogne-Franche-Comté pour constitution d'une banque de liquide articulaire et en vue du dosage des cytokines intra-articulaires avant / après cryothérapie (cF étude ALGGAR décrite dans le §V.).

3. Réalisation et interprétation des échographies.

Concernant les échographies, les patients ne prenaient pas de café ni traitement vaso-actif (anti-hypertenseurs, anti-migraineux) avant les examens [81]. Les traitements par AINS, corticoïdes, AINS et colchicine étaient interrompus au moins 24 heures avant l'inclusion et durant les 24 heures de l'étude.

Les échographies étaient réalisées sur le genou arthritique évalué et sur le genou controlatéral non traité, en décubitus dorsal et au repos. Tous les examens étaient réalisés par le même échographiste entraîné, titulaire du DIU ECRIN (XG). Les culs-de sac para-patellaire externe et supra-patellaire [61,82,83] étaient explorés dans les plans longitudinal et transversal [84] et la zone d'hypersignal Doppler maximal était choisie pour la mesure [60,70,85]. L'emplacement de la sonde était ensuite marqué afin que les examens suivants soient réalisés sur la même coupe. La pression exercée sur la sonde était minimisée et une importante quantité de gel était appliquée. La focale était placée à la limite os-tissu synovial.

L'hypersignal Doppler était évalué en diastole. L'appareil utilisé pour tous les patients était un MylabFive® (Esaote). Les réglages en mode B (Fréquence 4-13 MHz, gain 61%, PRF 750 Hz) et en mode Doppler puissance (Fréquence Doppler 6,3 MHz, gain 56%) étaient les mêmes pour tous les patients inclus. La fenêtre Doppler était élargie jusqu'au sommet de l'image. Le gain Doppler était réglé au seuil de disparition du bruit de fond.

Le score semi-quantitatif (0-3) proposé par Szkudlarek et al. pour l'évaluation des synovites et de l'hypersignal Doppler [63] (**Table 1.**) était déterminé sur la coupe choisie et à chacun des temps de mesure de l'étude.

A chaque temps de l'étude, le genou controlatéral non traité était évalué en échographie pour les scores Doppler et de synovite (groupe contrôle apparié).

Les images échographiques étaient stockées puis relues en aveugle du diagnostic, du temps d'étude, du traitement par le premier échographiste et par un deuxième échographiste également titulaire du DIU ECRIN (CP). En cas de désaccord, les images étaient ensuite revues de façon collégiale afin d'obtenir un consensus sur les scores Doppler et de synovite. Les coefficients kappa de Cohen ont été calculés pour la reproductibilité intra- (kappa=0,85) et inter-observateur (kappa=0,65) et se rapprochaient des valeurs rapportées dans la littérature cF. §IIB.).

4. Analyses statistiques.

L'effectif nécessaire pour montrer une diminution d'un point sur le score semi-quantitatif de Szkudlarek avec une puissance de 95% a été calculé à partir des données d'un article [71]. Ce nombre nécessaire de patients était de 9,07 soit 10 patients nécessaires et suffisants dans chacun des groupes traités par glace et CO2 pour montrer une variation d'un point sur le score Doppler semi-quantitatif. Devant la bonne faisabilité de l'étude, il a ensuite été décidé d'inclure 15 patients par groupe pour totaliser 30 patients avec arthrite de genou afin de

disposer de groupes plus conséquents pour les dosages de cytokines intra-articulaires (cF. §V.). Les valeurs moyennes du score Doppler, de l'EVA douleur, de la température cutanée, des taux de leucocytes et de polynucléaires neutrophiles dans le liquide synovial ont été comparées avant / après application de froid par des tests de Wilcoxon sur séries appariées (distribution non normale des données pour la variable « score Doppler », après vérification par le test de Shapiro-Wilk). Les variables quantitatives étaient comparées entre les groupes Glace et CO₂ en utilisant des tests de Mann-Whitney. Par ailleurs, les genoux controlatéraux non traités ont été utilisés pour calculer un effet taille de la baisse du score Doppler semi-quantitatif à chacun des temps d'évaluation (Différence avec intervalle de confiance à 95%, calculées à partir des scores Doppler médians et des écarts interquartiles d'après la méthode proposée dans [86], compte tenu de la distribution non normale de la variable « score Doppler » (0-3)). Concernant la comparaison des variables qualitatives entre les deux groupes (Glace et CO₂), des tests du Chi-2 étaient utilisés (avec correction de Yates ou tests de Fisher en cas d'effectifs calculés insuffisants). Les tests étaient de formulation bilatérale, et le risque α de première espèce fixé à 5%. Par ailleurs, des tests de corrélation de Pearson ou de Spearman (selon les conditions d'application) ont été réalisés entre les différentes variables quantitatives étudiées. L'évolution globale de la température cutanée, de l'EVA douleur, du score Doppler semi-quantitatif ont par ailleurs été comparées sur l'ensemble des temps de mesure entre les groupes glace et CO₂ en utilisant la technique de 2-way ANOVA sur mesures répétées avec application de la correction de Bonferroni. Une analyse univariée a été réalisée pour rechercher les paramètres associés à la baisse de l'hypersignal Doppler et de l'EVA douleur (variables dichotomisées). Pour les variables qualitatives, des odds-ratios avec intervalles de confiance à 95% étaient calculés. Pour les variables quantitatives, des tests t ou de Wilcoxon étaient réalisés (selon les conditions d'application). Les paramètres associés aux variations de l'EVA douleur et de l'hypersignal Doppler en univarié ($p \leq 0.3$), les paramètres

associés à ces variations dans la littérature, les facteurs de confusion et d'interaction éventuels (évalués par techniques du chi-2 de Mantel-Haenszel et d'interaction) étaient ensuite inclus dans une analyse multivariée par régression logistique avec sélection du meilleur modèle par le test du maximum de vraisemblance. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant les logiciels R et Graphpad®.

B. Résultats.

1. Caractéristiques des patients.

Trente patients ont été inclus au 16/03/2015 (15 dans le groupe CO₂, 22 dans le groupe glace). Leurs caractéristiques sont résumées dans la **Table 2**.

Table 2. Caractéristiques des 30 patients inclus dans l'étude CDRI

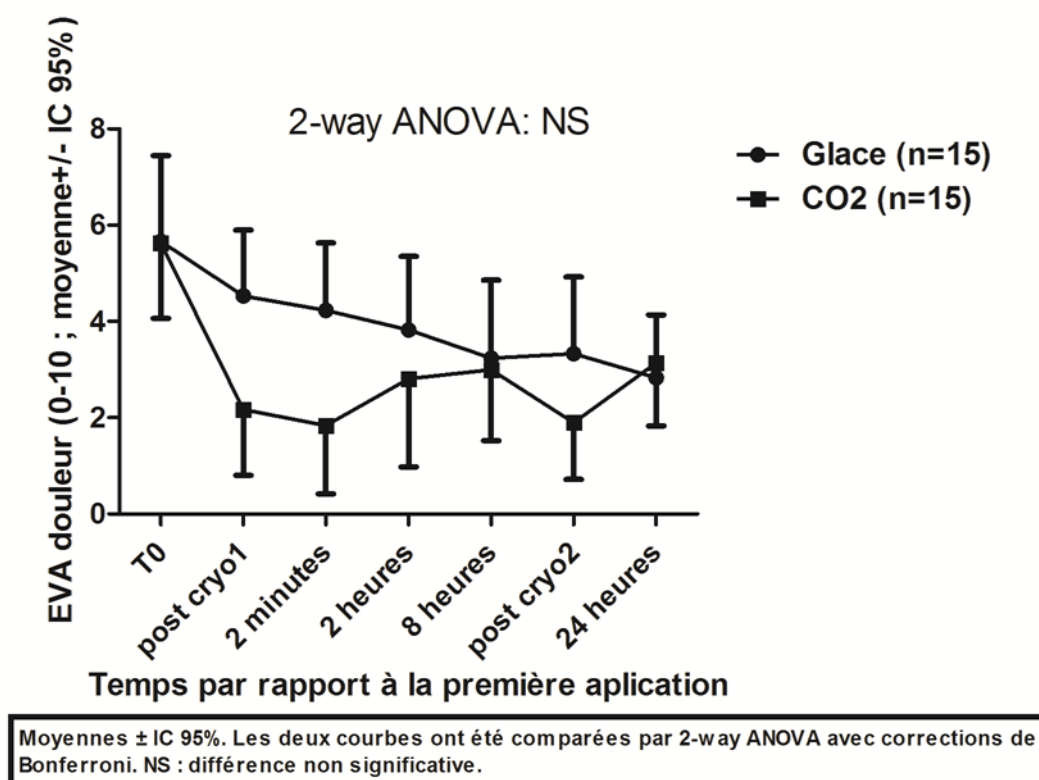
Moyenne/pourcentage +/- IC 95%	Glace+CO ₂ (n=30)	Glace (n=15)	CO ₂ (n=15)	P (Glace versus CO ₂)
Age (années)	56,8 [49,5-64,1]	65,5 [55,5-75,4]	48,2 [38,5-57,9]	P<0,01** (Wilcoxon)
Sexe	F : 9 - M : 21	F : 4 - M : 11	F : 5 - M : 10	P=1 (Fisher)
BMI (kg/m ²)	25,6 [23,7-27,5] N=29	26,4 [23,2-29,6] N=14	24,8 [22,3-27,3] N=15	P=0,5 (Wilcoxon)
Diagnostic	Goutte (14) CCA (7) PR (4) SPA (5)	Goutte (6) CCA (6) PR (2) SPA (1)	Goutte (8) CCA (1) PR (2) SPA (4)	P=0,13 (chi-2) - Microcristallin OUI / NON: p=0,43 (Fisher)
VS (mm)	65,1 [53,2-77] N=21	64,5 [40,9-88,1] N=8	57,4 [37,9-77] N=13	P=0,6 (Wilcoxon)
CRP (mg/L)	104,7 [76,9-132,4]	121 [75,8-166,2]	88,3 [52,3-124,4]	P=0,3 (Wilcoxon)

Les caractéristiques cliniques de départ ne différaient pas significativement entre les deux groupes de traitement à l'exception de l'âge. Aucun effet indésirable ni sortie d'étude n'a été à déplorer.

2. Les deux techniques de cryothérapie réduisaient l'EVA douleur à tous temps d'évaluation (**Fig. 3.**).

L'EVA douleur moyenne (0-10) diminuait après application de froid aux différents temps d'application comparativement à la valeur moyenne initiale avec une différence restant significative à H24. Juste après la première application de froid, l'EVA passait de $5,67 \pm 1,62$ (IC95%) à $4,53 \pm 1,25$ dans le groupe Glace ($n=15$; $p=0,031$) et de $5,63 \pm 1,43$ à $2,17 \pm 1,25$ dans le groupe CO2 ($n=15$; $p<0,01$). Ces différences restaient significatives à 2 minutes de la première application ($4,23 \pm 1,28$ et $1,83 \pm 1,3$; $p=0,026$ et $p<0,01$ dans les groupes Glace et CO2 respectivement), à deux heures dans le groupe CO2 ($2,81 \pm 1,64$ – $n=13$; $p=0,012$) mais pas dans le groupe glace ($3,82 \pm 1,38$ – $n=14$; $p=0,07$), à 8 heures de la première application (avant la deuxième application : Glace $3,23 \pm 1,48$ – CO2 $3 \pm 1,35$; $p=0,035$ et $p<0,01$ respectivement) et à 24 heures de la première application (soit après deux applications espacées de 8 heures : Glace $2,83 \pm 1,19$ – CO2 $3,13 \pm 1,19$; $p<0,01$ dans les deux groupes de 15 patients). L'EVA douleur ne diminuait en revanche pas significativement avant/après la deuxième application de froid ($p=0,37$ et $p=0,18$ respectivement).

Figure 3. Evolution de l'EVA douleur sur 24 heures dans les deux groupes de traitement.



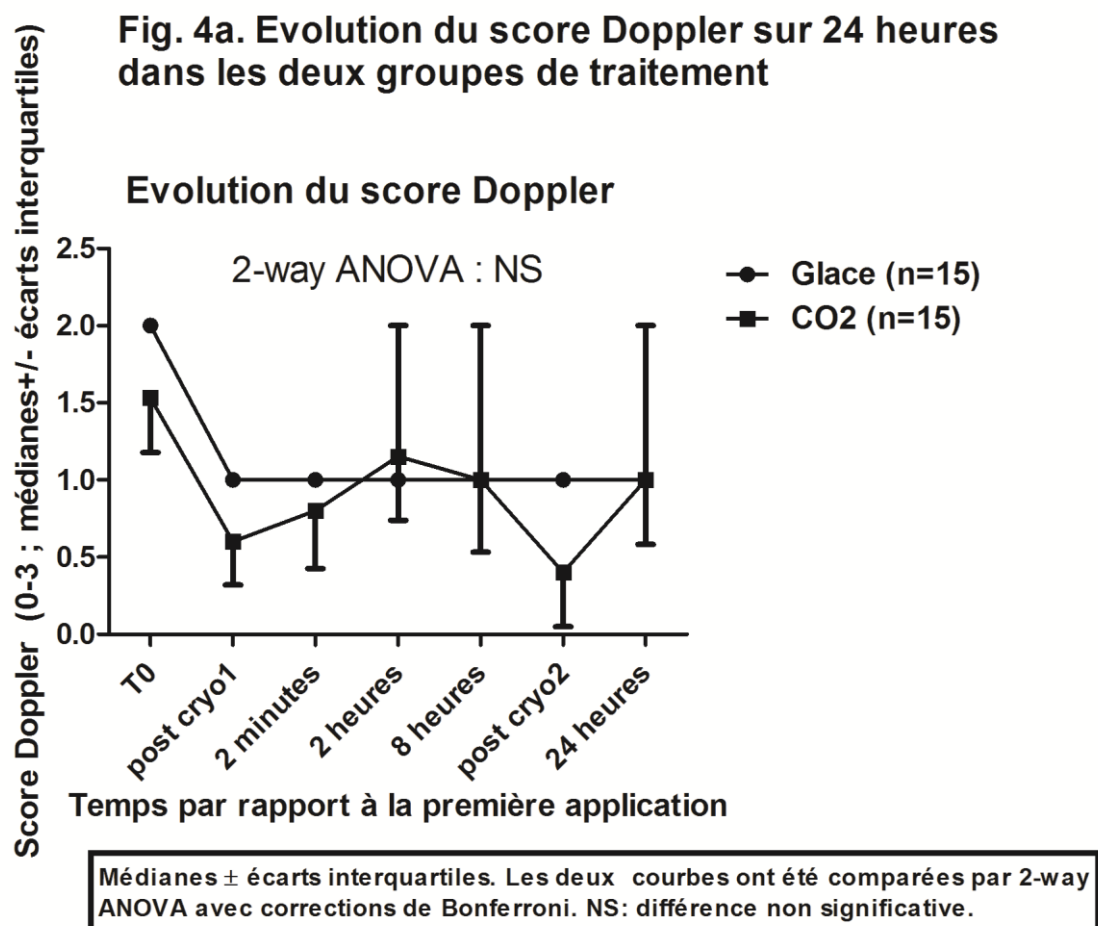
3. Les deux techniques de cryothérapie réduisaient l'hypersignal

Doppler à tous les temps d'évaluation (**Fig. 4a.**).

Le score Doppler moyen et médian sur les genoux traités par cryothérapie était significativement réduit après application de froid, comparativement à la valeur initiale, aux différents temps d'analyse, avec une différence restant significative à H24.

Le score Doppler était ainsi plus faible juste après la première application de froid (Glace : n=15 ; p<0,01 ; CO2 : n=15 ; p<0,01), deux minutes après celle-ci (Glace : p<0,01 ; CO2 : p<0,01), deux heures après (Glace : n=14 ; p=0,01 ; CO2 : n=13 ; p=0,047), huit heures après (avant la deuxième application de glace (Glace : p<0,01 ; CO2 : p<0,01)) et le lendemain matin, à 24 heures de la première application soit après deux applications espacées de 8 heures (Glace : n=15 ; p<0,01 ; CO2 : n=15 ; p=0,015). La deuxième application de froid

permettait également une diminution significative du score Doppler (H8 avant/après application) dans le groupe CO2 ($p<0,01$) mais pas dans le groupe glace ($p=0,15$).



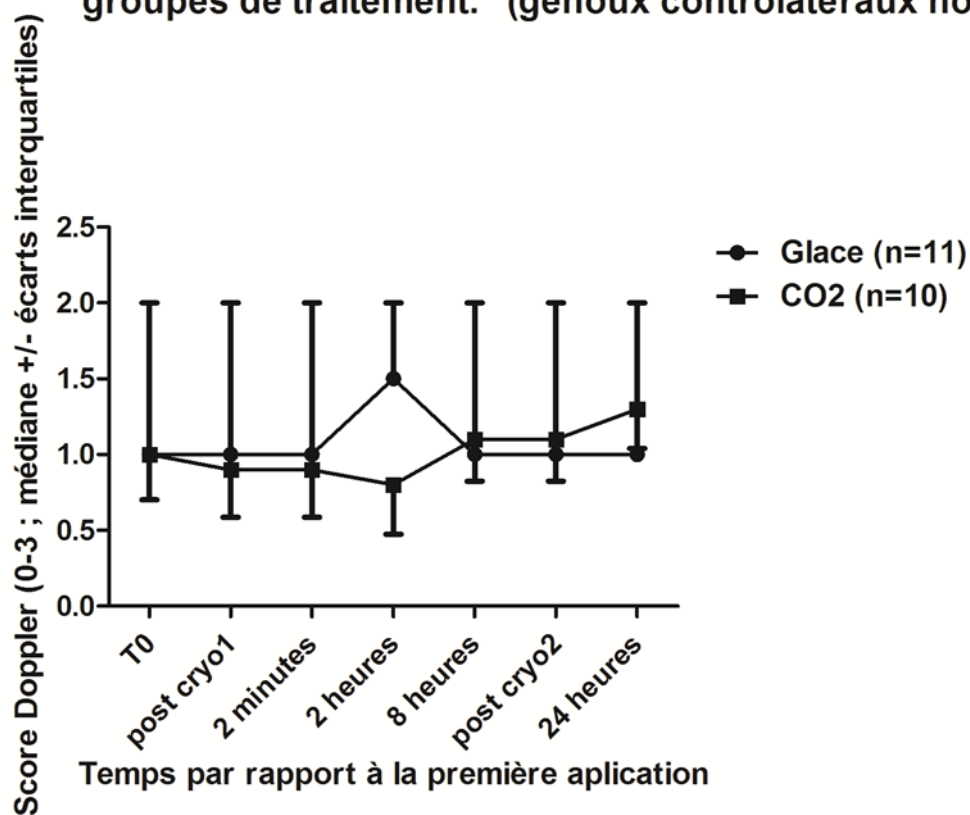
4. L'évolution globale sur 24h de la douleur et de l'hypersignal Doppler sur les genoux traités était globalement identique entre les deux technique de cryothérapie.

L'évolution globale de l'EVA douleur (**Fig. 3.**) et du score Doppler sur les genoux traités (**Fig. 4a.**) aux différents d'étude a été comparée entre les deux groupes de traitement (2-way ANOVA sur mesures répétées avec correction de Bonferroni). Il n'avait pas de différence significative pour l'EVA douleur ni le score Doppler (ni globale ni à aucun des temps d'étude) entre les patients traités par glace et CO2 pulsé.

5. L'hypersignal Doppler ne variait pas significativement au cours du temps sur les genoux controlatéraux non traités (**Fig. 4b.**).

Le score Doppler était mesuré également sur les genoux controlatéraux arthritiques non traités aux différents temps d'évaluation (groupe contrôle, n=21). Ce score ne variait significativement à aucun des temps d'étude ni dans aucun des deux groupes de traitement.

Fig. 4b. Evolution du score Doppler sur 24 heures dans les deux groupes de traitement. (genoux controlatéraux non traités)



6. La glace montrait un effet taille (versus genoux arthritiques controlatéraux non traités) sur le score Doppler plus constant sur 24 heures comparativement au CO2 pulsé (**Table 3.**).

En considérant les effets taille inter-classes (versus genoux arthritiques controlatéraux non traités) sur le score Doppler, la glace induisait une diminution significative de l'hypersignal Doppler tout au long des 24 heures de l'étude, ce qui n'était pas le cas pour le CO2. A H24 toutefois, après deux applications, les deux techniques montraient un effet persistant et significatif sur l'hypersignal Doppler (**Table 3. et Article 2. §XIIA. – page 113**).

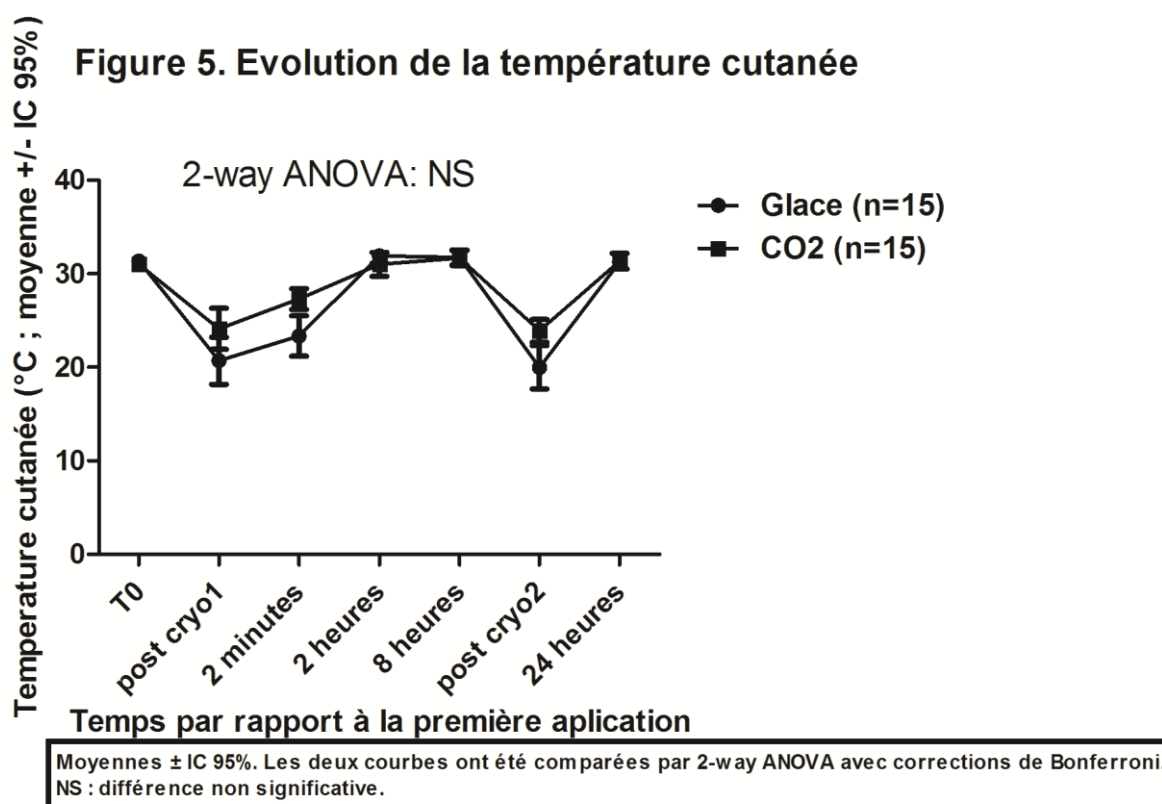
Table 3. Effets taille inter-classes de la cryothérapie locale sur le score Doppler sur 24 heures.

Comparaison au score initial	Glace	CO2	Global (Glace+CO2)
Après cryothérapie 1	-0.73 [-1.1;-0.36]	-0.51 [-0.99;-0.03]	-1 [-1.33;-0.67]
2 minutes	-0.73 [-1.02;-0.44]	-0.25 [-0.73;0.23]	-0.48 [-0.81;-0.15]
2 heures	-0.96 [-1.35;-0.57]	-0.02 [-0.5;0.46]	-0.24 [-0.58;0.1]
8 heures	-0.73 [-1.08;-0.38]	-0.47 [-0.97;0.03]	-0.48 [-0.83;-0.13]
Après cryothérapie 2	-0.73 [-1.06;-0.4]	-0.93 [-1.38;-0.48]	-0.48 [-0.81;-0.15]
24 heures	-0.73 [-1.06;-0.4]	-0.7 [-1.18;-0.22]	-1 [-1.23;-0.77]
Avant/après chaque application de froid	Glace	CO2	Global (Glace+CO2)
Cryothérapie 1 (9H00)	-0.73 [-1.1;-0.36]	-0.51 [-0.99;-0.03]	-1 [-1.33;-0.67]
Cryothérapie 2 (17H00)	0 [-0.44;0.44]	-0.47 [-0.94;0]	0 [-0.35;0.35]

A chacun des temps d'évaluation (juste après la première application de froid, 2 minutes après, 2 heures après, 8 heures après, 24 heures après), la différence entre la diminution médiane du score Doppler par rapport à la valeur initiale dans chaque groupe de traitement (glace: n=15, CO2: n=15, global: n=30) et la diminution médiane dans les genoux arthritiques controlatéraux non traités correspondants (glace: n=11, CO2: n=10, global: n=21) était mesurée pour calculer des effets tailles inter-classes. Ces effets tailles étaient également calculés juste après versus juste avant chacune des deux applications de froid (Cryothérapie 1 et 2). Les scores Doppler manquaient pour 3 patients à deux heures de la première application de froid (glace: n=14 – genoux controlatéraux: n=10; CO2: n=13 – genoux contralatéraux: n=10). Les résultats sont présentés sous forme de différences pondérées $\pm$ IC95%.

7. Température cutanée moyenne.

La température cutanée moyenne globale ne différait pas significativement entre les patients traités par CO₂ et glace sur l'ensemble des temps de mesure (2-way ANOVA sur mesures répétées avec corrections de Bonferroni). Cependant, la température cutanée était significativement plus basse juste après chacune des applications de froid chez les patients traités par glace ($p < 0,001$ – Fig. 5).



8. Température cutanée minimale et température ambiante.

Nous avons également noté les températures cutanées minimales atteintes durant chacune des applications de froid (glace durant les 30 minutes d'application ou CO₂ au cours des 2 minutes d'application). La température cutanée minimale moyenne induite par l'application de CO₂ pulsé était significativement plus basse que celle induite par l'application de glace aux deux temps d'application ($6,2 \pm 1,99^{\circ}\text{C}$ (IC 95%) versus $13,6 \pm 3,34^{\circ}\text{C}$; $p = 0,0016$

(Wilcoxon, n=15) à la première application et $5,6 \pm 1,38^{\circ}\text{C}$ versus $13,77 \pm 2,77^{\circ}\text{C}$; $p=0,00008$). La température ambiante moyenne ne différait à aucun temps de mesure entre les groupes traités par glace et par CO₂. La température moyenne de la pièce ne variait pas non plus significativement entre les deux mesures réalisées à H0 et H24 pour l'ensemble des patients.

9. Les taux de leucocytes et de polynucléaires neutrophiles dans le liquide articulaire ne variaient pas significativement après deux applications de froid.

Les taux de leucocytes et de polynucléaires neutrophiles dans le liquide synovial ponctionné avant la première application de froid puis à H24 tendaient à diminuer de manière non significative dans les deux groupes de traitement (Global : $16\,850/\text{mm}^3$ versus $23\,400/\text{mm}^3$, $n=14$, $p=0,36$ - Glace : $16\,780$ versus $24\,936$, $n=8$, $p=0,38$ - CO₂ : $16\,967$ versus $21\,864$, $n=6$, $p=0,84$; Wilcoxon sur séries appariées).

10. La variation du score Doppler était corrélée au pourcentage de variation de l'EVA douleur sur 24 heures.

En regroupant les données des deux groupes de traitement ($n=30$), il existait une corrélation positive entre la variation du score Doppler (H0 – H24) et le pourcentage de variation de l'EVA douleur (H0 – H24) : $r=0,44$; $p=0,015$ (Pearson).

11. En analyse multivariée, la baisse de l'EVA douleur de 3 points sur 24 heures était positivement associée à l'utilisation de glace et négativement associée au sexe masculin.

Les facteurs associés à une baisse de l'EVA douleur sur 24 heures (de 3 points d'EVA ou de 40%) ont été recherchés en analyse uni- puis multivariée par régression logistique. Les résultats sont résumés dans la **Table 4**.

Table 4. Facteurs associés à une baisse de l'EVA à H24

Analyse univariée				Analyse multivariée			
variable	OR ± IC 95%	Moyennes	p		variable	OR ± IC 95%	p
Sexe	0,056 [0,001-0,56]		P=0,004** (Fisher)	Baisse de l'EVA de 3 points	Sexe masculin	0.011 [0.001 – 0.103]	0,043*
Pathologie microcristalline Oui/Non	0,32 [0,04-2,02]		P=0,236 (Fisher)		Volume ponction	1.17 [1.083 – 1.27]	0,057
BMI		26,48 versus 24,43 kg/m2	P=0,26 (Wilcoxon)		Glacé	51.42 [6.96 – 379.94]	0,049*
Variation score Doppler (%)		-0,28 versus -0,46 %	P=0,24 (Wilcoxon)	Baisse de l'EVA de 40% (médiane)			
Volume ponction articulaire		16 versus 18,43 mL	P=0,303 (Wilcoxon)		Sexe masculin	0.017 [0.002 – 0.121]	0,039*
Technique de cryothérapie=Glacé	2,89 [0,54-17,26]		P=0,27 (Fisher)		BMI	0.77 [0.67 – 0.89]	0,059
					Baisse score Doppler	13.33 [3.78 – 47]	0,04*

Analyse univariée: odds ratios avec IC 95% (variables qualitatives) - tests t ou de Wilcoxon (variables quantitatives). Analyse multivariée par régression logistique. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Les facteurs associés à une baisse de 3 points de l'EVA sur 24 heures étaient l'utilisation de glace et le fait de ne pas être de sexe masculin. Le volume de la première ponction articulaire était plus faiblement associé à cette baisse de l'EVA sans atteindre la significativité.

Les facteurs associés à une baisse de 40% de l'EVA douleur sur 24 heures étaient la baisse du score Doppler sur 24 heures, le sexe (non masculin). Le BMI était inversement corrélé à la baisse de 40% de l'EVA douleur mais sans atteindre la significativité.

12. En analyse multivariée, la baisse du score Doppler était positivement associée à une baisse de l'EVA douleur de 40% sur 24 heures (Table 5.).

Table 5. Facteurs associés à une baisse du score Doppler (OUI/NON) à H24

Analyse univariée				Analyse multivariée			
variable	OR ±IC	Moyennes	p		variable	OR ± IC 95%	p
Baisse de l'EVA de 40% à H24	5,16 [0,92-35,56]		P=0,066 (Fisher)	Baisse du score Doppler à H24	Baisse de l'EVA de 40% à H24	5.87 [2.48 – 13.87]	0,04*
Baisse maximale de température induite par la première application de froid		-22,7 versus -19,7°C	P=0,149 (Wilcoxon)				
Variation T°C pièce entre H0 et H24		+0,22 vs -0,27°C	P=0,298 (test t)				

Analyse univariée: odds ratios avec IC 95% (variables qualitatives) - tests t ou de Wilcoxon (variables quantitatives). Analyse multivariée par régression logistique. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

C. Discussion.

En résumé, les deux techniques de cryothérapie locale (Glace et CO2 pulsé) appliquées deux fois à huit heures d'intervalle sur 30 genoux arthritiques permettaient une baisse significative de l'EVA douleur et du score Doppler, persistant à 24 heures de la première application. La baisse de l'hypersignal Doppler était par ailleurs significativement corrélée au pourcentage de

baisse de l'EVA douleur. Cette efficacité clinique était en outre associée à une très bonne tolérance (pas d'effet indésirable ni sortie d'étude). Sur les 24 heures de l'étude, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative globalement ni aux différents temps d'analyse entre l'application de glace et de CO2 pulsé sur des genoux arthritiques concernant l'évolution de l'EVA douleur et de l'hypersignal Doppler. En analyse multivariée toutefois, l'utilisation de glace était associée de manière indépendante à une diminution de 3 points de l'EVA douleur à 24 heures. D'autre part, en considérant les genoux arthritiques controlatéraux non traités, la glace montrait un effet taille sur l'hypersignal Doppler plus constamment significatif sur 24 heures.

Pendant les 24 heures de l'étude, les patients ne recevaient pas d'autre traitement anti-inflammatoire (AINS, corticoïdes, colchicine) susceptible d'influencer l'évolution de l'EVA douleur et de l'hypersignal Doppler. Une ponction articulaire était cependant réalisée avant la première application de froid, avec un potentiel effet antalgique propre (la deuxième ponction étant réalisée après le recueil des derniers scores Doppler et EVA douleurs). Toutefois, l'EVA douleur et le score Doppler diminuaient également, quoique de manière moins marquée, après la deuxième application de froid, en l'absence de ponction : Le score Doppler diminuait alors significativement dans le groupe CO2 uniquement et l'EVA douleur diminuait de manière quasi-significative en poolant les données des deux groupes ($p=0,058$; Wilcoxon). Après la ponction suivie de la première application de froid, l'EVA et les score Doppler se maintenaient ensuite à des niveaux inférieurs aux valeurs initiales, ce qui pourrait également expliquer un différentiel moins important sur ces deux critères après la deuxième application de froid. D'autre part, en analyse multivariée, le volume de liquide articulaire ponctionné n'avait qu'une influence faible et non significative sur la baisse de l'EVA douleur à H24, sans effet retrouvé sur l'évolution du score Doppler, contrairement à l'utilisation de glace par exemple, qui était fortement et indépendamment corrélée à une baisse de 3 points d'EVA sur 24 heures.

La ponction articulaire ne semble donc pas avoir été un facteur confondant majeur pour l'interprétation des effets de la cryothérapie sur l'EVA douleur et le score Doppler.

A noter que les mesures de l'EVA douleur, du score Doppler et de la température cutanée/ambiante n'ont pas été réalisées à deux heures de la première application de froid dans 3 cas (2 traités par CO₂ et un dans le groupe glace) pour limiter les transferts chez des patients particulièrement algiques ou difficilement mobilisables, ce qui pourrait avoir réduit la précision des estimations à ce temps d'évaluation.

Pour l'évaluation du score Doppler, nous nous sommes limités à l'évaluation des culs-de-sac supra-patellaires interne et externe en coupe longitudinale et transversale en choisissant la coupe montrant l'hypersignal maximal (score 0-3) pour chaque articulation et à chaque temps d'évaluation. Nous n'avons donc pas calculé la somme des scores sur les quatre sites de mesure possibles au genou, contrairement à d'autres auteurs [61,65,83,87]. Outre un gain de temps important compte tenu des mesures répétées, ce score Doppler global de zéro à trois par genou s'est révélé être suffisamment sensible au changement induit par le traitement et corrélé à l'évolution clinique (pourcentage de variation de l'EVA douleur). Notons d'ailleurs que dans les études additionnant les scores Doppler (0-3) de 4 sites différents pour chaque genou arthritique (score global de 0 à 12), le score Doppler moyen (0-3) était plus important dans les culs-de-sac supra-patellaires latéral puis médial par comparaison aux scores observés en supra- et infra-patellaire [65]. Les culs-de-sac supra-patellaires interne et externe pourraient donc avoir une meilleure sensibilité que les récessus supra/infra-patellaires pour détecter l'inflammation synoviale dans les rhumatismes inflammatoires en poussée. D'autres auteurs se bornaient par ailleurs également à l'étude de ces deux sites pour évaluer le score Doppler sur des genoux arthritiques [62,85].

Le score Doppler reste toutefois moins bien validé pour les genoux comparé aux petites articulations (poignets, MCP) en raison d'une difficulté à explorer l'ensemble de la cavité articulaire en échographie et de l'absence de gold standard (pas de score d'inflammation IRM validé contrairement aux petites articulations). Nous réalisons d'ailleurs en parallèle dans CDRI une étude comparée des effets de la glace et du CO2 pulsé sur l'hypersignal Doppler de poignets arthritiques (4 patients inclus sur 20 prévus – **Fig. 2a. page 22**).

L'ensemble des examens échographiques étaient réalisés par le même opérateur (XG) avec enregistrement des images et relecture par un deuxième échographiste en aveugle du premier scoring, du temps d'évaluation et du bras de traitement. En cas de discordance, les images étaient revues de manière collégiale avec recherche d'un consensus sur le score Doppler. Ceci assure la bonne validité interne et externe des résultats du scoring Doppler. Les coefficients kappa intra- et inter-observateur obtenus étaient en outre dans les gammes de valeurs rapportées dans la littérature pour l'examen échographique des grosses articulations [69,70,84,88].

L'étude CDRI était initialement une étude de faisabilité qui a permis d'objectiver un effet significatif de la cryothérapie locale sur la douleur et l'inflammation Doppler intra-articulaires avec une excellente tolérance (pas de sortie d'étude, aucun événement indésirable). Devant cet excellent rapport bénéfice/risque, l'objectif initial d'inclusions (dix à onze patients par groupe de traitement pour montrer une baisse significative du score Doppler) a pu être augmenté par étapes en vue de nouveaux objectifs, concernant notamment l'analyse des effets anti-inflammatoires de la cryothérapie locale dans le liquide articulaire.

Nous n'avons pas observé de variation significative de la formule leucocytaire du liquide articulaire prélevé avant / après les deux applications de froid. Lors de la deuxième ponction, un geste infiltratif était réalisé dans le même temps, l'ensemble des critères d'évaluation ayant

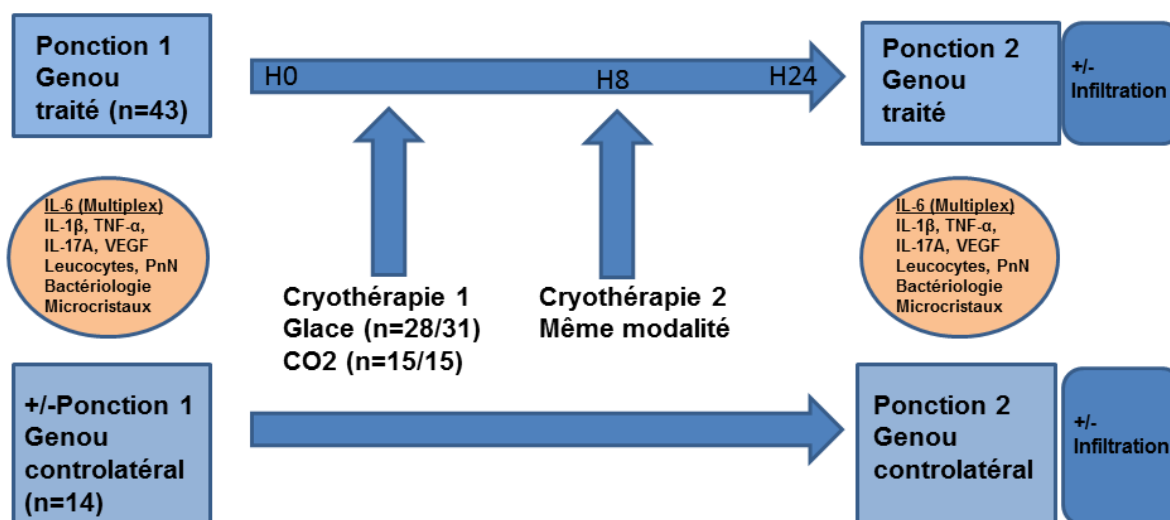
préalablement été recueillis à H24 (EVA, score Doppler, température cutanée, liquide articulaire). Ces prélèvements de liquide articulaire nous ont permis d'évaluer l'évolution des taux de cytokines intra-articulaires dans les genoux arthritiques traités par cryothérapie et, en cas de biarthrite, dans les genoux arthritiques controlatéraux non traités par cryothérapie. Cette analyse a fait l'objet de l'étude ancillaire ALGGAR (§V.).

V- EFFETS DE DEUX APPLICATIONS LOCALES DE FROID SUR LES TAUX DE CYTOKINES INTRA-ARTICULAIRES (**ETUDE ALGGAR – EULAR 2016. §XIIB.- page 156, et futur article 4.**).

A. Patients et Méthodes.

Nous avons ensuite prolongé l'étude CDRI par l'étude ancillaire ALGGAR, visant à mesurer l'évolution des taux de cytokines intra-articulaires avant / après deux applications de froid. Le critère principal choisi était l'évolution des taux intra-articulaires d'IL-6. En cas de biarthrite de genou, le genou arthritique controlatéral non traité par cryothérapie était également ponctionné à deux reprises (H0 et H24) pour constituer un groupe contrôle apparié (ne différant des genoux traités que par l'application de froid). Le design de l'étude ALGGAR est résumé dans les **Fig. 2b. page 23** et **Fig. 6.**

Figure 6. Schéma de l'étude ALGGAR



Nous avons calculé que le recrutement de 31 patients arthritiques traités par glace (15 issus de l'étude randomisée CDRI et 16 patients supplémentaires en cours de recrutement dans la phase d'extension ALGGAR) permettait de mettre en évidence une diminution significative des taux d'IL-6 intra-articulaires avec une puissance de 95% et au risque α de 5%, en nous basant sur les valeurs rapportées dans une étude portant sur l'analyse du liquide articulaire des genoux de 27 spondyloarthrites avant / après traitement par anti-TNF- α [89]. Le liquide articulaire des patients était ponctionné à deux reprises, selon le schéma utilisé dans l'étude CDRI : première ponction avant la première application de cryothérapie, à 9h00, puis deuxième ponction le lendemain à 9h00, après réalisation de la dernière échographie, avec réalisation d'une infiltration cortisonique dans le même temps (après recueil des derniers critères d'évaluation). Pour chaque patient, le liquide articulaire était donc recueilli avant et après deux applications de froid, et simultanément sur le genou controlatéral non traité en cas

de biarthrite. Le liquide articulaire était envoyé aux laboratoires de bactériologie et de biochimie (analyse cytologique et recherche de microcristaux). En plus de ces analyses standards, le surplus de liquide était envoyé à l'EFS de Bourgogne-Franche-Comté (INSERM U1098) pour dosage des cytokines (IL-6, IL-17A, TNF- α , IL-1 β , VEGF) par technique de cytométrie en multiplex (CBA® BD biosciences). Les méthodes statistiques utilisées étaient les mêmes que pour l'étude CDRI.

L'étude ALGGAR a fait l'objet d'un financement dans le cadre de l'appel à projets Jeune Chercheur en 2014 (GIRCI-Est - 21324 euros).

B. Résultats.

Les prélèvements de liquide articulaire de quarante-trois patients ont été recueillis au 01/11/2016 (15 dans le groupe CO₂, 28 sur 31 dans le groupe glace) avec échantillons avant / après deux applications de froid. Par ailleurs, le liquide articulaire du genou controlatéral non traité a été obtenu pour 14 patients (analysé pour 8 d'entre eux, un nouveau dosage de cytokines dans les échantillons de liquide articulaire étant prévu à la fin des inclusions). Une analyse intermédiaire des résultats a été réalisée en novembre 2015 (portant sur les liquides articulaires de 20 patients traités par glace et 15 patients traités par CO₂).

1. Les taux de leucocytes et de polynucléaires neutrophiles ne variaient pas significativement avant / après cryothérapie locale.

Les taux de leucocytes dans le liquide articulaire ponctionné avant la première application de froid puis 24 heures plus tard, après deux applications, ne variaient pas significativement chez les patients traités par cryothérapie (leucocytes : $12\,500 \pm 24\,500$ (médiane $\pm$ écart inter-quartile) versus $8\,350 \pm 27\,900$; $n=22$; $p=0.72$, polynucléaires neutrophiles (PnN) : $17\,140 \pm 27\,578$ versus $12\,920 \pm 26\,978$; $n=17$; $p=0,74$), dans le groupe glace (leucocytes : $n=16$; PnN : $n=13$) ni dans le groupe CO₂ (leucocytes : $n=6$; PnN : $n=4$). Ces taux de leucocytes ne

variaient pas non plus au bout de 24 heures dans les genoux controlatéraux non traités ($14\,900 \pm 27\,950$ versus $13\,200 \pm 30\,775$; $n=7$; $p=0,35$). L'effet anti-inflammatoire de deux applications locales de froid ne semblait donc pas être induit par une réduction de l'infiltrat cellulaire inflammatoire intra-articulaire chez nos patients. La ponction articulaire réalisée entre les deux mesures ne semble pas non plus avoir eu d'influence sur la formule cellulaire dans le liquide articulaire.

2. La cryothérapie locale (deux applications) réduisait les taux intra-articulaires d'IL-6 (**Fig. 7a. page 46**).

Les taux intra-articulaires d'IL-6 mesurés par technique Multiplex diminuaient significativement entre les deux prélèvements réalisés à 24 heures d'intervalle, après deux applications de froid (Glace ou CO₂ : $758\,916$ (médiane) $\pm 2\,990\,131$ (écart inter-quartiles) versus $164\,917 \pm 1\,459\,757$ pg/mL ; $n=34$; $p=0,0003$ (test de Wilcoxon sur séries appariées)).

Cette diminution était également significative dans le groupe traité par glace ($2\,104\,000 \pm 3\,021\,235$ versus $181\,629 \pm 1\,344\,21$ pg/mL ; $n=20$; $p=0,0014$). La diminution n'atteignait pas la significativité dans le groupe traité par CO₂ ($193\,139 \pm 2\,838\,067$ versus $71\,445 \pm 2\,010\,272$ pg/mL ; $n=14$; $p=0,1$).

3. Les taux intra-articulaires d'IL-1 β diminuaient après deux applications de froid (**Fig. 7b. page 46**).

Les taux d'IL-1 β diminuaient significativement dans le liquide articulaire après deux applications de froid en regroupant les groupes glace et CO₂ ($18,23 \pm 41,66$ versus $13,68 \pm 28,15$ pg/mL ; $n=29$; $p=0,018$ (Wilcoxon). Ces taux tendaient également à diminuer dans les deux groupes de traitement sans atteindre la significativité statistique (Glace : $28,89 \pm 55,3$ versus $20,19 \pm 48,18$ pg/mL ; $n=15$; $p=0,08$ – CO₂ : $10,97 \pm 30$ versus $6,78 \pm 12,75$ pg/mL ; $n=14$; $p=0,15$).

4. Les taux de VEGF diminuaient significativement dans le liquide articulaire après deux applications de froid (**Fig. 7c. page 46**).

Les taux intra-articulaires de VEGF diminuaient significativement après deux applications de froid en additionnant les deux groupes de traitement ($1195 \pm 1396,8$ versus $1195 \pm 1253,7$ pg/mL ; n=33 ; p=0,026 (Wilcoxon)) sans atteindre la significativité dans les deux sous-groupes (Glace : $1673 \pm 1769,1$ versus $1545 \pm 1854,6$ pg/mL ; n=18 ; p=0,19 – CO2 : $791,2 \pm 984,3$ versus $745,7 \pm 1187,5$; n=15 ; p=0,068).

5. Les taux de TNF- α tendaient à diminuer dans le liquide articulaire après deux applications de froid (**Fig. 7d. page 46**).

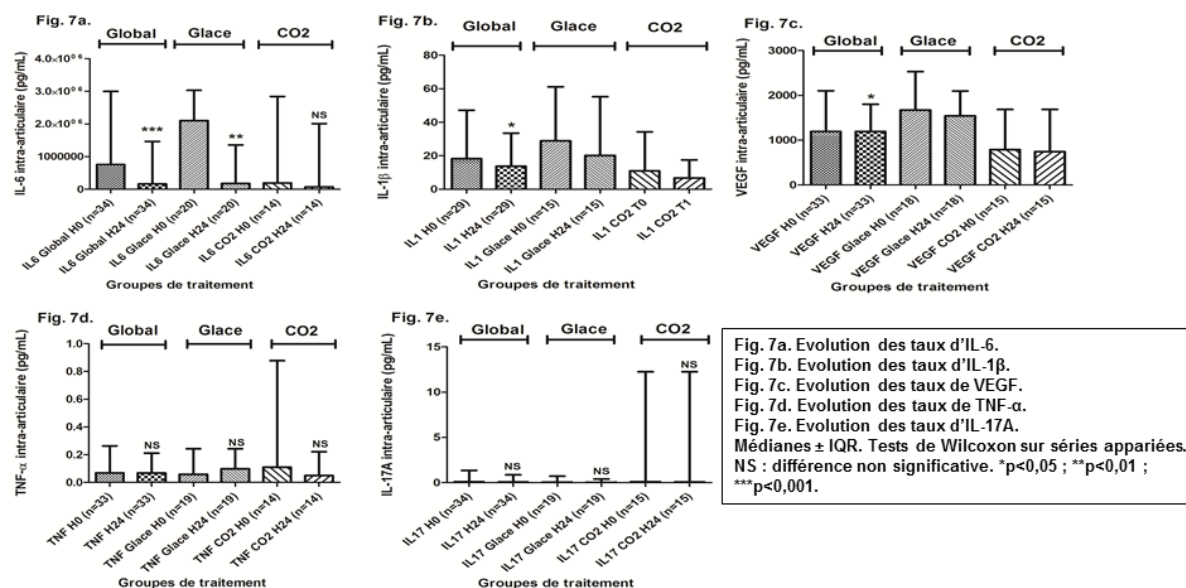
La diminution des taux de TNF- α avant / après deux applications de froid n'atteignait pas la significativité en regroupant les données des deux groupes ($0,07 \pm 0,24$ versus $0,07 \pm 0,2$ pg/mL ; n=33 ; p=0,15 (Wilcoxon) ni dans le groupe Glace ($0,06 \pm 0,24$ versus $0,099 \pm 0,24$ pg/mL ; n=19 ; p=0,86). La tendance à la diminution semblait plus marquée dans le groupe traité par CO2 ($0,11 \pm 0,85$ versus $0,05 \pm 0,21$ pg/mL ; n=14 ; p=0,079).

6. Les taux intra-articulaires IL-17A tendaient à diminuer après deux applications de froid (**Fig. 7e. page 46**).

Les taux intra-articulaires d'IL-17A diminuaient de manière proche de la significativité après les deux applications de froid (Deux groupes : $0,09 \pm 1,344$ versus $0,071 \pm 0,86$ pg/mL ; n=34 ; p=0,066 (Wilcoxon) – Glace : $0,06 \pm 0,7$ versus $0,023 \pm 0,39$ pg/mL ; n=19 ; p=0,28 – CO2 : $0,11 \pm 12,23$ versus $0,08 \pm 12,22$ pg/mL ; n=15 ; p=0,12).

Les effets de la cryothérapie locale sur les taux de cytokines intra-articulaires sont résumés dans la **Fig. 7**.

Figure 7. Evolution des taux intra-articulaires de cytokines après deux applications de froid



7. Evolution des taux de cytokines dans les genoux arthritiques controlatéraux non traités par cryothérapie.

Les taux de cytokines ne variaient pas de manière significative dans le liquide articulaire des genoux controlatéraux non traités par cryothérapie au bout de 24 heures mais avec des effectifs insuffisants pour conclure à ce stade (IL-6 : $45\,318 \pm 492\,973$ versus $24\,876 \pm 1\,494\,590$ pg/mL ; n=7 ; p=0,47 (Wilcoxon) – IL-1β : $29,31 \pm 39$ versus $13,24 \pm 19,51$ pg/mL ; n=4 ; p=0,25 – TNF-α : $0,076 \pm 0,71$ versus $0,19 \pm 0,68$ pg/mL ; n=6 ; p=0,44 – IL-17A : $0,25 \pm 13,62$ versus $0,27 \pm 6,4$ pg/mL ; n=6 ; p=0,38 – VEGF : $393,8 \pm 1902,2$ versus $393,8 \pm 1753,6$ pg/mL ; n=5 ; p=0,8).

8. Corrélations.

Les taux intra-articulaires initiaux d'IL-6 corrélaient significativement avec les taux de leucocytes et de PnN intra-articulaires ($r=0,78$; $p<0,0001$ et $r=0,7$; $p=0,0003$ respectivement (Spearman)), avec les taux intra-articulaires d'IL-1 β et de VEGF ($r=0,48$; $p=0,0068$ et $r=0,73$; $p<0,0001$ respectivement), les taux initiaux de CRP ($r=0,5$; $p=0,0026$), la température cutanée initiale ($r=0,35$; $p=0,04$). La variation des taux intra-articulaires d'IL-6 après deux applications de froid corrélait avec la variation du taux de leucocytes intra-articulaires ($r=0,48$; $p=0,039$), les variations des taux intra-articulaires d'IL-1 β et de VEGF ($r=0,51$; $p=0,006$ et $r=0,5$; $p=0,004$ respectivement), les taux de CRP initiaux ($r=-0,52$; $p=0,0016$).

Les taux initiaux d'IL-1 β intra-articulaires corrélaient significativement avec les taux de VEGF intra-articulaires ($r=0,46$; $p=0,009$), la CRP initiale ($r=0,41$; $p=0,02$), l'EVA douleur initiale ($r=0,43$; $p=0,016$). Les variations des taux intra-articulaire d'IL-1 β corrélaient avec la variation des taux de leucocytes intra-articulaires ($r=0,54$; $p=0,038$), la variation des taux de VEGF ($r=0,58$; $p=0,0009$), la CRP initiale ($r=-0,46$; $p=0,012$).

Les taux initiaux intra-articulaires de TNF- α corrélaient avec les taux d'IL-17A intra-articulaires ($r=0,65$; $p<0,0001$).

Les taux initiaux intra-articulaires de VEGF corrélaient avec les taux de leucocytes et de PnN intra-articulaires ($r=0,58$; $p=0,0025$ et $r=0,57$; $p=0,008$ respectivement), la CRP initiale ($r=0,42$; $p=0,016$). Les variations des taux intra-articulaires de VEGF corrélaient avec la CRP initiale ($r=-0,38$; $p=0,03$).

9. Facteurs associés aux variations des taux intra-articulaires de cytokines (analyses uni- et multivariée).

En analyse multivariée par régression logistique, les facteurs associés de manière indépendante à une baisse des taux intra-articulaires d'IL-6 (baisse supérieure à la médiane de baisse OUI/NON) après deux applications de froid étaient une CRP de départ élevée (OR 1.035 ; IC 95% [1.02 - 1.05] ; p=0.004) et une baisse maximale de la température cutanée induite par la cryothérapie supérieure à la médiane de baisse maximale (OR 1.39 [1.19 - 1.62] ; p=0.03) (Table 6.).

Table 6. Facteurs associés à une baisse des taux intra-articulaires d'IL-6 (pg/mL ; < médiane de baisse) à H24

Analyse univariée				Analyse multivariée		
variable	OR ± IC95%	Moyennes	p	variable	OR ± IC95%	p
Technique de cryothérapie	1,61 [0,34-8,06]	-1 624 000 pg/mL (Glace) vs -1 065 000 pg/mL (CO2)	0,18 (Wilcoxon)	CRP de départ	1,035 [1,02-1,05]	0,0039**
Baisse taux PnN intra-articulaires (< médiane)	3,62 [0,3-64,1]	-150 234 pg/mL vs -2 346 143 pg/mL	0,066 (Wilcoxon)	Baisse maximale moyenne de la température cutanée lors de la cryothérapie (>médiane : OUI/NON)	1,39 [1,19-1,62]	0,032*
CRP de départ (mg/L)		57 mg/L vs 157 mg/L	0,00007*** (Wilcoxon)			
Leucocytes sanguins (>médiane)	3,24 [0,68-17,32]	-1 261 744 pg/mL vs -1 525 686 pg/mL	0,16 (Wilcoxon)			
Baisse maximale moyenne de la température cutanée lors de la cryothérapie (<médiane)	0,39 [0,08-1,85]	-1 695 651 pg/mL vs -1 054 036 pg/mL	0,13 (Wilcoxon)			

Analyses uni- et multivarié par régression logistique.
*p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Les facteurs indépendamment associés à une baisse des taux d'IL-1 β (baisse supérieure à la médiane de baisse) à H24 étaient l'utilisation de glace versus CO2 (OR 25.8 [5.7 - 117.2] ; p=0.03), un BMI supérieur à la médiane (OR 0.018 [0.003 - 0.13] ; p=0.04). Les baisses des

taux d'IL-1 β intra-articulaires tendaient également à être plus importantes en cas d'arthropathie microcristalline (Table 7.).

Table 7. Facteurs associés à une baisse des taux intra-articulaires d'IL-1 β (pg/mL ; < médiane de baisse) à H24

Analyse univariée				Analyse multivariée		
variable	OR $\pm$ IC95%	Moyennes	p	variable	OR $\pm$ IC95%	p
Technique de cryothérapie = « Glace »	6,36 [1,07–47,93]	-14,49 pg/mL (Glace) vs +13,26 pg/mL (CO2)	0,027* (Fisher)	Technique de cryothérapie = « Glace »	25,8 [5,7-117,2]	0,032*
Atteinte microcristalline O/N	6,06 [0,84-75,3]	-1,69 pg/mL vs +34,9 pg/mL	0,015* (Wilcoxon)	BMI>médiane O/N	0,018 [0,003-0,13]	0,041*
Baisse leucocytes intra-articulaires (<médiane O/N)	8,4 [0,57-547]	-11 pg/mL vs +11,9 pg/mL	0,0496* (Wilcoxon)	Atteinte microcristalline O/N	15,1 [2,96-80,1]	0,096
CRP de départ (mg/L)		134,9 mg/L vs 89,6 mg/L	0,077 (Wilcoxon)	Analyses uni- et multivarié par régression logistique. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.		
Volume ponction articulaire (ml ; > médiane O/N)	0,26 [0,02-1,93]	-1,44 mL vs -11,19 mL	0,09 (Wilcoxon)			
BMI>médiane O/N		0,28 [0,04-1,57]	0,14 (Fisher)			
Sexe masculin O/N		2,88 [0,45-23,3]	0,25 (Fisher)			

La baisse des taux intra-articulaires d'IL-17A (supérieure à la médiane de baisse) était associée de manière indépendante à des taux de PnN sanguins initiaux supérieurs à la médiane (OR 48 [7,7 – 300] ; p=0,035) et de manière moins marquée au volume de liquide articulaire prélevé lors de la première ponction (OR 1,24 [1,12 – 1,36] ; p=0,027) (Table 8.).

Table 8. Facteurs associés à une baisse des taux intra-articulaires d'IL-17A (pg/mL ; < médiane de baisse) à H24

Analyse univariée				Analyse multivariée		
variable	OR ± IC	Moyennes	p	variable	OR ± IC95%	p
Pathologie microcristalline O/N	0,46 [0,08-2,44]	-1,2 pg/mL vs -1,46 pg/mL	0,13 (Wilcoxon)	Taux PnN sanguins>médiane O/N	48,1 [7,7-300]	0,035*
Baisse PnN intra-articulaires (<médiane O/N)	1 [0,07-17,3]	-7,9 pg/mL vs +2,33 pg/mL	0,29 (Wilcoxon)	Volume de ponction articulaire (mL)	1,24 [1,12-1,36]	0,027*
Taux de PnN sanguins de départ (/mm ³ ; >médiane O/N)	2,62 [0,54-14,18]	-3,07 pg/mL vs +0,32 pg/mL	0,089 (Wilcoxon)	Analyses uni- et multivarié par régression logistique. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.		
Baisse hypersignal Doppler O/N	1,09 [0,23-5,41]	-2,72 pg/mL vs +0,33 pg/mL	0,196 (Test t)			
Baisse EVA douleur ≥40% O/N	1,96 [0,4-10,6]	-6,72 pg/mL vs +5,39 pg/mL	0,23 (Wilcoxon)			
Volume ponction (mL ; >médiane O/N)	12,1 [1,3-604]	-0,65 pg/mL vs +7,79 pg/mL	0,011* (Fisher)			
BMI>médiane O/N	0,9 [0,18-4,42]	+8,56 pg/mL vs -1,84 pg/mL	0,19 (Test t)			

Aucun des facteurs significativement associés aux baisses des taux intra-articulaires de TNF- α ni de VEGF en univarié ne sortait de manière significative en analyse multivariée (données non montrées).

C. Discussion.

En résumé, les données de cette analyse intermédiaire des résultats de l'étude ALGGAR mettaient en évidence une baisse significative des taux intra-articulaires d'IL-6 mesurés par technique Multiplex après deux applications de froid (critère principal de l'étude) en regroupant les deux bras de traitement ainsi que dans le sous-groupe traité par glace. Les taux intra-articulaires d'IL-1 β et de VEGF diminuaient également significativement en regroupant les patients traités par glace et CO₂, les taux d'IL-17A et de TNF- α tendaient également à diminuer. Ces baisses des taux de cytokines intra-articulaires n'étaient a priori pas liées à une

baisse des taux de leucocytes intra-articulaires, qui ne variaient pas significativement. La ponction articulaire n'influait pas significativement les résultats en analyse multivariée, sauf peut-être pour les taux d'IL-17A. La baisse de température maximale induite par la cryothérapie locale était associée de manière significative et indépendante à une baisse plus importante des taux intra-articulaires d'IL-6, tandis que la cryothérapie locale par glace (versus CO2) était significativement associée à une baisse plus importante des taux intra-articulaires d'IL-1 β en analyse multivariée.

Ces résultats démontrent pour la première fois un effet anti-inflammatoire direct de la cryothérapie locale par diminution des taux d'IL-6, d'IL-1 β et de VEGF dans le liquide articulaire de genoux traités par deux applications locales de froid. La poursuite des inclusions (43/46 actuellement) permettra de préciser d'éventuelles différences entre l'application de glace et de gaz froid, et d'atteindre un effectif suffisant pour l'analyse des données du groupe contrôle (genoux controlatéraux non traités par glace – prélèvements disponibles pour 13 patients actuellement avec réalisation de l'ensemble des dosages à la fin des inclusions).

Les taux de TNF- α tendaient à diminuer, surtout dans le groupe traité par CO2 pulsé. Les taux d'IL-17A tendaient également à diminuer globalement et dans chacun des deux groupes. Les effectifs n'étaient sans doute pas suffisants à ce stade pour que certaines diminutions atteignent la significativité. Un nouveau dosage des taux de cytokines sera réalisé à la fin des inclusions prévues (encore trois patients traités par glace à inclure dans l'étude ALGGAR, certains échantillons de liquides articulaires non encore analysés ou avec des dosages à refaire en raison de valeurs hors-gamme).

Lors d'une première analyse intermédiaire, l'EVA douleur et l'hypersignal Doppler avaient semblé baisser de manière plus prolongée, le lendemain du traitement par glace comparativement au CO2 pulsé. Pour cette raison, pour l'étude ancillaire ALGGAR portant

sur le dosage des taux intra-articulaires d'IL-6, nous avons choisi d'inclure 16 patients supplémentaires traités par glace par rapport aux 30 patients de l'étude randomisée CDRI (15 patients traités par glace, 15 patients traités par CO₂). Il n'est donc pour l'instant pas prévu de recruter de patients supplémentaires dans le bras cryothérapie par CO₂ pulsé en vue des dosages de cytokines dans le liquide articulaire. Il en résultera un potentiel manque de puissance pour mettre en évidence les effets propres de cette technique sur les taux de cytokines.

Le recrutement de patients supplémentaires avec biarthrites de genou dans le groupe glace permettra d'étoffer le groupe contrôle constitué par le liquide de ponction issu des genoux arthritiques controlatéraux non traités (7 prélèvements analysés à ce jour, 13 prélèvements obtenus au 22/09/2016). Sur l'analyse portant sur les 7 premiers liquides articulaires issus de genoux controlatéraux non traités, les taux de cytokines tendaient également à décroître de manière non significative mais l'effectif était trop faible pour permettre de conclure. Si la baisse des taux de cytokines dans le liquide articulaire controlatéral se confirmait, cela pourrait suggérer un effet systémique de la cryothérapie locale, comme nous l'avons également démontré dans le modèle murin d'AIA. Il avait aussi été montré que l'application de CO₂ pulsé (Cryo+®) sur les mains de sujets sains faisait aussi baisser la température cutanée des mains controlatérales non traitées. Les auteurs attribuaient cette hypothermie controlatérale à une mise en jeu du système nerveux sympathique [90].

Le fait que plusieurs axes cytokiniques soient impactés par la cryothérapie locale dans le liquide articulaire (IL-6, IL-1 β , VEGF mais avec aussi une tendance à la diminution des taux d'IL-17A et de TNF- α) pourrait être en faveur d'une inhibition « en amont » de l'inflammation synoviale par l'hypothermie tissulaire modérée, potentiellement médiée par l'inhibition de voies enzymatiques majeures impliquées dans la génèse de l'inflammation (protéine kinases de la voie NF-kB, voie de la COX-2, métalloprotéinases...) [7].

Malgré l'inclusion de patients souffrant de rhumatismes inflammatoires divers (goutte, chondrocalcinose, PR, SPA – reflétant les patients arthritiques pouvant bénéficier d'une cryothérapie locale en pratique clinique), les résultats étaient homogènes en termes d'évolution de la composition en cytokines dans le liquide articulaire après deux applications de froid. Ceci pourrait suggère que l'effet thérapeutique de la cryothérapie locale pourrait mettre en jeu des mécanismes moléculaires communs dans ces différentes pathologies. En analyse multivariée, le diagnostic étiologique du rhumatisme n'avait pas d'influence significative sur la baisse des taux de cytokines intra-articulaires, hormis une tendance plus marquée à une baisse des taux d'IL-1 β chez les patients atteints de rhumatismes microcristallins (**Table 7. page 49**).

La première ponction articulaire réalisée avant les deux applications de froid pouvait également être considérée comme un facteur de confusion pour l'effet anti-inflammatoire de la cryothérapie locale. Les résultats de l'analyse multivariée des données de CDRI avaient déjà montré que la ponction n'était pas significativement ni indépendamment associée à la baisse de l'EVA douleur ni du score d'hypersignal Doppler. De la même manière, le volume de la ponction articulaire n'était pas associé aux baisses des taux d'IL-6 ni d'IL-1 β en analyse multivariée sur les résultats intermédiaires de l'étude ALGGAR. En revanche, le volume de ponction influait faiblement sur l'évolution des taux intra-articulaires d'IL-17A en analyse multivariée. Le fait que la formule cellulaire moyenne n'ait pas varié significativement entre les deux prélèvements de liquide articulaire atteste en outre que la concentration en cellules inflammatoires dans le tissu synovial n'était pas modifiée suite à la première ponction (baisse de volume du liquide articulaire sans modification de la concentration de l'infiltrat cellulaire inflammatoire, pouvant faire supposer que la concentration en cytokines n'était pas modifiée par la ponction articulaire, mais bien par la cryothérapie locale).

Nos résultats suggèrent également que les deux techniques de cryothérapie locale par glace et CO2 pulsé semblent d'une efficacité équivalente pour faire baisser les taux de cytokines intra-articulaires chez les patients, comme c'était le cas pour l'EVA douleur, l'hypersignal Doppler et la température cutanée dans l'étude CDRI. Les effectifs du groupe de patients traités par CO2 (n=15) ne sera peut-être pas suffisant pour obtenir des baisses statistiquement significatives des taux de cytokines, contrairement au groupe traité par glace (28 patients inclus, 3 autres en attente de recrutement). Il sera donc difficile de démontrer de manière formelle des différences de profil anti-inflammatoire entre ces deux techniques. A noter toutefois que les taux de TNF- α semblaient diminuer de manière plus marquée dans le groupe traité par CO2 pulsé avec un p proche de la significativité (p=0,08 ; n=14 avec un quinzième prélèvement à redoser pour valeur hors gamme). Sur l'ensemble des prélèvements analysés, le traitement par glace était en outre significativement associé à une baisse plus importante des taux intra-articulaires d'IL-1 β en analyse multivariée.

Les échantillons de liquide articulaires sont actuellement conservés à l'EFS de Bourgogne-Franche-Comté en vue de constituer une banque de liquide articulaire. Des dosages complémentaires sont par ailleurs prévus (analyse métabolomique avec dosage des marqueurs du stress oxydatif dans le cadre d'une collaboration avec le CHRU de Poitiers et l'équipe du Pr Dugué).

L'étude pourra également être complétée dans un deuxième temps (davantage de patients dans le bras CO2 pulsé pour le dosage des cytokines intra-articulaires, groupe de patients contrôles non traités avec deux ponctions articulaires espacées de 24 heures mais sans cryothérapie, groupes contrôles traités par corticoïdes ou AINS, durées de traitement plus prolongées,...).

Nous avons donc montré que deux applications de froid espacées de huit heures faisaient baisser les taux de plusieurs cytokines pro-inflammatoires dans le liquide articulaire à 24 heures d'intervalle.

Nous avons ensuite fait l'hypothèse que cette diminution des taux intra-articulaires de cytokines pro-inflammatoires pourrait être directement liée à l'hypothermie tissulaire induite par la cryothérapie. Nous avons pour cela cherché à confirmer l'effet propre de l'hypothermie tissulaire ponctuelle correspondant à une application de froid [85] sur l'inflammation synoviale (médiée par les cytokines précédemment étudiées) dans un modèle in vitro de culture de rotules de rats arthritiques à température contrôlée.

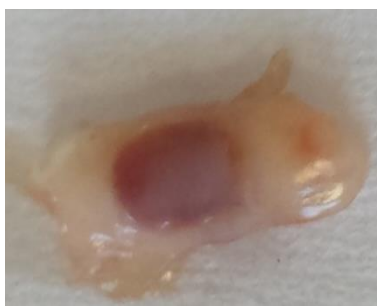
VI- EFFETS DE L'HYPOTHERMIE TISSULAIRE PONCTUELLE SUR L'INFLAMMATION SYNOVIALE IN VITRO DANS L'ARTHRITE A L'ADJUVANT (Article 3. §XIIA. – page 120, révision en cours).

Il a été montré que l'application de glace sur un genou arthritique réduisait la température intra-articulaire à 30°C pendant deux heures chez des patients atteints de PR [75]. Nous avons étudié les effets de cette hypothermie tissulaire modérée induite par la cryothérapie locale (30°C pendant deux heures) sur les taux de cytokines en utilisant un modèle de culture de rotules de rats arthritiques dans le modèle d'arthrite à l'adjuvant (AIA).

A. Matériels et Méthodes.

Les deux rotules de 24 rats AIA et de 10 rats contrôles non AIA ont été disséquées à J25 de l'induction de l'arthrite selon la technique décrite par Lubberts et al. [91] (**Fig. 8**).

Figure 8. Technique de dissection des rotules de rats AIA



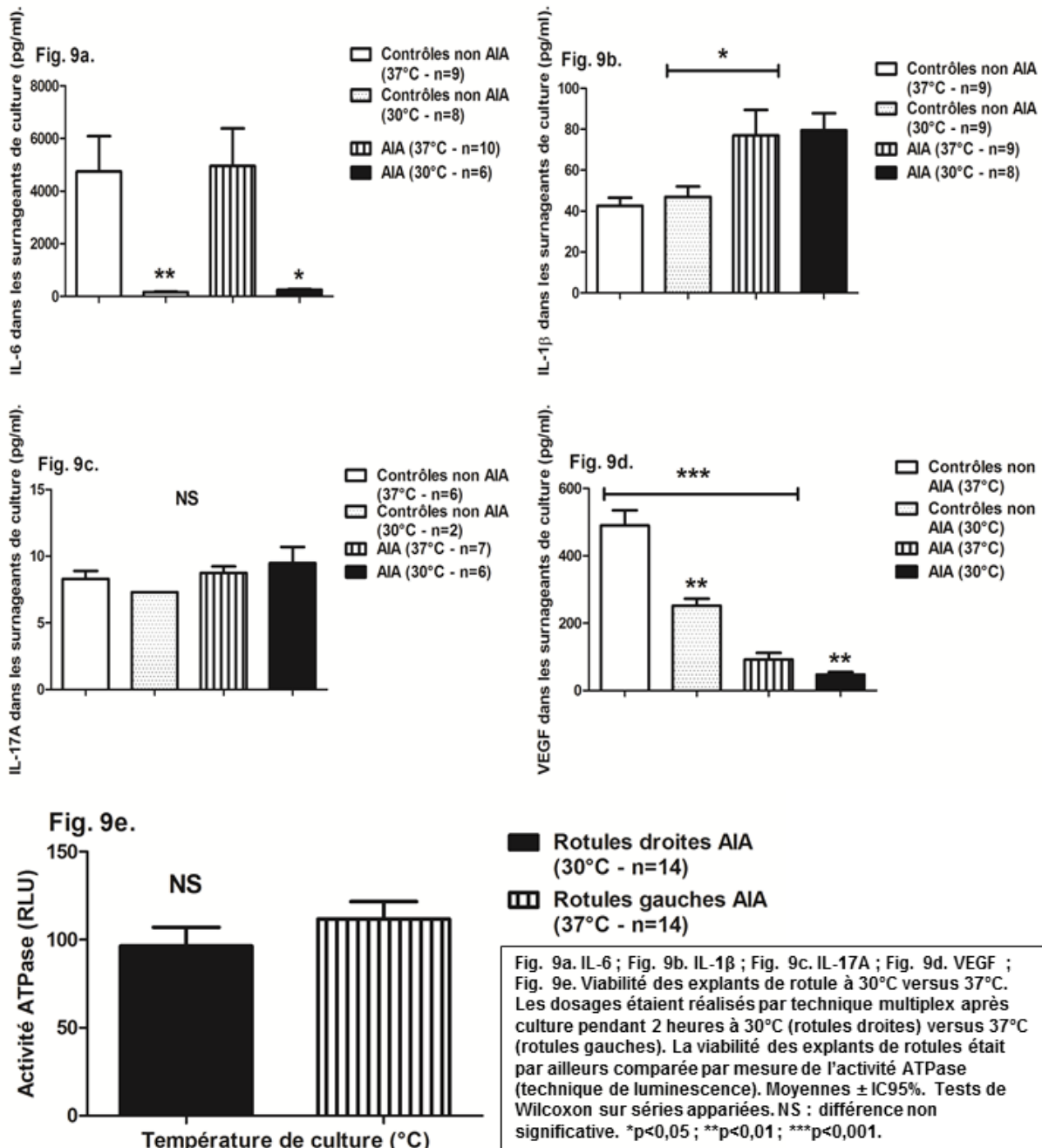
Après dissection, les rotules étaient mises en culture dans un milieu RPMI 1640 (200 microlitres par rotule) avec du mBSA à 0,1%, de la gentamycine (50 microgrammes par mL) et de la L-glutamine (2 mM). Pour chaque animal, la rotule gauche était cultivée à 37°C et la rotule droite à 30°C pendant deux heures. Les surnageants de culture étaient ensuite recueillis et congelés à -80°C. Les effets de l'hypothermie sur la viabilité cellulaire étaient par ailleurs étudiés sur les rotules à l'issue des deux heures de culture en mesurant l'activité ATPase par luminescence (CellTiter-Glo® Luminescent Test, Promega). Les taux de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-17A, TNF- α , IL-1 β) étaient mesurées par technique Multiplex (Magpix® Multiplexing Instrument, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) dans les surnageants de culture décongelés. Les taux moyens de cytokines dans les surnageants à 30°C versus 37°C étaient comparés en utilisant des tests de Wilcoxon à formulation bilatérale sur séries appariées (risque de première espèce α fixé à 5%). Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant les logiciels R® et Graphpad®.

B. Résultats: l'hypothermie inhibait l'expression synoviale d'IL-6 (**Fig. 9.**).

Les taux d'IL-6 n'étaient pas différents entre les rats AIA et non AIA, mais ils diminuaient dans les deux groupes à 30°C versus 37°C ($p=0,03$ pour les rats AIA et $p=0,0078$ pour les contrôles non AIA) (**Fig. 9a.**). Les taux d'IL-1 β étaient significativement plus élevés chez les rats AIA comparés aux contrôles non AIA, mais la température n'avait aucune influence sur les niveaux d'expression protéique (**Fig. 9b.**). Les taux d'IL-17A ne différaient pas entre les rats AIA et non AIA, et ne variaient pas selon la température (**Fig. 9c.**). Les taux de VEGF étaient significativement plus bas à 30°C versus 37°C chez les rats contrôles (Wilcoxon ; $p=0,0039$ – **Fig. 9d.**) et AIA (Wilcoxon ; $p=0,0039$). Toutefois, les taux de VEGF étaient paradoxalement significativement plus élevés chez les rats contrôles comparativement aux rats AIA (Mann-Whitney ; $p<0,0001$). La protéine TNF- α n'était en revanche pas détectable dans les surnageants de culture de rotules issus des rats AIA et non AIA, quelle que soit la température.

Les différences observées dans les taux d'IL-6 à 30°C versus 37°C n'étaient pas liés à des différences de viabilité cellulaires liées à l'hypothermie, car l'activité ATPase moyenne était identique entre les rotules cultivées à 30°C et celles cultivées à 37°C (**Fig. 9e.**).

Figure 9. Taux de cytokines dans les surnageants de culture de rotules de rats AIA à 30°C versus 37°C.



C. Discussion.

En résumé, l'hypothermie tissulaire ponctuelle induite par une application locale de glace (30°C pendant 2 heures) pourrait donc inhiber l'expression protéique d'IL-6, d'après ces résultats *in vitro* dans le modèle murin d'AIA. Ces données suggèrent également que les effets anti-inflammatoires locaux à court terme de la cryothérapie locale pourraient être IL-6 dépendants.

Nous avons ainsi observé une baisse de des taux protéiques d'IL-6 sans variation des niveaux d'IL-1 β ni d'IL-17A dans des surnageants de culture de rotules de rats AIA à 30°C versus 37°C pendant deux heures. Cette diminution des taux d'IL-6 à 30°C pourrait être lié à une inhibition transcriptionnelle par down-régulation du métabolisme enzymatique des voies NF- κ B et COX-2 à basse température [34]. Cette hypothermie tissulaire de deux heures pourrait en revanche avoir été trop brève pour avoir eu un impact sur les niveaux d'expression protéique des autres cytokines. L'IL-17 notamment est produite par les lymphocytes Th-17 qui se différencient sous l'influence de l'IL-6 [14]. Une diminution plus prolongée des taux d'IL-6 intra-articulaires, par une cryothérapie locale appliquée de manière chronique, aurait donc pu avoir un impact sur les niveaux d'expression protéiques d'IL-17A dans les pattes arrières de rats AIA. D'autre part, il pourrait exister des « stocks protéiques » de cytokines dans le tissu synovial arthritique, pouvant expliquer qu'une hypothermie de deux heures puisse inhiber la transcription du gène codant pour ces cytokines sans faire baisser leurs taux protéiques intra-articulaires, ce qui pourrait expliquer l'absence de baisse des taux protéiques d'IL-1 β et d'IL-17A dans les surnageants cultivés à 30°C pendant deux heures. Les dosages protéiques de cytokines dans les pattes arrières de rats AIA pourraient également avoir été faussés par des mécanismes locaux de dégradation enzymatique, comme cela a été démontré pour le TNF- α [92]. Ceci pourrait expliquer l'absence de détection de la protéine TNF- α dans ce modèle. Les niveaux d'expression des différentes cytokines étaient d'autre part évalués à

J24 de l'induction de l'arthrite, mais pourraient fluctuer au cours de l'évolution de celle-ci [92]. Pour mieux caractériser les mécanismes anti-inflammatoires de la cryothérapie, nous avons donc étudié également ses effets *in vivo* sur la transcription des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires, après une période d'application plus prolongée. Un effet anti-inflammatoire systémique éventuel (variation des taux de cytokines plasmatiques après cryothérapie) a également été recherché. Les résultats sont détaillés dans le paragraphe VII ci-dessous.

VII- EFFETS DE LA CRYOTHERAPIE LOCALE APPLIQUEE PENDANT 14 JOURS *IN VIVO* DANS L'ARTHRITE A L'ADJUVANT (Article 3. §XIIA. – **page 120**, révision en cours).

Dans le modèle murin de l'arthrite à l'adjuvant, nous avons étudié l'effet de deux applications de froid par jour (glace ou spray de gaz froid) pendant 14 jours sur les scores d'arthrite, le diamètre des pattes arrières et les taux de cytokines dans les pattes arrières et le plasma.

A. Matériels et Méthodes.

Ce protocole a été approuvé par le comité d'éthique pour l'expérimentation animale de l'université de Franche-Comté (n° 2012-019).

1. Induction de l'arthrite et groupes de traitements.

L'arthrite à l'adjuvant était induite chez des rats Lewis mâles âgés de 6 semaines par une injection unique de 120 µL dans la base de la queue contenant 1 mg of *Mycobacterium butyricum* tué par chauffage (Difco®, Detroit, MI) en suspension dans 0.1 ml d'huile minérale d'adjuvant incomplet de Freund (Difco®, Detroit, MI). Les rats contrôles non AIA recevaient une injection de serum physiologique dans la base de la queue. Après l'induction,

les paramètres cliniques étaient recueillis de manière quotidienne (poids, diamètre des chevilles, score d'arthrite). Dès l'apparition des premiers signes d'arthrite (J11 après l'induction), dix rats AIA ont été traités par application biquotidienne de glace pendant 14 jours (J11-J24), dix par application de gaz froid, dix rats contrôles AIA n'ont reçu aucun traitement et dix contrôles non AIA ont également été étudiés.

2. Modalités de traitement par cryothérapie locale.

La cryothérapie locale (glace ou gaz froid) était appliquée deux fois par jour (9H00 et 17H00) dès les premiers signes d'arthrite (J11) pendant 14 jours consécutifs. La température de la pièce et les températures cutanées après application de froid étaient également mesurées deux fois par jour (sonde de température cutanée MLT409/A®, ML309 transducer Thermistor Pod – AD Instruments). La température cutanée était mesurée juste après chaque application de froid sur les deux tarse et les deux chevilles de chaque animal traité en alternant l'ordre de mesure sur chacun des 4 sites. Les applications de froid étaient toujours réalisées dans la même pièce.

Dix rats AIA ont été traités par application locale de glace. Les animaux étaient placés pendant 30 minutes deux par deux (séparés par des packs de glace) dans 5 cages tapissées de bâtonnets de glace préalablement stockés à -26°C (Yéti®, Yetigel, Avignon, France) (**Fig. 10.**).

Figure 10. Technique de cryothérapie locale par application de glace chez les rats AIA



Le fond des cages était tapissé de bâtonnets de glace préalablement conservés à -26°C. Le traitement était appliqué pendant 30 minutes matin et soir pendant 14 jours consécutifs (J11-J24).

La température de surface du fond des cages était mesurée initialement puis 30 minutes plus tard, à la fin du traitement. Les rats étaient placés dans chacune des cages puis retirés dans le même ordre à 5 minutes d'intervalle à l'issue des 30 minutes de traitement pour mesure de la

température cutanée. L'ordre de traitement des rats alternait également entre les séances de cryothérapie.

Concernant le traitement par gaz froid, dix autres rats AIA ont été traités deux fois par jour (9h00 et 17h00) pendant 14 jours consécutifs dès les premiers symptômes d'arthrite (J11) par pulvérisation de gaz froid sur les deux pattes arrières (Ice Spray, Ghiaccio Spray®, Artsana Group, Italy. CE 0546). Le gaz froid était pulvérisé sur chacune des pattes arrières à une distance de 25 cm (neuf applications de cinq secondes espacées de 10 secondes pendant 2 minutes au total sur chaque patte arrière). L'ordre de traitement des rats et d'application sur chacune des deux pattes était également alterné. Les rats traités par cryothérapie locale étaient sacrifiés le lendemain de la dernière application de froid, à J24 et à l'âge de 9,5 semaines.

3. Mesure de l'expression des gènes codant pour les cytokines dans les pattes arrières (Q-RT-PCR).

Les rats des 4 groupes étaient sacrifiés à J24 après induction de l'arthrite par une injection intra-péritonéale de pentobarbital (60 mg/kg). Afin d'évaluer l'effet de la cryothérapie locale au long cours sur l'expression des gènes codant pour les cytokines dans les pattes arrières, ces dernières étaient coupées juste au-dessus des chevilles, dépecées puis plongées dans l'azote et conservées à -80°C en vue d'analyses par Q-RT-PCR [67–70]. Les pattes congelées étaient ensuite broyées à l'aide d'un mortier dans l'azote liquide, les ARN étaient extraits (Qiagen® mRNA extraction kit). Les Q-RT-PCR étaient ensuite réalisées (Biorad® cDNA and SybrGreen kits). Les gènes étudiés étaient TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17A. Les séquences des primers étaient : Actine : sens TATCGGCAATGACGCGTTCC – antisens TGCCTGGGTACATGGTGGTG ; GAPDH : sens GGGCATCCTGGGCTACACTG - antisens GAGGTCCACCACCCTGTTGC ; TNF- α : sens CCAATCTGTGTCCTTCTAA - antisens TTCTGAGCATCGTAGTTG ; IL-6 : sens GACCAAGACCATCCAAC - antisens

TAGGTTTGCCGAGTAGAC ; IL-1 β : sens CCTGCAGCTGGAGAGTGTGGAT - antisens TGCTCTGCTTGAGAGGTGCTG ; IL-17A: sens AACAGAGACCTGAGGCTA – antisens TCCATATCACTTGCTGAGATT.

4. Dosages des cytokines dans le plasma (ELISA et Multiplex).

Le jour du sacrifice également, afin de mesurer un éventuel effet systémique anti-inflammatoire de la cryothérapie locale, le sérum et le plasma étaient prélevés en intra-aortique, puis aliquotés après centrifugation et congelés à -80°C pour doser les taux circulants de cytokines (IL-6, IL-1 β , IL-17A, TNF- α , VEGF). L'expression protéique plasmatiques d'IL-17A, TNF- α , IL-1 β , VEGF étaient mesurés dans le plasma par technique Multiplex (Magpix® Multiplexing Instrument, Merck Millipore, Darmstadt, Germany), tandis que les taux plasmatiques d'IL-6 étaient mesurés par technique ELISA (rat IL6 platinum ELISA, BMS625®, ebioscience).

5. Analyses statistiques

Les groupes de traitement étaient comparés deux à deux pour l'évolution du score d'arthrite, du diamètre de cheville, de la température cutanée et du poids (two-way ANOVA sur mesures répétées). La correction de Bonferroni était appliquée. Les moyennes des variables quantitatives (taux de cytokines mesurés en PCR et en ELISA/multiplex) étaient comparées entre les différents groupes de traitement en utilisant des tests de Wilcoxon Mann Whitney. Les corrélations étaient calculées en utilisant des coefficients de corrélation de Pearson. Les tests étaient de formulation bilatérale et le risque α de première espèce fixé à 5%. Les calculs statistiques étaient effectués en utilisant les logiciels R® et Graphpad®.

B. Résultats.

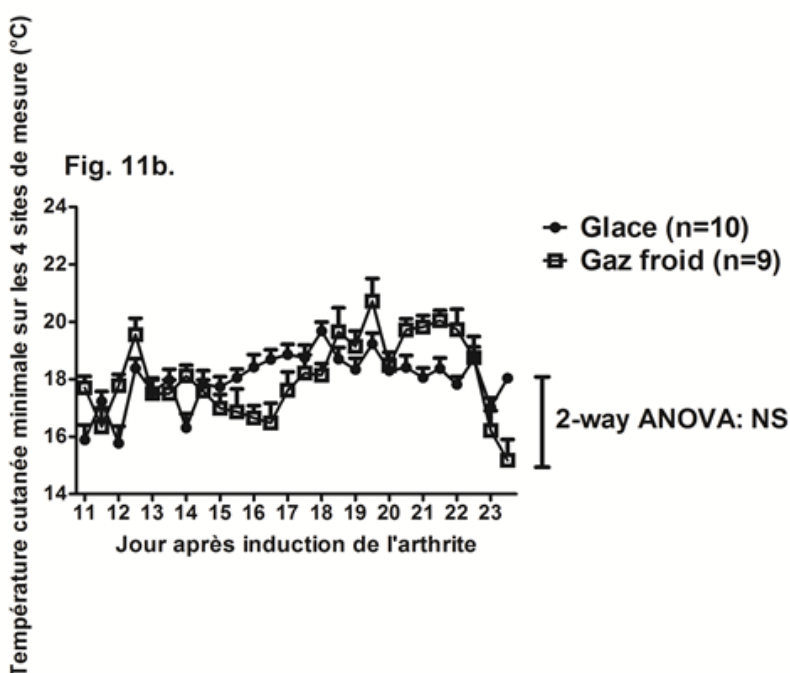
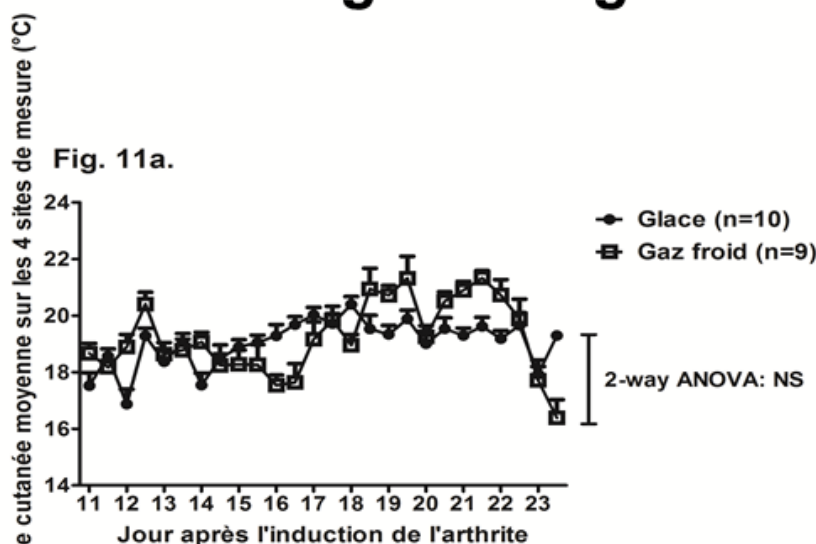
1. Caractéristiques cliniques des rats AIA.

Le jour de l'induction de l'arthrite (J0), le poids de départ moyen des rats n'était pas significativement différent entre les différents groupes de traitement (201.3 ± 3.1 g, 198.1 ± 1.4 g and 201.4 ± 2.4 g pour les rats AIA non traités, traités par glace et gaz froid respectivement). A J24, comme attendu [93], les poids des rats non arthritiques étaient significativement supérieurs à ceux de l'ensemble des groupes de rats arthritiques : rats AIA non traités : 207.3 ± 3.1 g ; glace : 210.7 ± 1.9 g ; gaz froid : 210.1 ± 2.6 g versus rats contrôles non AIA : 280 ± 4.7 g ($p < 0.001$). A noter que l'un des 10 rats AIA traités par gaz froid est mort lors de la première application suite à un arrêt cardiaque.

2. La température cutanée moyenne n'était pas significativement différente entre les deux groupes traités par cryothérapie.

Les températures cutanées moyenne et minimale sur les quatre sites de mesure ne différaient pas significativement entre les groupes traités par glace et gaz froid sur l'ensemble de la période de traitement (2-way ANOVA sur mesures répétées : **Fig. 11.**).

Figure 11. Evolution de la température cutanée chez les rats AIA traités par glace et gaz froid

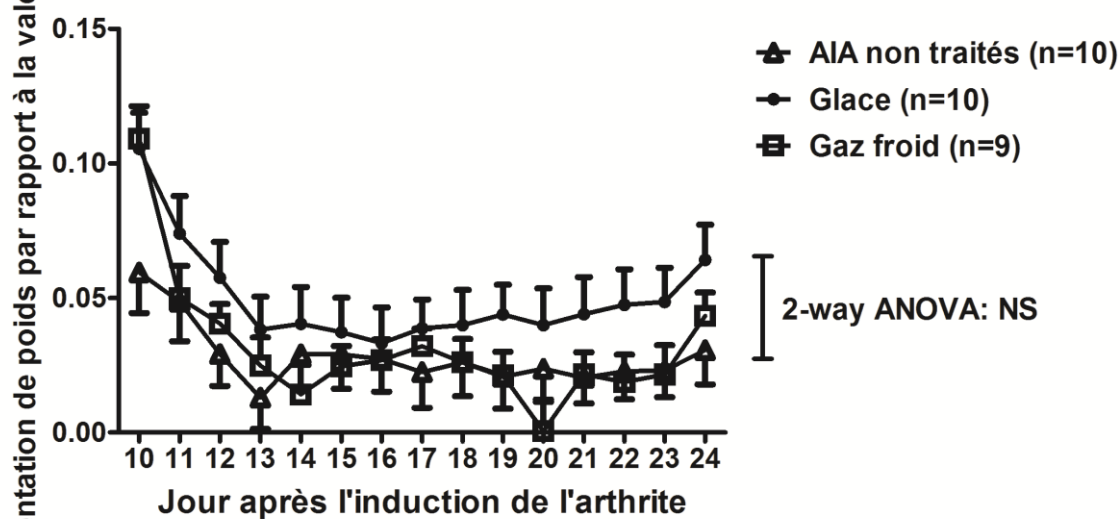


La température cutanée était mesurée juste après chacune des applications de froid sur les pattes arrières (glace ou gaz froid) sur les tarses et les chevilles des rats AIA traités en alternant l'ordre de mesure pour les 4 articulations après chaque séance. La température cutanée des rats était mesurée dans le même ordre que leur ordre de traitement (ordre qui alternait également entre les séances). Pour chaque animal et à chaque séance étaient recueillies la température cutanée moyenne sur les 4 sites de mesure (Fig. 11a.) ainsi que la température cutanée minimale (Fig. 11b.) sur ces mêmes 4 sites de mesure (2 tarses et 2 chevilles). Moyennes $\pm$ SEM. L'évolution globale moyenne des températures cutanées des 2 groupes de traitement étaient comparée sur 14 jours (2-way ANOVA avec post-tests de Bonferroni). NS : différence non significative.

Le traitement par glace a été effectué en mai 2014, le traitement par gaz froid en juin 2014. La température moyenne de la pièce était légèrement inférieure pour les rats traités par gaz froid par rapport à ceux traités par glace sur les 14 jours de traitement (température mesurée à 9h00 et 17h00) : $23.14^{\circ}\text{C} \pm 0.17$ versus $23.59 \pm 0.14^{\circ}\text{C}$; Wilcoxon ; $p=0.049$. Pour les rats traités par application de glace, la température moyenne au fond de la cage augmentait progressivement pendant la demi-heure de traitement de $-13.04 \pm 1.94^{\circ}\text{C}$ à $-6.32 \pm 1.36^{\circ}\text{C}$.

3. Le poids moyen ne différait pas entre les trois groupes de traitement tout au long des 14 jours de cryothérapie (**Fig. 12.**).

Figure 12. Evolution du gain pondéral (%) moyen dans les trois groupes de traitement.



Moyennes $\pm$ SEM. L'évolution globale moyenne des températures cutanées des 2 groupes de traitement étaient comparée sur 14 jours (2-way ANOVA avec post-tests de Bonferroni). NS : différence non significative.

4. La glace et le gaz froid amélioraient l'arthrite clinique selon deux profils de réponse distincts (**Fig. 13.**).

En nous basant sur notre revue systématique de la littérature [22], nous avons fait l'hypothèse qu'une cryothérapie locale appliquée deux fois par jour pendant 14 jours consécutifs pourrait avoir des effets thérapeutiques et anti-inflammatoires dans l'AIA, un modèle murin de PR. En considérant l'ensemble des 14 jours de traitement, par comparaison aux rats AIA non traités, l'application locale de glace réduisait significativement le score d'arthrite (2-way ANOVA sur mesures répétées pour le score global d'arthrite : $p=0.001$ (**Fig. 13a.**) ; pour le score d'arthrite aux pattes arrières : $p=0.002$ (résultat non montré). En utilisant la correction de Bonferroni, l'application locale de glace améliorait le score d'arthrite de J16 à J24. L'application locale de glace réduisait également significativement le diamètre moyen de cheville sur les 14 jours de traitement (2-way ANOVA sur mesures répétées: $p=0.0002$) avec une différence devenant significative par rapport aux rats AIA non traités de J17 à J24 (**Fig. 13b.**).

Concernant les rats AIA traités par application de gaz froid, la différence globale pour le score d'arthrite n'était pas significative sur les 14 jours de traitement ($p=0.89$ pour le score global d'arthrite (**Fig. 13c.**) et $p=0.18$ pour le score d'arthrite sur les pattes arrières (non montré). Cependant, les effets de ce traitement étaient biphasiques (aggravation initiale de l'arthrite à J11-J12 puis amélioration à J21-J24. La diminution globale du diamètre moyen des pattes arrières des rats AIA traités par gaz froid n'atteignait pas la significativité par rapport aux rats AIA non traités ($p=0,33$) mais, après une augmentation initiale, le diamètre moyen diminuait ensuite significativement lors des derniers jours de traitement (**Fig.13d.**).

Figure 13. Evolution du score d'arthrite et du diamètre des pattes arrières chez les rats AIA traités par glace et gaz froid comparés aux rats AIA non traités

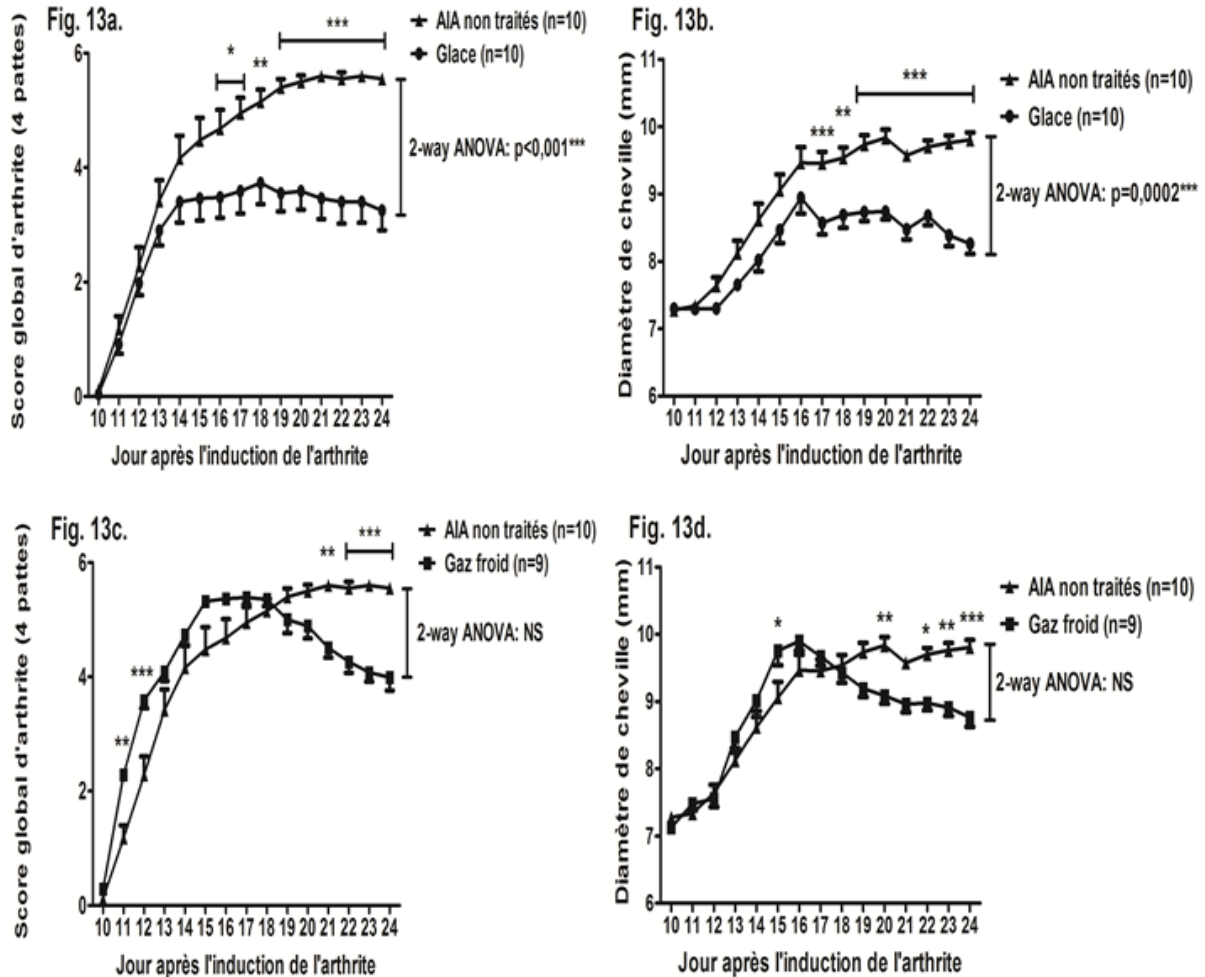


Fig. 13a. Score d'arthrite (Glace versus AIA non traités).

Fig. 13b. Diamètre des pattes arrières (Glace versus AIA non traités).

Fig. 13c. Score d'arthrite (Gaz froid versus AIA non traités).

Fig. 13d. Diamètre des pattes arrières (Gaz froid versus AIA non traités).

Moyennes $\pm$ SEM. Tests de Mann Whitney à chacun des temps de mesure. L'évolution globale moyenne des scores et diamètres moyens étaient comparée sur 14 jours (2-way ANOVA avec post-tests de Bonferroni).

NS : différence non significative. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Au total, le traitement par gaz froid induisait un profil de réponse thérapeutique biphasique sur le score d'arthrite et le diamètre de cheville, avec aggravation initiale puis amélioration en fin de traitement. La glace, quant à elle, améliorait les paramètres cliniques de manière graduelle à partir du 5^e jour d'application, avec une diminution du score d'arthrite et du diamètre de cheville significative sur l'ensemble des 14 jours. Nous avons ensuite essayé de déterminer si ces différences de profils de réponse clinique se traduisaient par des différences dans l'expression locale (pattes arrières) et systémique (plasma) de cytokines pro-inflammatoires après 14 jours de traitement.

5. La cryothérapie locale (glace et gaz froid) appliquée pendant 14 jours inhibait la transcription des gènes codant pour IL-6, IL-17A et IL-1 β dans les pattes arrières des rats AIA (**Fig. 14.**).

Nous avons fait l'hypothèse que l'hypothermie tissulaire induite par la cryothérapie locale pouvait inhiber la transcription des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires dans les pattes arrières traitées par inhibition du métabolisme enzymatique des voies NF-kB et COX-2 [34,94]. Nous avons donc évalué les niveaux d'expression des gènes codant pour IL-6, IL-17A, TNF- α , IL-1 β par Q-RT-PCR dans les pattes arrières des rats AIA à J24, après 14 jours de traitement par cryothérapie locale, versus rats AIA non traités et rats non AIA de même âge. Comme attendu, l'expression des gènes codant pour IL-6, IL-17A et IL-1 β était significativement plus élevée chez les rats AIA non traités comparativement aux rats non AIA (Wilcoxon, $p < 0,001$). Cependant, les taux de TNF- α n'étaient pas significativement plus élevés chez les rats AIA. La transcription du gène codant pour IL-6 était significativement down-régulée chez les rats AIA traités par glace et gaz froid (-59% et -63% respectivement ; $p < 0,001$) comparativement aux rats AIA non traités (**Fig. 14a.**). L'expression du gène codant pour IL-17A était également significativement down-régulée (-51% et -52% respectivement ; $p < 0,05$) (**Fig. 14b.**). La transcription du gène codant pour IL-1 β était également diminuée de 87% dans les deux groupes de traitement ($p < 0,0001$) (**Fig. 14c.**). En revanche, les niveaux d'expression du gène codant pour le TNF- α ne variaient pas significativement entre les groupes (**Fig. 14d.**).

Figure 14. Evolution des taux d'ARN messagers codant pour les cytokines pro-inflammatoires dans les pattes arrières des rats AIA traités par cryothérapie

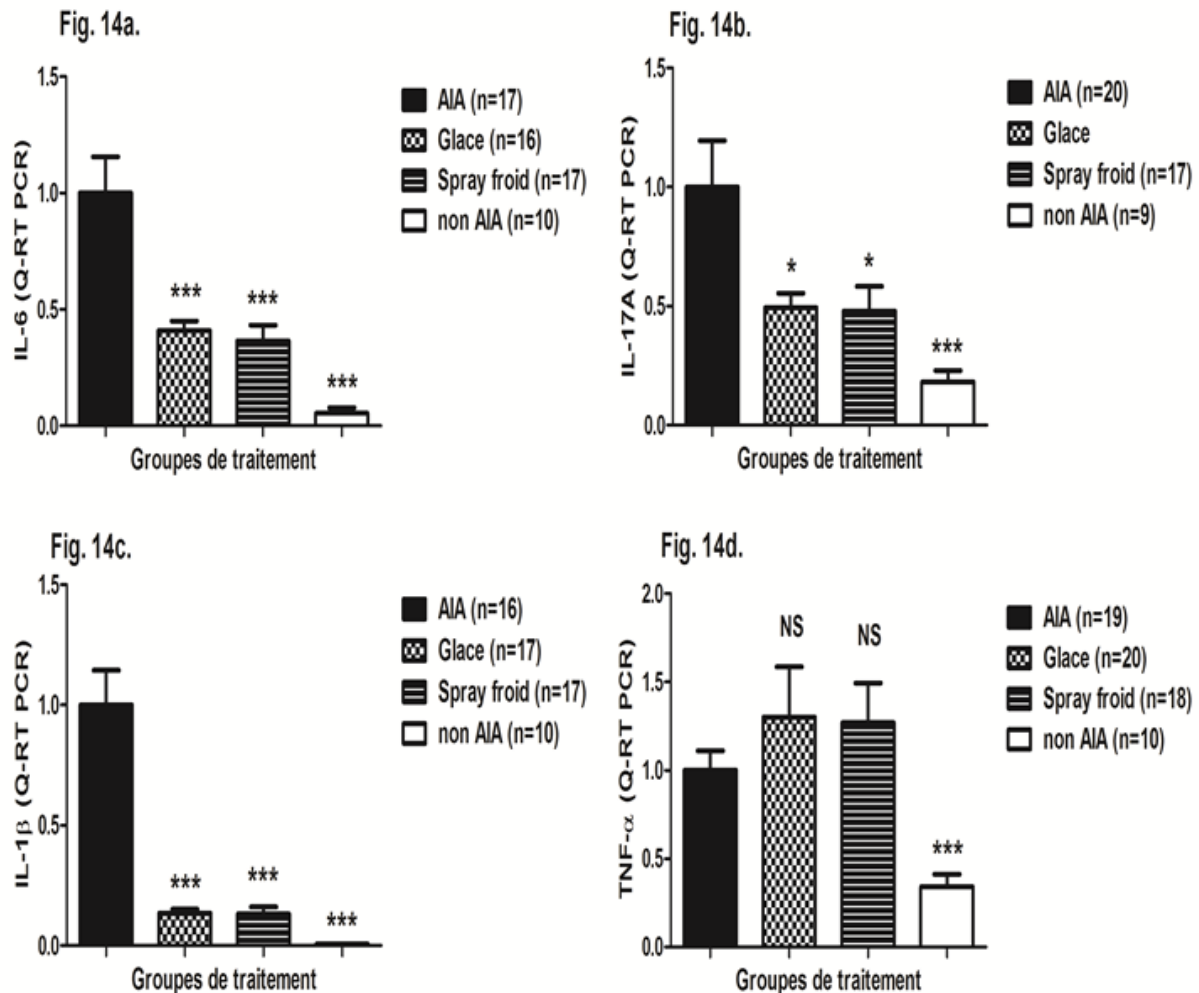


Fig. 14a. Transcription du gène codant pour IL-6 à J24 de l'induction.
 Fig. 14b. Transcription du gène codant pour IL-17A à J24 de l'induction (Q-RT-PCR).
 Fig. 14c. Transcription du gène codant pour IL-1β à J24 de l'induction (Q-RT-PCR).
 Fig. 14d. Transcription du gène codant pour TNF-α à J24 de l'induction (Q-RT-PCR).
 Moyennes ± SEM. Tests de Mann-Whitney. NS : différence non significative. Versus AIA non traités :
 *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Il existait également des corrélations significatives entre les niveaux d'expression des gènes codant pour IL-6, IL-17A, IL-1β et les paramètres cliniques (scores d'arthrite et diamètres de

cheville) sur les pattes arrières correspondantes en poolant les données de tous les groupes de traitement (Fig. 15.).

Figure 15. Corrélations entre les niveaux d'expression de cytokines dans les pattes arrières (PCR) et les paramètres cliniques à J24

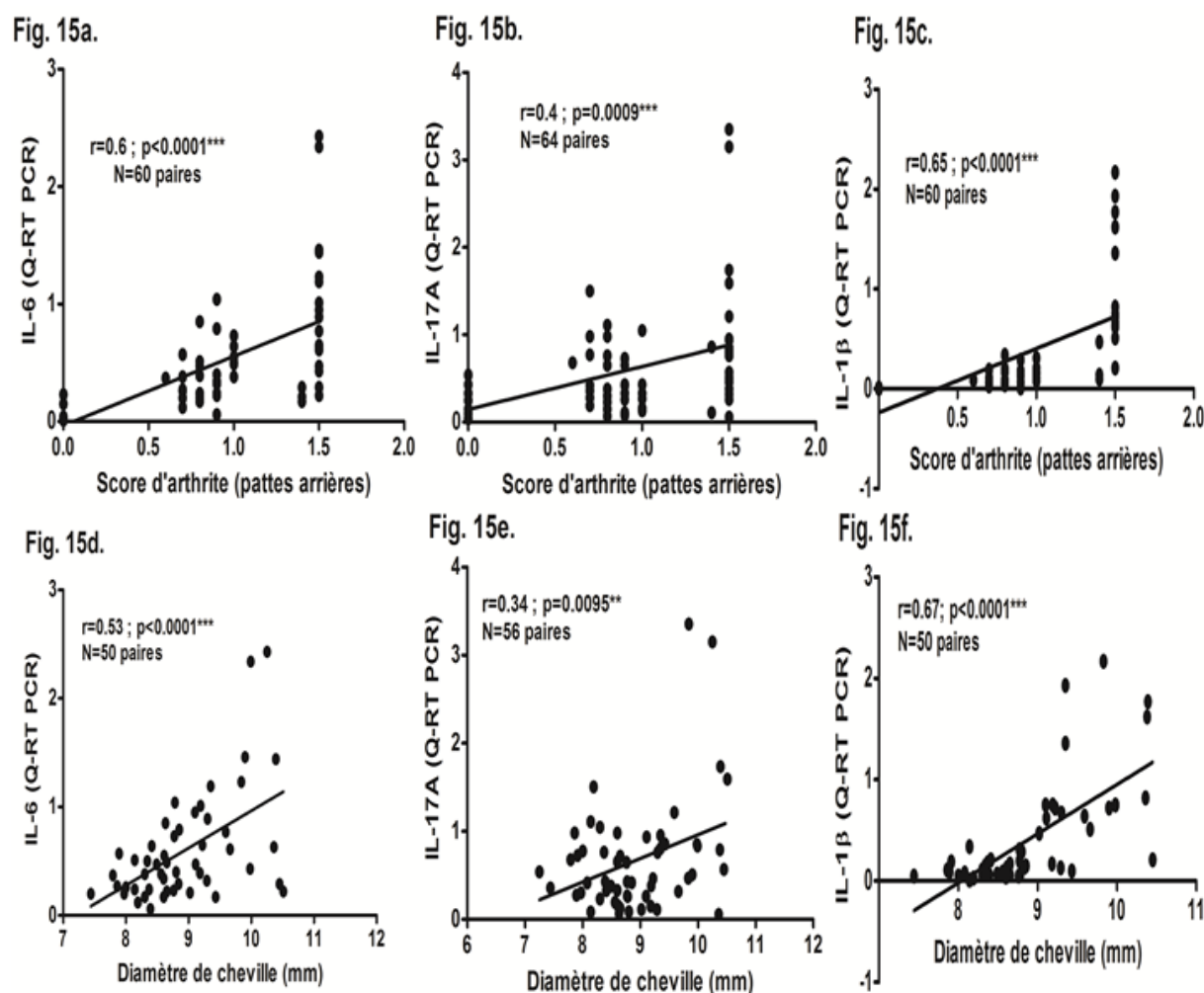


Fig. 15a. Corrélation entre IL-6 (ARNm) et score d'arthrite sur les pattes arrières.
 Fig. 15b. Corrélation entre IL-17A (ARNm) et score d'arthrite sur les pattes arrières.
 Fig. 15c. Corrélation entre IL-1 β (ARNm) et score d'arthrite sur les pattes arrières.
 Fig. 15d. Corrélation entre IL-6 (ARNm) et diamètre des pattes arrières.
 Fig. 15e. Corrélation entre IL-17A (ARNm) et diamètre des pattes arrières.
 Fig. 15f. Corrélation entre IL-1 β (ARNm) et diamètre des pattes arrières.
 Coefficients de corrélation de Pearson. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. Pour le score d'arthrite, les rats AIA traités par glace et gaz froid, les rats AIA non traités et les contrôles non AIA étaient pris en compte. Pour le diamètre des pattes arrières, les rats AIA traités et non traités étaient pris en compte.

En revanche, les niveaux de TNF- α ne corrélaient pas significativement avec ces mêmes paramètres cliniques (non montré).

Au total, ces données suggèrent que les effets locaux de la cryothérapie dans l'AIA pourraient être IL-6, IL-17A et IL-1 β dépendants par inhibition transcriptionnelle des gènes codant pour ces cytokines. Au contraire, les niveaux de TNF- α dans les pattes arrières n'étaient pas corrélés à l'inflammation clinique locale et ne variaient pas après application de froid.

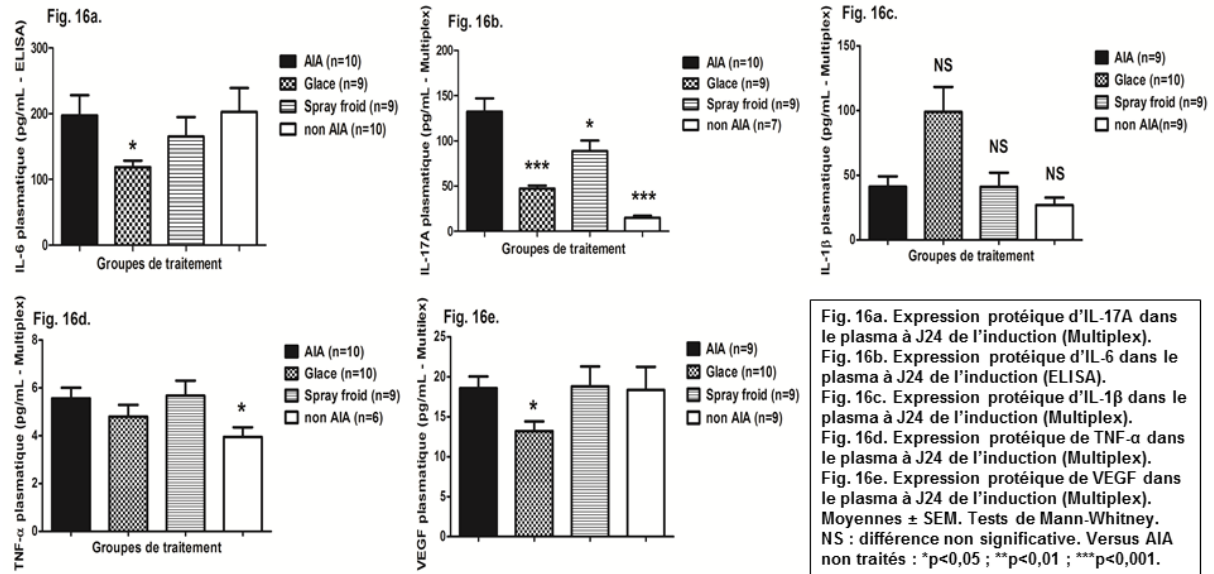
Nous nous sommes ensuite posé la question de savoir si ces effets anti-inflammatoires locaux de la cryothérapie s'accompagnaient sur le plan systémique de variations des taux plasmatiques de cytokines.

6. La cryothérapie locale réduisait significativement les taux plasmatiques d'IL-17A (et d'IL-6 pour la glace) après 14 jours de traitement (**Fig. 16.**).

Les niveaux d'expression protéique des cytokines plasmatiques étaient mesurés par technique Multiplex (IL-17A, TNF- α , IL-1 β) et par technique ELISA (IL-6) à J24 après l'induction de l'arthrite.

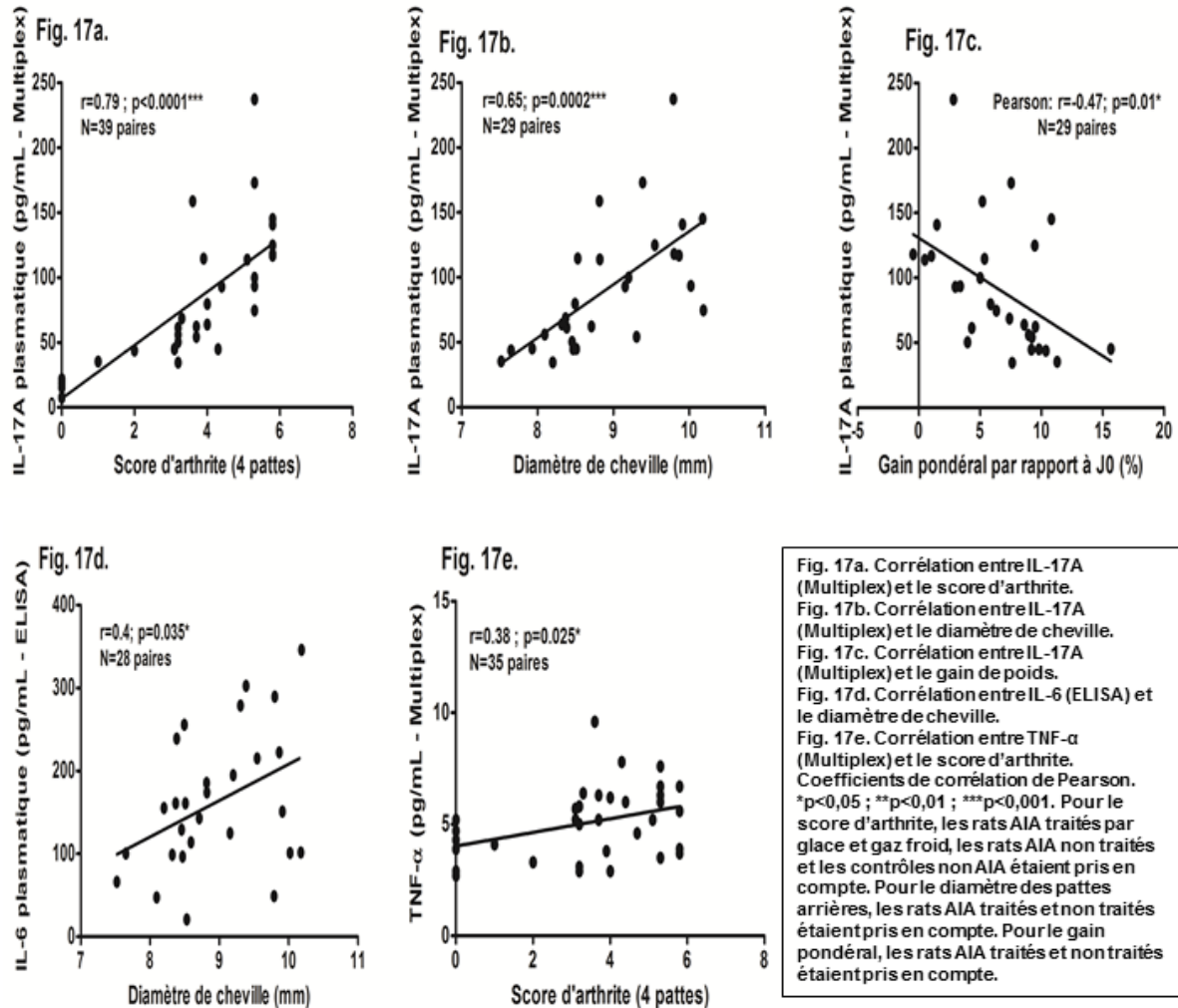
Les taux plasmatiques d'IL-17A et de TNF- α étaient significativement plus élevés chez les rats AIA comparativement aux contrôles non AIA (Mann-Whitney ; $p < 0.001$ et $p < 0.05$ respectivement). Les taux plasmatiques d'IL-17A étaient significativement plus bas chez les rats AIA traités par glace et gaz froid comparativement aux contrôles AIA non traités (Mann-Whitney ; $p < 0,0001$ et $p = 0,035$ respectivement) (**Fig. 16a.**). Les niveaux plasmatiques d'IL-6 étaient plus bas chez les rats AIA traités par glace (Mann-Whitney ; $p = 0,053$ – test t ; $p = 0,033$) (**Fig. 16b.**). Les taux plasmatiques de VEGF étaient également plus bas dans le groupe glace comparativement aux rats AIA non traités (Mann-Whitney ; $p = 0,013$). En revanche, les taux plasmatiques d'IL-1 β et de TNF- α ne variaient pas significativement chez les rats AIA traités par cryothérapie locale (**Fig. 16c. et 16d.**) et les taux d'IL-1 β tendaient même à augmenter chez les rats traités par glace (Mann-Whitney ; $p = 0,08$ – NS).

Figure 16. Niveaux plasmatiques de cytokines (Multiplex/ELISA) à J24 dans les groupes de traitement



En poolant les données de tous les groupes de traitement, les taux plasmatiques d'IL-17A à J24 corrélaient également positivement avec le score total d'arthrite (**Fig. 17a.**), le diamètre de cheville (**Fig. 17b.**) et négativement avec le gain de poids (**Fig. 17c.**), suggérant que l'effet anti-inflammatoire systémique de la cryothérapie locale pourrait être médié par la voie de l'IL-17A. Les taux d'IL-6 corrélaient positivement avec le diamètre de chevilles (**Fig. 17d.**). Les taux plasmatiques de TNF- α corrélaient également plus faiblement avec le score d'arthrite (**Fig. 17e.**). Les taux plasmatiques d'IL-17A et de TNF- α tendaient également à être corrélés aux niveaux d'expression des gènes correspondants dans les pattes arrières (Pearson ; $r=0,3$; $p=0,09$ et $r=0,3$; $p=0,08$ respectivement – non montré).

Figure 17. Corrélations entre les niveaux plasmatiques de cytokines (Multiplex/ELISA) et les paramètres cliniques à J24



Au total, ces résultats suggèrent un effet anti-inflammatoire systémique de la cryothérapie locale dans le modèle d'AIA, paraissant essentiellement médié par la voie Th-17.

C. Discussion.

En résumé, nous avons montré pour la première fois un effet thérapeutique et anti-inflammatoire de la cryothérapie locale appliquée de manière chronique dans le modèle d'AIA, les deux techniques (glace et gaz froid) améliorant le score d'arthrite et le diamètre des pattes arrières après 14 jours de traitement par comparaison aux rats arthritiques non traités. Toutefois, le traitement par gaz froid induisait un profil de réponse biphasique avec aggravation initiale et amélioration plus tardive des paramètres cliniques. Malgré tout, à J24, les deux techniques induisaient une diminution comparable de l'expression des gènes codant pour IL-6, IL-17A et IL-1 β dans les pattes arrières après 14 jours de traitement. Les deux techniques faisaient également baisser les taux plasmatiques d'IL-17A à J24, les variations plasmatiques de cette cytokine étant également corrélées avec l'amélioration des paramètres cliniques. L'application de glace faisait aussi baisser les niveaux plasmatiques d'IL-6 à J24. La cryothérapie locale n'avait en revanche aucun effet sur l'expression locale et systémique de TNF- α et des effets dissociés sur les taux d'IL-1 β (diminution locale dans les pattes arrières mais tendance à l'augmentation dans le plasma des rats AIA traités par glace).

Au total, ces données suggèrent que les effets thérapeutiques locaux et systémiques de la cryothérapie locale dans le modèle d'AIA pourraient être médiés principalement par l'axe cytokinique IL-6 – IL-17A, plutôt que par TNF- α et IL-1 β .

L'aggravation initiale des symptômes de l'arthrite chez les rats traités par gaz froid pourrait avoir été liée à un effet irritatif local, les animaux traités ayant en effet présenté une dépilation et un érythème cutané en regard de la zone d'application. La modalité d'application du gaz froid chez le petit animal devrait ainsi être optimisée pour en améliorer la tolérance (protection cutanée ? durées et périodicités d'application ?). Ces résultats soulignent par ailleurs le fait que la cryothérapie peut devenir pro-inflammatoire au-delà d'un certain seuil de

durée et d'intensité d'application. D'après nos résultats, l'application de glace induisait une amélioration plus précoce et globalement plus marquée des symptômes de l'arthrite sur les 14 jours de traitement. Ces effets apparaissaient dans notre étude après 5 à 6 jours de traitement, suggérant par analogie que plusieurs jours de traitement par cryothérapie locale pourraient être nécessaires pour obtenir des effets thérapeutiques et anti-inflammatoires significatifs chez les patients arthritiques.

Malgré ces profils de réponse clinique différents, après 14 jours, les deux traitements donnaient des résultats anti-inflammatoires biologiques similaires sur le plan local et systémique.

Les effets anti-inflammatoires de la cryothérapie locale dans l'AIA étaient surtout médiés par IL-6 et IL-17A, sans effet systémique sur les taux plasmatiques d'IL-1 β (tendance à l'augmentation) ni effet sur les taux de TNF- α dans les pattes arrières (ARNm) ni le plasma (protéine). Une des limites de cette étude in vivo est que les dosages de cytokines n'étaient effectués qu'après 14 jours de cryothérapie (J24). Ainsi, des effets plus précoces de la cryothérapie locale sur les taux d'IL-1 β et de TNF- α pourraient ne pas avoir été vus. D'autres études portant sur les effets des AINS et anti-COX-2 dans l'AIA avaient également montré des effets locaux et systémiques anti-IL-6 et/ou anti-IL-17 mais TNF- α indépendants [94,95]. D'autre part, dans une étude récente, les auteurs ne retrouvaient pas de variation significative des taux plasmatiques et synoviaux de TNF- α mesurés par technique multiplex tout au long de l'évolution de l'AIA mono-articulaire. La transcription du gène codant pour le TNF- α dans le tissu synovial arthritique était également moins soutenue dans le temps comparativement à celle du gène de l'IL-6, suggérant que ce modèle pourrait être plus IL-6 que TNF- α dépendant [92]. Dans notre modèle de rats AIA, notre équipe avait en outre montré que les taux plasmatiques de TNF- α mesurés par technique multiplex étaient davantage up-régulés à J30 de l'induction comparativement à J25. Nous dosons actuellement les taux protéiques de

cytokines dans les pattes arrières des rats AIA par Western Blot, à la demande du reviewer de l'**article 3. (§XIIA. – page 120)**, ce qui nous permettra de déterminer si la cryothérapie locale avait ou non des effets sur les taux protéiques de TNF- α dans les pattes arrières des rats AIA traités *in vivo*.

Concernant la tendance (non significative) à l'augmentation des taux plasmatiques d'IL-1 β chez les rats traités par glace (contrastant avec la diminution d'expression du gène codant pour IL-1 β dans les pattes arrières traitées, l'évolution des taux d'IL-6 et d'IL-17A et avec l'évolution clinique favorable de l'arthrite sous traitement), il aurait été intéressant de doser les taux plasmatiques d'IL-1RA, protéine susceptible de contrebalancer les effets de cette augmentation. Il a ainsi été montré que la cryothérapie locale post-exercice physique chez des sujets sains pouvait augmenter les taux plasmatiques d'IL-1RA, inhibiteur compétitif naturel du récepteur de l'IL-1 β [96].

Les taux plasmatiques d'IL-6 et d'IL-1 β n'étaient pas plus élevés chez les rats AIA comparativement aux contrôles non AIA à J24 (contrairement aux taux plasmatiques d'IL-17A et de TNF- α). Cependant, l'expression génique de ces deux cytokines était significativement plus élevée dans les pattes arrières des rats AIA, et nous avons tout de même pu montrer que l'application de glace réduisait significativement les taux plasmatiques d'IL-6 à J24, ainsi que l'expression de l'ARNm codant pour cette cytokine dans les pattes arrières traitées.

VIII- DISCUSSION GLOBALE.

Nous avons donc montré chez l'homme que la cryothérapie locale (glace ou CO₂ pulsé) appliquée deux fois à huit heures d'intervalle sur des genoux arthritiques était efficace sur la douleur, sur l'inflammation Doppler, et permettait une diminution des taux d'IL-6, d'IL-1 β ,

de VEGF mesurés par technique Multiplex dans le liquide articulaire entre deux ponctions réalisées à 24 heures d'intervalle.

Dans un modèle de culture de rotules de rats AIA (30°C versus 37°C), nous avons d'autre part montré *in vitro* que l'hypothermie tissulaire modérée correspondant à une application de glace sur une articulation arthritique (30°C pendant 2 heures) permettait une diminution des taux protéiques d'IL-6 et mais aussi de VEGF dans les surnageants de culture.

Enfin, dans le modèle d'AIA, nous avons montré *in vivo* que l'application sub-chronique (deux fois par jour pendant 14 jours consécutifs) de glace et de gaz froid sur les pattes arrières arthritiques améliorait nettement le score d'arthrite et le gonflement articulaire. La cryothérapie locale réduisait également significativement la transcription des gènes codant pour IL-6, IL-1 β , IL-17A mesurée par Q-RT-PCR dans des broyats de pattes arrières à l'issue des 14 jours de traitement. Nous avons aussi observé un effet systémique avec une réduction des taux plasmatiques d'IL-17A (et d'IL-6 et VEGF dans le groupe glace).

Ces résultats suggèrent un effet anti-inflammatoire de la cryothérapie principalement médié par une inhibition locale et systémique de l'expression génique et protéique de l'axe IL6-IL-17 dans l'arthrite, avec également un effet anti-angiogénique médié par une inhibition du VEGF. Les taux d'IL-1 β diminuaient également localement (liquide articulaire des patients, PCR sur pattes arrières des rats AIA) mais tendaient à augmenter légèrement dans les plasmas des rats AIA traités par glace.

Nous n'avons en revanche observé aucun effet de la cryothérapie locale sur l'expression génique et protéique du TNF- α dans les différents modèles étudiés, tant chez l'homme que chez l'animal. Les taux protéiques de TNF- α dans le plasma des rats AIA et l'expression du gène codant pour TNF- α dans les pattes arrières étaient toutefois – et de façon logique – plus élevés *in vivo* chez les rats AIA non traités comparativement aux contrôles non AIA, ce qui

écarter a priori l'hypothèse d'un problème technique lors des dosages. L'absence de détection *in vitro* de la protéine codant pour le TNF- α dans les explants de rotules de rats AIA pourrait être liée à des phénomènes enzymatiques locaux comme discuté précédemment. La réalisation de dosages protéiques de cytokines par Western Blot dans les pattes arrières des rats traités ou non permettra de mieux préciser l'expression protéique locale du TNF- α dans notre modèle.

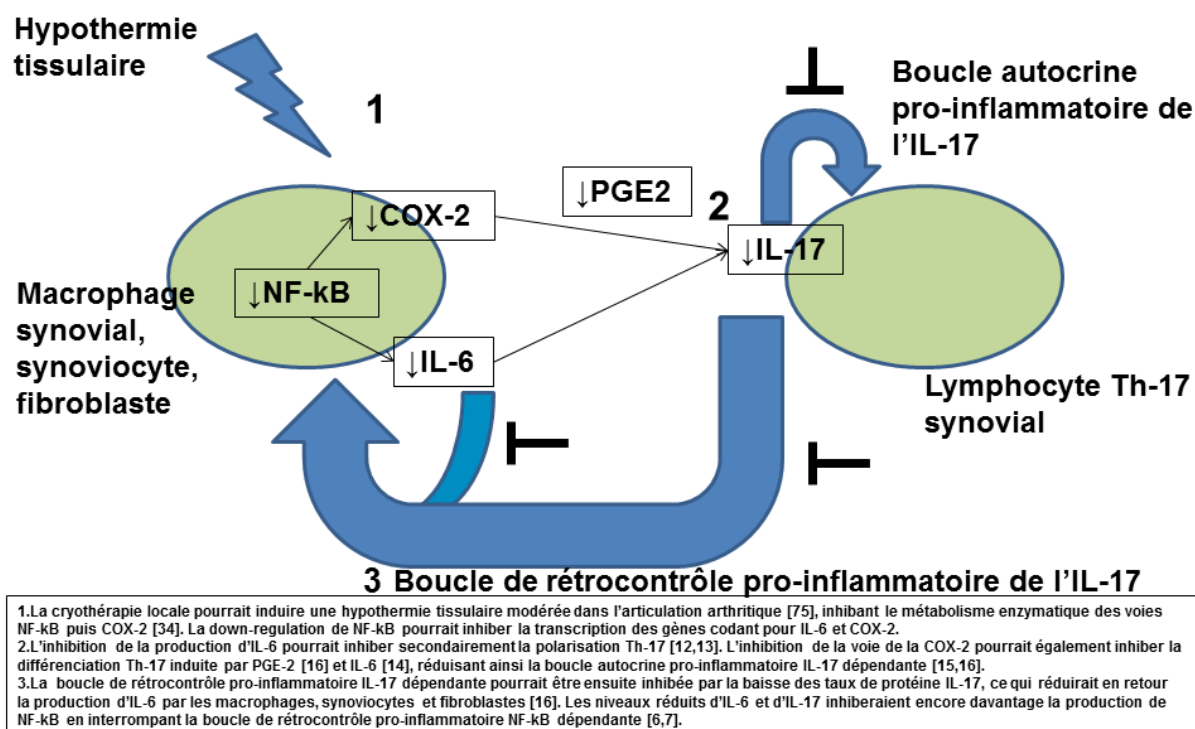
Sur l'ensemble des manipulations réalisées, il n'apparaissait pas chez l'homme de différence notable entre les techniques de cryothérapie par application de glace (30 minutes) et de CO₂ pulsé (2 minutes) hormis un effet taille plus constamment significatif au cours du temps (versus genoux controlatéraux non traités) sur 24 heures dans le groupe glace comparativement au groupe CO₂. Lors de l'application sub-chronique chez le rat AIA, nous avons toutefois noté une moins bonne efficacité clinique globale ainsi qu'une moins bonne tolérance de l'application de gaz froid (un rat décédé suite à un arrêt cardiaque lors de la première application, dépilation et érythème cutané en regard des zones de pulvérisation, effet pro-inflammatoire initial du gaz froid sur les paramètres cliniques sans conséquence sur l'inflammation biologique mesurée à J14). Sur le plan biologique, la glace semblait également avoir un effet systémique supérieur chez le rat avec une baisse des taux plasmatiques d'IL-6 et de VEGF à J14 en plus de la baisse des taux d'IL-17A constatée dans les deux groupes. Chez l'homme, la glace semblait faire baisser les taux d'IL-6 de façon plus marquée dans le liquide synovial sous réserve d'un manque de puissance dans le groupe traité par CO₂ pulsé.

Le groupe contrôle choisi chez l'homme était le genou controlatéral en cas de biarthrite (effectifs encore insuffisants pour conclure) mais les études chez les rats AIA étaient contrôlées (versus AIA non traités et versus contrôles non AIA) ce qui renforce la validité des résultats cliniques et biologiques obtenus dans le cadre de ce travail.

Le fait que les effets anti-cytokiniques puissent être plus marqués localement (PCR des pattes arrières dans le modèle d'AIA, liquide articulaire des patients traités par cryothérapie) que sur le plan systémique (plasma des rats AIA traités par cryothérapie locale) peut aisément se concevoir dans le cadre d'un traitement appliqué localement.

L'axe IL-6 / IL-17 joue un rôle majeur dans la genèse, l'activité et l'évolution structurale des rhumatismes inflammatoires (PR, spondyloarthrites notamment), IL-6 étant un facteur-clé de la différenciation Th-17, notamment dans les modèles murins d'arthrite tels que l'AIA [12–14]. Le fait que la cryothérapie locale appliquée ponctuellement inhibe l'expression d'IL-6 mais pas celle d'IL-17A (culture de rotules de rats AIA, liquide articulaire des patients arthritiques) tandis que la cryothérapie au long cours inhibe IL-6 et IL-17A (PCR sur pattes arrières de rats AIA, plasma des rats AIA traités par glace) pourrait être liée au fait que l'hypothermie tissulaire modérée inhibe la voie NF-kB (impliquée dans la production de cytokines, notamment IL-6, par les macrophages synoviaux) plus précocement que la voie COX-2 [34], cette dernière inhibant plus spécifiquement les cellules Th-17 [16]. De plus, IL-6 étant un facteur-clé de la différenciation Th-17, l'effet inhibiteur de la cryothérapie sur IL-6 pourrait entraîner secondairement une down-régulation plus retardée de la voie Th-17. Un modèle explicatif de cet effet anti-IL-6 précoce et anti-IL-17 plus tardif de la cryothérapie locale est proposé dans la **Fig. 18**.

Figure 18. Modèle explicatif de l'effet anti-IL-6 et anti-IL-17 de la cryothérapie locale dans l'arthrite.



L'effet anti-angiogénique de la cryothérapie par inhibition de la voie du VEGF (liquide articulaire de patients arthritiques, cultures de rotules, plasma des rats AIA traités) est également une donnée nouvelle. Il n'a pas été réalisé de PCR sur les pattes arrières de rats AIA pour cette cible en raison de niveaux d'expression faibles dans les broyats de pattes arrières sur une expérience préliminaire (données non montrées).

Les résultats concernant l'effet de la cryothérapie locale sur l'expression d'IL-1 β étaient plus discordants (baisse dans le liquide articulaire des patients arthritiques, pas d'effet dans les expériences de culture de rotules de rats AIA, baisse de la transcription du gène dans les pattes arrières des rats AIA après 14 jours de traitement mais avec une tendance à l'augmentation des taux plasmatiques chez les animaux traités par glace). Un dosage associé de l'antagoniste naturel de l'IL-1 β (IL-1RA) pourrait permettre de mieux préciser les effets de la cryothérapie sur cet axe cytokinique, qui représente toutefois une cible thérapeutique moins

pertinente dans les rhumatismes inflammatoires chez l'homme, notamment la PR (dont l'AIA est un modèle murin) et la spondyloarthrite [97].

IX- CONCLUSION GLOBALE ET PERSPECTIVES.

En conclusion, nous avons démontré pour la première fois un effet anti-inflammatoire clinique et biologique de la cryothérapie locale (Glace et CO₂ pulsé) en application courte (deux applications chez les patients arthritiques et hypothermie ponctuelle dans le modèle de culture de rotules de rats AIA) ou sub-chronique (rats AIA traités pendant 14 jours), chez l'homme et chez l'animal, in vivo et in vitro.

Les effets cliniques étaient significatifs sur la douleur (patients), le score d'arthrite et le diamètre des pattes arrières (rats AIA).

Les effets biologiques concernaient essentiellement l'axe IL-6 / IL-17 sur les plans génique et protéique, local et systémique.

Dans l'AIA, les effets cliniques apparaissaient essentiellement à partir de 5-6 jours de traitement par glace avec deux applications par jour. Cela suggère que la cryothérapie locale pourrait nécessiter des durées d'application plus prolongées que celles utilisées en soin courant pour obtenir un effet antalgique et anti-inflammatoire optimal.

Les modalités d'application devront également être évaluées afin d'optimiser la balance entre les effets anti-inflammatoires et pro-inflammatoires potentiels de la cryothérapie locale, notamment concernant l'application sub-chronique de gaz froid chez le rat (effet clinique pro-inflammatoire initial, mais avec ensuite une amélioration des paramètres cliniques de l'AIA et un effet biologique anti-inflammatoire local et systémique après 14 jours d'application).

Cet effet principalement médié par l'axe IL-6 / IL-17 de la cryothérapie locale (sans effet anti-TNF) pourrait également suggérer un effet adjuvant et synergique de la cryothérapie locale

potentiellement plus important chez les patients traités par anti-TNF- α comparativement aux traitements par anti-IL-6 (tocilizumab) ou anti-IL-17 (secukinumab prochainement disponible dans la spondyloarthrite).

Cet effet anti-inflammatoire local et systémique de la cryothérapie locale pourrait légitimer la réalisation d'essais contrôlés randomisés versus AINS et corticoïdes chez l'homme et chez l'animal afin de mieux préciser la place de la cryothérapie en tant que traitement adjuvant dans les stratégies thérapeutiques des rhumatismes inflammatoires. La cryothérapie présentant un excellent rapport coût / bénéfice / risque (avec une très bonne tolérance dans les études CDRI et ALGGAR), elle pourrait représenter une alternative (notamment en application sub-chronique sur des durées plus longues d'environ 14 jours) moins iatrogène aux traitements anti-inflammatoires classiques utilisés à titre adjuvant dans les rhumatismes inflammatoires chroniques (AINS, corticoïdes), ou permettre au moins une épargne médicamenteuse pour limiter le risque de iatrogénie, notamment chez les patients âgés ou fragiles.

Concernant les mécanismes biologiques, les expériences sur le modèle murin d'AIA et le liquide articulaire des patients arthritiques pourraient être complétées par des dosages complémentaires (NF- κ B, COX-2 au niveau génique et protéique, dosage des cytokines par Western-Blot (en cours sur les échantillons de pattes arrières de rats AIA), PCR VEGF dans les broyats de pattes arrières de rats AIA traités, dosages d'IL-1RA, d'IL-23 – acteur majeur de la différenciation Th-17 dans la spondyloarthrite, ...) afin de mieux caractériser les mécanismes moléculaires d'action de la cryothérapie locale dans les rhumatismes inflammatoires. Des échantillons de liquide articulaire de patients arthritiques (banque de liquide articulaire à l'EFS) ainsi que des broyats de pattes arrières de rats AIA traités ou non par cryothérapie sont encore utilisables pour des expériences complémentaires. Les aortes recueillies sur les rats AIA pourraient également permettre de rechercher d'éventuels effets de la cryothérapie locale sur la dysfonction endothéliale (voie de l'arginase). Les effets de la

cryothérapie locale sur les scores radiologiques et anatomopathologiques des rats AIA pourraient également faire l'objet d'autres études. Nous envisageons également de réaliser des analyses métabolomiques (liquide articulaire de patients arthritiques) afin d'évaluer les effets de la cryothérapie sur les agents du stress oxydatif (collaboration avec le Pr Dugué du CHRU de Poitiers).

La cryothérapie corps entier pourrait également faire l'objet d'évaluations de ce type chez l'homme et chez l'animal, même si aucune donnée actuelle ne suggère de supériorité de cette technique, par ailleurs plus coûteuse, sur la cryothérapie locale [22].

D'autres projets et collaborations sont en cours autour de l'axe « cryothérapie », qui a été labélisé par la FHU INCREASE :

- Effets de l'immersion en eau froide dans le cadre d'une collaboration internationale avec l'université de Santa Catarina (UDESC - Florianopolis - Brésil) avec la venue de Daniele Peres, doctorante brésilienne.

- Etude Rhumatex pilotée par le Dr Clément Prati sur les effets de la cryothérapie et de l'exercice physique sur la CRP dans la PR.

- La collaboration avec le Brésil s'est par ailleurs traduite par une mobilité de X.G à Florianopolis (1^{er}-15 octobre 2016) afin de prolonger les études CDRI et ALGGAR chez des patients PR brésiliens (population ayant un accès moindre aux biothérapies), en testant des durées d'application plus prolongées (deux applications par jour pendant 14 jours) et avec inclusion de groupes de patients contrôles (non traités, AINS, corticoïdes ou exercice physique pendant 14 jours) en collaboration avec le Pr Susana Cristina Domenech (Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) - Centro de Ciências da Saúde e do Esporte - Departamento de Ciências da Saúde - Laboratório de Instrumentação – LABIN. Rua Paschoal Simone, 358. 88080-350 Florianópolis - SC Brasil Tel: +55 48 36648671) et le Pr

Ivanio Pereira, chef du service de rhumatologie de l'hôpital fédéral de Florianópolis (UFSC – UNISUL-SC). Une nouvelle étude comparative est par ailleurs prévue sur le modèle d'arthrite à l'adjuvant (cryothérapie par glace versus exercice, AINS et corticoïdes dans l'AIA pendant 14 jours avec induction secondaire d'un sepsis), en collaboration avec le Pr Jamil du département de pharmacologie de l'université fédérale de Florianópolis (UFSC) et le Pr Deborah de Camargo Hizume Kunzler (DFIS - UDESC).

X- REFERENCES.

- 1 Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 2008;**118**:3537–45. doi:10.1172/JCI36389
- 2 Schett G, Elewaut D, McInnes IB, *et al.* How cytokine networks fuel inflammation: Toward a cytokine-based disease taxonomy. *Nat Med* 2013;**19**:822–4. doi:10.1038/nm.3260
- 3 de Punder YMR, van Riel PLCM. Rheumatoid arthritis: understanding joint damage and physical disability in RA. *Nat Rev Rheumatol* 2011;**7**:260–1. doi:10.1038/nrrheum.2011.49
- 4 Semb AG, Kvien TK, DeMicco DA, *et al.* Effect of intensive lipid-lowering therapy on cardiovascular outcome in patients with and those without inflammatory joint disease. *Arthritis Rheum* 2012;**64**:2836–46. doi:10.1002/art.34524
- 5 Solomon DH, Reed GW, Kremer JM, *et al.* Disease activity in rheumatoid arthritis and the risk of cardiovascular events. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 2015;**67**:1449–55. doi:10.1002/art.39098
- 6 Sultana F, Rasool M. A novel therapeutic approach targeting rheumatoid arthritis by combined administration of morin, a dietary flavanol and non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin with reference to pro-inflammatory cytokines, inflammatory enzymes, RANKL and transcription factors. *Chem Biol Interact* 2015;**230**:58–70. doi:10.1016/j.cbi.2015.02.007
- 7 Morel J, Berenbaum F. Signal transduction pathways: new targets for treating rheumatoid arthritis. *Jt Bone Spine Rev Rhum* 2004;**71**:503–10. doi:10.1016/j.jbspin.2004.03.004
- 8 Wright HL, Thomas HB, Moots RJ, *et al.* Interferon gene expression signature in rheumatoid arthritis neutrophils correlates with a good response to TNFi therapy. *Rheumatol Oxf Engl* 2015;**54**:188–93. doi:10.1093/rheumatology/keu299
- 9 Atsumi T, Yamamoto K, Takeuchi T, *et al.* The first double-blind, randomised, parallel-group certolizumab pegol study in methotrexate-naïve early rheumatoid arthritis patients with poor prognostic factors, C-OPERA, shows inhibition of radiographic progression. *Ann Rheum Dis* Published Online First: 2 July 2015. doi:10.1136/annrheumdis-2015-207511
- 10 Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009;**361**:888–98. doi:10.1056/NEJMra0707449

- 11 Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 2012;**11**:763–76. doi:10.1038/nrd3794
- 12 Bettelli E, Korn T, Oukka M, *et al.* Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008;**453**:1051–7. doi:10.1038/nature07036
- 13 Bettelli E, Carrier Y, Gao W, *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;**441**:235–8. doi:10.1038/nature04753
- 14 Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 2010;**40**:1830–5. doi:10.1002/eji.201040391
- 15 Lubberts E. The IL-23-IL-17 axis in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2015;**11**:415–29. doi:10.1038/nrrheum.2015.53
- 16 Paulissen SMJ, van Hamburg JP, Davelaar N, *et al.* Synovial fibroblasts directly induce Th17 pathogenicity via the cyclooxygenase/prostaglandin E2 pathway, independent of IL-23. *J Immunol Baltim Md 1950* 2013;**191**:1364–72. doi:10.4049/jimmunol.1300274
- 17 Cornelissen F, Asmawidjaja PS, Mus AMC, *et al.* IL-23 dependent and independent stages of experimental arthritis: no clinical effect of therapeutic IL-23p19 inhibition in collagen-induced arthritis. *PLoS One* 2013;**8**:e57553. doi:10.1371/journal.pone.0057553
- 18 Corneth OBJ, Mus AMC, Asmawidjaja PS, *et al.* Absence of interleukin-17 receptor a signaling prevents autoimmune inflammation of the joint and leads to a Th2-like phenotype in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 2014;**66**:340–9. doi:10.1002/art.38229
- 19 Atzeni F, Turiel M, Caporali R, *et al.* The effect of pharmacological therapy on the cardiovascular system of patients with systemic rheumatic diseases. *Autoimmun Rev* 2010;**9**:835–9. doi:10.1016/j.autrev.2010.07.018
- 20 Demoulin C, Vanderthommen M. Cryotherapy in rheumatic diseases. *Jt Bone Spine Rev Rhum* 2012;**79**:117–8. doi:10.1016/j.jbspin.2011.09.016
- 21 Welch V, Brosseau L, Shea B, *et al.* Thermotherapy for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev* 2001;:CD002826. doi:10.1002/14651858.CD002826
- 22 Guillot X, Tordi N, Mourot L, *et al.* Cryotherapy in inflammatory rheumatic diseases: a systematic review. *Expert Rev Clin Immunol* 2014;**10**:281–94. doi:10.1586/1744666X.2014.870036
- 23 Hirvonen HE, Mikkelsen MK, Kautiainen H, *et al.* Effectiveness of different cryotherapies on pain and disease activity in active rheumatoid arthritis. A randomised single blinded controlled trial. *Clin Exp Rheumatol* 2006;**24**:295–301.
- 24 Gizińska M, Rutkowski R, Romanowski W, *et al.* Effects of Whole-Body Cryotherapy in Comparison with Other Physical Modalities Used with Kinesiotherapy in Rheumatoid Arthritis. *BioMed Res Int* 2015;**2015**:409174. doi:10.1155/2015/409174
- 25 Jastrzębek R, Straburzyńska-Lupa A, Rutkowski R, *et al.* Effects of different local cryotherapies on systemic levels of TNF- α , IL-6, and clinical parameters in active rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2013;**33**:2053–60. doi:10.1007/s00296-013-2692-5

- 26 Orlova E, Karateev D. Efficacy of complex rehabilitation of patients with early rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2012;:466.
- 27 Braun K-P, Brookman-Amis S, Geissler K, *et al.* [Whole-body cryotherapy in patients with inflammatory rheumatic disease. A prospective study]. *Med Klin Munich Ger* 1983 2009;**104**:192–6. doi:10.1007/s00063-009-1031-9
- 28 Gizinska M, Straburzynska-Lupa A, Romanowski W, *et al.* The influence of whole-body cryotherapy (-110°C) and kinesitherapy on selected functional parameters and DAS28 in female patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2010;:719.
- 29 Samborski W, Lisinski P, Sobieska M. An effectiveness of kinesis therapy preceded by cryotherapy in rheumatoid arthritis patients with coxitis. *Ann. Rheum. Dis.* 2006;:613.
- 30 Oosterveld FG, Rasker JJ, Jacobs JW, *et al.* The effect of local heat and cold therapy on the intraarticular and skin surface temperature of the knee. *Arthritis Rheum* 1992;**35**:146–51.
- 31 Yenari MA, Han HS. Influence of hypothermia on post-ischemic inflammation: role of nuclear factor kappa B (NFkappaB). *Neurochem Int* 2006;**49**:164–9. doi:10.1016/j.neuint.2006.03.016
- 32 Suehiro E, Fujisawa H, Akimura T, *et al.* Increased matrix metalloproteinase-9 in blood in association with activation of interleukin-6 after traumatic brain injury: influence of hypothermic therapy. *J Neurotrauma* 2004;**21**:1706–11. doi:10.1089/neu.2004.21.1706
- 33 Harris ED, McCroskey PA. The influence of temperature and fibril stability on degradation of cartilage collagen by rheumatoid synovial collagenase. *N Engl J Med* 1974;**290**:1–6. doi:10.1056/NEJM197401032900101
- 34 Diestel A, Roessler J, Berger F, *et al.* Hypothermia downregulates inflammation but enhances IL-6 secretion by stimulated endothelial cells. *Cryobiology* 2008;**57**:216–22. doi:10.1016/j.cryobiol.2008.08.005
- 35 Zhang H, Zhou M, Zhang J, *et al.* Therapeutic effect of post-ischemic hypothermia duration on cerebral ischemic injury. *Neurol Res* 2008;**30**:332–6. doi:10.1179/174313208X300279
- 36 Miller E, Markiewicz Ł, Saluk J, *et al.* Effect of short-term cryostimulation on antioxidative status and its clinical applications in humans. *Eur J Appl Physiol* 2012;**112**:1645–52. doi:10.1007/s00421-011-2122-x
- 37 Dugué B, Smolander J, Westerlund T, *et al.* Acute and long-term effects of winter swimming and whole-body cryotherapy on plasma antioxidative capacity in healthy women. *Scand J Clin Lab Invest* 2005;**65**:395–402. doi:10.1080/00365510510025728
- 38 Cao J, Xu J, Li W, *et al.* Influence of selective brain cooling on the expression of ICAM-1 mRNA and infiltration of PMNLs and monocytes/macrophages in rats suffering from global brain ischemia/reperfusion injury. *Biosci Trends* 2008;**2**:241–4.
- 39 Pournot H, Bieuzen F, Duffield R, *et al.* Short term effects of various water immersions on recovery from exhaustive intermittent exercise. *Eur J Appl Physiol* 2011;**111**:1287–95. doi:10.1007/s00421-010-1754-6
- 40 Leppäluoto J, Westerlund T, Huttunen P, *et al.* Effects of long-term whole-body cold exposures on plasma concentrations of ACTH, beta-endorphin, cortisol, catecholamines and

cytokines in healthy females. *Scand J Clin Lab Invest* 2008;**68**:145–53.
doi:10.1080/00365510701516350

- 41 Brenner IK, Castellani JW, Gabaree C, *et al.* Immune changes in humans during cold exposure: effects of prior heating and exercise. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 1999;**87**:699–710.
- 42 Straub RH, Pongratz G, Hirvonen H, *et al.* Acute cold stress in rheumatoid arthritis inadequately activates stress responses and induces an increase of interleukin 6. *Ann Rheum Dis* 2009;**68**:572–8. doi:10.1136/ard.2008.089458
- 43 Lange U, Uhlemann C, Müller-Ladner U. [Serial whole-body cryotherapy in the criostream for inflammatory rheumatic diseases. A pilot study]. *Med Klin Munich Ger* 1983 2008;**103**:383–8. doi:10.1007/s00063-008-1056-5
- 44 Wojtecka-Lukasik E, Ksiezopolska-Orlowska K, Gaszewska E, *et al.* Cryotherapy decreases histamine levels in the blood of patients with rheumatoid arthritis. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al* 2010;**59 Suppl 2**:S253-255. doi:10.1007/s00011-009-0144-1
- 45 Istrati J, Suszko R, Iwaniec T, *et al.* The effect of the whole-body cooling therapy on the fibrinolytic system in blood. The pilot study. *Ann Rheum Dis* 2003;**62**.
- 46 Schlesinger N, Detry MA, Holland BK, *et al.* Local ice therapy during bouts of acute gouty arthritis. *J Rheumatol* 2002;**29**:331–4.
- 47 Stanek A, Sieroń A, Cieślar G, *et al.* The impact of whole-body cryotherapy on parameters of spinal mobility in patients with ankylosing spondylitis. *Ortop Traumatol Rehabil* 2005;**7**:549–54.
- 48 Bettoni L, Bonomi FG, Zani V, *et al.* Effects of 15 consecutive cryotherapy sessions on the clinical output of fibromyalgic patients. *Clin Rheumatol* 2013;**32**:1337–45. doi:10.1007/s10067-013-2280-9
- 49 Drynda S, Mika O, Kekow J. Impact of whole-body cryotherapy on gene expression of peripheral blood cells in patients with fibromyalgia. *Ann. Rheum. Dis.* 2015;**309**.
- 50 Brosseau L, Yonge KA, Robinson V, *et al.* Thermotherapy for treatment of osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;:CD004522. doi:10.1002/14651858.CD004522
- 51 Chatap G, De Sousa A, Giraud K, *et al.* Pain in the elderly: Prospective study of hyperbaric CO2 cryotherapy (neurocryostimulation). *Jt Bone Spine Rev Rhum* 2007;**74**:617–21. doi:10.1016/j.jbspin.2006.10.011
- 52 Ma S-Y, Je HD, Jeong JH, *et al.* Effects of whole-body cryotherapy in the management of adhesive capsulitis of the shoulder. *Arch Phys Med Rehabil* 2013;**94**:9–16. doi:10.1016/j.apmr.2012.07.013
- 53 Park K-N, Kwon O-Y, Weon J-H, *et al.* Comparison of the effects of local cryotherapy and passive cross-body stretch on extensibility in subjects with posterior shoulder tightness. *J Sports Sci Med* 2014;**13**:84–90.
- 54 Poppendieck W, Faude O, Wegmann M, *et al.* Cooling and performance recovery of trained athletes: a meta-analytical review. *Int J Sports Physiol Perform* 2013;**8**:227–42.

- 55 Pournot H, Bieuzen F, Louis J, *et al.* Time-course of changes in inflammatory response after whole-body cryotherapy multi exposures following severe exercise. *PLoS One* 2011;**6**:e22748. doi:10.1371/journal.pone.0022748
- 56 Bleakley C, McDonough S, Gardner E, *et al.* Cold-water immersion (cryotherapy) for preventing and treating muscle soreness after exercise. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;**2**:CD008262. doi:10.1002/14651858.CD008262.pub2
- 57 Ni S-H, Jiang W-T, Guo L, *et al.* Cryotherapy on postoperative rehabilitation of joint arthroplasty. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc Off J ESSKA* Published Online First: 14 June 2014. doi:10.1007/s00167-014-3135-x
- 58 Martimbianco ALC, Gomes da Silva BN, de Carvalho APV, *et al.* Effectiveness and safety of cryotherapy after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction. A systematic review of the literature. *Phys Ther Sport Off J Assoc Chart Physiother Sports Med* 2014;**15**:261–8. doi:10.1016/j.ptsp.2014.02.008
- 59 Carotti M, Salaffi F, Manganelli P, *et al.* Power Doppler sonography in the assessment of synovial tissue of the knee joint in rheumatoid arthritis: a preliminary experience. *Ann Rheum Dis* 2002;**61**:877–82.
- 60 Koski JM, Saarakkala S, Helle M, *et al.* Power Doppler ultrasonography and synovitis: correlating ultrasound imaging with histopathological findings and evaluating the performance of ultrasound equipments. *Ann Rheum Dis* 2006;**65**:1590–5. doi:10.1136/ard.2005.051235
- 61 Naredo E, Collado P, Cruz A, *et al.* Longitudinal power Doppler ultrasonographic assessment of joint inflammatory activity in early rheumatoid arthritis: predictive value in disease activity and radiologic progression. *Arthritis Rheum* 2007;**57**:116–24. doi:10.1002/art.22461
- 62 Kawashiri S, Kawakami A, Iwamoto N, *et al.* The power Doppler ultrasonography score from 24 synovial sites or 6 simplified synovial sites, including the metacarpophalangeal joints, reflects the clinical disease activity and level of serum biomarkers in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Oxf Engl* 2011;**50**:962–5. doi:10.1093/rheumatology/keq415
- 63 Szkudlarek M, Court-Payen M, Strandberg C, *et al.* Power Doppler ultrasonography for assessment of synovitis in the metacarpophalangeal joints of patients with rheumatoid arthritis: a comparison with dynamic magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum* 2001;**44**:2018–23. doi:10.1002/1529-0131(200109)44:9<2018::AID-ART350>3.0.CO;2-C
- 64 Backhaus M, Ohrndorf S, Kellner H, *et al.* Evaluation of a novel 7-joint ultrasound score in daily rheumatologic practice: a pilot project. *Arthritis Rheum* 2009;**61**:1194–201. doi:10.1002/art.24646
- 65 Beiteringer N, Ehrenstein B, Schreiner B, *et al.* The value of colour Doppler sonography of the knee joint: a useful tool to discriminate inflammatory from non-inflammatory disease? *Rheumatol Oxf Engl* 2013;**52**:1425–8. doi:10.1093/rheumatology/kev136
- 66 Iagnocco A, Finucci A, Ceccarelli F, *et al.* Power Doppler ultrasound monitoring of response to anti-tumour necrosis factor alpha treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Oxf Engl* 2015;**54**:1890–6. doi:10.1093/rheumatology/kev211

- 67 Keen HI, Hensor EMA, Wakefield RJ, *et al.* Ultrasound assessment of response to intra-articular therapy in osteoarthritis of the knee. *Rheumatol Oxf Engl* 2015;**54**:1385–91. doi:10.1093/rheumatology/keu529
- 68 Hammer HB, Bolton-King P, Bakkeheim V, *et al.* Examination of intra and interrater reliability with a new ultrasonographic reference atlas for scoring of synovitis in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2011;**70**:1995–8. doi:10.1136/ard.2011.152926
- 69 Hartung W, Kellner H, Strunk J, *et al.* Development and evaluation of a novel ultrasound score for large joints in rheumatoid arthritis: one year of experience in daily clinical practice. *Arthritis Care Res* 2012;**64**:675–82. doi:10.1002/acr.21574
- 70 Koski JM, Saarakkala S, Helle M, *et al.* Assessing the intra- and inter-reader reliability of dynamic ultrasound images in power Doppler ultrasonography. *Ann Rheum Dis* 2006;**65**:1658–60. doi:10.1136/ard.2005.051250
- 71 Strunk J, Strube K, Klingenberg P, *et al.* Two- and three-dimensional Doppler sonographic evaluation of the effect of local cryotherapy on synovial perfusion in wrist arthritis. *Rheumatol Oxf Engl* 2006;**45**:637–40. doi:10.1093/rheumatology/kel079
- 72 Albrecht K, Albert C, Lange U, *et al.* Different effects of local cryogel and cold air physical therapy in wrist rheumatoid arthritis visualised by power Doppler ultrasound. *Ann Rheum Dis* 2009;**68**:1234–5. doi:10.1136/ard.2008.096081
- 73 Ellegaard K, Torp-Pedersen S, Henriksen M, *et al.* Influence of recent exercise and skin temperature on ultrasound Doppler measurements in patients with rheumatoid arthritis—an intervention study. *Rheumatol Oxf Engl* 2009;**48**:1520–3. doi:10.1093/rheumatology/kep294
- 74 Guillot X, Tordi N, Prati C, *et al.* Effet antalgique et anti-inflammatoire de la cryothérapie locale : comparaison de deux techniques (glace et cryothérapie gazeuse) dans les rhumatismes inflammatoires. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* 2014;:A133.
- 75 Oosterveld FG, Rasker JJ. Effects of local heat and cold treatment on surface and articular temperature of arthritic knees. *Arthritis Rheum* 1994;**37**:1578–82.
- 76 Coassin M, Duncan KG, Bailey KR, *et al.* Hypothermia reduces secretion of vascular endothelial growth factor by cultured retinal pigment epithelial cells. *Br J Ophthalmol* 2010;**94**:1678–83. doi:10.1136/bjo.2009.168864
- 77 Gibbons H, Sato TA, Dragunow M. Hypothermia suppresses inducible nitric oxide synthase and stimulates cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide stimulated BV-2 cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2003;**110**:63–75.
- 78 Fernandes ES, Russell FA, Alawi KM, *et al.* Environmental cold exposure increases blood flow and affects pain sensitivity in the knee joints of CFA-induced arthritic mice in a TRPA1-dependent manner. *Arthritis Res Ther* 2016;**18**:7. doi:10.1186/s13075-015-0905-x
- 79 Weinberger A, Giler S. Treatment of inflammatory synovitis with ice application. *Arthritis Rheum* 1995;**38 Suppl**:S242.
- 80 Wojtecka-Lukasic E, Ksiezopolska-Orlowska K, Burakowski T, *et al.* Effect of cryotherapy on adjuvant arthritis in the rat. *Ann Rheum Dis* 2002;**61 Suppl**.

- 81 Semerano L, Gutierrez M, Falgarone G, *et al.* Diurnal variation of power Doppler in metacarpophalangeal joints of patients with rheumatoid arthritis: a preliminary study. *Ann Rheum Dis* 2011;**70**:1699–700. doi:10.1136/ard.2010.146761
- 82 Naredo E, Möller I, Cruz A, *et al.* Power Doppler ultrasonographic monitoring of response to anti-tumor necrosis factor therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;**58**:2248–56. doi:10.1002/art.23682
- 83 Naredo E, Rodríguez M, Campos C, *et al.* Validity, reproducibility, and responsiveness of a twelve-joint simplified power doppler ultrasonographic assessment of joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;**59**:515–22. doi:10.1002/art.23529
- 84 Gok M, Erdem H, Gogus F, *et al.* Relationship of ultrasonographic findings with synovial angiogenesis modulators in different forms of knee arthritides. *Rheumatol Int* 2013;**33**:879–85. doi:10.1007/s00296-012-2452-y
- 85 Perricone C, Ceccarelli F, Modesti M, *et al.* The 6-joint ultrasonographic assessment: a valid, sensitive-to-change and feasible method for evaluating joint inflammation in RA. *Rheumatol Oxf Engl* 2012;**51**:866–73. doi:10.1093/rheumatology/ker405
- 86 Hozo SP, Djulbegovic B, Hozo I. Estimating the mean and variance from the median, range, and the size of a sample. *BMC Med Res Methodol* 2005;**5**:13. doi:10.1186/1471-2288-5-13
- 87 Backhaus M, Burmester GR, Gerber T, *et al.* Guidelines for musculoskeletal ultrasound in rheumatology. *Ann Rheum Dis* 2001;**60**:641–9.
- 88 Ohrndorf S, Naumann L, Grundey J, *et al.* Is musculoskeletal ultrasonography an operator-dependent method or a fast and reliably teachable diagnostic tool? Interreader agreements of three ultrasonographers with different training levels. *Int J Rheumatol* 2010;**2010**:164518. doi:10.1155/2010/164518
- 89 Fiocco U, Sfriso P, Oliviero F, *et al.* Blockade of intra-articular TNF in peripheral spondyloarthritis: its relevance to clinical scores, quantitative imaging and synovial fluid and synovial tissue biomarkers. *Jt Bone Spine Rev Rhum* 2013;**80**:165–70. doi:10.1016/j.jbspin.2012.06.016
- 90 Mourot L, Cluzeau C, Regnard J. Hyperbaric gaseous cryotherapy: effects on skin temperature and systemic vasoconstriction. *Arch Phys Med Rehabil* 2007;**88**:1339–43. doi:10.1016/j.apmr.2007.06.771
- 91 van Hamburg JP, Mus A-M, de Bruijn MJW, *et al.* GATA-3 protects against severe joint inflammation and bone erosion and reduces differentiation of Th17 cells during experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;**60**:750–9. doi:10.1002/art.24329
- 92 Paquet J, Goebel J-C, Delaunay C, *et al.* Cytokines profiling by multiplex analysis in experimental arthritis: which pathophysiological relevance for articular versus systemic mediators? *Arthritis Res Ther* 2012;**14**:R60. doi:10.1186/ar3774
- 93 Oliver SJ, Brahn E. Combination therapy in rheumatoid arthritis: the animal model perspective. *J Rheumatol Suppl* 1996;**44**:56–60.

- 94 Anderson GD, Hauser SD, McGarity KL, *et al.* Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest* 1996;**97**:2672–9. doi:10.1172/JCI118717
- 95 Portanova JP, Zhang Y, Anderson GD, *et al.* Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *J Exp Med* 1996;**184**:883–91.
- 96 Nemet D, Meckel Y, Bar-Sela S, *et al.* Effect of local cold-pack application on systemic anabolic and inflammatory response to sprint-interval training: a prospective comparative trial. *Eur J Appl Physiol* 2009;**107**:411–7. doi:10.1007/s00421-009-1138-y
- 97 Furst DE. Anakinra: review of recombinant human interleukin-I receptor antagonist in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Ther* 2004;**26**:1960–75. doi:10.1016/j.clinthera.2004.12.019

XI- ABREVIATIONS.

PR: polyarthrite rhumatoïde

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

IL-1 β : Interleukine 1bêta

IL-6: Interleukine 6

TNF- α : tumor necrosis factor alpha

IL-17: Interleukine 17

NF-kB: Nuclear Factor kappa BAINS: anti-inflammatoires non stéroïdiens

COX-2: cyclo-oxygenase 2

AIA: arthrite à l'adjuvant

CIA : arthrite au collagène

AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens

DAS-28: disease activity score (28 joints)

NO: oxyde nitrique

DMARDs: disease modifying anti-rheumatic drugs

PnN: polynucléaires neutrophiles.

XII- ANNEXES.

A. Articles.

- **Article 1.**

EXPERT
REVIEWSCryotherapy in inflammatory
rheumatic diseases:
a systematic review

Expert Rev. Clin. Immunol. Early online, 1–14 (2014)

Xavier Guillo^{1,2},
Nicolas Tordi²,
Laurent Mourot³,
Céline Demougeot²,
Benoît Dugué⁴,
Clément Prati^{1,2} and
Daniel Wendling^{1,5}¹Department of Rheumatology,
University Hospital of Besançon,
boulevard Fleming, 25030 Besançon
Cedex, France²University of Franche-Comté, EA 4267,
Exercise Performance Health Innovation
Platform and Clinical Investigation
Center, Inserm Center CIT 808,
Franche-Comté University, Besançon
Cedex, France³University of Franche-Comté, EA 4660,
Exercise Performance Health Innovation
Platform and Clinical Investigation
Center, Inserm Center CIT 808,
Franche-Comté University, Besançon
Cedex, France⁴University of Poitiers, Laboratoire
"Vieillesse, Exercice, Mobilité
(MOVE) -EA6314, 86000 Poitiers Cedex,
France⁵University of Franche-Comté, EA 4266,
Pathogens and Inflammation,
Franche-Comté University, Besançon
Cedex, France*Author for correspondence:
Tel.: +33 038 166 8241
Fax: +33 038 166 8686
xguillo@chu-besancon.fr

The aim of this article was to review current evidence about cryotherapy in inflammatory rheumatic diseases (therapeutic and biological effects). For therapeutic effects, we performed a systematic review (PubMed, EMBASE, Cochrane Library, LILACS databases, unpublished data) and selected studies including non-operated and non-infected arthritic patients treated with local cryotherapy or whole-body cryotherapy. By pooling 6 studies including 257 rheumatoid arthritis (RA) patients, we showed a significant decrease in pain visual analogic scale (mm) and 28-joint disease activity score after chronic cryotherapy in RA patients. For molecular pathways, local cryotherapy induces an intrajoint temperature decrease, which might downregulate several mediators involved in joint inflammation and destruction (cytokines, cartilage-degrading enzymes, proangiogenic factors), but studies in RA are rare. Cryotherapy should be included in RA therapeutic strategies as an adjunct therapy, with potential corticosteroid and nonsteroidal anti-inflammatory drug dose-sparing effects. However, techniques and protocols should be more precisely defined in randomized controlled trials with stronger methodology.

Keywords: cryotherapy • cytokines • DAS28 • enzymes • pain VAS

Inflammatory joint diseases, such as rheumatoid arthritis (RA), represent a major public health concern, with both synovial inflammation causing joint destruction, pain and disability [1] and systemic inflammation thought to increase cardiovascular risk and mortality [23]. Recently, progress in immunology provided new therapeutic targets and new drugs such as biologic agents allowing to achieve clinical remission and prevent joint destruction [45]. These treatments, however, remain expensive, with rare but potentially life-threatening side effects such as infections [6]. Long-term nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and corticosteroids also have a well-known toxicity [7]. So the development of adjunct therapies in order to spare biologic and corticosteroid doses is a key focus in these diseases.

Cryotherapy is used empirically in a wide range of rheumatic diseases as a symptomatic treatment, with well-known analgesic, anti-phlogistic, myorelaxing, vasoconstrictive, anti-inflammatory, enzyme-blocking and antioxidative effects [8–10]. It can be used not only in inflammatory joint diseases (such as crystal-

induced arthritis, spondyloarthritis and RA [10]) but also in such painful rheumatic condition as osteoarthritis [89], fibromyalgia [11], shoulder capsulitis [12] and muscle damage [13]. Whole-body cryotherapy (WBC) also showed effects on bone biomarkers [14]. This adjunct treatment is cheap (at least for local cryotherapy [LC]) and generally well tolerated [15,16]. Technical modalities (local/general application, duration, number of sessions [17], and physical form) are very diverse and lack standardization [18]. This widespread use contrasts with a poor level of evidence [18]. Cryotherapy has been shown to decrease intra-articular temperature (T°C) in human knees to 30°C [19,20]. This intrajoint temperature is in the same range as therapeutic mild hypothermia used in several other medical fields. Mild hypothermia (28–34°C) has shown anti-inflammatory effects in healthy subjects [21,22] and in very diverse pathologies such as cerebral ischemia in humans [23] and murine models [23,24], traumatic tissue injury in murine models [25,26] and humans [27], hemorrhagic shock in rats [28], cardiac arrest in humans [29], coma in pigs [30],

coronary artery or cardiopulmonary bypass in humans [31], aortic ischemia/reperfusion in mice [32], mechanical ventilation in rats [33,34], postexercise hyperthermia in humans [35], age-related macular degeneration in culture experiments using a retinal cell line [36] and pancreatitis in rats [37]. These studies showed potential effects on important molecular/cellular mechanisms involved in synovial inflammation and joint destruction such as proinflammatory cytokines [21,23,38], VEGF [36], enzymatic pathways (metalloproteinases [39,40], collagenase [41]), adhesion molecules (ICAM-1) and white blood cell infiltrate formation in rats [42] and humans [43], oxidative stress in rats [24] and humans [44], norepinephrine in humans [24,45,46]. This suggests potential therapeutic effects in inflammatory rheumatic diseases such as RA, as some of these molecular pathways are known to be related to pain, disease activity scores including 28-joint disease activity score (DAS28), biological inflammation and radiologic joint damage.

The aim of this article is to review data and evidence concerning cryotherapy's effects in inflammatory rheumatic diseases.

First, we performed a systematic review of the literature about cryotherapy's therapeutic effects in rheumatic inflammatory joint diseases. The primary endpoints were pain assessed by visual analogic scale (VAS) and DAS28. The secondary endpoints were tolerance and molecular anti-inflammatory effects of cryotherapy in these diseases.

Cryotherapy effects on pain & disease activity in rheumatoid arthritis: systematic review

Methods

We followed the PRISMA statement checklist for meta-analysis and systematic review quality criteria [47].

Searching

We used PubMed, EMBASE, LILACS and Cochrane library databases. Keywords 'cryotherapy', 'cryotherapy arthritis', 'cryotherapy inflammation', 'cold', 'cold arthritis', 'cryostimulation' and 'WBC' were used alone and in combination. We considered articles with available abstracts in English, German, Spanish, French language and in referenced journals from their inception to March 2013. We also manually screened references cited in the selected articles, considered abstracts from rheumatology congresses (ACR, EULAR since 2001).

As concerns unpublished data, we considered the International Standard Randomised Controlled Trial Number Register [101], The National Institute of Health [102] and the WHO [103]. The screening was performed by two independent reviewers with discussion when needed in order to reach consensus.

Eligibility & study selection

Selection criteria for cryotherapy therapeutic effect evaluation were studies including inflammatory rheumatic disease patients (i.e., RA, microcrystals, peripheral spondyloarthritis) treated with LC or WBC, with endpoints evaluating pain and joint disease activity (pain VAS, erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein, DAS28 and Doppler activity). Articles

about postoperative joint cryotherapy and infectious diseases were excluded. We selected original articles, abstracts, reviews and meta-analyses. Duplicates were removed.

Quality assessment

For cryotherapy therapeutic effects, we analyzed technical cryotherapy modalities in detail (physical form and device, duration, skin or joint temperature).

The methodology was also evaluated: study population, randomization, blinding, control groups (other therapeutic modalities such as pharmacological treatments, physical therapy, different cryotherapy techniques or placebo groups), withdrawal and dropout reporting, as well as potential confounders (corticosteroids, NSAIDs, biologics, physical exercise, kinesiotherapy, BMI, considered joint) when assessed in the studies. Data extraction was performed by two independent reviewers.

Therefore, we assessed study quality based on specific validated scores depending on the study design. A JADAD 5-point scale was used for randomized controlled trials [48]. For non-randomized studies, we used the Newcastle-Ottawa Scale (NOS) system (0–9) [104]. Furthermore, a JADAD 11-point scale [48] was applied to all the selected studies whatever their design in order to compare them globally and to provide a general qualitative overview. Studies that scored six or higher using JADAD 11-point scale (3/5 with JADAD-5 and 5/9 with NOS) were considered to be of higher quality. This quality assessment was also performed by two independent reviewers.

Quantitative data synthesis

Most outcomes were continuous in nature (pain VAS, DAS28). When pooling data from different trials was possible, the principal measures of effect were means $\pm$ SD (weighted mean differences before/after cryotherapy or relative to control groups when possible). Heterogeneity was assessed graphically with 95% confidence intervals and statistically tested using Fisher's variance comparison tests. Heterogeneity threshold was calculated for each primary outcome ($F = 2.73$ or greater was significantly heterogeneous for pain VAS in patients treated with LC, $F = 2.7$ for pain VAS in WBC-treated patients, $F = 2.73$ for DAS28 in LC-treated patients and $F = 3.12$ in WBC-treated patients). We used a fixed effect model. Pooled means $\pm$ SD were compared before/after cryotherapy (within-group effect size; paired t tests; α risk 5%) and the mean differences before/after treatment were compared between cryotherapy-treated patients and control groups when available (between-group effect size; unpaired t tests; $\alpha = 5\%$; variance comparison using Fisher's test).

Data were analyzed using Statview[®] (SAS Institute Inc. Version 5.0) device. There were no *a priori* sensitivity and subgroup analyses. We also considered unpublished data in order to minimize publication bias.

Results

Flowchart

The Flowchart is shown in Figure 1.

Screening results

PubMed search (in English with abstracts) displayed 11,344 citations for 'cryotherapy' keyword on 4 March 2013. The keywords 'cryotherapy arthritis', 'cryotherapy inflammation', 'WBC', 'cold', 'cold arthritis', 'cold inflammation' and 'cryostimulation' showed 67, 346, 331, 108, 707, 733, 4355 and 31 results, respectively.

EMBASE database displayed 23,228 citations for 'cryotherapy' keyword, 22,632 results for 'cold', 1784 results for 'cold arthritis', 445 results for 'cryotherapy arthritis', 95 results for 'WBC', 17,445 results for 'cold inflammation', 3402 results for 'cryotherapy inflammation' and 32 results for 'cryostimulation'.

The LILACS database displayed 230 results for 'cryotherapy' keyword, 1 for 'cryotherapy arthritis', 7 for 'cryotherapy inflammation', 52 for 'WBC', 1479 results for 'cold' keyword, 6 for 'cold arthritis', 19 for 'cold inflammation' and 34 results for 'cryostimulation'.

In EULAR congress abstracts, we found 17 and 132 abstracts related to 'cryotherapy' and 'cold', respectively, since 2001 on EULAR website (ACR website: 21 abstracts related to 'cold' in 2006–2011, none related to 'cryotherapy').

The International Standard Randomised Controlled Trial Number Register website displayed 15 results for 'cryotherapy' keyword and 99 results for 'cold' keyword. The National Institutes of Health website displayed 188 results for 'cryotherapy' keyword (4 for 'cryotherapy arthritis', 5 for 'WBC') and 645 results for 'cold' keyword (16 for 'cold arthritis'). The WHO website displayed 1830 results for 'cryotherapy' keyword (56 for 'cryotherapy arthritis', 22 for 'whole body cryotherapy') and 3,020 results for 'cold' keyword (949 for 'cold arthritis').

Article selection process

First, articles were excluded on the basis of title and abstract: numerous records dealing with completely different scientific or medical fields such as dermatology, gynecology, urology, oncology, ophthalmology, infectious or lung diseases, chemistry, etc., very low temperature cell lysing-cryotherapy, local cryotherapy not applied to joints spine, etc. After duplicate removal, we found 511 records potentially dealing with cryotherapy in all types of joint diseases according to the titles and abstracts. After applying eligibility criteria, we screened 146 potentially relevant references in the field of therapeutic cryotherapy in inflammatory joint diseases.

Then, we excluded 124 articles for the following reasons: duplicates, articles related to postoperative cryotherapy, noninflammatory diseases, nonrheumatologic diseases, with inadequate outcomes or endpoints, lacking accuracy in cryotherapy

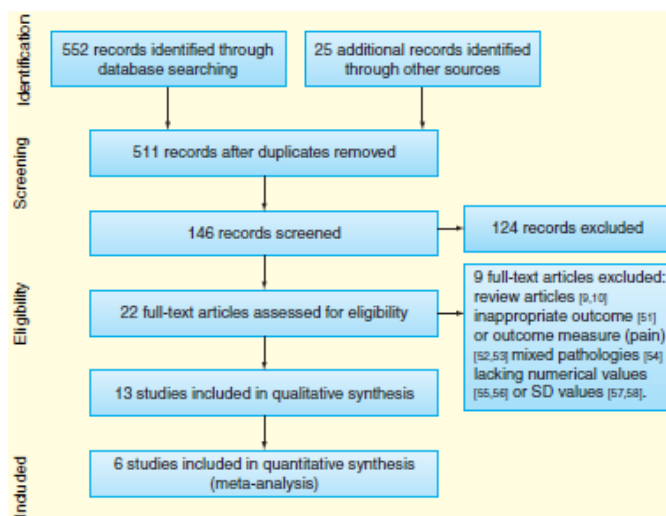


Figure 1. Study selection process.

DAS28: 28-joint Disease Activity Score (composite score including patient VAS for disease activity, acute-phase reactant (erythrocyte sedimentation rate or C-reactive protein), tender joint count and swollen joint score); LC: Local cryotherapy; RCT: Randomized controlled trial; SD: Standard deviation; VAS: Visual Analogic Scale; WBC: Whole-body cryotherapy.

technical description or numerical data reporting, with full text not available and insufficient data in the abstract.

A Cochrane meta-analysis including five RCT about cryotherapy in RA [49–53] was published in 2001 and updated in 2011 [18]. None of these articles were appropriate to be used in our meta-analysis, as summarized in **Table 1**. Two of the studies were performed in operated patients [49,50]. The outcomes [46,47] or outcome measures were inappropriate to our analysis [49,52,53]. Cold application was also probably insufficient in intensity [49,50], in duration [51] or periodicity [51–53]. Furthermore, hot packs used in three of the studies [50,52,53] could have proinflammatory properties [20] and therefore do not seem to be relevant treatments for control group.

The remaining articles (22 articles including 8 RCTs for therapeutic effects) were assessed for further evaluation on the basis of full-text article when available. Nine articles were further excluded [9,10,51–58].

The 13 remaining studies were potentially appropriate to be included in a meta-analysis. There were five RCTs, two nonrandomized controlled studies, three studies comparing several cryotherapy techniques in parallel treatment arms and three noncontrolled studies. Seven articles dealt with local cryotherapy [8,59–64], four with WBC [65–68] and two with both (**Figure 1**) [69,70].

Characteristics of the studies selected for quantitative analysis (cryotherapy therapeutic effects)

Study characteristics and quality assessment results are summarized in **Table 2**.

The endpoints were compared before and after cryotherapy.

Table 1. Cochrane meta-analysis: review of the five randomized controlled trials about cryotherapy.

Pathology	Joint	Endpoints	Postoperative cryotherapy (yes/no)	JADAD score (/5)	Cryotherapy modality	Control group	Reason for exclusion	Ref.
24 RA (ARA criteria)	Knees	Joint circumference Infrared thermography	No	2/5 R1BOW1	Crushed ice in damp towels (10 min daily for 10 days)	Contralateral joint (no cryotherapy)	Endpoints Insufficient cold exposure (duration)?	[51]
5 RA; 83 OA	Knees	Pain (PCA use)	Yes	3/5 R2BOW1	Thermal pad (50°F vs 60°F vs 70°F); duration? periodicity?	None	Postoperative cryotherapy Insufficient cold exposure (temperature)?	[49]
14 chronic RA (definite or classic RA)	20 knees	Pain (none = 0–5 = severe) assessed by two observers at the same time Stiffness, range of movement, knee circumference, skin temperature, patient preference	No	1/5 R1BOW0	Ice packs in damp towels (20 min, once a day for 10 days)	Hot packs (cross-over)	Pain assessment	[52]
Patients hospitalized for surgical procedures to the hand	30 hands	Edema evolution over preoperative volume	Yes	2/5 (R1BOW1)	Cold water immersion (10°C for 4 min; twice a day for 1 day)	Hot packs (n = 15)	Postoperative Endpoints Insufficient cold exposure (temperature and duration)?	[50]
18 recent RA (<5 years)	Shoulders	Pain (Mc Gill questionnaire) Range of movement	No	1/5 (R1BOW0)	Ice (20 min) + exercises program	Hot packs (n = 9)	Pain assessment	[53]

This meta-analysis performed in 2001 and updated in 2011 mixed studies with cold or heat application. It showed no significant effect on pain (primary endpoint), joint swelling, medication intake, range of motion, grip strength or hand function. No harmful side effect was reported [18]. The five RCTs about cryotherapy had limitations: the studies showed a great heterogeneity as concerns cryotherapy methods, treated joints, outcomes associated medications and physical exercise. The control groups were: hot packs in three studies and contralateral joint in one study. Heat application does not seem to be an appropriate control nor treatment group because it could increase joint inflammation and collagenase activity [20]. Cold exposure was probably insufficient in intensity and duration in some of the studies compared with more recent studies. ARA: American Rheumatism Association; B: Binding; OA: Osteoarthritis; PCA: Patient-controlled analgesia; R: Randomization; RA: Rheumatoid arthritis; W: Withdrawal (JADAD score).
Data taken from the articles cited in this table.

Table 2. Therapeutic effects of cryotherapy: articles included in the meta-analysis (n = 6).

Pathology/ joints (n)	LC/WBC (n)	Cryotherapy modalities	Control group (n)	Relevant endpoints (for meta-analysis) and evaluation times	JADAD 5/ NOS JADAD11	Bias/confounders	Ref.
RA (60 patients)	LC (n = 20) OR WBC (-60°C; n = 20) OR WBC (-110°C; n = 20)	Cold packs or cold air on 5 joints (-30°C; 10–30 or 1–5 min) OR WBC (-60°C OR -110°C; duration?) → Three-times a day; 7 days (20 applications)	None	Pain VAS DAS28 ESR CRP → Before; Day 7 'after the last cryotherapy' n = 20; 17;	R1BOW1 8/11	Associated kinesitherapy Corticosteroids (10/20; 14/20; 9/20); median dose 5 mg/day (25–15) NSAIDs: 16/20; 17/20; 18/20 DMARDs: 10/20; 9/20; 9/20 'cytostatics': 11/20; 14/20; 12/20 No change in pharmacological treatment. BMI: 25.7 ± 4 vs 24.6 ± 3.6 vs 28.3 ± 5.9 Biologics, physical exercise, skin/room TC: NA	[70]
RA (ACR; n = 40 patients)	LC (2 modalities)	Cold air (-30°C; 3 min; n = 20) OR Liquid nitrogen vapors (-160°C; 3 min; n = 20) → Twice a day (knees in the morning, 4 h break, then hands) for 10 days	None	Pain VAS DAS28 → Before and after 10 days of treatment	S3C102 6/11	Associated kinesitherapy and physical exercise Corticosteroids 28/40 DMARDs 40/40 Biologics: none No change in pharmacological treatment. BMI: 28.4 ± 4.5 and 28.2 ± 2.3 NSAIDs, skin/room TC	[61]
Early RA (n = 36 patients)	LC (n = 20 patients)	Cold air (-60°C; 15 min; 10 sessions; hands, knees or ankles) Included in a Complex Rehabilitation Program (40 min exercise, 40 min occupational therapy + 'Drug therapy'). Total duration?	'Drug therapy' only (n = 16)	Pain VAS DAS28 → Before and after treatment (10 days?)	S3C101 3/11	Corticosteroids, NSAIDs, DMARDs, biologics, kinesitherapy, skin/room TC, BMI: NA	[64]
RA (n = 48 patients), AS (n = 12)	WBC	WBC (-110°C for 3 min; twice a day) → Average number of sessions: 15.8 ± 8.37	None	Pain VAS DAS 28 (48 patients) BASDAI (12 patients) → Before and after treatment	S2C001 4/11	Associated kinesitherapy and physical exercise. No change in pharmacological treatment. Corticosteroids, NSAIDs, kinesitherapy, physical exercise, skin temperature, BMI: NA	[66]

ACR: American College of Rheumatology (Diagnostic criteria for rheumatoid arthritis); B: Binding; BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; C: Control group; CRP: C-reactive protein; DMARD: Disease activity-modifying drug; ESR: Erythrocyte sedimentation rate; LC: Local Cryotherapy; NA: Not assessed; NSAID: Nonsteroidal anti-inflammatory drug; O: Outcome measurement (NOS score); Pain VAS: pain Visual Analogic; RA: Rheumatoid arthritis; RCTs: R: Randomization; S: Sampling; Scale DAS28: 28 joint-disease activity score (composite score including patient VAS for disease activity, acute-phase reactant (ESR or CRP), tender joint count and swollen joint score); T: Temperature; W: Withdrawals (JADAD score); WBC: Whole-body cryotherapy
Data taken from the cited articles.

Table 2. Therapeutic effects of cryotherapy: articles included in the meta-analysis (n = 6) (cont.).

Pathology/ joints (n)	LC/WBC (n)	Cryotherapy modalities	Control group (n)	Relevant endpoints (for meta-analysis) and evaluation times	JADAD 5/ NOS JADAD11	Bias/confounders	Ref.
RA (ACR; n = 32 patients)	WBC (n = 15 patients)	WBC (-110°C for 3 min; once a day) + kinesiotherapy → 'Complex therapy' for 8 days	Low frequency magnetic field (20–40 Hz, 5–7 mT); 20 min; n = 17 patients + kinesiotherapy	Pain VAS DAS28 → Before and after treatment (8 days)	S4C101 5/11	Associated kinesiotherapy No change in pharmacological treatment. Corticosteroids, NSAIDs, physical exercise, skin temperature, BMI: NA	[67]
RA (ACR; n = 41 patients)	WBC	WBC (-160°C; 3–5 min; twice a day (6 h interval) for 15 days) + active exercises (45 min)	None	Pain VAS → Before and after treatment (15 days)	S3C101 3/11	Associated kinesiotherapy and physical exercise No change in pharmacological treatment. Corticosteroids, NSAIDs, DMARDs, biologics, skin temperature, BMI: NA	[68]

ACR: American College of Rheumatology (Diagnostic criteria for rheumatoid arthritis); B: Blinding; BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; C: Control groups; CRP: C-reactive protein; DMARD: Disease activity-modifying drug; ESR: Erythrocyte sedimentation rate; LC: Local Cryotherapy; NA: Not assessed; NSAID: Nonsteroidal anti-inflammatory drug; O: Outcome measurement (NOS score); Pain VAS: pain Visual Analogue; RA: Rheumatoid arthritis; RCTs: R: Randomization; S: Sampling; Scale DAS28: 28-joint disease activity score (composite score including patient VAS for disease activity, acute-phase reactant (ESR or CRP), tender joint count and swollen joint count); T: Temperature; W: Withdrawals (JADAD score); WBC: Whole-body cryotherapy
Data taken from the cited articles.

Cryotherapy modalities (technique, temperature, duration and periodicity) were heterogeneous. The main potential confounders were assessed when possible: Corticosteroid, NSAID, disease activity-modifying drug (DMARD), biologic intake, kinesiotherapy, physical exercise, room temperature. No serious adverse event was reported in any of the studies.

We could only perform a pooled quantitative analysis for two endpoints: pain VAS and DAS28 in RA patients. For that purpose, six studies were included in the quantitative data analysis (Table 2) [64,65,67–69,71]. Reasons for excluding the seven other studies [8,59–62,65,69] were: one duplicate [69], impossibility to combine data for power Doppler hypersignal endpoint due to different evaluation scores [59–61], as for gout patients: too different designs [62], one study mixed patients suffering from heterogeneous rheumatic diseases (inflammatory as well as noninflammatory) [65]. Straub and Hirvonen's studies were considered as duplicates as they were performed, at least partly, in the same patient cohort [69,70]. For WBC, we only considered -110°C-treated patients in Hirvonen's study [70].

Results: study quality assessment

Six studies including 257 RA patients were appropriate to be included in quantitative data synthesis. There was one RCT with 40 patients meeting the inclusion criteria [70], two controlled trials [63,64], two studies comparing parallel cryotherapy treatment groups [67,68] and one noncontrolled study [66].

The RCT scored 2 out of 5 (JADAD5 score) [70]. As for the five noncontrolled studies, the mean NOS quality score was 5 ± 1.2 [63,64,66–68]. Overall, the mean JADAD11 score for the six selected studies was 4.8 ± 1.9 . The quality scores for each study are displayed in Table 2.

Results: heterogeneity assessment

We could only perform quantitative analysis for two endpoints: pain VAS (mm) and DAS28 in RA patients after chronic application (7–15 days) (Figures 2 & 3) [63,64,66–68,70].

There was no significant heterogeneity between studies for pain VAS and DAS28 in LC or WBC-treated patients, as shown in Figures 2 & 3, displaying means and 95% confidence intervals. Fisher's tests showed $F_0 = 1.48$; p : [0.2; 0.3] for pain VAS after local cryotherapy (Figure 2A), $F_0 = 1.44$; p : [0.2; 0.3] for DAS28 after local cryotherapy (Figure 2B), $F_0 = 1.07$; p : [0.3; 0.5] for pain VAS after WBC (Figure 3A), $F_0 = 0.47$; p : [0.5; 0.9] for DAS28 after WBC (Figure 3B).

Paired t-tests were used to assess pain VAS and DAS28 evolution after cryotherapy.

As concerns local cryotherapy, the mean number of cold applications was 17.1 (ranging from 10 to 20), mean temperature of -70.3°C (-30 to -160) applied for 11.5 min (3–30).

As for WBC and pain VAS (mm), the mean number of applications was 20.2 (8–30) at a mean temperature of -126.5°C (-110 to -160) during 3.2 min (2–5).

Considering WBC and DAS28, the mean number of applications was 14.4 (8–20) at a temperature of -110°C during 2.8 min (2–3).

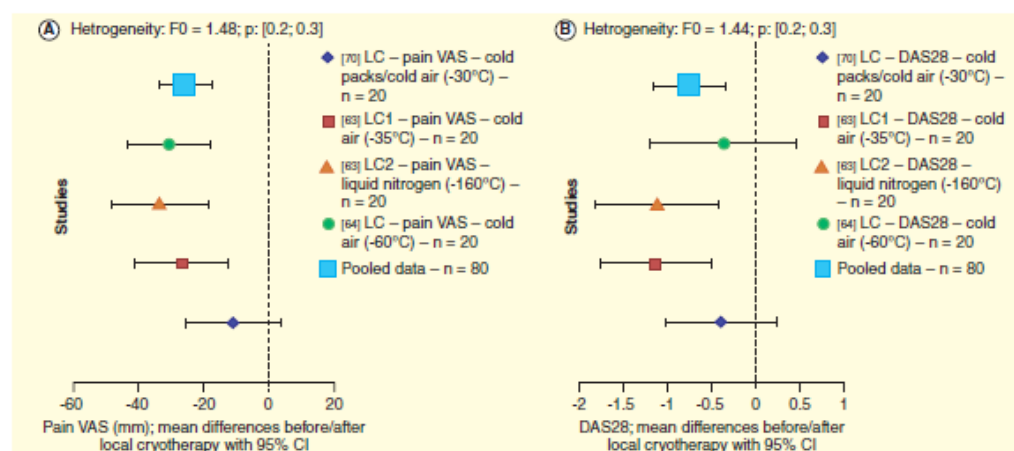


Figure 2. Effects of local cryotherapy on pain. VAS (A) and DAS28 (B). DAS28: 28-joint disease Activity Score (composite score including patient VAS for disease activity, acute-phase reactant (erythrocyte sedimentation rate or C-reactive protein), tender joint count and swollen joint score); LC: Local cryotherapy; VAS: Visual Analogue Scale. Data taken from the cited articles.

Results: primary outcomes (pain VAS & DAS28)

As concerns pain, LC (cold packs, cold air, liquid nitrogen applied on 1–5 joints) significantly reduced pain VAS (mm) in 80 RA patients originating from three studies [63,64,70], with 20 of these patients were included in a RCT [70]. Mean

pain VAS decreased from 59.10 ± 25.86 (95% CI: 42.17–75.63) to 33.55 ± 20.77 (95% CI: 26.07–56.33) after LC ($p < 0.000002$). WBC also significantly decreased pain VAS in 124 RA patients from 4 studies [66–68,70] (20 patients originated from a RCT [66]). Mean pain VAS decreased from

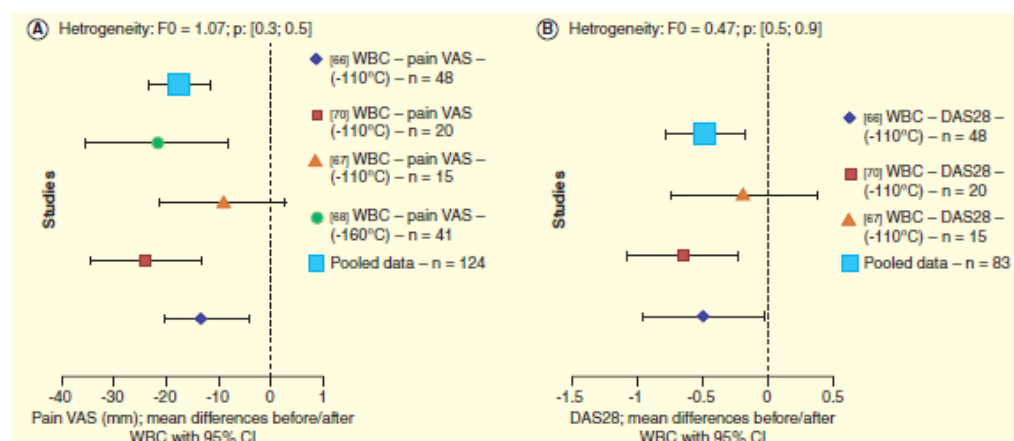


Figure 3. Effects of whole-body cryotherapy on pain. VAS (A) and DAS28 (B). Mean differences in pain VAS (mm) or DAS28 before/after LC or WBC are represented for each of the six studies included in the meta-analysis [63,64,66–68,70], with 95% confidence intervals. Heterogeneity was also tested using Fisher's test (F_0 and p -values are shown on the graphs). Design of the studies: randomized controlled trial [70], controlled trials [63,64], parallel cryotherapy treatment groups [67,68] and noncontrolled study [66]. DAS28: 28-joint disease Activity Score (composite score including patient VAS for disease activity, acute-phase reactant (erythrocyte sedimentation rate or C-reactive protein), tender joint count and swollen joint score); LC: Local cryotherapy; VAS: Visual Analogue Scale; WBC: Whole-body cryotherapy.

Table 3. Local cryotherapy techniques.

Local cryotherapy	Physical form	Temperature	Pressure	Duration	Skin temperature	Ref.
Ice bags	Ice cubes, mixture of water and crushed Fee	0°C	Straps for compression	10–30 min 30 min	13–15°C in 15–30 min 1 G°C (minimal value)	[72] [20]
Cold packs prerefrigerated gels	Joint-shaped, flexibility (CryoCuff®; Polar Care®) Gel-filled cold pack (TMP Trishaus®) 12X29 cm	-15°C	+	10–30 min; three-times a day for 7 days 20 min; 5/day 20 min	22–24°C 5, 5°C	[69] [82] [58,59]
Gas (thermal shock)	Cold air (filtered ambient air: no consumables) Cryo 5®: 4000 l/min	-30°C -20 to -30°C	0	5 min 10–30 min; 3/day; 7 days 3 min 3 min	9.7°C in 5 min (data not available)	[19] [68]
					23.1°C after 1 min 6°C	[15] [58]
				6.5 min 3 min	9.8°C (minimal value) 17.9°C after 1 min	[20] [15]
				45 s–2 min (2/day); flare duration 90s (3/day)	7.3°C 2°C in 20–30s 12°C	[73] [8]
	Liquid Nitrogen vapors (Medivent®)	-160°C	0			
	CO ₂ microcrystals (Cryotron®)	-78°C	50 bars (2–75 bars)			

53.15 ± 20.45 (95% CI: 49.55–56.75) at baseline to 35.64 ± 26.69 mm (95% CI: 30.94–40.34) after WBC ($p < 0.000002$).

As regards disease activity, LC significantly reduced DAS28 in 80 RA patients from 3 studies [63,64,70], with 20 patients included in a RCT [70]. Mean DAS28 decreased from 5.45 ± 1.37 (95% CI: 5.14–5.75) at baseline to 4.69 ± 1.16 (95% CI: 4.44–4.95) after LC ($p < 0.0001$), which could suggest a systemic effect of LC that was applied on several joints (4–6) in these patients. WBC also significantly reduced DAS28 in 83 RA patients from 3 studies [66,67,70], including 20 patients originating from a RCT [70]. Mean DAS28 decreased from 4.27 ± 0.83 (95% CI: 4.02–4.52) at baseline to 3.79 ± 0.81 (95% CI: 3.56–4.02) after WBC ($p < 0.002$).

Results: secondary outcomes (tolerance & physiological effects)

As concerns tolerance, no major adverse effect was reported in any of the screened studies. Cryotherapy is overall a well-tolerated treatment [8,9] compared with other adjunct therapies in RA such as corticosteroids and NSAIDs. The contraindications are patients with systemic lupus erythematosus, vasculitis, cryoglobulinemia, cold hypersensitivity, allergy or urticarial, cold-induced bronchospasm, Raynaud's phenomenon, acrocyanosis, sickle cell anemia, skin circulation disorders, paroxysmal cold hemoglobinuria, heart arrhythmia, symptomatic cardiovascular or lung disease, uncontrolled hypertension, advanced diabetes mellitus and cutaneous hypoesthesia. It should be avoided in patients with scleroderma, spinal cord injury or poor circulation (risk of skin lesions such as frostbite, chilblains or necrosis). Beyond a certain application duration threshold (for instance, 20–30 min for cold packs, 2 min for CO₂

cryotherapy at -78°C as indicated in manufacturers' instructions for use), cryotherapy can be painful and proinflammatory. Anyway, specific instructions for use should be read carefully before using any cryotherapy device, especially as concerns maximal recommended application duration. During CO₂ cryotherapy, skin temperature must be kept above 2°C, gas blow must be performed at 10–15 cm from skin surface (4–6 cm for cold air) [15], the application area must be swept and ice crystal formation on skin surface must be avoided (frostbite, chilblain and burn prevention). Cold packs must not be in direct contact with the skin. Cryotherapy can also induce nerve lesions (it must be used with caution in the vicinity of superficial nerves) and slow wound healing. The main cryotherapy techniques are summarized in Table 3 (local cryotherapy) and Table 4 (whole-body cryotherapy).

As for cryotherapy, physiological effects in RA, LC may reduce joint temperature to about 30°C in healthy as well as arthritic human knees for 2 h [19,20].

Studies in animal models and other medical fields suggest that mild hypothermia (with local and/or core body temperatures around 30°C) may inhibit white blood cell infiltrate formation [42], proinflammatory cytokine gene transcription [23,30], enzymatic pathways such as collagenases [40], metalloproteinases [39,40], proangiogenic agents such as VEGF [36]. In RA, cryotherapy might decrease proinflammatory cytokine and proteolytic enzyme levels, but studies are rare. LC significantly decreased serum TNF- α and tended to decrease serum IL-6 levels in 40 RA patients [63]. LC and WBC tended to decrease serum IL-6 levels in 59 RA patients [69]. WBC significantly decreased serum histamine levels in 20 RA patients [71]. In experiments using RA synovial collagenase cultured with human collagen fibrils, the authors showed a four-time decreased collagen lysis at 33 versus 36°C [41]. In arthritic zymosan-injected

Table 4. Ice-water and whole-body cryotherapy techniques.

Technique	Physical form	Temperature	Pressure	Duration	Skin temperature	Ref.
Ice-water immersion						
Ice water		0–20°C	+	0–2°C for 20 s (three-times a week for 12 weeks)		[22,45]
Whole-body cryotherapy						
Cryogenic chambers	Dehydrated air (Criostream®)	-60°C to 140°C	0	2–3 min		
	Cold air cooled by liquid nitrogen (Zimmer® KR2005N®)	< (1 or 2 acclimation chambers)		2 min (three-times/week; 12 weeks)	12–16°C (110*0)	[45]
				2 min; three-times a day; 7 days		[68]
		-130°C		3 min/day–10 days	11°C (forearm)	[81]

Data were taken from the cited articles.

rabbits, ice chip application caused a nonsignificant decrease in cell infiltration and synovial hyperplasia [72]. These results hold strong therapeutic promises in RA. However, studies about cryotherapy's molecular effects in RA are scarce and heterogeneous, so we could not perform any quantitative data analysis.

Discussion

Pooling 6 studies including 257 RA patients, we show that chronic local or WBC (14–20 applications) significantly decreases pain VAS (mm) and DAS28 (within-group effect size).

As concerns control groups, 16 patients were treated with 'drug therapy' and compared with LC-treated patients [64] and 17 patients exposed to magnetic fields were compared with WBC-treated patients [67]. These control groups were poorly described, and the studies were not randomized, so we could not perform any comparison with pooled mean differences in cryotherapy-treated patients nor calculate any between-group effect size. We excluded control groups with heat application that has proinflammatory effects [20]. It is of course difficult to create placebo groups for cryotherapy. All the patients in the selected studies received associated pharmacological treatment. This drug therapy intake (NSAIDs, corticosteroids, DMARDs and biologics) was not precisely described in four out of six studies. However, RA treatment is quite standardized and pharmacological treatment protocols (drugs and doses) remained stable before and throughout the studies, so the variations in pain VAS and DAS28 scores are likely to reflect cryotherapy's effects as an adjunct therapy.

We pooled patients treated with different cryotherapy techniques, because group sizes were not sufficient for separate analyzes, and because no significant difference for considered endpoints was found between these techniques in studies using parallel treatment arms. Notably, we could not perform any subgroup analysis comparing cold packs (cooling) to gaseous cryostimulation in LC-treated patients due to insufficient sample sizes [6,70]. Cryotherapy protocols were quite heterogeneous (duration, intensity, considered joints, physical agents, temperature, duration and periodicity) as summarized in Table 2. The

overall quality scores of the selected studies were quite low, but they reflect currently available evidence about cryotherapy. Studies were mainly limited by a lack of randomization and valid control groups. It is obviously difficult to find appropriate placebo groups for cryotherapy. Dropouts and withdrawals were also poorly reported. However, as cryotherapy is a very well-tolerated treatment, and as no major side effect was reported in any of the selected studies, the amount of missing data is likely to be very low.

Importantly, despite various cryotherapy modalities and potential confounders, the six selected studies showed very homogeneous results (Figure 2).

Unlike Welsh's Cochrane meta-analysis, we excluded articles dealing with postoperative cryotherapy, as surgery by itself might interfere with joint inflammation (Tables 1 & 2).

Expert commentary & five-year view

Clinical practice and physiological rationale strongly suggest a potential interest of cryotherapy as an adjunct therapy in rheumatic inflammatory diseases.

Cryotherapy applied locally on an inflamed joint allows to reach a 30°C intra-articular temperature plateau, with a possibly 2–3 h remanent local hypothermia [19,20]. Studies conducted in other medical fields suggest that it might therefore downregulate such proangiogenic and proinflammatory pathways as VEGF, proinflammatory cytokines and enzymatic activities involved in synovial microvascular hyperplasia, joint inflammation and destruction (Figure 4).

Synovial and systemic endothelial dysfunction in RA induce pain, joint inflammation and destruction and increased cardiovascular morbidity and mortality. Cryotherapy, by upregulating noradrenalin pathway, could downregulate IL-6 and i-NOS pathways, which are known to be involved in endothelial dysfunction and inflammation [3]. Further studies are needed to establish these molecular effects of cryotherapy specifically in RA. Studies in animal models such as collagen-induced arthritis or adjuvant-induced arthritis will certainly lead to a better description of cryotherapy effects on these promising molecular

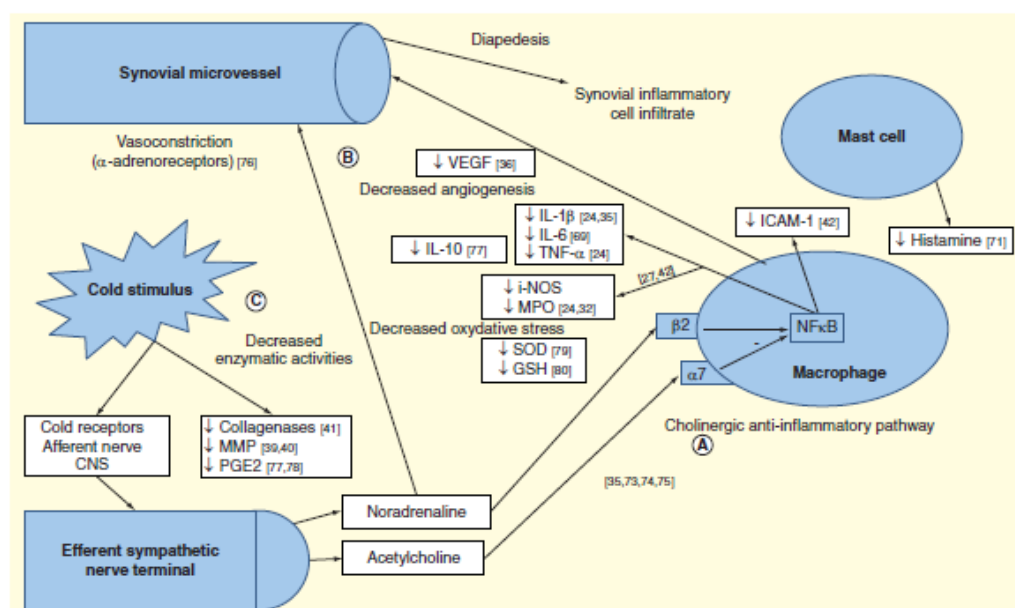


Figure 4. Molecular pathways involved in cryotherapy (proposed model). In rheumatoid arthritis, local and systemic inflammation promote neoangiogenesis which in turn favors inflammatory cell infiltrate and proinflammatory cytokine release. **(A)** After cold stimulation, the autonomic nervous system is activated [73] and efferent sympathetic neurons release acetylcholine that binds $\alpha 7$ nAChR receptor and noradrenaline that binds $\beta 2$ -adrenoreceptor. These ligand-receptor interactions may then inhibit the NF κ B pathway and subsequently downregulate proinflammatory cytokine, oxidative stress agent and adhesion molecule gene transcription [23,35,38,73–75]. **(B)** Noradrenaline also induces vasoconstriction through α -adrenoreceptor binding on the vascular wall [76], which could contribute to limit inflammation. Cryotherapy might also downregulate the expression of proangiogenic factors such as VEGF [36]. **(C)** Cryotherapy might also downregulate important enzymatic pathways involved in joint inflammation and destruction [39,59,77,78]. Citations refer to studies conducted in humans [23,35,39,41,69,71,73,76–79], human cell [41] or cell line [36] cultures, rats [24,38,40,42,80], mice [23,32], dogs [76] and two review articles [74,75]. ICAM-1: Inter cellular adhesion molecule-1; i-NOS: Inducible NO-synthase; MMP: Metalloproteinase; PGE2: Prostaglandin E2; VAS: Visual Analogic Scale; WBC: Whole-body cryotherapy. Data taken from the articles cited below and in the figure.

targets in the field of rheumatology, as already the case in neurology for instance, with well-known therapeutic effects of mild hypothermia after brain ischemia [23,24].

We could show a significant decrease in pain VAS (mm) and DAS28 in RA patients after chronic LC as well as WBC (within-group effect size). This result was remarkably constant among the six selected studies (Figure 2). However, we could not calculate any between-group effectsize because available control groups were small and methodologically unsatisfying. Randomized trials with valid control groups and stronger methodology are required in order to measure this effect size more accurately.

In light of the results of this systematic review and considering a solid biological rationale, cryotherapy deserves to be evaluated as a full therapeutic option in patients without any corticosteroid, NSAID, DMARD, biologic or physical therapy.

Short-term cryotherapy effects should also be addressed. LC applied once to an inflamed joint has been shown to decrease

synovial power Doppler hypersignal in RA, which is a good reflect of synovial neoangiogenesis and inflammation [60,61]. Our team is currently studying the effects of two local cryotherapy applications on synovial power Doppler hypersignal as well as synovial fluid cytokine and VEGF levels in arthritic patients.

In order to conduct these important studies, a better standardization of cryotherapy techniques will be required (Table 3). Optimal cryotherapy protocols need to be precisely defined (physical agent, temperature and duration periodicity). It is notably important to determine, for each cryotherapy technique, the therapeutic range and the cold intensity threshold beyond which it may become proinflammatory [10,20,39,69]. Gaseous LC might induce a more pronounced and acute decrease in tissue temperature (thermal shock) and cold packs a deeper and more prolonged cooling. WBC is still expensive, but new techniques using filtered and cooled ambient air without any

consumable will probably be cheaper and require less room space, allowing a more widespread use.

These studies will help to define cryotherapy's role in treatment strategies in RA and other joint inflammatory diseases, most probably as an adjunct therapy to DMARDs and targeted biologic treatments, along with corticosteroids and NSAIDs. Corticosteroid and NSAID toxicity represent a major public health concern, with numerous, well-known, side effects and complications. Cryotherapy used as an adjuvant therapy and applied using standardized and optimized protocols could help to spare corticosteroid and NSAID doses in these patients, and subsequently decrease cardiovascular, infectious, gastrointestinal morbidity and mortality. This treatment option may be of special interest in an increasing number of patients with NSAID and/or corticosteroid contraindications (cardiovascular diseases, diabetes, kidney deficiency,

and so on). This dose-sparing effect should also be addressed and measured specifically in randomized controlled trials.

Local cryotherapy is a cheap and very well-tolerated therapeutic option, which can be easily performed at patient's home. In the future, it could contribute to reduce the economic burden and iatrogenicity related to the treatment of arthritic patients, especially for the elderly.

Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Key issues

- Molecular pathways targeted by cryotherapy (proinflammatory cytokines, VEGF, cartilage-degrading enzymes) suggest interesting anti-inflammatory properties in rheumatic inflammatory diseases, which should be further investigated.
- Cryotherapy could be an interesting adjunct therapy in these diseases with a better safety profile as compared with corticosteroids and NSAIDs.
- By pooling six studies, we show that chronic local cryotherapy and WBC significantly reduce pain visual analogic scale and 28-joint disease activity score in rheumatoid arthritis (within-group effect size). However, methodological issues and a lack of control groups prevent from calculating any between-group effect size.

References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest

•• of considerable interest

- de Punder YM, van Riel PL. Rheumatoid arthritis: understanding joint damage and physical disability in RA. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7(5), 260–261 (2011).
- Semb AG, Kvien TK, DeMichele DA *et al.* Effect of intensive lipid-lowering therapy on cardiovascular outcome in patients with and those without inflammatory joint disease. *Arthritis Rheum.* 64(9), 2836–2846 (2012).
- Prati C, Berthelot A, Wendling D, Demougeot C. Endothelial dysfunction in rat adjuvant-induced arthritis: up-regulation of the vascular arginase pathway. *Arthritis Rheum.* 63(8), 2309–2317 (2011).
- Schipper LG, Vermeer M, Kuper HH *et al.* A tight control treatment strategy aiming for remission in early rheumatoid arthritis is more effective than usual care treatment in daily clinical practice: a study of two cohorts in the Dutch Rheumatoid Arthritis Monitoring registry. *Ann. Rheum. Dis.* 71(6), 845–850 (2012).
- Kavanaugh A, Fleischmann RM, Emery P *et al.* Clinical, functional and radiographic consequences of achieving stable low disease activity and remission with adalimumab plus methotrexate or methotrexate alone in early rheumatoid arthritis: 26-week results from the randomised, controlled OPTIMA study. *Ann. Rheum. Dis.* 72(1), 64–71 (2013).
- Woodrick RS, Ruderman EM. Safety of biologic therapy in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7(11), 639–652 (2011).
- Atzeni F, Turid M, Caporali R *et al.* The effect of pharmacological therapy on the cardiovascular system of patients with systemic rheumatic diseases. *Autoimmun. Rev.* 9(12), 835–839 (2010).
- Chatap G, De Sousa A, Giraud K, Vincent JP. Pain in the elderly: prospective study of hyperbaric CO₂ cryotherapy (neurocryostimulation). *Joint Bone Spine* 74(6), 617–621 (2007).
- Demoulin C, Vanderthommen M. Cryotherapy in rheumatic diseases. *Joint Bone Spine* 79(2), 117–118 (2012).
- Oosterveld FG, Rasker JJ. Treating arthritis with locally applied heat or cold. *Semin. Arthritis Rheum.* 24(2), 82–90 (1994).
- Bettoni L, Bonomi FG, Zani V *et al.* Effects of 15 consecutive cryotherapy sessions on the clinical output of fibromyalgic patients. *Clin. Rheumatol.* 32(9), 1337–1345 (2013).
- Ma SY, Je HD, Jeong JH, Kim HY, Kim HD. Effects of whole-body cryotherapy in the management of adhesive capsulitis of the shoulder. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 94(1), 9–16 (2013).
- Hauswirth C, Louis J, Biazzen F *et al.* Effects of whole-body cryotherapy vs. far-infrared vs. Passive modalities on recovery from exercise-induced muscle damage in highly-trained runners. *PLoS ONE* 6(12), e27749 (2011).
- Galliera E, Dogliotti G, Melegari G, Corsi Romanelli MM, Cabrita P, Barfi G. Bone remodelling biomarkers after whole body cryotherapy (WBC) in elite rugby players. *Injury* 44(8), 1117–1121 (2013).
- Korman P, Straburzynska-Lupa A, Romanowski W, Trafarski A. Temperature changes in rheumatoid hand treated with nitrogen vapors and cold air. *Rheumatol. Int.* 32(10), 2987–2992 (2012).
- Nadler SF, Weingand K, Kruse RJ. The physiologic basis and clinical applications of cryotherapy and thermotherapy for the pain practitioner. *Pain Physician* 7(3), 395–399 (2004).

- 17 Lubkowska A, Dolgowska B, Szygula Z. Whole-body cryostimulation—potential beneficial treatment for improving antioxidant capacity in healthy men—significance of the number of sessions. *PLoS ONE* 7(10), e46352 (2012).
- 18 Welch V, Brosseau L, Shea B, McGowan J, Wells G, Tugwell P. Thermotherapy for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2), CD002826 (2011).
- 19 Kim YH, Baek SS, Choi KS, Lee SG, Park SB. The effect of cold air application on intra-articular and skin temperatures in the knee. *Yonsei Med. J.* 43(5), 621–626 (2002).
- 20 Oosterveld FG, Rasker JJ. Effects of local heat and cold treatment on surface and articular temperature of arthritic knees. *Arthritis Rheum.* 37(11), 1578–1582 (1994).
- The only study monitoring intrajoint temperature in arthritic patients treated with local cryotherapy. Local cryotherapy induces an intrajoint temperature plateau (about 30°C for 2 h).
- 21 Lubkowska A, Szygula Z, Chlubek D, Banfi G. The effect of prolonged whole-body cryostimulation treatment with different amounts of sessions on chosen pro- and anti-inflammatory cytokines levels in healthy men. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 71(5), 419–425 (2011).
- 22 Dugue B, Leppanen E. Adaptation related to cytokines in mice: effects of regular swimming in ice-cold water. *Clin. Physiol.* 20(2), 114–121 (2000).
- 23 Yenari MA, Han HS. Influence of hypothermia on post-ischemic inflammation: role of nuclear factor kappa B (NF-kappaB). *Neurochem. Int.* 49(2), 164–169 (2006).
- 24 Zhang H, Zhou M, Zhang J, Mei Y, Sun S, Tong E. Therapeutic effect of post-ischemic hypothermia duration on cerebral ischemic injury. *Neural Res.* 30(4), 332–336 (2008).
- 25 Hildebrand F, van Griensven M, Giannoudis P et al. Effects of hypothermia and re-warming on the inflammatory response in a murine multiple hit model of trauma. *Cytokine* 31(5), 382–393 (2005).
- 26 Truettner JS, Suzuki T, Dietrich WD. The effect of therapeutic hypothermia on the expression of inflammatory response genes following moderate traumatic brain injury in the rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 138(2), 124–134 (2005).
- 27 Nandate K, Vuytstele A, Crosbie AE, Messahel S, Oduro-Dominah A, Menon DK. Cerebrovascular cytokine responses during coronary artery bypass surgery: specific production of interleukin-8 and its attenuation by hypothermic cardiopulmonary bypass. *Anesth. Analg.* 89(4), 823–828 (1999).
- 28 Gundersen Y, Vaagenes P, Pharo A, Valo ET, Opstad PK. Moderate hypothermia blunts the inflammatory response and reduces organ injury after acute haemorrhage. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 45(8), 994–1001 (2001).
- 29 Hastbacka J, Tiainen M, Hynninen M et al. Serum matrix metalloproteinases in patients resuscitated from cardiac arrest. The association with therapeutic hypothermia. *Resuscitation* 83(2), 197–201 (2012).
- 30 Meybohm P, Gruenewald M, Zacharowski KD et al. Mild hypothermia alone or in combination with anesthetic post-conditioning reduces expression of inflammatory cytokines in the cerebral cortex of pigs after cardiopulmonary resuscitation. *Crit. Care* 14(1), R21 (2010).
- 31 Tavares-Murta BM, Cordeiro AO, Murta EF, Cunha Fde Q, Bisinotto FM. Effect of myocardial protection and perfusion temperature on production of cytokines and nitric oxide during cardiopulmonary bypass. *Acta Cir. Bras.* 22(4), 243–250 (2007).
- 32 Kang J, Albadawi H, Casey PJ et al. The effects of systemic hypothermia on a murine model of thoracic aortic ischemia reperfusion. *J. Vasc. Surg.* 52(2), 435–443 (2010).
- 33 Hofmeister C, Boost KA, Flondor M et al. Anti-inflammatory effects of sevoflurane and mild hypothermia in endotoxemic rats. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 51(7), 893–899 (2007).
- 34 Morita Y, Oda S, Sadahiro T et al. The effects of body temperature control on cytokine production in a rat model of ventilator-induced lung injury. *Cytokine* 47(1), 48–55 (2009).
- 35 Pourmot H, Bieszen F, Louis J et al. Time-course of changes in inflammatory response after whole-body cryotherapy multi exposures following severe exercise. *PLoS ONE* 6(7), e22748 (2011).
- 36 Coassin M, Duncan KG, Bailey KR, Singh A, Schwartz DM. Hypothermia reduces secretion of vascular endothelial growth factor by cultured retinal pigment epithelial cells. *Br. J. Ophthalmol.* 94(12), 1678–1683 (2010).
- An experimental study in ophthalmology suggesting that cryotherapy might downregulate VEGF production.
- 37 Fujimoto K, Fujita M, Tsuruta R et al. Early induction of moderate hypothermia suppresses systemic inflammatory cytokines and intracellular adhesion molecule-1 in rats with caerulein-induced pancreatitis and endotoxemia. *Pancreas* 37(2), 176–181 (2008).
- 38 Webster CM, Kelly S, Koike MA, Chock VY, Giffard RG, Yenari MA. Inflammation and NF-kappaB activation is decreased by hypothermia following global cerebral ischemia. *Neurobiol. Dis.* 33(2), 301–312 (2009).
- 39 Suehiro E, Fujisawa H, Aikawa T et al. Increased matrix metalloproteinase-9 in blood in association with activation of interleukin-6 after traumatic brain injury: influence of hypothermic therapy. *J. Neurotrauma*. 21(12), 1706–1711 (2004).
- 40 Truettner JS, Alonso OF, Dalton Dietrich W. Influence of therapeutic hypothermia on matrix metalloproteinase activity after traumatic brain injury in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25(11), 1505–1516 (2005).
- 41 Harris ED, Jr., McCroskey PA. The influence of temperature and fibril stability on degradation of cartilage collagen by rheumatoid synovial collagenase. *N. Engl. J. Med.* 290(1), 1–6 (1974).
- An experimental study suggesting that cryotherapy might downregulate collagenase activity in RA.
- 42 Cao J, Xu J, Li W, Liu J. Influence of selective brain cooling on the expression of ICAM-1 mRNA and infiltration of PMNLs and monocytes/macrophages in rats suffering from global brain ischemia/reperfusion injury. *Biosci. Trends* 2(6), 241–244 (2008).
- 43 Pourmot H, Bieszen F, Duffield R, Lepretre PM, Cozzolino C, Hauswirth C. Short term effects of various water immersions on recovery from exhaustive intermittent exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 111(7), 1287–1295 (2011).
- 44 Dugue B, Smolander J, Westerlund T et al. Acute and long-term effects of winter swimming and whole-body cryotherapy on plasma antioxidative capacity in healthy women. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 65(5), 395–402 (2005).
- 45 Leppaluoto J, Westerlund T, Huttunen P et al. Effects of long-term whole-body cold exposures on plasma concentrations of ACTH, beta-endorphin, cortisol, catecholamines and cytokines in healthy females. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 68(2), 145–153 (2008).

- 46 Brenner IK, Castellani JW, Gabaree C *et al*. Immune changes in humans during cold exposure: effects of prior heating and exercise. *J. Appl. Physiol.* 87(2), 699–710 (1999).
- 47 Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, the PRISMA Group. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med.* 6(7), e1000097 (2009).
- 48 Jadad AR, Moore RA, Carroll D *et al*. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin. Trials* 17(1), 1–12 (1996).
- 49 Ivey M, Johnston RV, Uchida T. Cryotherapy for postoperative pain relief following knee arthroplasty. *J. Arthroplasty.* 9(3), 285–290 (1994).
- 50 Rembe EC. Use of cryotherapy on the postsurgical rheumatoid hand. *Phys. Ther.* 50(1), 19–23 (1970).
- 51 Bulstrode S CA, Harrison RA. A controlled trial to study the effects of therapy on joint inflammation in chronic arthritis. *Physiother. Pract.* 2, 104–108 (1986).
- 52 Kirk JA, Kersley GD. Heat and cold in the physical treatment of rheumatoid arthritis of the knee. A controlled clinical trial. *Ann. Phys. Med.* 9(7), 270–274 (1968).
- 53 Williams J, Harvey J, Tannenbaum H. Use of superficial heat versus ice for the rheumatoid arthritis shoulder: a pilot study. *Physiother. Can.* 38(1), 8–13 (1986).
- 54 Metzger D, Zwiggmann C, Protz W, Jackel WH. [Whole-body cryotherapy in rehabilitation of patients with rheumatoid diseases—pilot study]. *Rehabilitation (Stuttg)* 39(2), 93–100 (2000).
- 55 Kelly S, Taylor P, Pitzalis C. Three dimensional power Doppler signal is more sensitive to change than two dimensional signal under a physiological stimulus. *Arthritis Rheum.* 58, S467 (2008).
- 56 Wojtecka-Lukasik E, Ksiezopolska-Orlowska K, Burakowski T *et al*. Effect of cryotherapy on adjuvant arthritis in the rat. *Ann. Rheum. Dis.* (Suppl.), AB0050 (2002).
- 57 Knorr BV, Keitel W. Comparative study of therapy: ultrasound, cryotherapy and intra-articular corticosteroids to treat alterations of the shoulder joint due to inflammation. *Z. Physiother.* 42, 221–225 (1990).
- 58 Jonderko G, Szpinski J, Galazek M, Galazek Z. Influence of heat and cold air therapy in sequence on the pain threshold as well as on the subjective pain feeling in rheumatoid arthritis. *Z. Phys. Med. Baln. Med. Klin.* 19, 49–53 (1990).
- 59 Albrecht K, Albert C, Lange U, Müller-Ladner U, Strunk J. Different effects of local cryogel and cold air physical therapy in wrist rheumatoid arthritis visualised by power Doppler ultrasound. *Ann. Rheum. Dis.* 68(7), 1234–1235 (2009).
- 60 Strunk J, Strube K, Klingenberg P, Müller-Ladner U, Lange U. Two- and three-dimensional Doppler sonographic evaluation of the effect of local cryotherapy on synovial perfusion in wrist arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 45(5), 637–640 (2006).
- 61 Ellegaard K, Torp-Pedersen S, Henriksen M, Lund H, Danneskiold-Samsøe B, Bliddal H. Influence of recent exercise and skin temperature on ultrasound Doppler measurements in patients with rheumatoid arthritis—an intervention study. *Rheumatology (Oxford)* 48(12), 1520–1523 (2009).
- A randomized controlled trial with crossover design showing wrist power Doppler hypersignal decrease after a single cold pack application.
- 62 Schlesinger N, Detry MA, Holland BK *et al*. Local ice therapy during bouts of acute gouty arthritis. *J. Rheumatol.* 29(2), 331–334 (2002).
- A randomized controlled trial in gout showing greater pain VAS decrease in patients treated by corticosteroids + colchicine + ice packs versus corticosteroids + colchicine.
- 63 Jastrabek R, Straburzynska-Lupa A, Rutkowski R, Romanowski W. Effects of different local cryotherapies on systemic levels of TNF- α , IL-6, and clinical parameters in active rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 33, 2053–2060 (2013).
- A controlled trial comparing two cryotherapy modalities (cold air versus liquid nitrogen, 20 applications over 10 days, two groups of 20 patients) and showing significant decreases in pain VAS, DAS28 and serum TNF- α .
- 64 Orlova EV, Karateev DE. Efficacy of complex rehabilitation of patients with early rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 71(Suppl. 3), 466 (2012).
- 65 Lange U, Uhlemann C, Müller-Ladner U. [Serial whole-body cryotherapy in the criostream for inflammatory rheumatic diseases. A pilot study]. *Med. Klin. (Munich)* 103(6), 383–388 (2008).
- 66 Braun KP, Brookman-Amisah S, Geisler K, Axt D, May M, Ernst H. [Whole-body cryotherapy in patients with inflammatory rheumatic disease. A prospective study]. *Med. Klin. (Munich)* 104(3), 192–196 (2009).
- 67 Gizinska M, Straburzynska-Lupa A, Romanowski W *et al*. The influence of whole-body cryotherapy (-110°C) and kinesiotherapy on selected functional parameters and DAS28 in female patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 69(Suppl. 3), 719 (2010).
- 68 Samborski W, Lisinski P, Sobieska M. An effectiveness of kinesis therapy preceded by cryotherapy in rheumatoid arthritis patients with coxitis. *Ann. Rheum. Dis.* 65(Suppl. II), 613 (2006).
- 69 Straub RH, Pongratz G, Hirvonen H, Pohjolainen T, Mikkelsen M, Leirisalo-Repo M. Acute cold stress in rheumatoid arthritis inadequately activates stress responses and induces an increase of interleukin 6. *Ann. Rheum. Dis.* 68(4), 572–578 (2009).
- A randomized controlled trial showing a decrease in serum IL-6 levels in RA patients without corticosteroids after chronic cryotherapy (LC applied to five joints simultaneously or WBC (-60°C) both performed two- or three-times a day for 7 days). Conversely, -110°C WBC following the same application protocol increased serum IL-6 levels. This suggests potential systemic anti-inflammatory effects of cryotherapy and a possible pro-inflammatory effect of cryotherapy beyond a cold stimulation intensity threshold.
- 70 Hirvonen HE, Mikkelsen MK, Kauriainen H, Pohjolainen TH, Leirisalo-Repo M. Effectiveness of different cryotherapies on pain and disease activity in active rheumatoid arthritis. A randomised single blinded controlled trial. *Clin. Exp. Rheumatol.* 24(3), 295–301 (2006).
- A randomized controlled trial showing significant decreases in pain VAS and DAS28 in RA patients treated with LC as well as WBC (performed two- or three-times a day for 7 days)
- 71 Wojtecka-Lukasik E, Ksiezopolska-Orlowska K, Gaszewska E *et al*. Cryotherapy decreases histamine levels in the blood of patients with rheumatoid arthritis. *Inflamm. Res.* 59(Suppl. 2), S253–S255 (2010).
- 72 Weinberger A, Giler S, Nyska A. Treatment of inflammatory synovitis with ice

- application. *Arthritis Rheum.* 38(Suppl), S242, 532 (1995).
- 73 Mourot L, Cluzeau C, Regnard J. Hyperbaric gaseous cryotherapy: effects on skin temperature and systemic vasoconstriction. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 88, 1339–1343 (2007).
 - 74 Pavlov VA, Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav. Immun.* 19, 493–499 (2005).
 - 75 Tracey KJ. Reflex control of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 418–428 (2009).
 - 76 Shepherd JT, Rusch NJ, Vanhoutte PM. Effect of cold on the blood vessel wall. *Gen. Pharmacol.* 14, 61–64 (1983).
 - 77 Banfi G, Melegari G, Barassi A *et al.* Effects of whole-body cryotherapy on serum mediators of inflammation and serum muscle enzymes in athletes. *J. Therm. Biol.* 34, 55–59 (2009).
 - 78 Salzman A, Berglund L, Dugnerc E *et al.* Temperature-sensitive release of prostaglandin e2 and diminished energy requirements in synovial tissue with postoperative cryotherapy: a prospective randomized study after knee arthroscopy. *J. Bone Joint Surg. Am.* 93, 1961–1968 (2011).
 - 79 Miller E, Maridewicz L, Saluk J *et al.* Effect of short-term cryostimulation on antioxidative status and its clinical applications in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 112, 1645–1652 (2012).
 - 80 Zhang H, Zhang JJ, Mei YW *et al.* Effects of immediate and delayed mild hypothermia on endogenous antioxidant enzymes and energy metabolites following global cerebral ischemia. *Chin. Med. J.* 124, 2764–2766 (2011).
 - 81 Demoulin C, Brouwers M, Darot S *et al.* Comparison of gaseous cryotherapy with more traditional forms of cryotherapy following total knee arthroplasty. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* 55, 229–240 (2012).
 - 82 Banfi G, Lombardi G, Colombini A *et al.* Whole-body cryotherapy in athletes. *Sports Med.* 40, 509–517 (2010).

Websites

- 101 International Standard Randomised Controlled Trial Number Register. www.controlled-trials.com/iscrt
- 102 ClinicalTrials.gov. www.clinicaltrials.gov
- 103 WHO. International Clinical Trials Registry Platform. www.who.int/ictip/search/en
- 104 Wells G, Shea B. Data extraction for nonrandomised systematic reviews. University of Ottawa, Ottawa. www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.htm



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en



Original article

Cryotherapy decreases synovial Doppler activity and pain in knee arthritis: A randomized-controlled trial

Xavier Guillot^{a,b,*}, Nicolas Tordi^b, Clément Prati^{a,b}, Frank Verhoeven^a, Lionel Pazart^c, Daniel Wendling^{a,d}



^a Rheumatology Department, University Hospital of Besançon, Boulevard Fleming, 25030 Besançon Cedex, France

^b FDE EA 4267, FHU INCREASE, Bourgogne Franche-Comté University, 25000 Besançon, France

^c CIC II, INSERM Center CT 808, University Hospital of Besançon, Boulevard Fleming, 25030 Besançon Cedex, France

^d EA 4266, Bourgogne Franche-Comté University, 25000 Besançon, France

ARTICLE INFO

Article history:
Accepted 7 September 2016
Available online xxx

Keywords:
Local cryotherapy
Knee arthritis
Power Doppler score
Pain

ABSTRACT

Objective: To measure and compare the effects of 2 local cryotherapy techniques on synovial power Doppler activity (primary outcome) and pain in non-septic knee arthritis without any concurrent treatment.

Methods: 30 patients were randomized (ice: 30 min, $n = 15$ or cold CO₂: 2 min, $n = 15$ both applied twice at 8 h interval). Contralateral non-treated arthritic knees were used as paired controls ($n = 11$ and $n = 10$ respectively). The PDUS semi-quantitative score (0–3) and pain visual analogic scale were evaluated before/after each cold application, 2 min, 2 h, 24 h after the first application. PDUS scores were checked in double-blind by 2 ultrasonographers.

Results: The inter-class effect size of local cryotherapy on the power Doppler score remained significant the day after treatment in local cryotherapy-treated compared to contralateral non-treated knees (Global difference: -1 [95% confidence interval: -1.23 ; -0.77]; ice: -0.73 [-1.06 ; -0.4]; CO₂: -0.7 [-1.18 ; -0.22]). Both techniques significantly and to the same extent reduced the power Doppler score and pain visual analogic scale at all evaluation times and globally throughout the 24 hour-study period. No dropout nor adverse event was reported. In multivariate analysis, the Power Doppler score decrease was associated with pain decrease, while pain decrease was associated with the female sex and ice technique.

Conclusion: Local ice and cold CO₂ applied twice equally reduced synovial Power Doppler activity and pain over 24 h in knee arthritis. These effects remained significant the day after treatment. ClinicalTrials.gov identifier: NCT02573298.

© 2016 Société française de rhumatologie. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

In inflammatory rheumatic diseases, such as rheumatoid arthritis (RA), spondyloarthritis (SpA), crystal-induced arthritides, synovial tissue local inflammation causes pain, disability and joint destruction. Knee involvement particularly impairs patient locomotion and quality of life, causing major disability. Despite targeted biologic treatments which revolutionized the prognosis of RA and SpA, allowing to reach disease remission and to halt joint structural damage, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and corticosteroids are still widely used in rheumatic diseases in

the adjuvant setting, causing increased morbidity and mortality, notably in the most vulnerable patients [1].

Cryotherapy (applied locally or to the whole body) has been widely and empirically used in rheumatic diseases since Hippocrates, with well-known analgesic, anti-phlogistic, myo-relaxing effects. It is notably used in an adjuvant setting in inflammatory arthritis flares in RA, SpA, crystal-induced arthritides [2]. This treatment is generally cheap and very well tolerated [3] as compared to NSAIDs and corticosteroids [4]. Beside local ice application, providing a deep and long-term tissue cooling, hyperbaric cold gas pulverization has emerged more recently, causing a supposedly faster but more superficial cooling and additional anti-inflammatory effects through a brutal local vasoconstriction followed by a vasodilatation (called “thermal shock”) [5]. CO₂ hyperbaric local cryotherapy (LC) applied during 60–90 s (about 5 times) significantly decreased pain VAS in elderly patients suffering from various rheumatic diseases [6]. As for cryotherapy therapeutic

* Corresponding author at: Jean Minjot Hospital, Rheumatology Department, Boulevard Fleming, 25030 Besançon Cedex, France.
E-mail address: xguillot@chu-besancon.fr (X. Guillot).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2016.09.004>

1297-319X/© 2016 Société française de rhumatologie. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Guillot X, et al. Cryotherapy decreases synovial Doppler activity and pain in knee arthritis: A randomized-controlled trial. Joint Bone Spine (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2016.09.004>

and anti-inflammatory effect sizes, however, the level of evidence is paradoxically low [7], due to a lack of standardization in therapeutic protocols (physical agents, temperature, application duration, periodicity, associated kinesiotherapy, exercise and pharmacological anti-inflammatory drugs). It is also impossible to create valid placebo groups for cryotherapy. By pooling the results of 6 studies, we could show that local as well as whole-body cryotherapy applied 14–20 times (twice a day) significantly reduces pain visual analogic score (VAS) and disease activity score assessed on 28 joints (DAS-28) in rheumatoid arthritis [8]. In LC-treated patients, we could not differentiate between the effects of ice and cold gas application, as both treatments were used concomitantly in some studies [9]. However, it would be important to compare these two techniques directly in order to define the optimal LC modality. LC's analgesic and anti-inflammatory effects might be directly linked with cryotherapy-induced intra-joint hypothermia [10], which might inhibit key enzymatic processes involved in joint inflammation [11].

Intra-joint synovial inflammation can be reliably evaluated using validated semi-quantitative power-Doppler ultrasonographic (PDUS) scores, which correlate with histological inflammation [12,13], disease activity [14,15], radiographic destructions [14,16,17] and response to biologic treatments [18]. Semi-quantitative PDUS scores showed good diagnostic performances on arthritic knees in RA [19], correlated positively with pain evolution after corticosteroid injection in knee osteoarthritis [20] and might therefore be a reliable tool to monitor the effects of local treatments such as cryotherapy on arthritic knees. As for the effects of cryotherapy on PDUS synovial inflammation, data are scarce. One 20 min cold pack application decreased synovial PDUS score in 7/13 RA wrists just after cold application, suggesting anti-inflammatory effects. However, patients concomitantly received corticosteroids (11/13), NSAIDs (5/13), disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) (8/13) and etanercept (2/13), potentially biasing the results and preventing from specifically evaluating LC's own effects on synovial inflammation [21]. Ice or cold water immersion also reduced the number of Doppler pixels in 29 RA wrists just after cold application [22]. In another non-controlled study, local cryo-gel application for 20 min significantly decreased the number of Doppler pixels while cold air application (-30°C for 3 min) tended to increase the number of Doppler pixels in 25 RA joints suggesting that LC may have pro-inflammatory properties beyond a certain threshold of temperature or duration. However, the evaluation time after cold application did not exceed 10 min [23]. The PDUS score might be a valuable tool to quantify the own and longer-term effects of LC on knee synovial inflammation but no randomized-controlled trial addressed this question so far.

The primary objective of this study was to quantify the effects of LC applied twice in one day on knee synovial power Doppler activity in non-septic inflammatory rheumatic diseases. The secondary aims were to evaluate the effects of LC on pain, skin temperature, its tolerance and to compare two techniques (ice and cold gas).

2. Methods

The protocol was approved by local ethics committee on 2012, September, 6th (CPP-Est II – 12/664) and registered on clinicaltrials.gov [http://www.clinicaltrials.gov, NCT02573298].

2.1. Study design and subjects

Thirty patients were included in a randomized-controlled trial comparing 2 parallel treatment arms (local ice or hyperbaric cold CO_2 applied twice in a single day, allocation ratio 1:1) and contralateral non-treated knees were used as controls for the PDUS score (in case of knee bi-arthritis). The study design is summarized in Fig. 1.

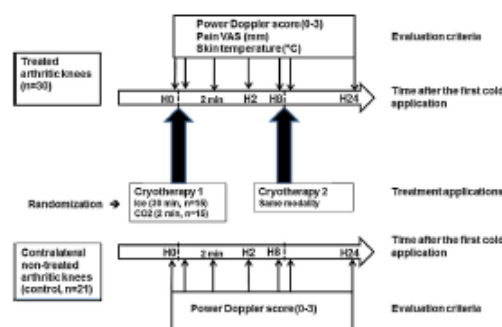


Fig. 1. Study design. Patients suffering from non-septic knee arthritides were randomized to receive either ice (30 min – $n=15$) or cold CO_2 (2 min – $n=15$) twice in a single day at an interval of 8 h. The semi-quantitative PDUS score (0–3) was evaluated on the treated knee just before and just after each cold application (H0 and H8), 2 min, 2 h (H2), 8 h (H8), 24 h (H24) after the first cold application (i.e. 16 h after the second application – H24). The PDUS score was also measured on contralateral arthritic knees at the same evaluation times (control group – $n=21$ including 11 ice-treated patients and 10 cold CO_2 -treated patients). Pain VAS (mm) and skin temperature on the treated knee were also recorded at each evaluation time.

After providing informed consent, patients aged 18–85 and suffering from non-septic non-osteoarthritic knee arthritides (RA according to ACR criteria, SpA according to ASAS criteria, gout, CPDD) were included. Patients could be included if the initial knee ultrasonography showed at least one PDUS activity dot. Patients hadn't been treated by cryotherapy for one month nor by biologics for at least 6 months before inclusion. Exclusion criteria respected the main cryotherapy contra-indications (Raynaud phenomenon, neuro-sensory impairment in the area of application, uncontrolled diabetes, hypertension, cardiac rhythm disorders or cardiopathy, cold-induced allergy or urticaria, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, sickle-cell anemia, chronic obstructive arterial disease, vasculitis). The study was monocentric and patients were all hospitalized in a tertiary rheumatology unit in France.

2.2. Cryotherapy techniques

Patients were randomly included in two parallel treatment arms: ice packs (Thermogel® – Artsana, Asnières, France) for 30 min or hyperbaric CO_2 cryotherapy (-78°C – Cryo+® – Cryonic, Salins-les-bains, France) for 2 min, applied at 9 a.m and 5 p.m for just one day on one arthritic knee. In case of knee bi-arthritis, the most painful knee (chosen by the patient) was treated by LC while the contralateral arthritic knee was used as a non-treated control.

2.3. Ultrasonography and power Doppler scoring

The PDUS score (primary outcome) was assessed on both knees, before and after each cold application, by a trained and graduated operator, using MylabFive® device (Esaote, Genoa, Italy). The contralateral non-treated knee served as control. The pressure on the probe was minimized, an abundant amount of ultrasonographic gel was used. A first ultrasonographic evaluation of both knees was performed at 9 a.m before the first cold application and patients were included if at least one of the knees showed any significant PDUS activity (1 or more out of 3 in semi-quantitative score [14,16]). The selected settings were: 4–13 MHz for frequency, 61% for gain, 6.3 MHz for Doppler frequency, 56% for power-Doppler gain (set just at the noise disappearance threshold), 750 Hz for PRF. The Doppler window was enlarged to the top of the picture and

the focus was placed on the bone-synovium border. Transversal and longitudinal examinations [24] of both lateral parapatellar and supra-patellar recesses [14,25,26] were performed at baseline on both knees. The view showing the maximal diastolic PDUS activity was then selected for each knee and used throughout the study for repeated PDUS score evaluations [13,26]. Marks on the skin indicated the position of the ultrasonographic probe in order to improve the reproducibility between examinations. Before each ultrasonographic examination, patients were placed in a dorsal decubitus position, had performed no significant physical activity for at least 1 h before each ultrasonographic evaluation and had been asked not to smoke nor drink coffee before power Doppler evaluations [27]. Vaso-active drugs (especially anti-hypertensive agents), corticosteroids, NSAIDs and colchicine were interrupted for 24 h during the study period. The examinations were performed at baseline (9 a.m.) just before the first cryotherapy application, just after the first cold applications, 2 min then 2 h after this application. Two other ultrasonographic examinations were performed at 5 p.m. (8 h after the first cold application) just before then just after a second cold application. A final ultrasonographic evaluation was performed the day after at 9 a.m. in order to assess cryotherapy's longer term effects. All the ultrasonographic examinations and initial PDUS scorings were performed by the same graduated and trained ultrasonographer (XG).

2.4. Outcome measures

At each ultrasonographic evaluation time, the following data were gathered: Szklarek's PDUS (0–3) semi-quantitative scores on cryotherapy-treated and contralateral non-treated knees (primary endpoint) [14,16,19,28], pain visual analogic scale (VAS), skin (on cryotherapy-treated area) and room temperatures. Ultrasonographic pictures were also anonymised then stored. Room and cryotherapy-treated area skin temperatures were measured using MLT409/A Skin Temperature Probe® and ML309 Thermistor Pod® (ADInstruments, Dunedin, NZ).

2.5. Power Doppler score reliability

After all the patients were included, the PDUS scoring was again performed on anonymized stored ultrasound images by 2 independent osteoarticular ultrasonography-graduated and trained rheumatologists (XG and CP), blinded with regard to the time of evaluation, the treatment group, the score from the other evaluator. Intra-observer (compared to the score obtained when ultrasonographic examinations were performed on the patients) and inter-observer agreements were assessed by Cohen's kappa coefficients. Inter-observer agreement was good (kappa: 0.65) while intra-observer agreement was almost perfect (kappa: 0.85). In case of disagreement, the concerned pictures were specifically and collegially discussed (also blinded for diagnosis, treatment arm and time of evaluation regarding cold applications) until a consensus was reached.

2.6. Statistical analysis

The sample size was calculated in order to be able to detect a one-point decrease in the PDUS score with 95% power and 5% *P*-value [21]. For continuous variables such as PDUS score and pain VAS, medians $\pm$ interquartile ranges were compared before and after cryotherapy using non-parametric paired Wilcoxon tests and between treatment groups (CO₂, ice, non-treated contralateral knees) using unpaired Mann–Whitney tests. As for the primary outcome, the inter-class effect size for the PDUS semi-quantitative score was calculated as the difference between the median PDUS score decrease from baseline values in LC-treated knees (*n* = 30) and

the median decrease in contralateral non-treated arthritic knees (*n* = 21) at each evaluation time and in each treatment arm. This effect size was also measured just before/just after each cold application. As the PDUS semi-quantitative score variable (0–3) was not normally distributed, these effect sizes were calculated using medians and interquartile ranges as proposed by Hozo et al. [29]. Chi-square or Fisher tests were used in case of categorical variables. Normality (using Shapiro–Wilk tests) and the equality of variances were also tested. *P*-values < 0.05 were considered significant. The statistical tests were two-sided. The global evolutions of pain VAS and PDUS score throughout the study period were assessed using 2-way ANOVAs with Bonferroni post-test corrections. The factors associated with PDUS score and pain VAS evolution after 24 h were evaluated in univariate then multivariate analysis by logistic regression. Baseline covariates included in the models were sex (M/F), age, crystal-induced arthritis (yes/no), BMI, cryotherapy technique, minimal skin temperature reached during LC treatment, CRP (mg/L). The most relevant multivariate models were then selected using likelihood ratio tests. Statistical analyses were performed using R and Graphpad softwares.

2.7. Funding source

This work was supported by Besançon University Hospital and Groupement Interrégional de Recherche Clinique et d'Innovation de l'Est [APJ 2014 to XG].

3. Results

3.1. Patient disposition and baseline characteristics

Thirty patients were included, all of them could be randomized and completed the whole study (15 in ice-treated group, 15 in cold CO₂-treated group). No adverse event nor dropout occurred. Data could not be collected at the 2 hour-evaluation time point for 3 impaired patients (2 in CO₂, 1 in ice-treated groups). Patients were included from 2013, February, 13th to 2015, March, 3rd. Inclusions were stopped after 30 patients were recruited, as initially planned. Patient baseline characteristics did not differ between treatment groups except for age, as summarized in Table 1.

3.2. Effects of local cryotherapy on synovial power Doppler activity score

Both LC techniques significantly reduced the PDUS score compared to baseline values, with no difference between ice and cold CO₂ throughout the study period of 24 h (2-way ANOVA – Fig. 2A).

By contrast, the PDUS score did not vary significantly at any time in contralateral non-treated arthritic knees (*n* = 11 in ice-treated and *n* = 10 in cold CO₂-treated groups – Fig. 2B).

After 24 h (the day after treatment at 9 a.m.), the inter-class effect size (expressed as the median difference in PDUS score decreases from baseline values between LC-treated (*n* = 30) and contralateral non-treated arthritic knees (*n* = 21)) was -1 [–1.23; –0.77]. In treatment subgroups, effect sizes were -0.73 [–1.06; –0.4] in ice-treated and -0.7 [–1.18; –0.22] in CO₂-treated patients. The inter-class effects sizes for power Doppler score in each treatment group and at each evaluation time over 24 h are summarized in Table 2.

3.3. Effects of local cryotherapy on pain

Both LC techniques also significantly reduced the median pain VAS as compared to baseline values at all evaluation times, with no global difference between ice and cold CO₂ throughout the 24 h study period (2-way ANOVA – Fig. 3).

Please cite this article in press as: Guillot X, et al. Cryotherapy decreases synovial Doppler activity and pain in knee arthritis: A randomized-controlled trial. Joint Bone Spine (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2016.09.004>

Table 1
Patient baseline characteristics.

	Ice + CO ₂ (n = 30)	Ice (n = 15)	CO ₂ (n = 15)	P (ice versus CO ₂)
Age (years)	56.8 [49.5–64.1]	65.5 [55.5–75.4]	48.2 [38.5–57.9]	P < 0.01**
Sex	F: 9/M: 21	F: 4/M: 11	F: 5/M: 10	P = 1
BMI (kg/m ²)	25.6 [23.7–27.5] N = 29	26.4 [23.2–29.6] N = 14	24.8 [22.3–27.3] N = 15	P = 0.5
Diagnosis	Gout (14) CPDD (7) RA (4) SpA (5) Crystal-induced arthritis YES/NO:	Gout (6) CPDD (6) RA (2) SpA (1)	Gout (8) CPDD (1) RA (2) SpA (4)	P = 0.13 P = 0.43
ESR (mm)	65.1 [53.2–77] N = 21	64.5 [40.9–88.1] N = 8	57.4 [37.9–77] N = 13	P = 0.6
CRP (mg/L)	104.7 [76.9–132.4]	121 [75.8–166.2]	88.3 [52.3–124.4]	P = 0.3
Previous anti-inflammatory drugs (stopped 24 h or more prior to inclusion)	Colchicine (14) Corticosteroids (4) NSAIDs (6)	Colchicine (7) Corticosteroids (2) NSAIDs (3)	Colchicine (7) Corticosteroids (2) NSAIDs (3)	

Results are presented as means / percentages ± 95% CI

** P < 0.01.

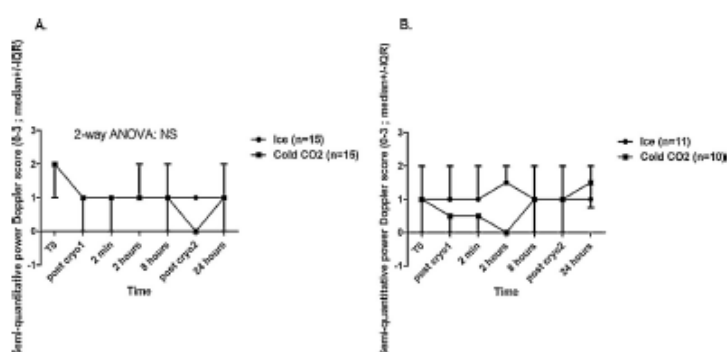


Fig. 2. Effects of local ice and cold CO₂ on synovial power Doppler activity. The PDUS semi-quantitative score (0–3) was measured at different evaluation times before/after 2 cold applications (ice or cold CO₂) in LC-treated (A) as well as contralateral non-treated arthritic knees (B). Results are presented as medians ± interquartile ranges (IQR). Post cryo 1/2: Median values just after the first/second cold application. T0: Median values at baseline. (A) In LC-treated knees, the median PDUS semi-quantitative score significantly decreased in both groups just after the first cold application compared to baseline values (Ice: n = 15; paired Wilcoxon; P < 0.01, cold CO₂: n = 15; P < 0.01), 2 min after (Ice: P < 0.01 versus baseline value, CO₂: P < 0.01), 2 h after (Ice: 1 ± 0.41; n = 14; P = 0.01, CO₂: 1.15 ± 0.37; n = 13; P = 0.047), 8 h after—just before the second cold application (Ice: P < 0.01, CO₂: P < 0.01) and this decrease remained significant the day after 2 cold applications at an 8-h interval, 24 h after the first cold application (Ice: n = 15; P < 0.01, CO₂: n = 15; P = 0.015). The median PDUS scores were also significantly lower just after compared to just before the second cold application in CO₂-treated patients (P < 0.01) but not in ice-treated patients (P = 0.15). Results are presented as medians ± interquartile ranges (IQR). IQR are directed below for the CO₂-treated group and above for the ice-treated group. (B) In contralateral non-treated arthritic knees, the median semi-quantitative power Doppler score did not vary significantly throughout the study (paired Wilcoxon and 2-way ANOVA). Results are presented as medians ± interquartile ranges (IQR). Post cryo 1/2: median values just after the first/second cold application. T0: median values at baseline. IQR are directed below for the CO₂-treated group and above for the ice-treated group.

Table 2
Inter-class effect size of local cryotherapy on the PDUS score over 24 h.

Compared to baseline scores	Ice	CO ₂	Global (ice + CO ₂)
After cryotherapy 1			
2 min	–0.73 [–1.1; –0.36]	–0.51 [–0.99; –0.03]	–1 [–1.33; –0.67]
2 h	–0.73 [–1.02; –0.44]	–0.25 [–0.73; 0.23]	–0.48 [–0.81; –0.15]
8 h	–0.96 [–1.35; –0.57]	–0.02 [–0.5; 0.46]	–0.24 [–0.58; 0.1]
After cryotherapy 2			
24 h	–0.73 [–1.08; –0.38]	–0.47 [–0.97; 0.03]	–0.48 [–0.83; –0.13]
Before/after each cold application			
Cryotherapy 1 (9 a.m.)	–0.73 [–1.1; –0.36]	–0.51 [–0.99; –0.03]	–1 [–1.33; –0.67]
Cryotherapy 2 (5 p.m.)	0 [–0.44; 0.44]	–0.47 [–0.94; 0]	0 [–0.35; –0.35]

At each evaluation time (just after the first cold application, 2 min after, 2 h after, 8 h after, 24 h after), the difference between the median PDUS score decrease from baseline in each treatment group (ice: n = 15, CO₂: n = 15, global: n = 30) and the median decrease in corresponding contralateral non-treated knees (ice: n = 11, CO₂: n = 10, global: n = 21) was assessed in order to calculate inter-class effect sizes. The effect sizes were also calculated just before/just after each cold application (Cryotherapy 1 and 2). Data were not collected for 3 patients at the 2 hour-evaluation time (ice: n = 14 – contralateral: n = 10; CO₂: n = 13 – contralateral: n = 10). At each evaluation time and for each treatment group, due to small sample sizes and a non-normal distribution of the data, the effect sizes and 95% CI were calculated using medians and IQR as described in [29].

Please cite this article in press as: Guillot X, et al. Cryotherapy decreases synovial Doppler activity and pain in knee arthritis: A randomized-controlled trial. Joint Bone Spine (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2016.09.004>

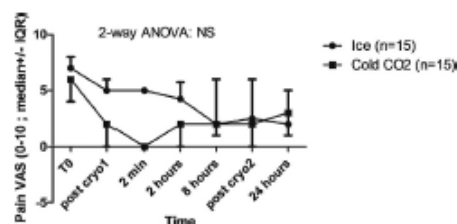


Fig. 3. Effects of local ice and cold CO₂ on pain. Pain VAS (mm) was measured at different evaluation times before/after 2 cold applications (ice or cold CO₂). Pain VAS (mm) significantly decreased just after the first cold application in ice-treated group ($n = 15$; paired Wilcoxon; $P = 0.031$) and in CO₂-treated group ($n = 15$; $P < 0.01$). These differences remained significant 2 min after ($P = 0.026$ and $P < 0.01$ in ice- and CO₂-treated groups respectively), after 2 h in CO₂-treated group ($n = 13$; $P = 0.012$) but not in ice-treated group ($n = 14$; $P = 0.07$), 8 h after the first cold application (just before the second application: ice – $P = 0.035$ and CO₂ – $P < 0.01$ respectively) and 24 h after the first application (after 2 applications at a 8 h interval): $P < 0.01$ in both treatment groups. However, the difference was not statistically significant just after versus just before the second cold application ($P = 0.37$ and $P = 0.18$ in ice- and CO₂-treated groups respectively). Results are presented as medians $\pm$ interquartile ranges (IQR). Post cryo 1/2: median values just after the first/second cold application. T0: median values at baseline.

3.4. Effects of local cryotherapy on skin temperature

The mean skin temperature did not globally differ between ice- and cold-CO₂ treated patients throughout the 24 h study period (2-way ANOVA – Fig. 4). However, the mean skin temperature was significantly lower just after each CO₂ application compared to the corresponding ice application $6.2 \pm 1.99^\circ\text{C}$ versus $13.6 \pm 3.34^\circ\text{C}$ ($P = 0.0016$) after the first cold application and $5.6 \pm 1.38^\circ\text{C}$ versus $13.77 \pm 2.77^\circ\text{C}$ ($P = 0.0008$) after the second cold application. The mean room temperature did not differ between treatment groups at any evaluation time.

3.5. Factors associated with Doppler activity and pain variations

We found a positive correlation between PDUS score variation (H0–H24) and pain VAS variation percentage (H0–H24): $r = 0.44$; $P = 0.015$ (Pearson; $n = 30$).

Factors associated with a decrease in the PDUS score and pain VAS (3 point or 40% drops) between baseline and H24 were evaluated. In multivariate analysis, the PDUS score decrease was significantly and independently associated with a 40% drop in pain VAS (OR 5.87 [2.48–13.87] (95% CI); $P = 0.04$ [Appendix A, Table S1; see the supplementary material associated with this article

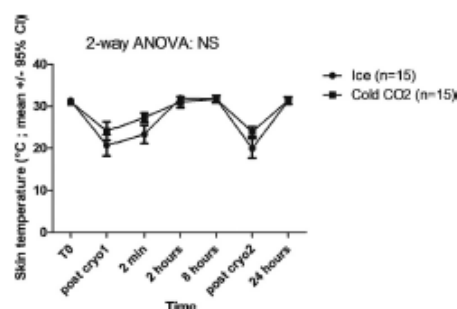


Fig. 4. Effects of local ice and cold CO₂ on skin temperature. The skin temperature ($^\circ\text{C}$) was measured at different evaluation times before/after 2 cold applications (ice or cold CO₂). Results are presented as means $\pm$ 95% CI. Post cryo 1/2: mean values just after the first/second cold application. T0: mean values at baseline.

online]). A 3-point pain VAS decrease was significantly, independently and negatively associated with the male sex (OR 0.011 [0.001–0.103]; $P = 0.043$) and positively with ice cryotherapy technique (versus CO₂: OR 51.42 [6.96–379.94]; $P = 0.049$), while a 40% drop in pain VAS (which was the median drop value) was negatively associated with the male sex (OR 0.017 [0.002–0.121]; $P = 0.039$) and positively with the percentage of decrease in the PDUS score (OR 13.33 [3.78–47]; $P = 0.04$ [Appendix A, Table S2]).

4. Discussion

In this article, we report the results of the first randomized-controlled trial showing that two LC techniques (ice during 30 min as well as cold CO₂ during 2 min) applied twice at an interval of 8 h without any concurrent treatment equally reduced PDUS synovial activity in 30 patients with knee arthritis. The PDUS activity remained unchanged in contralateral non-treated arthritic knees. Both techniques also globally reduced pain significantly and to the same extent. These anti-inflammatory and analgesic effects were still significant 24 h after the first cold application, as shown notably by inter-class effect sizes for the PDUS score, which had not, to our knowledge, been demonstrated before. We found a significant and positive correlation between the PDUS score and pain VAS evolutions after 24 h. In multivariate analysis, the PDUS score decrease after 24 h was significantly and independently associated with pain decrease. Pain VAS decrease was negatively associated with the male sex and positively with the ice technique. The tolerance was also excellent (no dropout nor adverse event). The effects of LC on synovial PDUS score are poorly documented in the literature. In a randomized-cross over study, ice applied once significantly decreased the PDUS score in 25 RA wrists just after cold application, but the score was then non-significantly lower 2, 5 and 10 min later while cold air (-30°C for 3 min) tended to increase the PDUS score 2, 5 and 10 min after cold application [23]. These apparent discrepancies compared to our results might be related to differences in LC modalities, as we applied ice for a longer duration (30 min twice) and used colder gas (hyperbaric CO₂ at -78°C for 2 min twice). In our study, we found no overall difference in the PDUS score decrease between ice- and cold gas-treated patients (2-way ANOVA – Fig. 2A). By contrast, when using contralateral arthritic knees as controls and calculating inter-class effect-sizes, the PDUS score reduction was more constantly significant and more prolonged after the first application in ice-treated patients, while the difference was no more significant 2 min, 2 h and 8 h after the first cold CO₂ application, suggesting a shorter-term effect of one cold gas application compared to ice. However, the two techniques performed equally well in terms of PDUS score reduction after 2 applications, as the interclass effect-size remained significant after 24 h in both groups. The mean skin temperatures we obtained just after LC applications were about 20°C (Fig. 4), but the minimal skin temperatures we measured during LC treatment were about 10°C in ice-treated and 4°C in cold CO₂-treated patients (data not shown). These values were globally in line with the data reported in the literature, despite a great heterogeneity between studies, probably due to differences in treatment protocols, techniques and treated joints (mostly wrists) [5,10,21–23,30–33].

The limitations of our study were a few missing data, as the PDUS activity, pain VAS and temperature could not be evaluated 2 h after the first cold application for 3 patients with great functional impairment (1 in ice-treated group, 2 in cold CO₂-treated group). We also did not include any non-treated control patients, as it could have been ethically problematic to perform repeated US examination in arthritic patients receiving no anti-inflammatory treatment. Furthermore, it is impossible to conceive placebo groups mimicking the effects of cryotherapy. Therefore, pain VAS

evaluation could not be performed in double-blind. However, we used contralateral arthritic knees as paired controls when possible for the primary outcome (PDUS score) evaluation, and the scoring was blinded for the treatment arm (ice, cold CO₂ or non-treated contralateral arthritic knee) and the evaluation time. Furthermore, a multivariate analysis was performed in order to control for potential confounders and biases for pain and PDUS score evaluation. We performed a logistic regression on a relatively small sample of 30 patients, which could have reduced the power to detect some associations and decrease the precision of some estimations.

As for the anti-inflammatory drugs (colchicine, NSAIDs, corticosteroids) they were stopped at least 24 h prior to patient inclusion. A residual anti-inflammatory effect of these drugs might be discussed, however their interruption might also have increased the synovial inflammation and consequently caused an underestimation of the anti-inflammatory effects of local cryotherapy. Furthermore, the patients were not improved by these drugs prior to inclusion and it would have been ethically problematic to include highly painful and disabled patients receiving no anti-inflammatory drug for several days. When comparing patient subgroups having received or not prior anti-inflammatory drugs, we also observed no difference in the PDUS score and pain evolution, suggesting that this potential bias was not significant in our study. As concerns the non-treated contralateral arthritic knees we used as a paired control group for the PDUS score evaluation, the most painful knee (chosen by the patient in case of knee bi-arthritis) was treated by LC in order to maximally improve the patients' symptoms. As demonstrated by Mourot et al., the tissue temperature might also have decreased in contralateral non-treated knees through an autonomic nervous system stimulation [5]. However, this kind of consensual reaction was not strong enough to decrease the synovial PDUS score in contralateral non-treated knees, and the difference remained significant between LC-treated and non-treated knees globally as well as in each treatment group.

As for the strengths of our study, we quantified the own effects of LC on synovial Doppler activity and pain, without any associated treatment (which is the major methodological limitation in cryotherapy-related current published data). The study was also controlled for the PDUS score evaluation, as contralateral arthritic knees were evaluated when possible. The PDUS scoring technique was reproducible and sensitive to change, as shown by good inter-observer and almost perfect intra-observer agreement coefficients.

For the PDUS scoring, we considered lateral parapatellar and suprapatellar recesses as validated by Naredo et al. [14,15,25,26]. Therefore, our scoring graded from 0 to 3 for each knee and at each evaluation time [26]. We did not consider medial parapatellar nor infra-patellar recesses [19,28,34]. However, in one study, lateral parapatellar recesses showed the highest PDUS activity levels in arthritic knees, so this area might be the most representative of knee synovial inflammation [28]. The intra- and inter-observer agreements we found for knee PDUS scoring were in line with the values previously reported in the literature for large joints in RA [19,24,35,36].

In multivariate analysis, pain decrease after LC was strongly and negatively associated with the male sex (Table S2). Existing data in the literature suggest sex-related differences in pain perception. Notably, female patients suffering from knee osteoarthritis showed higher pain VAS levels compared to male patients [37]. Indeed, in our study, female patients also showed significantly higher baseline pain VAS levels compared to male patients (7.4 ± 1.4 ; $n=9$ versus 4.9 ± 1.4 ; $n=21$; $P=0.038$) which might explain a greater amplitude of pain decrease after LC treatment in this subgroup.

As a conclusion, in this randomized-controlled trial, we could show that local ice and cold CO₂ applied twice in a single day at an interval of 8 h significantly and equally reduced the synovial PDUS activity, pain and were both perfectly tolerated in knee arthritis.

LC's efficacy and tolerance should be further validated in longer-term prospective randomized-controlled trials. Comparative trials versus NSAIDs and corticosteroids will also allow to compare their respective analgesic and anti-inflammatory effect-sizes.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2016.09.004>.

References

- [1] Roubille C, Richer V, Starnino T, et al. The effects of tumour necrosis factor inhibitors, methotrexate, non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids on cardiovascular events in rheumatoid arthritis, psoriasis and psoriatic arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 2015;74:480–9.
- [2] Schlesinger N, Detry MA, Holland BK, et al. Local ice therapy during bouts of acute gouty arthritis. *J Rheumatol* 2002;29:331–4.
- [3] Demoulin C, Vanderthommen M. Cryotherapy in rheumatic diseases. *Jt Bone Spine Rev Rhum* 2012;79:117–8.
- [4] Atzeni F, Turiel M, Caporali R, et al. The effect of pharmacological therapy on the cardiovascular system of patients with systemic rheumatic diseases. *Autoimmun Rev* 2010;9:835–9.
- [5] Mourot L, Cluzeau C, Regnard J. Hyperbaric gaseous cryotherapy: effects on skin temperature and systemic vasoconstriction. *Arch Phys Med Rehabil* 2007;88:1339–43.
- [6] Chatap G, De Sousa A, Giraud K, et al. Pain in the elderly: Prospective study of hyperbaric CO₂ cryotherapy (neurocryostimulation). *Jt Bone Spine Rev Rhum* 2007;74:617–21.
- [7] Welch V, Brosseau L, Shea B, et al. Thermotherapy for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev* 2001;CD002826.
- [8] Guillot X, Tordi N, Mourot L, et al. Cryotherapy in inflammatory rheumatic diseases: a systematic review. *Expert Rev Clin Immunol* 2014;10:281–94.
- [9] Hirvonen HE, Mikkelsen MK, Kautiainen H, et al. Effectiveness of different cryotherapies on pain and disease activity in active rheumatoid arthritis. A randomised single blinded controlled trial. *Clin Exp Rheumatol* 2006;24:295–301.
- [10] Oosterveld FG, Rasker JJ. Effects of local heat and cold treatment on surface and articular temperature of arthritic knees. *Arthritis Rheum* 1994;37:1578–82.
- [11] Harris ED, McCroskey PA. The influence of temperature and fibril stability on degradation of cartilage collagen by rheumatoid synovial collagenase. *N Engl J Med* 1974;290:1–6.
- [12] Carotti M, Salaffi F, Manganelli P, et al. Power Doppler sonography in the assessment of synovial tissue of the knee joint in rheumatoid arthritis: a preliminary experience. *Ann Rheum Dis* 2002;61:877–82.
- [13] Koski JM, Saarakkala S, Helle M, et al. Power Doppler ultrasonography and synovitis: correlating ultrasound imaging with histopathological findings and evaluating the performance of ultrasound equipments. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1590–5.
- [14] Naredo E, Collado P, Cruz A, et al. Longitudinal power Doppler ultrasonographic assessment of joint inflammatory activity in early rheumatoid arthritis: predictive value in disease activity and radiologic progression. *Arthritis Rheum* 2007;57:116–24.
- [15] Kawashiri S, Kawakami A, Iwamoto N, et al. The power Doppler ultrasonography score from 24 synovial sites or 6 simplified synovial sites, including the metacarpophalangeal joints, reflects the clinical disease activity and level of serum biomarkers in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Oxf Engl* 2011;50:962–5.
- [16] Szklarek M, Court-Payen M, Strandberg C, et al. Power Doppler ultrasonography for assessment of synovitis in the metacarpophalangeal joints of patients with rheumatoid arthritis: a comparison with dynamic magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum* 2001;44:2018–23. [http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131\(200109\)44:9<2018::AID-ART350>3.0.CO;2-C](http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131(200109)44:9<2018::AID-ART350>3.0.CO;2-C)
- [17] Backhaus M, Ohndorf S, Kellner H, et al. Evaluation of a novel 7-joint ultrasound score in daily rheumatologic practice: a pilot project. *Arthritis Rheum* 2009;61:1194–201.
- [18] Iagnocco A, Finucci A, Ceccarelli F, et al. Power Doppler ultrasound monitoring of response to anti-tumour necrosis factor alpha treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Oxf Engl* 2015;54:1890–6.
- [19] Hartung W, Kellner H, Strunk J, et al. Development and evaluation of a novel ultrasound score for large joints in rheumatoid arthritis: one year of experience in daily clinical practice. *Arthritis Care Res* 2012;64:675–82.
- [20] Keen HI, Hensor EMA, Wakefield RJ, et al. Ultrasound assessment of response to intra-articular therapy in osteoarthritis of the knee. *Rheumatol Oxf Engl* 2015;54:1385–91.

Please cite this article in press as: Guillot X, et al. Cryotherapy decreases synovial Doppler activity and pain in knee arthritis: A randomized-controlled trial. *Joint Bone Spine* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2016.09.004>

- [21] Strunk J, Strube K, Klingenberg P, et al. Two- and three-dimensional Doppler sonographic evaluation of the effect of local cryotherapy on synovial perfusion in wrist arthritis. *Rheumatol Oxf Engl* 2006;45:637–40.
- [22] Ellegaard K, Torp-Pedersen S, Henriksen M, et al. Influence of recent exercise and skin temperature on ultrasound Doppler measurements in patients with rheumatoid arthritis—an intervention study. *Rheumatol Oxf Engl* 2009;48:1520–3.
- [23] Albrecht K, Albert C, Lange U, et al. Different effects of local cryo and cold air physical therapy in wrist rheumatoid arthritis visualised by power Doppler ultrasound. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1234–5.
- [24] Gok M, Erdem H, Gogus F, et al. Relationship of ultrasonographic findings with synovial angiogenesis modulators in different forms of knee arthritides. *Rheumatol Int* 2013;33:879–85.
- [25] Naredo E, Rodríguez M, Campos C, et al. Validity, reproducibility, and responsiveness of a twelve-joint simplified power Doppler ultrasonographic assessment of joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;59:515–22.
- [26] Perricone C, Ceccarelli F, Modesti M, et al. The 6-joint ultrasonographic assessment: a valid, sensitive-to-change and feasible method for evaluating joint inflammation in RA. *Rheumatol Oxf Engl* 2012;51:866–73.
- [27] Semerano L, Gutierrez M, Falgarone G, et al. Diurnal variation of power Doppler in metacarpophalangeal joints of patients with rheumatoid arthritis: a preliminary study. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1699–700.
- [28] Beitzinger N, Ehrenstein B, Schreiner B, et al. The value of colour Doppler sonography of the knee joint: a useful tool to discriminate inflammatory from non-inflammatory disease? *Rheumatol Oxf Engl* 2013;52:1425–8.
- [29] Hozo SP, Djulbegovic B, Hozo I. Estimating the mean and variance from the median, range, and the size of a sample. *BMC Med Res Methodol* 2005;5:13.
- [30] Demoulin C, Brouwers M, Darot S, et al. Comparison of gaseous cryotherapy with more traditional forms of cryotherapy following total knee arthroplasty. *Ann Phys Rehabil Med* 2012;55:229–40.
- [31] Kim YH, Baek SS, Choi KS, et al. The effect of cold air application on intra-articular and skin temperatures in the knee. *Yonsei Med J* 2002;43:621–6.
- [32] Oosterveld FG, Rasker JJ, Jacobs JW, et al. The effect of local heat and cold therapy on the intraarticular and skin surface temperature of the knee. *Arthritis Rheum* 1992;35:146–51.
- [33] Korman P, Straburzyńska-Lupa A, Romanowski W, et al. Temperature changes in rheumatoid hand treated with nitrogen vapors and cold air. *Rheumatol Int* 2012;32:2987–92.
- [34] Backhaus M, Burmester GR, Gerber T, et al. Guidelines for musculoskeletal ultrasound in rheumatology. *Ann Rheum Dis* 2001;60:641–9.
- [35] Koski JM, Saarakkala S, Helle M, et al. Assessing the intra- and inter-reader reliability of dynamic ultrasound images in power Doppler ultrasonography. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1658–60.
- [36] Ohrndorf S, Naumann L, Grundey J, et al. Is musculoskeletal ultrasonography an operator-dependent method or a fast and reliably teachable diagnostic tool? Interreader agreements of three ultrasonographers with different training levels. *Int J Rheumatol* 2010;2010:164518.
- [37] Glass N, Segal NA, Sluka KA, et al. Examining sex differences in knee pain: the multicenter osteoarthritis study. *Osteoarthritis Cartilage* 2014;22:1100–6.

Please cite this article in press as: Guillot X, et al. Cryotherapy decreases synovial Doppler activity and pain in knee arthritis: A randomized-controlled trial. *Joint Bone Spine* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2016.09.004>

- **Article 3.**

PONE-D-16-26181

Local cryotherapy improves adjuvant-induced arthritis through downregulation of IL-6 / IL-17 pathway but independently of TNF α

PLOS ONE

Dear Dr Guillot,

Thank you for submitting your manuscript to PLOS ONE and for your email below. We sincerely apologize for the length of time it has taken for us to make our decision. We rely heavily on the generosity of all reviewers and unfortunately it had taken some time before all reviewers had finished reviewing your manuscript.

After careful consideration, we feel that it has merit, but is not suitable for publication as it currently stands. Therefore, my decision is "Major Revision."

Please address the critiques submit your revision within forty-five days of the date of this decision. Please note that any manuscripts that require a revision period greater than 6 months should be resubmitted as a new submission to PLOS ONE. Any manuscripts remaining in Editorial Manager after 6 months will be withdrawn. If you choose not to submit a revision, please notify us. Yours sincerely,

Deyu Fang, Ph.D. Academic Editor

PLOS ONE

Reviewers' comments:

Comments to the Author

1. Is the manuscript technically sound, and do the data support the conclusions?

The manuscript must describe a technically sound piece of scientific research with data that supports the conclusions. Experiments must have been conducted rigorously, with appropriate controls, replication, and sample sizes. The conclusions must be drawn appropriately based on the data presented. Reviewer #1: Yes

2. Has the statistical analysis been performed appropriately and rigorously? Reviewer #1: Yes

3. Have the authors made all data underlying the findings in their manuscript fully available?

Reviewer #1: Yes

4. Is the manuscript presented in an intelligible fashion and written in standard English?

Reviewer #1: Yes

5. Review Comments to the Author

Reviewer #1: The manuscript is well written in an engaging lively style and addresses a clinical relevant therapeutic approach treating rheumatoid arthritis.

The abstract could benefit if it was stated that the AIA model of rheumatoid arthritis was used.

The author could strength the paper by explaining why in Figure 1 only IL-1b was upregulated in AIA rat patella explants compared to healthy control, temperature only affected IL-6 levels and IL-17 was unchanged in all conditions. Figure 2 contains important information which are very suitable for the supplemental information. Further would the figure benefit from showing also the untreated control group.

The authors claim on page 10 significant differences for arthritis scores and ankle diameter after cold spray treatment which are not shown in Fig. 3c +d. On page 11 the authors state local TNF- α levels while only showing mRNA expression levels. Nonetheless, local protein levels would be very feasible for the impact of the paper.

In the discussion on page 14 the authors statement that local ice therapy is better tolerated than cold gas should be confirmed by further evidence.

The manuscript contains very interesting findings on the impact of local ice and cold spray therapy in rheumatoid arthritis. However, there is insufficient data and discussion on the cells and pathways contributing to the decrease in IL-17 and IL-6 levels after cryotherapy. The paper would gain major impact if those cells and pathways promoting the described effects could further be elucidated.

The paper would further strongly benefit from a direct comparison of cold spray to local ice therapy regarding local and systemic IL-17 and IL-6 levels and a possible explanation of the differences.

The finding of significantly decreased plasma serum IL-17 level are very interesting, but the other plasma levels are nearly unchanged leaving their impact in cryotherapy in rheumatoid arthritis unclear.

Altogether the manuscript aims to provide novel insights in the mechanisms contributing to the beneficial effects of cryotherapy in rheumatoid arthritis. Providing some further data this manuscript will undoubtedly be of interest to numerous researchers in the field.

PLOS ONE

Local cryotherapy improves adjuvant-induced arthritis through downregulation of IL-6 / IL-17 pathway but independently of TNF α

—Manuscript Draft—

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Local cryotherapy improves adjuvant-induced arthritis through downregulation of IL-6 / IL-17 pathway but independently of TNF α
Short Title:	IL-6 and IL-17 dependent therapeutic effects of local cryotherapy in murine arthritis
Corresponding Author:	Xavier Guillot, MD Centre Hospitalier Universitaire de Besançon Besançon, FRANCE
Keywords:	Cryotherapy; Adjuvant-induced arthritis; inflammation; IL-6; IL-17; Physical therapy; Synovitis; Rehabilitation; Rheumatoid arthritis.
Abstract:	Objectives: Local cryotherapy is widely and empirically used in the adjuvant setting in rheumatoid arthritis treatment, however its own therapeutic and anti-inflammatory effects are poorly characterized. We aimed to evaluate the effects of local cryotherapy on local and systemic inflammation in Adjuvant-induced arthritis. Methods: The effects of mild hypothermia (30°C for 2 hours) were evaluated in vitro in cultured rat adjuvant-induced arthritis patellae. In vivo, local cryotherapy was applied twice a day for 14 days in arthritic rats (ice: n=10, cold gas: n=9, non-treated: n=10). At day 24 after the induction of arthritis, cytokine levels were measured in hind paws (Q-RT-PCR) and plasma (Multiplex/ELISA). Results: In vitro, punctual mild hypothermia down-regulated IL-6 protein expression. In vivo, ice showed a better efficacy profile on the arthritis score and joint swelling and was better tolerated, while cold gas induced a biphasic response profile with initial, transient arthritis worsening. Local cryotherapy also exerted local and systemic anti-inflammatory effects, both at the gene and the protein levels: IL-6, IL-17A and IL-1β gene expression levels were significantly down-regulated in hind paws. Both techniques decreased plasma IL-17A while ice decreased plasma IL-6 protein levels. By contrast, we observed no effect on local/systemic TNF-α pathway. Conclusions: We demonstrated for the first time that sub-chronically applied local cryotherapy (ice and cold gas) is an effective and well-tolerated treatment in adjuvant-induced arthritis. Furthermore, we provided novel insights into the cytokine pathways involved in Local cryotherapy's local and systemic anti-inflammatory effects, which were mainly IL-6/IL-17A-driven and TNF-α independent in this model.
Order of Authors:	Xavier Guillot, MD Hélène Martin Katy Maguin-Gaté Stéphanie Py Johnny Moretto Perle Totosen Daniel Wendling Céline Demougeot Nicolas Tordi
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Financial Disclosure	The author(s) received no specific funding for this work.

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Dear editor,

Thank you for considering this article related to the anti-inflammatory effects of local cryotherapy in adjuvant-induced arthritis. We both studied the effects of punctual mild hypothermia (in vitro) and the therapeutic effects of two techniques (ice and cold gas sprays) applied twice a day for 14 days without any concurrent treatment and versus non-treated controls, which hadn't been done before. This original approach allowed us to demonstrate for the first time that local cryotherapy down-regulates pivotal cytokine pathways involved in inflammatory rheumatic diseases such as IL-6 – IL-17 axis. These effects were both local and systemic, at the gene as well as at the protein level. The effects of cryotherapy on IL-17 had never been reported before. By contrast, we observed no effect on the TNF- α pathway. We used control groups (non-treated AIA rats and non AIA rats), which strengthens the validity of our results. These results were presented in poster tour during the EULAR congress (Guillot X, et al. SAT0047– PT- DOI: 10.1136/annrheumdis-2016-eular.1779-S3 abstract. and S4 poster.).

In human rheumatic diseases, the results concerning the effects of cryotherapy on local/systemic cytokine levels are sparse with a lack of standardization in the procedures, no control groups, and associated pharmacologic/physical treatments preventing from analyzing the own anti-inflammatory effects of cryotherapy. We published a systematic review on this topic in 2014 (Guillot X, et al. Cryotherapy in inflammatory rheumatic diseases: a systematic review. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014 Feb;10(2):281-94– S5 article.).

We showed recently that local cryotherapy applied on human arthritic knees decreased pain and synovial Doppler inflammation (Guillot X, et al. *Joint Bone Spine.* Under review - S6 article.). Consistently with the results we observed in AIA, we also demonstrated that local cryotherapy significantly decreased IL-6, IL-1 β and VEGF levels in the synovial fluid of arthritic patients (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02573298 – Guillot X, et al. SAT0626 – P - DOI:

10.1136/annrheumdis-2016-eular.1699 -S7 abstract. and S8 poster.). Therefore, our data in AIA were partly confirmed in arthritic patients, further corroborating the hypothesis that local cryotherapy's therapeutic effects might be mainly IL-6-driven and TNF- α -independent.

These previously unknown clinical and biological effects of long-term cryotherapy in murine arthritis provide new insight on the biological anti-inflammatory effects of cryotherapy. Further comparative studies will help determine whether long-term local cryotherapy might be a dose-sparing agent or a safer alternative to pharmacological adjunct anti-inflammatory drugs such as corticosteroids and NSAIDs, in order to reduce iatrogeny. This manuscript has not previously been published and is not currently under consideration for publication in any other journal.

Sincerely,

X. Guillot.

Local Cryotherapy Improves Adjuvant-Induced Arthritis through Down-Regulation of IL-6 / IL-17 Pathway but Independently of TNF α

Xavier Guillot^{*1,2}, Hélène Martin¹, Katy Maguin-Gaté¹, Stéphanie Py³, Johnny Moretto¹, Perle Totoson¹, Daniel Wendling^{2,4}, Céline Demougeot¹, Nicolas Tordi¹

¹ EA 4267 FDE, Univ.Bourgogne Franche-Comté, F-25030 Besançon, France.

² Service de Rhumatologie, CHRU Besançon, France.

³ CIC IT, INSERM Center CIT 808, Besançon Cedex, France.

⁴ EA 4266, Univ.Bourgogne Franche-Comté, F-25030 Besançon, France.

*Correspondence: Xavier Guillot, MD, xguillot@chu-besancon.fr

Hôpital Jean Minjoz, service de rhumatologie, boulevard Fleming, 25030, Besançon Cedex, France. (33) 3 81 66 82 41 /Fax (33) 3 81 66 86 86.

Abstract

Objectives: Local cryotherapy is widely and empirically used in the adjuvant setting in rheumatoid arthritis treatment, however its own therapeutic and anti-inflammatory effects are poorly characterized. We aimed to evaluate the effects of local cryotherapy on local and systemic inflammation in Adjuvant-induced arthritis.

Methods: The effects of mild hypothermia (30°C for 2 hours) were evaluated *in vitro* in cultured rat adjuvant-induced arthritis patellae. *In vivo*, local cryotherapy was applied twice a day for 14 days in arthritic rats (ice: n=10, cold gas: n=9, non-treated: n=10). At day 24 after the induction of arthritis, cytokine levels were measured in hind paws (Q-RT-PCR) and plasma (Multiplex/ELISA).

Results: *In vitro*, punctual mild hypothermia down-regulated IL-6 protein expression. *In vivo*, ice showed a better efficacy profile on the arthritis score and joint swelling and was better tolerated, while cold gas induced a biphasic response profile with initial, transient arthritis worsening. Local cryotherapy also exerted local and systemic anti-inflammatory effects, both at the gene and the protein levels: IL-6, IL-17A and IL-1 β gene expression levels were significantly down-regulated in hind paws. Both techniques decreased plasma IL-17A while ice decreased plasma IL-6 protein levels. By contrast, we observed no effect on local/systemic TNF- α pathway.

Conclusions: We demonstrated for the first time that sub-chronically applied local cryotherapy (ice and cold gas) is an effective and well-tolerated treatment in adjuvant-induced arthritis. Furthermore, we provided novel insights into the cytokine pathways involved in Local cryotherapy's local and systemic anti-inflammatory effects, which were mainly IL-6/IL-17A-driven and TNF- α independent in this model.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is an auto-immune disease in which synovial inflammation causes pain, joint destruction, disability. In the inflamed joint, macrophages, T and B lymphocytes, synoviocytes secrete pro-inflammatory cytokines and induce enzymes involved in synovial inflammation and cartilage degradation (Cyclo-oxygenase-2 (COX-2), inducible-NO synthase (i-NOS), metalloproteinases) under the direct control of pivotal transcription factors such as Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B) [1]. Local and systemic inflammation are driven by specific CD4+ T lymphocyte subsets and cytokine profiles resulting in a complex pro-inflammatory cytokine network [2]. RA was first considered as a T-helper 1 (Th1)-driven disease, mainly depending on IFN- γ /TNF- α pathway and Th1/Th2 balance [3]. More recently, IL-6 has been shown to induce Th-17 differentiation and to decrease regulatory-T cell (Treg) expansion in

murine models of RA, promoting a pro-inflammatory immune response profile [4–6]. These IL-6/IL-17 axis and Th-17/Treg balance have emerged as a major pathogenic pathway in RA [7], through widely TNF-independent mechanisms [8,9]. Consistent with these hypotheses, both TNF- α and IL-6 blockades are efficient therapeutic strategies in RA [10]. Despite these highly efficient targeted biologic treatments, many arthritic patients still need adjunct anti-inflammatory drugs such as corticosteroids or non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), known to be iatrogenic and to increase morbidity and mortality [11]. Therefore, the use of adjunct anti-inflammatory treatments with a better risk-benefit balance could be very helpful in RA.

Cryotherapy is empirically used in the adjuvant setting in RA treatment, with a very good tolerance profile as compared to corticosteroids or NSAIDs, but protocols lack standardization. A recent systematic review of literature, reported that local (ice, cold gas) as well as whole-body cryotherapy (WBC) applied 2 times a day for 7 to 15 days (14–20 applications) significantly decreased pain Visual Analogic Scale (VAS) and Disease Activity Score assessed on 28 joints (DAS28) in 257 RA patients [12]. The majority of the few available studies regarding cryotherapy in RA patients suffer from many limitations related to the lack of assessment of associated physical and pharmacological treatments, a high level of polymedication, the lack of control group, small sample sizes, the heterogeneity in cryotherapy protocols (physical agents, temperature, duration, periodicity, indications). Moreover, it would be impossible to conceive a placebo mimicking cryotherapy. In this context, the use of animal models of arthritis is a benchmark choice to address the own effects of long-term cryotherapy in RA. Previous studies in many physiological and pathological conditions identified cryotherapy related analgesic [13], antiphlogistic, myorelaxing [14,15], vasoconstrictive [16], anti-inflammatory [17], enzyme-blocking [18] and anti-oxidative [19] effects. These effects were related to NF- κ B-dependent IL-1 β , IL-6 and TNF- α gene

transcription inhibition [20], temperature-dependent enzyme metabolism blockade [21]. However, whether these mechanisms are involved in cryotherapy-treated RA is not known.

In the present study, we investigated the effect of a sub-chronic treatment with local cryotherapy (LC) in the widely-used rat model of adjuvant-induced arthritis (AIA). Two modalities of cryotherapy were compared: local ice and cold spray application. After 14-days of daily treatment, the effect of cryotherapy on hind paw cytokines gene expression, plasma cytokine levels, hind paw diameter and arthritis scores were assessed. To determine the effect of temperature by itself, cytokines levels were also measured *in vitro* in a cultured patellar explant model after exposure to a mild hypothermia (30°C).

Materials and Methods

Animals

Six-week old male Lewis rats (n = 30 for *in vivo* experiments, n=10 for *in vitro* experiments) were purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Animals were kept under a 12h-12h light: dark cycle and allowed free access to food and water. The experimental procedures were approved by the local committee for ethics in animal experimentation (n° 2012-019) of Franche-Comté University (Besançon, France), and complied with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animal published by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revised 2011).

Induction and clinical evaluation of the arthritis model

Adjuvant arthritis was induced by a single intradermal injection at the base of the tail of 120 µL of 1 mg of heat-killed *Mycobacterium butyricum* (Difco®, Detroit, MI) suspended in 0.1 ml of mineral oil (Freund's incomplete adjuvant (Difco®, Detroit, MI)). The AIA model is characterized by rapid onset and progression of a robust and easily measurable polyarthritis,

clinically characterized by severe erythema and diffuse soft swelling with complete ankylosis and malformations in the paws, reduced locomotor activity, frequently associated to ears and tail inflammation, weight loss, anorexia and diarrhea [22]. Rats were weighed and monitored 7 days per week for clinical signs of arthritis. The scoring system was employed as follows [23]: arthritis of one finger scores 0.1, weak and moderate arthritis of one big joint (ankle or wrist) scores 0.5 and, intense arthritis of one big joint scores 1. Tarsus and ankle were considered as the same joint. Sum of joints scores of 4 limbs leads to an arthritic score of maximum 6 to each rat. The ankle diameter was measured with a digital caliper (Vernier Stainless®, China). A group of non-arthritic age-matched rats was used as controls and received saline at the base of the tail.

Local cryotherapy treatments

At the day of the first inflammatory symptoms (i.e. at day 10-11 post-immunization) AIA rats were randomized in 3 groups. One group received ice application (n=10), one group received cold spray application (n=10), one group was untreated (n=10). Local cryotherapy was applied to both hind paws twice a day with a 8-hour interval (at 9 A.M and 5 P.M) for 14 consecutive days. Room and skin temperature were monitored using MLT409/A® Skin Temperature Probe (ML309 transducer Thermistor Pod – AD Instruments). Skin temperature was measured just after each cold application on hind paws (on both tarsae and ankles in alternating order of measurement). The mean room temperature over 14 days (mornings and afternoons) was slightly lower in ice-treated group compared to cold gas spray-treated animals ($23.14^{\circ}\text{C} \pm 0.17$ versus $23.59 \pm 0.14^{\circ}\text{C}$; $p=0.049$). For ice application, the bottom of 5 cages (2 rats per cage separated by ice chips) was lined with 50 mL ice pops (Yéti®, Yetigel, Avignon, France) previously frozen at -26°C . Rats were installed in the ice-lined cages for 30 minutes. Rats were placed in the cages and removed 30 minutes later at a 5 minute-interval in an alternating order. As concerns gas LC, rats were treated twice a day for 14 consecutive

days using cold sprays (Ice Spray, Ghiaccio Spray®, Artsana Group, Italy. CE 0546). Cold gas was pulverized on each hind paw at a distance of 25 cm (Nine 5 second-applications alternated with 10 second breaks during 2 minutes for each hind paw). The orders of treatment for rats and paw sides were also alternated. Cryotherapy-treated rats were killed the day after the last cold application.

Tissue collection

Twenty-four days after treatment initiation, rats were anaesthetized with pentobarbital (60 mg/kg, i.p.). Blood was withdrawn from the abdominal artery and centrifuged to obtain plasma, divided into aliquots and stored at -80°C until analysis. Hind paws were dissected just above ankles, then prepared as described in the Q-RT-PCR section.

Cultured patellae explants

Separated group of AIA (n=10) and control Lewis rats (n=10) were used to assess the anti-inflammatory effects of one local cold application in synovial tissues. At day 24 post-immunization, after anaesthesia with pentobarbital (60 mg/kg, i.p.), both patellae were dissected according to the method described by Lubberts et al. [24–27]. Patellae were then cultured in RPMI 1640 medium (200 microliters per patella) mixed with mBSA (0.1%), gentamycin (50 micrograms per mL) and L-Glutamin (2 mM) at 37°C (left patellae) versus 30°C (right patellae) for 2 hours, in order to reproduce synovial temperature conditions in local ice-treated arthritic knees in humans (tissue mild hypothermia) [28]. Culture supernatants were then harvested. The effect of hypothermia on cell viability was assessed by measuring ATP levels in patellae by luminescence. The results showed that hypothermia did not affect cell viability of the explant [S1 Fig.]. Supernatants were aliquoted and stored at -80°C until analysis.

Q-RT-PCR

In order to assess long-term local cryotherapy anti-inflammatory effects, hind paws from AIA rats treated by cryotherapy and non-treated controls were cut just above the ankles. Skin and claws were dissected, then paws were directly frozen in liquid nitrogen then stored at -80°C. Frozen paws were then used for quantitative real-time PCR analysis as described in [29–35]. Frozen paws were then finely grinded in a mortar, mRNA were extracted using Qiagen® mRNA extraction kit, then Q-RT-PCR were performed using Biorad® cDNA and SybrGreen kits. TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17A gene expression were quantified in paws (Primer sequences: Actin: sense TATCGGCAATGACGCGTTCC–antisense GCCTGGGTACATGGTGGTG ; GADPH: sense GGGCATCCTGGGCTACACTG–antisense GAGGTCCACCACCCTGTTGC ; TNF- α : sense CCAATCTGTGTCCTTCTAA–antisense TTCTGAGCATCGTAGTTG ; IL-6: sense GACCAAGACCATCCAACCT–antisense TAGGTTTGCCGAGTAGAC ; IL-1 β : sense CCTGCAGCTGGAGAGTGTGGAT–antisense TGCTCTGCTTGAGAGGTGCTG ; IL-17A: sense AACAGAGACCTGAGGCTA–antisense TCCATATCACTTGCTGAGATT).

Plasma and supernatant cytokine levels

Levels of TNF- α , IL-17A and IL-1 β levels were measured using Milliplex magnetic bead panel kits (eBioscience, Vienna, Austria) that were analyzed using a Luminex MAGPIX system (Luminex Corporation; Houston, TX) and Milliplex Analyst software (Millipore; St. Charles, MO). The limits of detection provided by the manufacturer for IL-17A, IL-1 β and TNF α were 3.32 pg/mL, 13 pg/mL and 3.78 pg/mL respectively. IL-6 levels were measured using ELISA technique (rat IL6 platinum ELISA, BMS625®, eBioscience, Vienna, Austria – detection limit: 12 pg/ml).

Statistical analysis

Values are presented as means $\pm$ SEM. In order to compare the evolution of arthritic scores, ankle diameters, weight gain (%) and cytokine levels in hind paws and plasma in ice, cold gas or non-treated rats, non-parametric Mann-whitney tests and 2-way repeated measures ANOVA were performed. Bonferroni post-tests were performed in order to compare daily values between groups. As for patella culture assays, paired Wilcoxon tests were used. The type I error coefficient was set at 0.05. Pearson's coefficients were used. Statistical analyses were performed using R and Graphpad® softwares.

Results

Effects of mild hypothermia on cytokine protein expression in cultured AIA patellar explants in vitro

At 37°C, IL-1 β levels were significantly higher in arthritic AIA compared to control rats ($p=0.05$ – Fig. 1C.). Conversely, no difference was measured for IL-6 (Fig. 1A.) nor IL-17A (Fig. 1B.) levels.

In AIA, as compared to 37°C, hypothermia significantly decreased IL-6 levels ($p<0.05$ – Fig. 1D.) but not IL-17A (Fig. 1E.) nor IL-1 β (Fig. 1F.) protein levels. The same results were obtained in control rats (Fig. 1G. - Fig. 1H. - Fig. 1I.). TNF- α protein was not detectable in any culture supernatant, irrespective of the temperature and the arthritic status.

Fig. 1. Cytokine levels in patellar explant culture supernatants from control and AIA rats. Both patellae from AIA ($n=10$) and non-AIA ($n=10$) rats were cultured at 30°C (right patellae) versus 37°C (left patellae) for 2 hours. IL-6 (A, D, G), IL-17A (B, E, H) and IL-1 β (C, F, I) levels were measured in culture supernatants. Results are expressed as means $\pm$ SEM. Paired Wilcoxon tests were used. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Effects of local cryotherapy in AIA rats: tolerance and skin temperature

To determine whether the anti-inflammatory effects of hypothermia observed *in vitro* might translate into clinical benefits *in vivo*, AIA rats were treated for 14 days with local cryotherapy (ice or cold gas) twice a day. Cryotherapy was globally well-tolerated except for one rat who died from cardiac arrest during the first cold gas spray application. Cold gas-treated animals exhibited macroscopic signs of hind paw skin inflammation after one week under treatment. The mean body weight of AIA rats was unaffected by the treatment. At day 24, body weights (g) were 207 ± 3 in AIA, 211 ± 2 in ice-treated AIA rats (AIA-I) and 210 ± 3 in cold gas-treated AIA rats (AIA-CG) (NS). The mean skin temperature on treated ankles and tarsae over 14 days of treatment (mornings and afternoons) was $18.97 \pm 0.8^\circ\text{C}$ (mean $\pm$ SD) in ice-treated AIA rats and $19.17 \pm 1.34^\circ\text{C}$ in cold gas treated rats. The minimal temperature measured on the 4 sites over 14 days was $17.9 \pm 0.92^\circ\text{C}$ in AIA-I and $18 \pm 1.38^\circ\text{C}$ in AIA-CG. Mean and minimal skin temperatures didn't differ between ice- and cold gas spray-treated arthritic rats throughout the 14 days of treatment (2-way ANOVA on repeated measures - Fig. 2.).

Fig. 2. Skin temperature after cold application. Skin temperature was measured on hind paws (on both ankles and tarsae) just after each cold application using a temperature probe. The mean temperature (A) as well as the minimal temperature (B) on the 4 joints were calculated for each treated AIA rat. Results are expressed as means $\pm$ SEM (n=9-10 rats). 2-way ANOVAs with Bonferroni post-tests were used. NS: non significant.

Effects of local cryotherapy on clinical arthritis

The first clinical signs of arthritis (paw edema, erythema, stiffness) appeared between day 11 and day 14 after immunization. From day 11 onwards, AIA rats experienced disease progression into a polyarthritis, characterized by severe erythema and diffuse soft swelling with complete ankylosis and malformations in the paws, reduced locomotor activity, frequently associated with ear and tail inflammation. In AIA, the arthritis score increased

from day 11 until its maximum at day 21 (5.6 ± 0.3) and plateaued until day 24 (5.6 ± 0.3 at day 24 – Fig. 3A. and Fig. 3C.). The time-course of the hind paw diameters was superimposable to that of arthritis score (Fig. 3B. and Fig. 3D.). As compared to AIA, when considering the whole 14 day-treatment period, local ice cryotherapy significantly decreased arthritis score ($p=0.001$ - Fig. 3A.) and mean ankle diameter ($p<0.001$ - Fig. 3B.) whereas the difference was not significant for cold spray therapy concerning the arthritis score (Fig. 3C.) and for the mean ankle diameter (Fig. 3D.). Actually, cold spray treatment induced a biphasic response (Fig. 3C. and Fig. 3D.): it first aggravated the arthritis score at days 11-12 and then reduced the score at days 21-24 (Fig. 3C.).

Fig. 3. Effect of cryotherapy on the time-course of arthritis. AIA rats were treated or not (control) either by being placed into cages lined with ice pops for 30 minutes ($n=10$) or by intermittent cold gas spray applications on hind paws for 2 minutes ($n=9$), twice a day for 14 consecutive days from day 11 to day 24 post-immunization. Mean arthritis scores (A, C) and mean ankle diameter (B, D) were plotted over time after AIA induction. Results are expressed as means $\pm$ SEM ($n=9-10$ /group). 2-way ANOVAs with Bonferroni post-tests were used. *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$.

Thus, even though the time-course was different, at the end at the treatment (day 24), both treatment significantly reduced arthritis score (- 41 %, $p<10^{-4}$ for ice and - 28 %, $p<0.001$ for cold spray) and mean ankle diameters (-15.7%, $p<0.0001$ for ice and -10.6 %, $p=0.0003$ for cold spray) as compared to AIA. However, at day 24, mean arthritis scores tended to be lower in ice-treated compared to cold gas-treated rats (3.25 ± 0.35 versus 3.99 ± 0.23 , NS) and mean ankle diameters were significantly lower in ice-treated rats (8.26 ± 0.15 mm) compared to cold gas (8.76 ± 0.14 mm, $p<0.05$). The time-course of the arthritis score on hind paws in each treatment group was superimposable to the time-course of the global arthritis score [S2 Fig.].

Effects of local cryotherapy on cytokine gene transcription in AIA hind paws

To determine whether the clinical effect of 14 day-local cryotherapy was associated with local effects on cytokines, we measured cytokines gene expression in AIA groups at the end of the treatment period (day 24). As compared to control rats, AIA exhibited significantly higher IL-6, IL-17A, IL-1 β and TNF- α gene expression (Fig. 4A. to 4D.). Both ice and cold gas significantly decreased IL-6 (-59% and -63% respectively, $p < 0.001$), IL-17A (-51% and -52% respectively, $p < 0.05$) and IL-1 β (-87% in both ice- and cold gas spray-treated rats, $p < 0.0001$) gene expression. By contrast, TNF- α levels were unaffected by cryotherapy whatever the modality (Fig. 4E. to 4L.).

Fig. 4. Mean cytokine levels in treatment groups (Q-RT-PCR on grinded hind paws). AIA rats were treated or not (control) either by being placed into cages lined with ice pops for 30 minutes ($n=10$) or by intermittent cold gas spray applications on hind paws for 2 minutes ($n=9$), twice a day for 14 consecutive days from day 11 to day 24 post-immunization. At day 24, Q-RT-PCR analyses of IL-6 (A, E, I), IL-17A (B, F, J), IL-1 β (C, G, K) and TNF- α (D, H, L) gene expression were performed. Results are expressed as means $\pm$ SEM ($n=9-10$ /group). Mann-Whitney tests were used. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

Effects of local cryotherapy on plasmatic cytokine levels in AIA

Then we determined whether the local effects of cryotherapy on cytokines were associated with systemic effects on cytokines.

Plasma IL-17A and TNF- α were significantly higher in AIA as compared to controls ($p < 0.001$ – Fig. 5B. and $p < 0.05$ – Fig. 5D. respectively). IL-1 β tended to be higher in AIA but the difference did not reach significance (Fig. 5C.). No change in IL-6 levels was observed (Fig. 5A.). As compared to AIA, ice-treated AIA had lower levels of IL-17A ($p < 10^{-4}$, Fig. 5F.), IL-6 ($p = 0.05$, Fig. 5E.) but unchanged TNF- α (Fig. 5H.) and IL-1 β plasma levels (Fig.

5G.). Likewise, Cold-spray therapy significantly reduced IL-17A ($p<0.05$, Fig. 5J.) levels, with unchanged TNF- α (Fig. 5L.) and IL-1 β levels (Fig. 5K.) but conversely to ice, it did not change IL-6 plasma levels (Fig. 5I.).

Fig. 5. Cytokine plasmatic levels in non-arthritic, non-treated arthritic and cryotherapy-treated arthritic rats. Plasma levels of IL-6 (A, E, I), IL-17A (B, F, J), IL-1 β (C, G, K), TNF- α (D, H, L) were assessed in AIA rats treated or not either by being placed into cages lined with ice pops for 30 minutes ($n=10$) or by intermittent cold gas spray applications on hind paws for 2 minutes ($n=9$), twice a day for 14 consecutive days from day 11 to day 24 post-immunization. Results are expressed as means $\pm$ SEM ($n=7-10$ rats/group). Mann-Whitney tests were used. *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$.

Correlations between cytokines levels and clinical parameters

A significant correlation was observed between IL-6, IL-17A as well as IL-1 β hind paw gene expression levels and the corresponding hind paws arthritis score (Fig. 6A. to 6C.), and ankle diameter (Fig. 6D. to 6F.). By contrast, no correlation was found between TNF- α gene expression levels and hind paw arthritis score ($r=0.17$, $p=0.17$ for arthritis score and $r=-0.14$, $p=0.29$ for ankle diameter, not shown).

As regards plasma cytokines levels, plasma IL-17A levels correlated positively with the global arthritis score ($r=0.79$ – $p=10^{-4}$ Fig. 6G.), with ankle diameter ($r=0.65$ – $p<0.001$ – Fig. 6H.). Plasma IL-6 levels didn't correlate with the arthritis score ($r=-0.04$, $p=0.83$, not shown) but correlated with the ankle diameter (Fig. 6I.). TNF- α levels correlated with the arthritis score (Fig. 6J.) but not with ankle diameter ($r=0.22$, $p=0.25$, not shown). IL-1 β levels didn't correlate with the arthritis score ($r=0.14$, $p=0.4$) and quite surprisingly correlated negatively with the ankle diameter ($r=-0.46$, $p=0.015$, not shown). Hind paw cytokine gene expression levels did not correlate with the corresponding protein plasma levels whatever the cytokine.

Fig. 6. Correlations between pro-inflammatory cytokine levels and clinical parameters. Pearson's r correlation coefficients were calculated between hind paw IL-6 (A, D), IL-17A (B, E), IL- β 1 (C, F) gene expression levels and clinical parameters, and between plasma levels of IL-6 (I), IL-17A (G, H), TNF (J) and clinical parameters measured at day 24 post-immunization in AIA treated or not either by being placed into cages lined with ice pops for 30 minutes (n=10) or by intermittent cold gas spray applications on hind paws for 2 minutes (n=9), twice a day for 14 consecutive days from day 11 to day 24 post-immunization. For the arthritis score and ankle diameter, AIA rats from the 3 treatment groups and non-arthritic controls were considered (n=60, n=64, n=60 pairs for hind paw IL-6, IL-17A and IL- β mRNA levels and n=35 pairs for both IL-17A and TNF- α plasma levels respectively). For ankle diameter, both hind paws from the 3 treatment groups were considered (n=50, n=56, n=50 pairs for hind paw IL-6, IL-17A and IL- β mRNA levels and n=28 pairs for both IL-17A and IL-6 plasma levels respectively).

Discussion

The seminal findings of this study are that 1) a subchronic treatment with local cryotherapy alone is efficient for reducing arthritis activity in AIA, 2) these beneficial effects are, at least in part, mediated by a down-regulation of joint and systemic IL-6/IL-17 pathway but independent on the TNF α pathway. These therapeutic and anti-inflammatory effects were recently partly confirmed in preliminary human studies [see Additional files 5-8].

Cryotherapy is a cheap, well-tolerated therapeutic option in an adjuvant setting in inflammatory rheumatic diseases. It is widely and empirically used in rheumatic diseases such as RA, with a paradoxically low level of evidence, mostly due to methodological issues and biases in clinical studies [12,36]. In murine models of arthritis, the therapeutic and anti-inflammatory effects of cryotherapy are also poorly documented. In AIA, WBC (liquid

nitrogen at -110°C for 2 minutes, once a day for 2 weeks) applied in association with NSAIDs, corticosteroids and kinesitherapy reduced the number of swollen joints and increased histamine and cortisol in peripheral blood [37]. In another study, ice chips (0°C) applied 30 minutes a day for 10 days in rabbit zymosan-induced arthritis model tended to reduce synovial hyperplasia and cell infiltrate [38].

In this study, we used the two most frequently used cryotherapy modalities: ice and to a lesser extent cold gas pulverization, which were not directly compared in the literature so far [12]. Ice (applied for 20-30 minutes) is supposed to provide a more in-deep and progressive cooling, while cold gas (applied for 2-5 minutes) induces a more ample temperature drop with associated vaso-active effects (a thermal shock with an intense vaso-constriction followed by a vaso-dilatation phenomenon). The optimal treatment periodicity and duration (twice a day for 14 days) was also suggested by the literature [12]. In other animal studies, ice chips applied for 30 minutes reduced intra-joint temperature to 17.1°C in zymosan-induced arthritis in rabbits [38] and ice induced a 16.6°C drop in healthy dog skin temperature, in line with our results in AIA [39]. In our study, ice was more precociously efficient on clinical arthritis and reduced the mean arthritis score and ankle diameter throughout the 14 days of treatment (2-way ANOVA), which was not the case for cold gas spray application, which showed a biphasic therapeutic response profile. Thus, from a clinical point of view, local ice appeared to be more efficient and better tolerated.

As regards the mechanisms involved, the anti-inflammatory effects of LC appeared to be mostly IL-6/IL-17-driven. Indeed, both techniques reduced IL-6 and IL-17A gene expression in treated hind paws and we observed significant correlations between gene expression and clinical parameters for these two cytokines. While mild hypothermia previously showed inhibitory effects on IL-6 pathway in human and mouse stroke, in HUVEC endothelial cell line culture, in rat pancreatitis and cardiac arrest models [20,40–42] and WBC-treated RA

patients without corticosteroids [43], at least partly mediated through NF- κ B inhibition [20,40], the inhibitory effect of LC on IL-17A, a pivotal pathway involved in RA pathogenesis, is reported here for the first time. *In vitro* patella culture experiments revealed that synovial mild hypothermia decreased IL-6 protein levels, with no effect on other cytokines. This direct effect of hypothermia on synovial IL-6 pathway might precede and cause a subsequent decrease in IL-17A levels [4–6]. By contrast, both synovial mild hypothermia and sub-chronic LC had no effect on TNF- α gene and protein levels. This result was quite surprising, as mild hypothermia reduced TNF- α levels in several non-arthritic murine models [44,45]. In arthritic patients, LC [17] as well as WBC [46] decreased TNF- α plasma levels but the studies were non-controlled and the patients received concurrent corticosteroids and DMARDs. Of interest, previous studies reported that NSAIDs repressed IL-6 gene transcription in murine arthritic hind paws, decreased IL-6 serum protein levels in AIA [29], and inhibited IL-17A through COX-2 pathway blockade in RA fibroblast culture models [47]. Thus, LC effects on IL-6/IL-17 axis might be mediated through common pathways with NSAIDs (COX-2 and NF- κ B inhibition [48]), but with a potentially better risk-benefit balance.

Another interesting result of our study is that even though cryotherapy was locally applied, it induced changes in systemic cytokine levels. Indeed, both LC techniques decreased IL-17A plasma levels, while ice only reduced plasma IL-6 levels. WBC also reduced plasma IL-6 levels in a subgroup of RA patients without corticosteroids [43]. However, these systemic effects of LC on IL-6 and IL-17A plasmatic levels had never been reported before in RA patients nor in murine models of arthritis. These systemic anti-inflammatory effects might be partly mediated through autonomic nervous system involvement. Indeed, ice-water swimming was shown to increase peripheral norepinephrine levels in healthy subjects [16]. Furthermore, the α/β 2-adrenergic receptor balance in the immune system has been shown to influence local

and systemic inflammation as well as Th-1/Th-2 balance in AIA [49]. These systemic anti-inflammatory effects might also be partly related to NF- κ B pathway inhibition in the spinal cord, which showed anti-inflammatory properties in AIA [50]. The molecular mechanisms involved in these previously unknown anti-IL-6 and anti-IL-17 effects of sub-chronic local cryotherapy in the context of murine arthritis (NF- κ B dependent cytokine gene transcription inhibition? Temperature-dependent down-regulation of key enzyme pathways such as COX-2, metalloproteinases?) require further investigations and additional studies on this topic which could help elucidate and optimize the anti-inflammatory effects of local cryotherapy in human arthritis as well.

Conclusions

The present study demonstrated that two LC techniques applied for 14 consecutive days have therapeutic effects in AIA. Ice showed a better efficacy and tolerance profile than cold gas spray. These therapeutic effects were associated with local and systemic anti-inflammatory effects, mainly through IL-6/IL-17 pathway inhibition. Cryotherapy techniques and protocols should be further evaluated and standardized in order to determine whether long-term LC might be a safer alternative to NSAIDs and corticosteroids, or offer dose-sparing effects, especially for vulnerable or elderly patients [13].

Acknowledgements

Not applicable.

References

1. de Punder YMR, van Riel PLCM. Rheumatoid arthritis: understanding joint damage and physical disability in RA. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7: 260–261. doi:10.1038/nrrheum.2011.49
2. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 2008;118: 3537–3545. doi:10.1172/JCI36389

3. Wright HL, Thomas HB, Moots RJ, Edwards SW. Interferon gene expression signature in rheumatoid arthritis neutrophils correlates with a good response to TNFi therapy. *Rheumatol Oxf Engl*. 2015;54: 188–193. doi:10.1093/rheumatology/keu299
4. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*. 2010;40: 1830–1835. doi:10.1002/eji.201040391
5. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*. 2008;453: 1051–1057. doi:10.1038/nature07036
6. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441: 235–238. doi:10.1038/nature04753
7. Lubberts E. Th17 cytokines and arthritis. *Semin Immunopathol*. 2010;32: 43–53. doi:10.1007/s00281-009-0189-9
8. van Hamburg JP, Asmawidjaja PS, Davelaar N, Mus AMC, Cornelissen F, van Leeuwen JPTM, et al. TNF blockade requires 1,25(OH)2D3 to control human Th17-mediated synovial inflammation. *Ann Rheum Dis*. 2012;71: 606–612. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200424
9. Lubberts E. The IL-23-IL-17 axis in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11: 415–429. doi:10.1038/nrrheum.2015.53
10. Huizinga TWJ, Conaghan PG, Martin-Mola E, Schett G, Amital H, Xavier RM, et al. Clinical and radiographic outcomes at 2 years and the effect of tocilizumab discontinuation following sustained remission in the second and third year of the ACT-RAY study. *Ann Rheum Dis*. 2015;74: 35–43. doi:10.1136/annrheumdis-2014-205752
11. Zampeli E, Protogerou A, Stamatelopoulos K, Fragiadaki K, Katsiari CG, Kyrkou K, et al. Predictors of new atherosclerotic carotid plaque development in patients with rheumatoid arthritis: a longitudinal study. *Arthritis Res Ther*. 2012;14: R44. doi:10.1186/ar3757
12. Guillot X, Tordi N, Mourot L, Demougeot C, Dugué B, Prati C, et al. Cryotherapy in inflammatory rheumatic diseases: a systematic review. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10: 281–294. doi:10.1586/1744666X.2014.870036
13. Chatap G, De Sousa A, Giraud K, Vincent J-P, Acute Pain in the Elderly Study Group. Pain in the elderly: Prospective study of hyperbaric CO2 cryotherapy (neurocryostimulation). *Jt Bone Spine Rev Rhum*. 2007;74: 617–621. doi:10.1016/j.jbspin.2006.10.011
14. Banfi G, Lombardi G, Colombini A, Melegati G. Whole-body cryotherapy in athletes. *Sports Med Auckl NZ*. 2010;40: 509–517. doi:10.2165/11531940-000000000-00000
15. Pournot H, Bieuzen F, Louis J, Mounier R, Fillard J-R, Barbiche E, et al. Time-course of changes in inflammatory response after whole-body cryotherapy multi exposures following severe exercise. *PLoS One*. 2011;6: e22748. doi:10.1371/journal.pone.0022748
16. Leppäluoto J, Westerlund T, Huttunen P, Oksa J, Smolander J, Dugué B, et al. Effects of long-term whole-body cold exposures on plasma concentrations of ACTH, beta-endorphin, cortisol, catecholamines and cytokines in healthy females. *Scand J Clin Lab Invest*. 2008;68: 145–153. doi:10.1080/00365510701516350

17. Jastrzębek R, Straburzyńska-Lupa A, Rutkowski R, Romanowski W. Effects of different local cryotherapies on systemic levels of TNF- α , IL-6, and clinical parameters in active rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2013;33: 2053–2060. doi:10.1007/s00296-013-2692-5
18. Harris ED, McCroskery PA. The influence of temperature and fibril stability on degradation of cartilage collagen by rheumatoid synovial collagenase. *N Engl J Med.* 1974;290: 1–6. doi:10.1056/NEJM197401032900101
19. Dugué B, Smolander J, Westerlund T, Oksa J, Nieminen R, Moilanen E, et al. Acute and long-term effects of winter swimming and whole-body cryotherapy on plasma antioxidative capacity in healthy women. *Scand J Clin Lab Invest.* 2005;65: 395–402. doi:10.1080/00365510510025728
20. Yenari MA, Han HS. Influence of hypothermia on post-ischemic inflammation: role of nuclear factor kappa B (NFkappaB). *Neurochem Int.* 2006;49: 164–169. doi:10.1016/j.neuint.2006.03.016
21. Truettner JS, Alonso OF, Dalton Dietrich W. Influence of therapeutic hypothermia on matrix metalloproteinase activity after traumatic brain injury in rats. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25: 1505–1516. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600150
22. Oliver SJ, Brahn E. Combination therapy in rheumatoid arthritis: the animal model perspective. *J Rheumatol Suppl.* 1996;44: 56–60.
23. Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, et al. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature.* 2003;426: 454–460. doi:10.1038/nature02119
24. Van den Berg WK, Van den Putte L. The mouse patella assay: an easy method of quantitating articular chondrocyte function in vivo and in vitro. *Rheumatol Int.* 1982;1: 165–9.
25. Lubberts E, Joosten LA, Helsen MM, van den Berg WB. Regulatory role of interleukin 10 in joint inflammation and cartilage destruction in murine streptococcal cell wall (SCW) arthritis. More therapeutic benefit with IL-4/IL-10 combination therapy than with IL-10 treatment alone. *Cytokine.* 1998;10: 361–369. doi:10.1006/cyto.1997.0298
26. Lubberts E, Joosten LA, van de Loo FA, van den Gersselaar LA, van den Berg WB. Reduction of interleukin-17-induced inhibition of chondrocyte proteoglycan synthesis in intact murine articular cartilage by interleukin-4. *Arthritis Rheum.* 2000;43: 1300–1306. doi:10.1002/1529-0131(200006)43:6<1300::AID-ANR12>3.0.CO;2-D
27. van Hamburg JP, Mus A-M, de Bruijn MJW, de Vogel L, Boon L, Cornelissen F, et al. GATA-3 protects against severe joint inflammation and bone erosion and reduces differentiation of Th17 cells during experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60: 750–759. doi:10.1002/art.24329
28. Oosterveld FG, Rasker JJ. Effects of local heat and cold treatment on surface and articular temperature of arthritic knees. *Arthritis Rheum.* 1994;37: 1578–1582.
29. Anderson GD, Hauser SD, McGarity KL, Bremer ME, Isakson PC, Gregory SA. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest.* 1996;97: 2672–2679. doi:10.1172/JCI118717

30. Earp JC, Dubois DC, Molano DS, Pyszczyński NA, Keller CE, Almon RR, et al. Modeling corticosteroid effects in a rat model of rheumatoid arthritis I: mechanistic disease progression model for the time course of collagen-induced arthritis in Lewis rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;326: 532–545. doi:10.1124/jpet.108.137372
31. Schmidt-Weber CB, Pohlers D, Siegling A, Schädlich H, Buchner E, Volk HD, et al. Cytokine gene activation in synovial membrane, regional lymph nodes, and spleen during the course of rat adjuvant arthritis. *Cell Immunol*. 1999;195: 53–65. doi:10.1006/cimm.1999.1509
32. Ayer LM, Issekutz AC, Waterhouse CC, Stadnyk AW. Cytokine mRNA in the joints and draining lymph nodes of rats with adjuvant arthritis and effects of cyclosporin A. *Inflammation*. 2000;24: 447–461.
33. Hu W, Xia L-J, Chen F-H, Wu F-R, Tang J, Chen C-Z, et al. Recombinant human endostatin inhibits adjuvant arthritis by down-regulating VEGF expression and suppression of TNF- α , IL-1 β production. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc AI*. 2012;61: 827–835. doi:10.1007/s00011-012-0477-z
34. Rioja I, Bush KA, Buckton JB, Dickson MC, Life PF. Joint cytokine quantification in two rodent arthritis models: kinetics of expression, correlation of mRNA and protein levels and response to prednisolone treatment. *Clin Exp Immunol*. 2004;137: 65–73. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02499.x
35. Portanova JP, Zhang Y, Anderson GD, Hauser SD, Masferrer JL, Seibert K, et al. Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *J Exp Med*. 1996;184: 883–891.
36. Welch V, Brosseau L, Shea B, McGowan J, Wells G, Tugwell P. Thermotherapy for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2001; CD002826. doi:10.1002/14651858.CD002826
37. Wojtecka-Lukasz E, Ksiezopolska-Orłowska K, Burakowski T, Marton A, Maoelinska D, Maoelinski W, et al. Effect of cryotherapy on adjuvant arthritis in the rat. *Ann Rheum Dis*. 2002;61 Suppl.
38. Weinberger A, Giler S. Treatment of inflammatory synovitis with ice application. *Arthritis Rheum*. 1995;38 Suppl: S242.
39. Wakim KG, Porter AN, Krusen FH. Influence of physical agents and of certain drugs on intra-articular temperature. *Arch Phys Med Rehabil*. 1951;32: 714–721.
40. Diestel A, Roessler J, Berger F, Schmitt KRL. Hypothermia downregulates inflammation but enhances IL-6 secretion by stimulated endothelial cells. *Cryobiology*. 2008;57: 216–222. doi:10.1016/j.cryobiol.2008.08.005
41. Fujimoto K, Fujita M, Tsuruta R, Tanaka R, Shinagawa H, Izumi T, et al. Early induction of moderate hypothermia suppresses systemic inflammatory cytokines and intracellular adhesion molecule-1 in rats with caerulein-induced pancreatitis and endotoxemia. *Pancreas*. 2008;37: 176–181. doi:10.1097/MPA.0b013e318162cb26
42. Tortorici MA, Mu Y, Kochanek PM, Xie W, Poloyac SM. Moderate hypothermia prevents cardiac arrest-mediated suppression of drug metabolism and induction of interleukin-6 in rats. *Crit Care Med*. 2009;37: 263–269. doi:10.1097/CCM.0b013e3181931ed3

43. Straub RH, Pongratz G, Hirvonen H, Pohjolainen T, Mikkelsson M, Leirisalo-Repo M. Acute cold stress in rheumatoid arthritis inadequately activates stress responses and induces an increase of interleukin 6. *Ann Rheum Dis*. 2009;68: 572–578. doi:10.1136/ard.2008.089458
44. Webster CM, Kelly S, Koike MA, Chock VY, Giffard RG, Yenari MA. Inflammation and NFkappaB activation is decreased by hypothermia following global cerebral ischemia. *Neurobiol Dis*. 2009;33: 301–312. doi:10.1016/j.nbd.2008.11.001
45. Hildebrand F, van Griensven M, Giannoudis P, Luerig A, Harwood P, Harms O, et al. Effects of hypothermia and re-warming on the inflammatory response in a murine multiple hit model of trauma. *Cytokine*. 2005;31: 382–393. doi:10.1016/j.cyto.2005.06.008
46. Lange U, Uhlemann C, Müller-Ladner U. [Serial whole-body cryotherapy in the criostream for inflammatory rheumatic diseases. A pilot study]. *Med Klin Munich Ger* 1983. 2008;103: 383–388. doi:10.1007/s00063-008-1056-5
47. Paulissen SMJ, van Hamburg JP, Davelaar N, Asmawidjaja PS, Hazes JMW, Lubberts E. Synovial fibroblasts directly induce Th17 pathogenicity via the cyclooxygenase/prostaglandin E2 pathway, independent of IL-23. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2013;191: 1364–1372. doi:10.4049/jimmunol.1300274
48. Sultana F, Rasool M. A novel therapeutic approach targeting rheumatoid arthritis by combined administration of morin, a dietary flavanol and non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin with reference to pro-inflammatory cytokines, inflammatory enzymes, RANKL and transcription factors. *Chem Biol Interact*. 2015;230: 58–70. doi:10.1016/j.cbi.2015.02.007
49. Lubahn CL, Lorton D, Schaller JA, Sweeney SJ, Bellinger DL. Targeting α - and β -Adrenergic Receptors Differentially Shifts Th1, Th2, and Inflammatory Cytokine Profiles in Immune Organs to Attenuate Adjuvant Arthritis. *Front Immunol*. 2014;5: 346. doi:10.3389/fimmu.2014.00346
50. Luo J-G, Zhao X-L, Xu W-C, Zhao X-J, Wang J-N, Lin X-W, et al. Activation of spinal NF- κ B/p65 contributes to peripheral inflammation and hyperalgesia in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2014;66: 896–906. doi:10.1002/art.38328

Supporting data

Our data were recently presented in poster tour at the EULAR congress [see S3 abstract and S4 poster]. Recent supporting preliminary data relevant to the topic are also reported in S5 article, S6 article, S7 abstract, S8 poster.

S1 Fig. Effects of mild hypothermia on the cell viability of cultured AIA patellar explants After sacrifice, both patellae of each rat were dissected. Before culture, cell viability was assessed by measuring ATPase activity using fluorescence technique (CellTiter-Glo® Luminescent Test, Promega). Viability didn't differ significantly between 30°C- and 37°C-cultured patellae groups, suggesting that 2 hour-mild hypothermia had no influence on

20

patellar explant cell viability. Paired Wilcoxon tests were used. Results are expressed as means $\pm$ SEM.

S2 Fig. Supplemental figure 2.tif Time-course of arthritis score on hind paws in ice- (A) and cold gas-treated (B) AIA rats compared to controls. Results are expressed as means $\pm$ SEM (n=9-10 rats/group). 2-way ANOVAs with Bonferroni post-tests were used.

***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05.

S3 Abstract. Guillot X, et al. LOCAL CRYOTHERAPY DOWN-REGULATES LOCAL AND SYSTEMIC IL-6 AND IL-17 PATHWAYS IN ADJUVANT-INDUCED ARTHRITIS. SAT0047- PT- DOI: 10.1136/annrheumdis-2016-eular.1779.

S4 Poster. Guillot X, et al. LOCAL CRYOTHERAPY DOWN-REGULATES LOCAL AND SYSTEMIC IL-6 AND IL-17 PATHWAYS IN ADJUVANT-INDUCED ARTHRITIS. SAT0047- PT- DOI: 10.1136/annrheumdis-2016-eular.1779.

S5 article. Guillot X, et al. Cryotherapy in inflammatory rheumatic diseases: a systematic review. Expert Rev Clin Immunol. 2014 Feb;10(2):281-94.

S6 article. Guillot X, et al. Cryotherapy decreases synovial Doppler activity and pain in knee arthritis: a randomized-controlled trial. Joint Bone Spine. Under review.

S7 abstract. ClinicalTrials.gov identifier: NCT02573298 – Guillot X, et al. LOCAL CRYOTHERAPY (PULSED CO2 OR ICE) DECREASES IL-6, IL-1B AND VEGF SYNOVIAL LEVELS IN KNEE ARTHRITIS. SAT0626 – P - DOI: 10.1136/annrheumdis-2016-eular.1699.

S8 poster. ClinicalTrials.gov identifier: NCT02573298 – Guillot X, et al. LOCAL CRYOTHERAPY (PULSED CO2 OR ICE) DECREASES IL-6, IL-1B AND VEGF

SYNOVIAL LEVELS IN KNEE ARTHRITIS. SAT0626 – P - DOI: 10.1136/annrheumdis-2016-eular.1699.

Abbreviations

LC: Local cryotherapy

WBC: Whole-body cryotherapy

RA: Rheumatoid arthritis

COX-2: Cyclo-oxygenase-2

i-NOS: inducible-NO-synthase

NFkB : Nuclear factor kappa B

Th-1: T helper-1

Treg: regulatory T cell

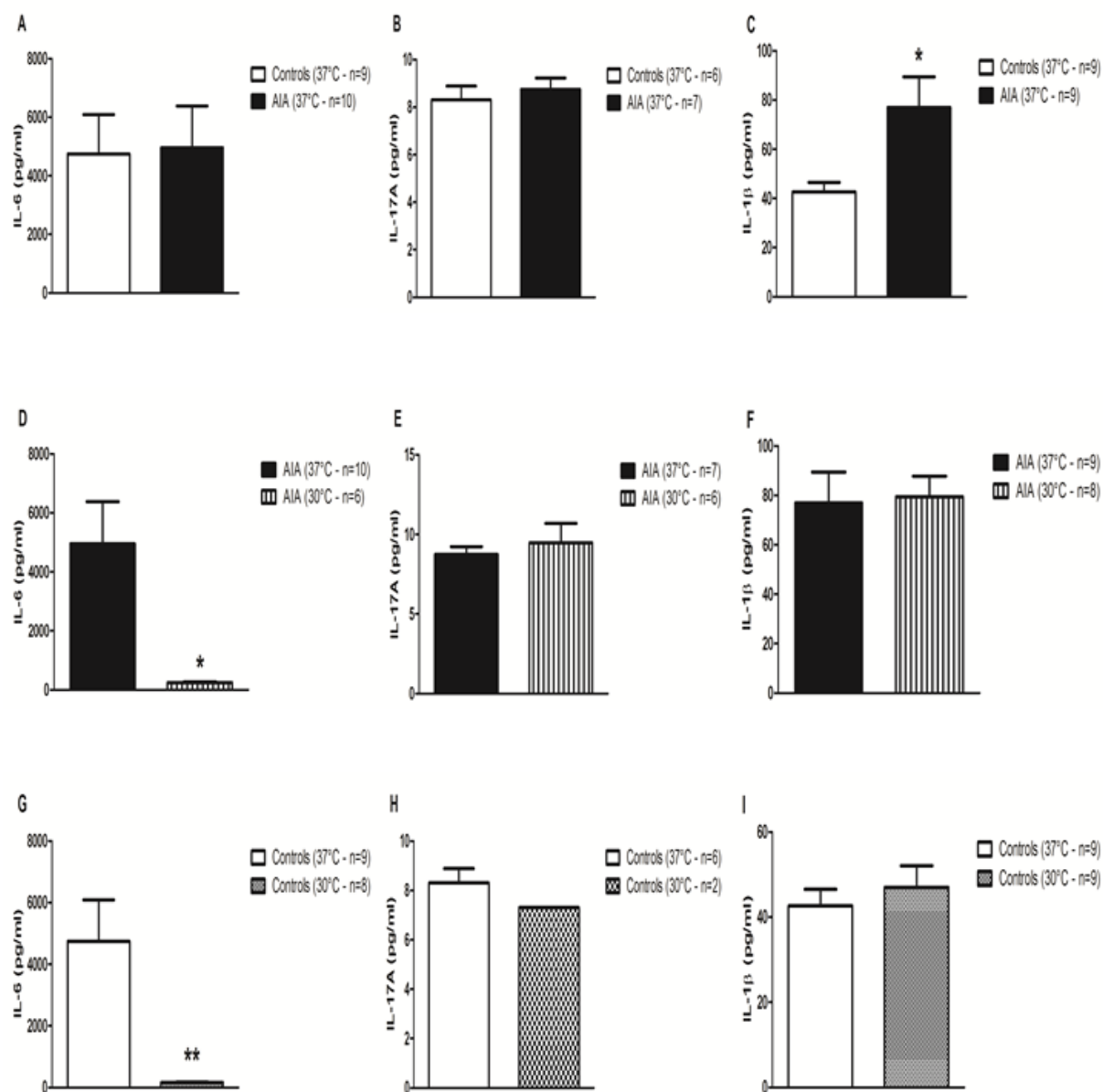
AIA: Adjuvant-induced arthritis

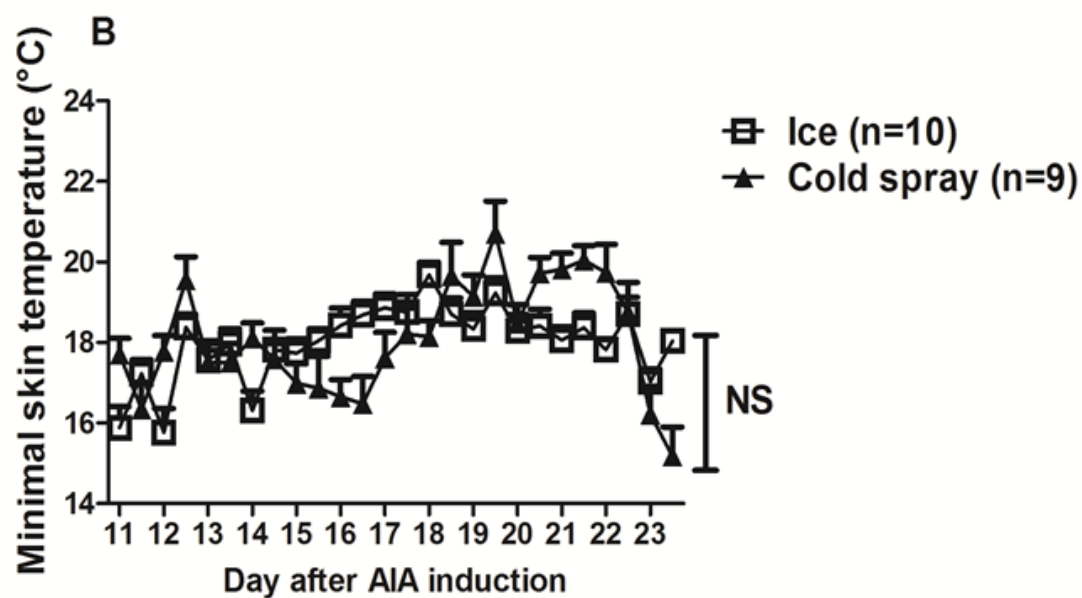
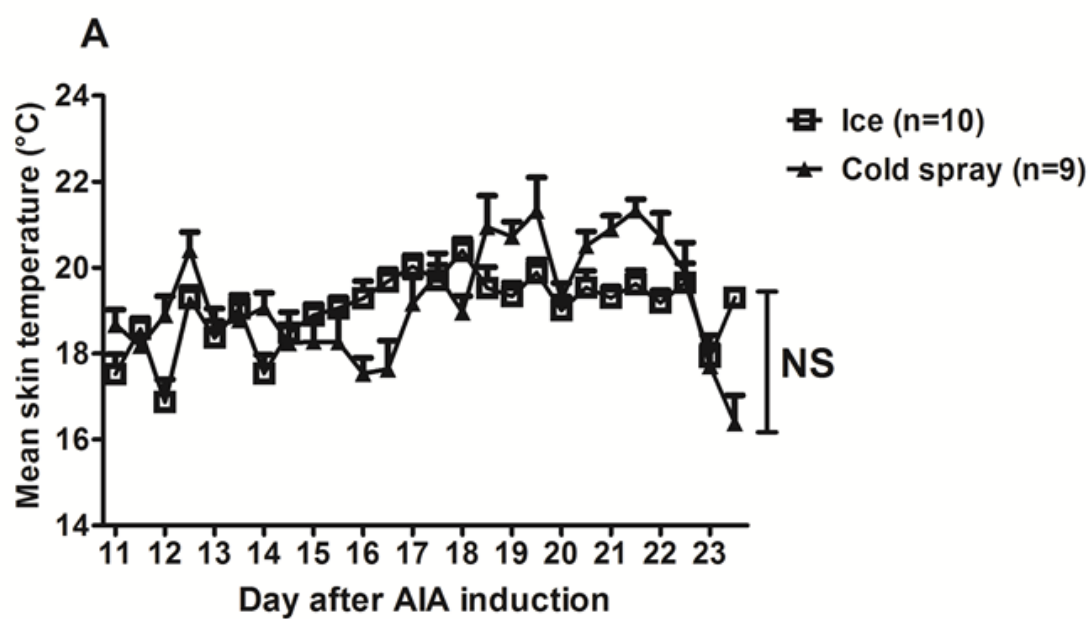
Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)

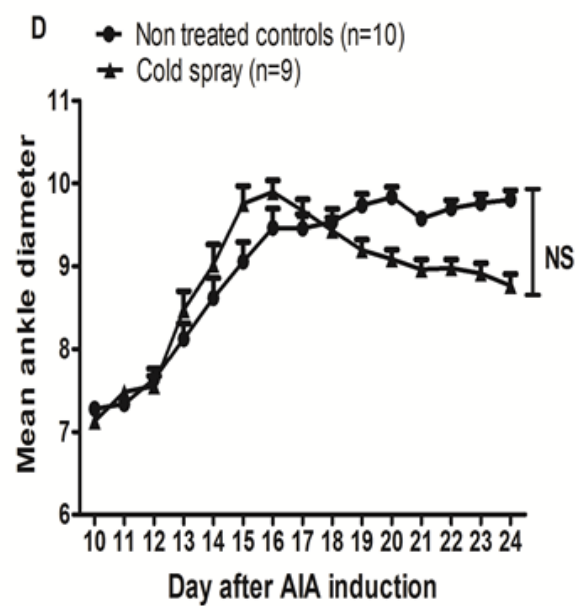
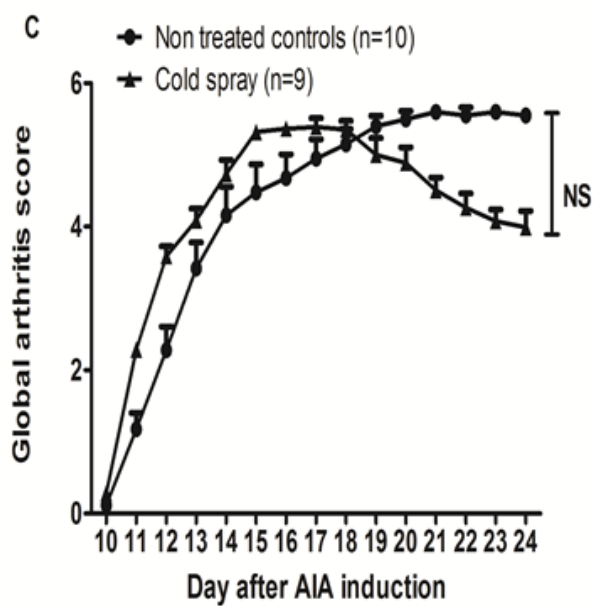
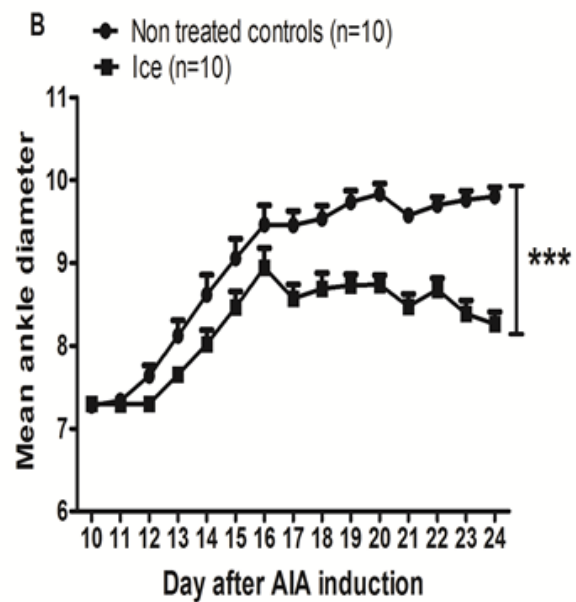
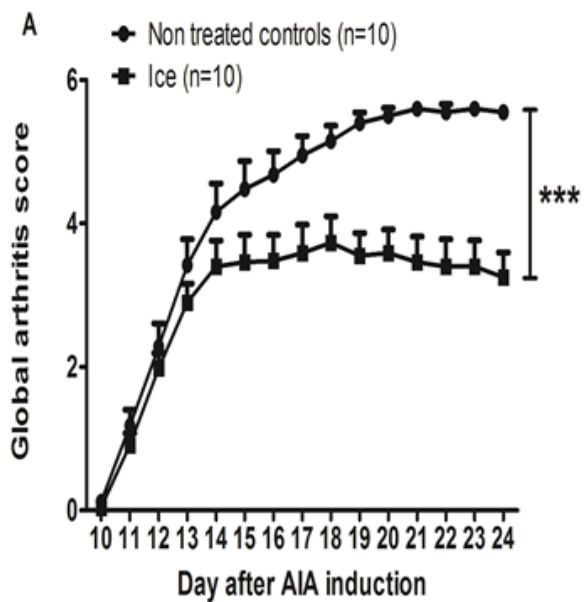
PGE2: Prostaglandin E2

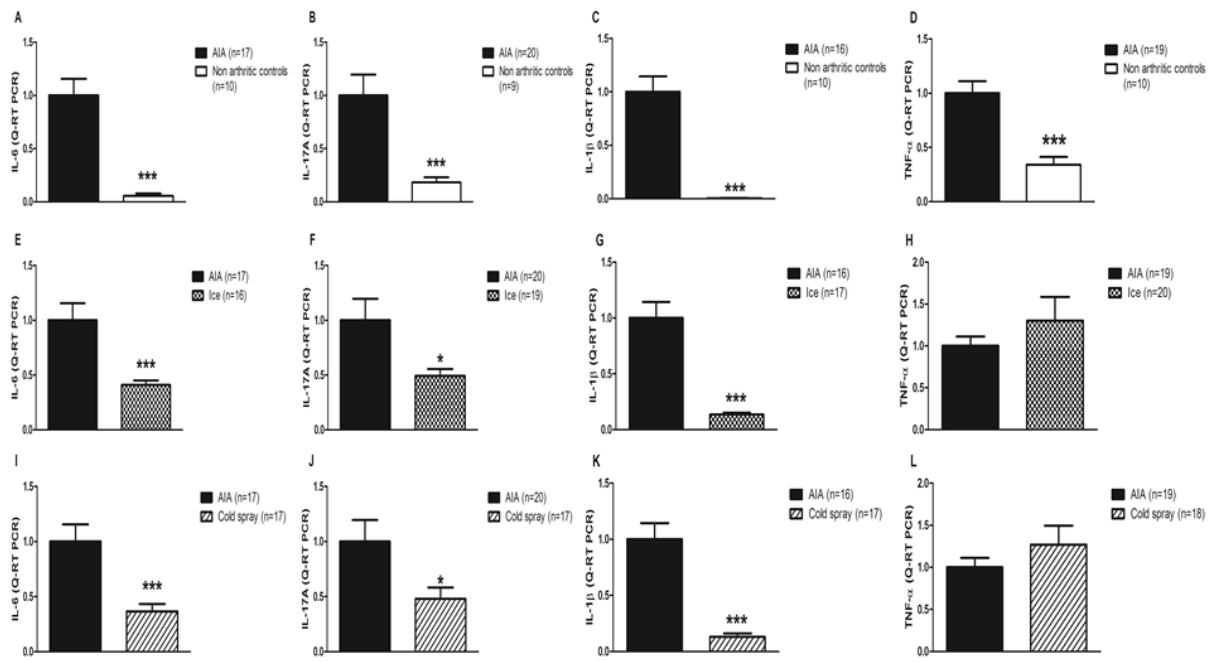
Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)

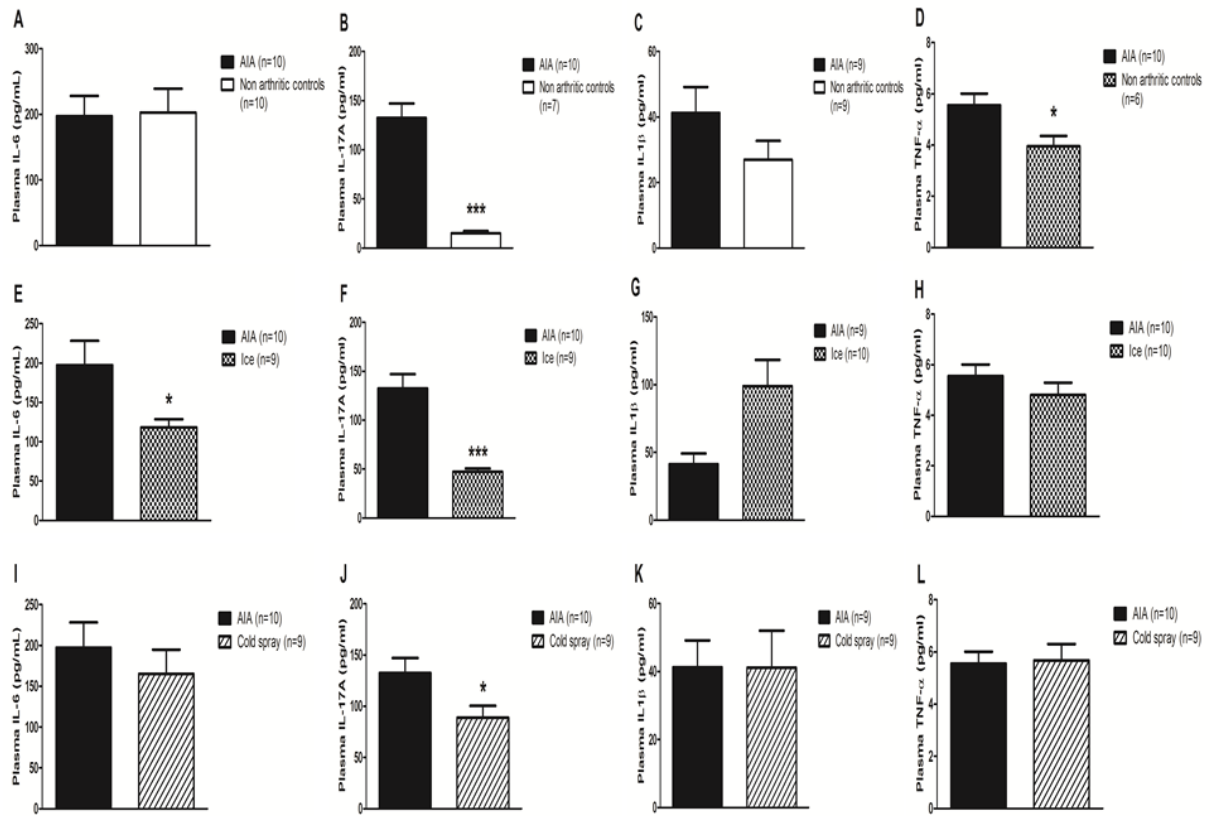
DAS-28: Disease activity score (28 joints).

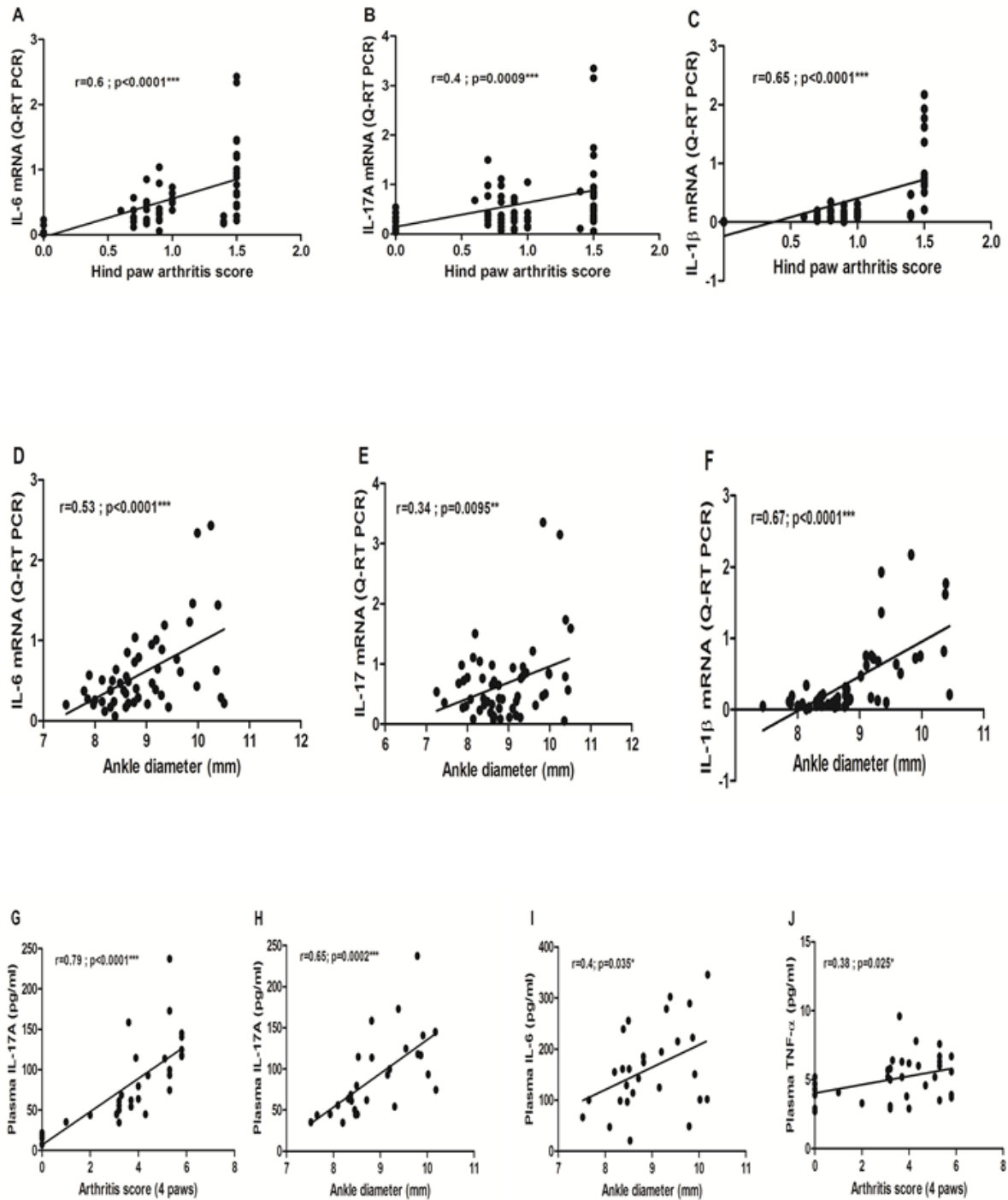












B. Communications et posters 2016.

- EULAR 2016:

Medical or Research Professionals/Clinicians

Topic area: Basic and translational research

Topic: 6. Rheumatoid arthritis - etiology, pathogenesis and animal models

EULAR16-1779

LOCAL CRYOTHERAPY DOWN-REGULATES LOCAL AND SYSTEMIC IL-6 AND IL-17 PATHWAYS IN ADJUVANT-INDUCED ARTHRITIS

X. Guillot^{1,2}, H. Martin¹, K. Maguin-Gaté¹, S. Py³, C. Demougeot¹, D. Wendling², N. Tordi¹

¹FDE EA4267, FHU INCREASE, Bourgogne Franche-Comté University, F-25000 Besançon, ²Rheumatology department,

³INSERM-CIC 1431, Besançon University Hospital, F-25030 Besançon Cedex, France

My abstract has been or will be presented at a scientific meeting during a 12 months period prior to EULAR 2016:
No

Is the first author applying for a travel bursary and/or an award for undergraduate medical students?: No

Background: Cryotherapy is widely and empirically used in an adjuvant and symptomatic setting in inflammatory rheumatic diseases, with a low level of evidence [1].

Objectives: The aim of this work was to evaluate local and systemic anti-inflammatory effects of local cryotherapy (LC) in adjuvant-induced arthritis (AIA), comparing 2 techniques (ice and cold gas spray). We considered clinical (arthritic score and ankle diameter) and biological effects on IL-6, IL-17A, IL-1 β , TNF- α local and systemic levels.

Methods: Arthritis was induced by a single Mycobacterium butyricum injection in male Lewis rat tails (day 0). At the onset of arthritis (day 11), rats were treated either by 30 minute-ice applications on hind paws (in cages lined with ice pops – n=10) or by 2 minute-cold gas pulverizations on both hind paws (n=9) twice a day for 14 consecutive days. Ten non-treated AIA rats were used as controls. At day 24 (the day after the last cold application), hind paws were grinded in order to measure cytokine gene expression levels by Q-RT-PCR. Plasmatic levels of the same cytokines were also measured in plasma by cytometry (Multiplex Magpix® ebioscience). IL-6 plasma levels were measured by ELISA (rat IL6 platinum ELISA, BMS625®, ebioscience).

Results: Ice application significantly reduced the mean arthritic score and ankle diameter from day 6 to day 14 ($p<0.001$) and globally throughout the 14 day treatment period (2-way ANOVA: $p<0.001$) compared to non-treated AIA controls. Cold gas first aggravated arthritis at days 11-12 ($p<0.01$) then improved clinical inflammation at days 21-24 ($p<0.001$). Skin temperature after LC didn't differ between treatment groups. Both techniques significantly reduced IL-6, IL-1 β , IL-17A gene expression levels in hind paws at day 24 compared to non-treated AIA (by 60%, 87% and 50% respectively, $p<0.001$, $p<0.001$ and $p<0.05$). Cytokine gene expression levels correlated positively with hind paw arthritic score and ankle diameter. Conversely, LC had no effect on TNF- α gene expression in hind paws. LC also significantly reduced IL-17A plasmatic protein levels at day 24 (Ice : 47 ± 3 pg/ml versus 132 ± 15 pg/ml; $n=9$; $p<0.0001$ – cold gas : 89 ± 12 pg/ml versus 132 ± 15 pg/ml; $p<0.02$) and IL-17A plasmatic levels correlated positively with arthritic score, ankle diameter and negatively with weight gain. Ice also reduced IL-6 plasmatic levels (118 ± 20 pg/ml versus 197 ± 60 pg/ml; $p<0.05$). LC had no effect on TNF- α nor IL-1 β plasmatic levels.

Conclusions: These results demonstrate in vivo previously unknown therapeutic and anti-inflammatory effects of 14 day-LC in AIA. We observed both local (at the gene level in treated hind paws) and systemic (at the protein level in plasma) down-regulation of key cytokine pathways critically involved in the pathogenesis and severity of inflammatory rheumatic diseases. LC local and systemic anti-inflammatory effects were mainly IL-6 / IL-17A-driven and TNF- α -independent in this model.

References: [1] Guillot X, et al. Cryotherapy in inflammatory rheumatic diseases: a systematic review. Expert Rev Clin Immunol. 2014;10(2):281-94.

Disclosure of Interest: None declared

Xavier Guillot^{1,2}, Hélène Martin¹, Katy Maguin-Gaté¹, Stéphanie Py³, Céline Demougeot¹, Daniel Wendling², Nicolas Tordi¹.

¹ FDE EA4267, FHU INCREASE, Bourgogne Franche-Comté University, F-25000 Besançon Cedex, France

² INSERM-CIC 1431, Besançon University Hospital, F-25030 Besançon Cedex, France

Background

Cryotherapy is widely used in the adjuvant setting in inflammatory rheumatic diseases with a paradoxically low level of evidence [1]. Furthermore, ice has been shown to decrease intra-joint temperature to 30°C for 2 hours in RA [2]. This temperature range corresponds to tissue mild hypothermia, which has shown anti-inflammatory properties, notably through NF- κ B-mediated cytokine gene transcription inhibition [3] and the repression of key-enzymatic pathways such as COX-2, MMP, collagenases [4]. Whether these mechanisms are involved in cryotherapy-treated RA is not known.

Objectives

The aim of this work was to evaluate the clinical as well as local/systemic biological anti-inflammatory effects of local cryotherapy applied twice a day for 14 days *in vivo* in Adjuvant-Induced Arthritis (AIA) model. We also compared the effects of 2 techniques (ice and cold gas).

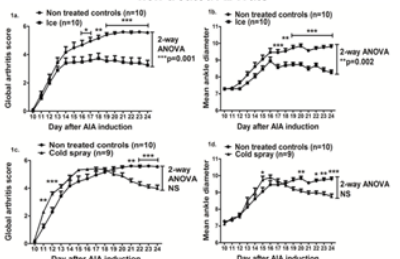
Methods

AIA was induced in 30 male Lewis rats by *M. butyricum* injection in the tail (day 0), i.e. the clinical onset of arthritis (day 11), rats were treated by ice cold application (30 minutes in cages lined with ice pops, $n=10$), cold gas application (intermittent pulverizations on hind paws for 2 minutes, $n=9$) both twice a day for 14 consecutive days. Non-treated AIA controls were also considered ($n=10$). The arthritis score, ankle diameter, skin temperature after treatment, weight were daily monitored. The rats were then sacrificed the day after the last cold application (Day 25). Cytokine gene expression levels in hind paws were evaluated by Q-RT-PCR, while plasma cytokine levels were measured by ELISA and Multiplex techniques.

Results

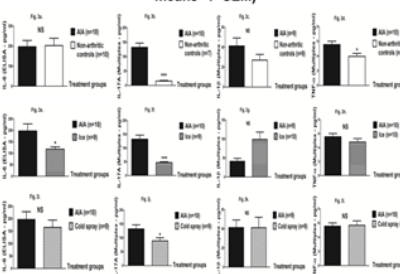
Ice and cold gas showed distinct therapeutic response patterns (Fig. 1.). Both techniques reduced IL-6, IL-17A and IL-1 β gene expression levels in hind paws (Fig. 2.). We also observed systemic anti-inflammatory effects on plasma IL-17A and IL-6 levels (Fig. 3.). By contrast, we observed no effect on local nor systemic TNF- α levels. Local and systemic IL-6 and IL-17A levels correlated with the clinical parameters (Fig. 4.).

Fig. 1. Time-course of arthritis in cryotherapy-treated versus non-treated AIA rats



→ Ice significantly improved the arthritis score and ankle diameter over 14 days.
→ Cold gas showed a biphasic therapeutic response pattern (initial aggravation then improvement).

Fig. 3. Cytokine plasmatic levels in treatment groups (day 25 means $\pm$ SEM)



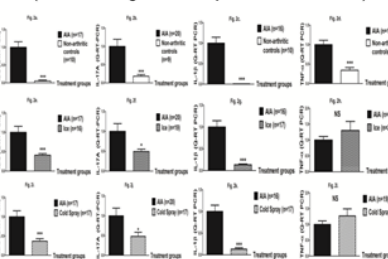
- Both techniques reduced plasma IL-17A levels at day 25.
- Ice decreased plasma IL-6 levels at day 25.

→ Ice decreased plasma IL-6 levels at day 25.

Conclusions

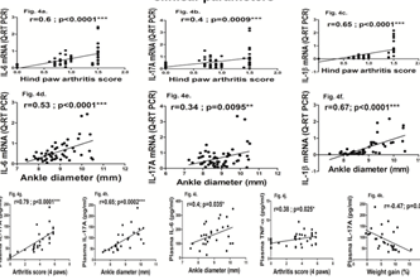
- Local cryotherapy applied twice a day for 14 days exhibited therapeutic and anti-inflammatory effects in AIA.
- Ice was globally more efficient on the clinical parameters, and better tolerated than cold gas.
- Both techniques induced local but also systemic anti-inflammatory effects.
- These effects were mainly IL-6 and IL-17A-driven, but TNF- α -independent in this model.

Fig. 2. Mean cytokine levels in treatment groups at day 25 (Q-RT-PCR on grinded hind paws – means $\pm$ SEM)



→ At day 25, both techniques significantly reduced IL-6, IL-17A and IL-1 β gene expression levels in hind paws (by 60%, 50% and 87% respectively)

Fig. 4. Correlations between local / systemic cytokine levels and clinical parameters



Plasma IL-17A and TNF- α levels correlated positively with the arthritis score, plasma IL-17A and IL-6 levels positively with the ankle diameter.

* Plasma IL-17A levels correlated negatively with the weight gain.

[1] Guillet, et al. *Expot*
Res Clin Immunol, 2014

References

- [1] Guillet, et al. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014.
[2] Christovold, et al. *Arthritis Rheum*. 1994.
[3] Yoneni, et al. *Neurochem Int*. 2006.
[4] Harris, et al. *N Engl J Med*. 1974.
Disclosures of Interest
None.

Medical or Research Professionals/Clinicians

Topic area: Clinical topics by area of research

Topic: 33. Rehabilitation

EULAR16-1699

LOCAL CRYOTHERAPY (PULSED CO₂ OR ICE) DECREASES IL-6, IL-1 β AND VEGF SYNOVIAL LEVELS IN KNEE ARTHRITIS

X. Guilloit^{1,2}, N. Tordi¹, C. Laheurte³, L. Pazart⁴, C. Prati¹, P. Saas³, D. Wendling²

¹FDE EA4267, FHU INCREASE, Bourgogne Franche-Comté University, F-25000 Besançon, ²Rheumatology department, Besançon University Hospital, ³INSERM U1098, biomonitoring platform, EFS Bourgogne-Franche-Comté, ⁴INSERM-CIC 1431, Besançon University Hospital, F-25030 Besançon Cedex, France

My abstract has been or will be presented at a scientific meeting during a 12 months period prior to EULAR 2016:

No

Is the first author applying for a travel bursary and/or an award for undergraduate medical students?: No

Background: Cryotherapy is widely and empirically used in an adjuvant and symptomatic setting in inflammatory rheumatic diseases, with a low level of evidence.

Objectives: The aim of this work was to evaluate the effects of two local cryotherapy (LC) techniques (ice or hyperbaric cold CO₂) applied twice on pain and pro-inflammatory cytokine levels in arthritic knees.

Methods: Thirty-five patients suffering from non-septic knee arthritis were included (16 gout, 8 calcium pyrophosphate dehydrate crystal deposition diseases, 5 spondyloarthritides, 6 rheumatoid arthritides). Patients didn't receive any concurrent anti-inflammatory drug (corticosteroids, NSAIDs, colchicine, DMARDs, biologics) throughout the study period (24 hours). They were randomized to receive local ice (for 30 minutes) or cold pulsed CO₂ (for 2 minutes - Cryo+® Cryonic) at 9 A.M and 5 P.M. Synovial fluid was collected just before the first cold application then 24 hours later (also at 9 A.M). Synovial fluid cell count and cytokine levels (IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-17A, VEGF by Multiplex flow cytometry - CBA® BD biosciences) were measured and compared before and after the two LC applications. Paired Wilcoxon tests were performed. The factors associated with cytokine level evolution were assessed (uni- then multivariate analysis by logistic regression).

Results: Pain VAS significantly decreased after 24 hours in both treatment groups (Ice: 5.3+/-1.3 versus 2.7+/-1.1; n=20; p=0.0003 - CO₂: 5.6+/-1.4 versus 3.1+/-1.2; n=15; p=0.002). Synovial fluid leukocyte count non-significantly decreased (23580+/-10015 versus 19120+/-8981; p=0.49). IL-6 levels significantly decreased after 2 LC applications (456100+/-163570pg/mL versus 281500+/-142006pg/mL; n=35; p=0.0001). This decrease was also significant in ice-treated subgroup (n=20; p=0.0002) but not in CO₂-treated patients (n=15; p=0.07). In multivariate analysis, IL-6 decrease was associated with a higher CRP rate at baseline (r=0.35; p=0.004) and a greater skin temperature drop during LC (r=0.33; p=0.03). IL-1 β levels also decreased after treatment (26.75+/-8.95pg/mL versus 23.10+/-10.11pg/mL; n=35; p=0.02) but the difference didn't reach significance in treatment subgroups (Ice: n=19; p=0.07 - CO₂: n=15; p=0.15). In multivariate analysis, IL-1 β decrease was associated with "ice" modality (r=3.25; p=0.03) and negatively associated with BMI (r=-4.02; p=0.04). VEGF levels also decreased globally (1391+/-295pg/mL versus 1263+/-281pg/mL; n=34; p=0.03) but not significantly in subgroups (Ice: n=19; p=0.2 - CO₂: n=15; p=0.07). IL-17A rates also tended to decrease (16.3+/-15.75pg/mL versus 14.95+/-15.2pg/mL; n=35; p=0.065). TNF- α levels tended to decrease in CO₂ group (n=15; p=0.08).

Conclusions: LC (ice or pulsed CO₂) applied twice during one day showed anti-inflammatory effects by reducing synovial IL-6, IL-1 β and VEGF levels in arthritic knees. Both techniques equally reduced pain but sample sizes were still insufficient to show any difference in terms of local cytokine level reduction.

Disclosure of Interest: None declared

LOCAL CRYOTHERAPY (PULSED CO2 OR ICE) DECREASES IL-6, IL-1 β AND VEGF SYNOVIAL LEVELS IN KNEE ARTHRITIS

EULAR16-1699

P - SAT0626

Rehabilitation

Xavier Guillot^{1,2}, Nicolas Tordi¹, Caroline Laheute³, Lionel Pazar⁴, Clément Prati^{1,2}, Philippe Saas³, Daniel Wendling²

¹FDE EA4267, FHU INCREASE, Bourgogne Franche-Comté University, F-25000 Besançon, France.

²Rheumatology department, Besançon University Hospital, F-25030 Besançon Cedex, France.

³INSERM U1098, biomonitoring platform, EFS Bourgogne-Franche-Comté, F-25030 Besançon Cedex, France.

⁴INSERM-CIC1431, Besançon University Hospital, F-25030 Besançon Cedex, France



Background

Cryotherapy is widely and empirically used in an adjuvant and symptomatic setting in inflammatory rheumatic diseases, with a low level of evidence [1]. In RA, ice application was shown to reduce knee intra-joint temperature to 30°C for 2 hours [2]. This temperature range corresponds to tissue mild hypothermia, which already showed therapeutic and anti-inflammatory effects in other pathologies such as brain ischaemia, notably through NF- κ B dependent cytokine gene transcription inhibition [3] and enzyme metabolism blockade [4].

Objectives

The aim of this work was to evaluate the effects of two local cryotherapy (LC) techniques (ice or hyperbaric cold CO2) applied twice on pain and pro-inflammatory cytokine levels in arthritic knees.

Methods

Thirty-five patients suffering from non-septic knee arthritis were included (16 gout, 8 calcium pyrophosphate dehydrate crystal deposition diseases, 5 spondyloarthritis, 6 rheumatoid arthritis). Patients didn't receive any concurrent anti-inflammatory drug (corticosteroids, NSAIDs, colchicine, DMARDs, biologics) throughout the study period (24 hours). They were randomized to receive local ice (for 30 minutes) or cold pulsed CO2 (for 2 minutes - Cryo-® Cryonic) at 9 A.M and 5 P.M. Synovial fluid was collected just before the first cold application then 24 hours later (also at 9 A.M - Fig. 1.). Synovial fluid cell count and cytokine levels (IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-17A, VEGF by Multiplex flow cytometry - CBA® BD biosciences) were measured and compared before and after the two LC applications.

Results

Pain VAS significantly decreased after 24 hours in both treatment groups (Fig. 2.). The Mean synovial fluid leukocyte count non-significantly decreased (Fig. 3.). IL-6 levels significantly decreased after 2 LC applications. This decrease was also significant in ice-treated subgroup (but not in CO2-treated patients (Fig. 4.). In multivariate analysis, IL-6 decrease was associated with a higher CRP rate at baseline ($r=0.35; p=0.004$) and a greater skin temperature drop during LC ($r=0.33; p=0.03$). IL-1 β levels also decreased after treatment, but the difference didn't reach significance in treatment subgroups (Fig. 5.). In multivariate analysis, IL-1 β decrease was associated with "ice" modality ($r=3.25; p=0.03$) and negatively associated with BMI ($r=-4.02; p=0.04$). VEGF levels also decreased globally but not significantly in subgroups (Fig. 6.). IL-17A and TNF- α rates non-significantly tended to decrease. Cytokine levels didn't vary significantly in contralateral non-treated knees (n=10) over 24 hours.

Conclusions

- Local cryotherapy (ice or pulsed CO2) applied twice during one day showed anti-inflammatory effects by reducing synovial IL-6, IL-1 β and VEGF levels in arthritic knees.
- Both techniques equally reduced pain but sample sizes were still insufficient to show any difference in terms of local cytokine level reduction.

Fig. 1. Study design

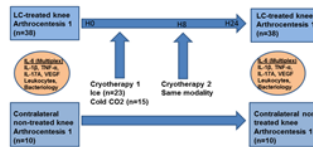


Fig. 3. Synovial fluid leukocyte count evolution (means $\pm$ 95% CI)

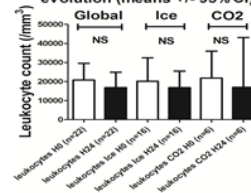


Fig. 5. Synovial fluid IL-1 β evolution after 2 LC applications (Multiplex, means $\pm$ 95% CI)

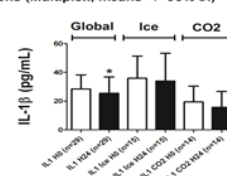


Fig. 2. Pain VAS evolution after 2 LC applications (means $\pm$ 95% CI)

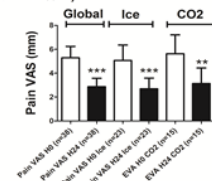


Fig. 4. Synovial fluid IL-6 evolution after 2 LC applications (Multiplex, means $\pm$ 95% CI)

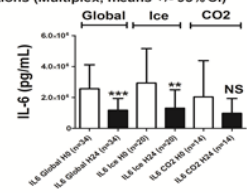
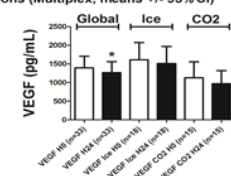


Fig. 6. Synovial fluid VEGF evolution after 2 LC applications (Multiplex, means $\pm$ 95% CI)



References

- Guilley L, et al. *Open Rev Clin Rheumatol*. 2014.
- Quaranta M, et al. *Ann Rheum Dis*. 1990.
- Wang H, et al. *Neuroscience*. 2005.
- Harris M, et al. *J Biol Chem*. 1976.

Disclosures of interest: none

- **ACR 2016:**

Friday, September 2, 2016

Dear Xavier Guillot,

We are pleased to inform you that the ACR/ARHP Abstract Selection Committee has accepted your abstract titled "Local Cryotherapy Down-Regulates Local and Systemic IL-6/IL-17 Pathway with No Effect on TNF- α in Adjuvant-Induced Arthritis" for presentation at the 2016 ACR/ARHP Annual Meeting, to be held in Washington, DC, November 11-16. Please accept or reject this invitation and notify your Co-authors of this status.

ABSTRACT ACCEPTANCE INFORMATION

Presentation Type: Poster

Session Title: Rheumatoid Arthritis – Animal Models - Poster Session I

Session Date/Time: Sunday, November 13, 2016; 8:30 AM - 4:00 PM*

Presentation Time: 9:00 - 11:00 AM **IMPORTANT:** Poster presenters are required to be present at their poster during this time.

Abstract Submission ID: 56020

Abstract Title: Local Cryotherapy Down-Regulates Local and Systemic IL-6/IL-17 Pathway with No Effect on TNF- α in Adjuvant-Induced Arthritis

Local Cryotherapy Down-Regulates Local and Systemic IL-6/IL-17 Pathway with No Effect on TNF- α in Adjuvant-Induced Arthritis

ACR16 - 480

Rheumatoid Arthritis – Animal Models

Background

Cryotherapy is widely used in the adjuvant setting in inflammatory rheumatic diseases with a paradoxically low level of evidence [1]. Furthermore, ice has been shown to decrease intra-joint temperature to 30°C for 2 hours in RA [2]. This temperature range corresponds to tissue mild hypothermia, which has shown anti-inflammatory properties, notably through NF- κ B-mediated cytokine gene transcription inhibition [3] and the repression of key-enzymatic pathways such as COX-2, MMP, collagenases [4]. Whether these mechanisms are involved in cryotherapy-treated RA is not known.

Objectives

The aim of this work was to evaluate the clinical as well as local/systemic biological anti-inflammatory effects of local cryotherapy applied twice a day for 14 days in vivo in Adjuvant-Induced Arthritis (AIA) model. We also compared the effects of 2 techniques (ice and cold gas).

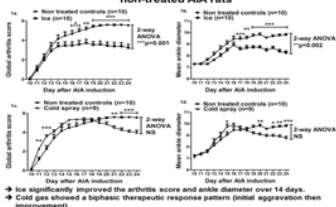
Methods

AIA was induced in 30 male Lewis rats by M.butyrricum injection in the tail (day 0). At the clinical onset of arthritis (day 11), rats were treated by ice application (30 minutes in cages lined with ice pops, n=10), cold gas application (intermittent pulverizations on hind paws for 2 minutes, n=9) both twice a day for 14 consecutive days. Non-treated AIA controls were also considered (n=10). The arthritis score, ankle diameter, skin temperature after treatment, weight were daily monitored. The rats were then sacrificed the day after the last cold application (Day 25). Cytokine gene expression levels in hind paws were evaluated by Q-RT-PCR, while plasma cytokine levels were measured by ELISA and Multiplex techniques.

Results

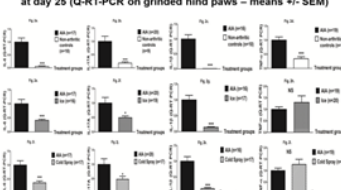
Ice and cold gas showed distinct therapeutic response patterns (Fig. 1.). Both techniques reduced IL-6, IL-17A and IL-18 gene expression levels in hind paws (Fig. 2.). We also observed systemic anti-inflammatory effects on plasma IL-17A and IL-6 levels (Fig. 3.). By contrast, we observed no effect on local nor systemic TNF- α levels. Local and systemic IL-6 and IL-17A levels correlated with the clinical parameters (Fig. 4.).

Fig. 1. Time-course of arthritis in cryotherapy-treated versus non-treated AIA rats



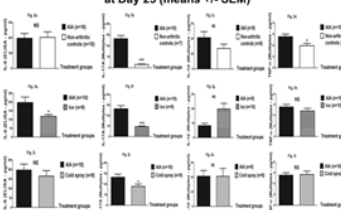
→ Ice significantly improved the arthritis score and ankle diameter over 14 days.
→ Cold gas showed a biphasic therapeutic response pattern (initial aggravation then improvement).

Fig. 2. Mean cytokine gene expression levels in treatment groups at day 25 (Q-RT-PCR on grinded hind paws – means $\pm$ SEM)



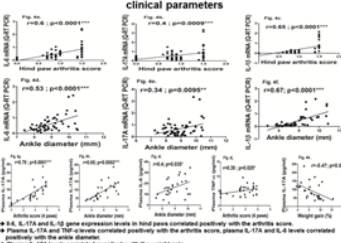
→ At day 25, both techniques significantly reduced IL-6, IL-17A and IL-18 gene expression levels in hind paws (by 60%, 50% and 87% respectively)

Fig. 3. Cytokine plasma levels in treatment groups at Day 25 (means $\pm$ SEM)



→ Both techniques reduced plasma IL-17A levels at day 25.
→ Ice decreased plasma IL-6 levels at day 25.

Fig. 4. Correlations between local / systemic cytokine levels and clinical parameters



→ IL-6, IL-17A and IL-18 gene expression levels in hind paws correlated positively with the arthritis score.
→ Plasma IL-17A and TNF- α levels correlated positively with the ankle diameter.
→ Plasma IL-17A levels correlated negatively with the weight gain.



Conclusions

- Local cryotherapy applied twice a day for 14 days exhibited therapeutic and anti-inflammatory effects in AIA.
- Ice was globally more efficient on the clinical parameters, and better tolerated than cold gas.
- Both techniques induced local but also systemic anti-inflammatory effects.
- These effects were mainly IL-6 and IL-17A-driven, but TNF- α -independent in this model.

References

- [1] Guillot, et al. Sport Rev Clin Immunol 2004.
- [2] Oostendorp, et al. Arthritis Rheum. 1994.
- [3] Torani, et al. Neurochem Int. 2006.
- [4] Nishi, et al. N Engl J Med. 1974.

Disclosures of interest: None.



Télé Star & ma santé
AVEC LÉAINE de
Marina Carrère d'Encausse
Médecin et journaliste, *Le Magazine*
de la santé sur France 5
www.madocentre.fr

Cryothérapie Les traitements par le froid en plein essor

Rhumatologie, traumatologie, médecine du sport, bien-être, esthétique... Autant de domaines où la cryothérapie se développe. Que peut-on attendre des techniques qui utilisent le froid extrême ? Quelles sont leurs applications ? **Télé Star** fait le point. **Emmanuelle Bianco**

La poche de glace : des indications multiples

Quand on applique de la glace sur un hématome, c'est déjà de la cryothérapie.

L'intérêt du grand froid ? Il calme la douleur, a une action anti-inflammatoire et limite la formation d'un œdème. D'où une large palette d'indications : contusions, traumatismes musculaires (claquage, déchirure...), et articulaires (luxation, entorse...), tendinites.

«La cryothérapie locale agit aussi sur les douleurs et inflammations chez des personnes qui souffrent de polyarthrite rhumatoïde, de spondylarthrite ankylosante ou bien de goutte, signale le docteur Xavier Guillot, rhumatologue au CHU de Besançon. Elle ne se substitue pas au traitement de fond, mais pourrait être une alternative aux anti-inflammatoires et aux corticoïdes ou du moins permettre d'en baisser les doses.»

Le bon matériel : on peut utiliser une poche en plastique remplie de glaçons, un sachet de petits

pois surgelés ou encore un «pack froid» acheté en pharmacie ou en grande surface et stocké au congélateur. Quel que soit le dispositif, il faut l'enrouler d'un linge humide pour éviter de brûler la peau.

L'application : s'il s'agit d'un traumatisme, 3 à 5 applications de 15 à 20 minutes chacune, en les espaçant d'une heure. Consultez si la douleur persiste au-delà de 3 jours.

«Pour les maladies rhumatismales, une application matin et soir de 30 minutes environ sur les articulations douloureuses, précise le Dr Guillot. Mais plusieurs jours consécutifs de

traitements sont parfois nécessaires pour obtenir un effet analgésique optimal.»

La cryothérapie corps entier (CCE) : une technique à succès

La encore, ce sont les propriétés antalgiques, anti-œdémateuses et anti-inflammatoires du froid qui sont mises à profit. Mais, ici, c'est l'ensemble du corps qui est immergé dans un «bain» d'air sec à -110 °C, tenu à 30 minutes environ sur les articulations douloureuses, rappelle le Dr Guillot. Mais plusieurs jours consécutifs de

MINCEUR PAR LE FROID : à savoir avant d'y recourir

La cryolipolyse vise à réduire les annes grasses très localisées (ventre, cuisses, bras, etc.), en détruisant les cellules de graisse (adipocytes) en déshydratant par le froid (entre 3 et 6 °C, environ 20 °C, des cellules grasses qui y sont logées. Selon les appareils, la séance dure de 30 min à 1 heure, celle de 200 à 600 € par zone traitée). Le double s'il faut traiter des deux côtés, et il en faut souvent plus de deux pour obtenir un résultat satisfaisant. Problème : ça ne fonctionne pas chez tout le monde et, si l'on reprend ensuite du poids, les cellules grasses restantes peuvent gonfler et occuper la place laissée vacante par celles qui ont été éliminées. Autrement dit : retour à la case départ !



Le déroulement : cette technique s'effectue en centre spécialisé. Vêtu d'un maillot de bain, de chaussettes, de gants, d'un bonnet et d'un masque chirurgical pour protéger le nez et la bouche, on pénètre dans un sas à -60 °C, durant 30 secondes, le temps que la peau s'habitue et, s'assèche, avant de passer dans la chambre à -110 °C, où l'on reste 2 à 3 minutes.

Les indications : - Son intérêt est démontré dans la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante, la thrombose et la tendinite.

«Elle a aussi un effet positif sur l'humeur, inhibe un sommeil de mauvaise qualité, et cela a même été constaté chez des personnes qui souffrent d'un syndrome dépressif, signale François Blet, chercheur en physiologie de l'exercice à l'Inserm, premier centre français à s'être équipé. Un bénéfice probablement lié à l'action du froid sur le système nerveux autonome des neurotransmetteurs.

Après 30 secondes à -60 °C, c'est 2 minutes à -110 °C.



- Et pour la récupération après un entraînement sportif ? «Elle donne des résultats encourageants mais, pour les courbures, ne fait pas mieux qu'une immersion dans un bain froid, entre 8 et 15 °C, pendant 10 minutes juste après l'effort.»

- Son bénéfice reste à démontrer scientifiquement dans la sclérose en plaques, les maladies dermatologiques (psoriasis et dermatite atopique), l'eczéma et la migraine. L'association de la cryothérapie à un syndrome dépressif, jusqu'à 20 pour une polyarthrite rhumatoïde... Il semble que les résultats soient meilleurs quand les

LÉAINE de
Marina Carrère d'Encausse

LE FROID EST UTILE POUR...

▶ Traiter

- Les cancers : on fait pénétrer dans les organes des sondes métalliques, refroidies par une circulation liquide d'azote ou d'argon afin d'éliminer de petites tumeurs cancéreuses.

- Les troubles du rythme cardiaque : ces sondes peuvent aussi s'attaquer, dans le cœur, à des groupes de cellules qui perturbent son bon fonctionnement.

▶ **Conserver les cellules** L'azote liquide permet, depuis longtemps, de congeler des cellules isolées. On conserve ainsi des cellules humaines (globules rouges, spermatozoïdes) ou des groupes de cellules (valves cardiaques, embryon).

Ne pas confondre CCE avec «cryosauna»

Le cryosauna repose sur le même principe que la cryothérapie corps entier à deux exceptions près : le froid est obtenu par évaporation d'azote liquide (et non par refroidissement d'air sec par un système électrique), et le corps n'est immergé que jusqu'aux épaules, la tête dépassant du haut de la cabine. Or, une étude du Dr Hausswirth de l'Inserm a montré que le refroidissement cutané est plus homogène dans le cas de la cryothérapie corps entier, et tend à mieux activer le système nerveux parasympathique qui apporte le calme et la détente.

RESUME.

Introduction. La cryothérapie est utilisée de manière large et empirique à visée adjuvante dans les rhumatismes inflammatoires, avec un niveau de preuve faible. Dans une revue systématique de la littérature, en poolant les données de 6 études non contrôlées, nous avons pu démontrer que la cryothérapie (locale ou corps entier) appliquée deux fois par jour pendant 7 à 15 jours réduisait significativement l'EVA douleur et le score d'activité DAS28 dans la polyarthrite rhumatoïde. La cryothérapie locale (glace ou gaz froid) montrait par ailleurs des effets taille intra-classes supérieurs à ceux obtenus en utilisant la cryothérapie corps entier.

L'objectif de ce travail était de mesurer les effets de la cryothérapie locale sur la douleur, l'inflammation synoviale et systémique chez les patients arthritiques et dans le modèle murin d'arthrite à l'adjuvant.

Matériels et méthodes. Dans les études randomisées CDRI et ALGGAR, nous avons évalué les effets de deux applications locales de froid (glace versus gaz froid) sur la douleur, l'activité Doppler et les taux protéiques de cytokines intra-articulaires chez 46 patients souffrant d'arthrites de genou non septiques. Les genoux arthritiques contralatéraux non traités étaient utilisés comme contrôles. Nous avons par ailleurs étudié *in vitro* les effets de l'hypothermie modérée (30°C pendant 2 heures) sur l'expression protéique des cytokines dans un modèle de culture de rotules de rats arthritiques. Nous avons enfin étudié *in vivo* dans l'arthrite à l'adjuvant les effets de l'application sub-chronique de glace ou de gaz froid (2 fois par jour pendant 14 jours versus contrôles arthritiques non traités) sur le score d'arthrite, le diamètre de cheville, la transcription des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires dans les pattes arrières (Q-RT-PCR) et l'expression protéique des cytokines dans le plasma (Multiplex et ELISA) après 14 jours de traitement.

Résultats. Dans l'étude CDRI, la cryothérapie locale (glace et gaz froid) réduisait significativement l'EVA douleur ainsi que le score Doppler dans les genoux traités, ces effets persistant le lendemain des deux applications. Dans une analyse intermédiaire des résultats de l'étude ALGGAR, en combinant les deux groupes de traitement (glace et gaz froid), nous avons observé une baisse des taux d'IL-6, d'IL-1 β et de VEGF dans le liquide articulaire après deux applications. Dans les cultures d'explants de rotules de rats arthritiques, l'hypothermie ponctuelle réduisait significativement les taux d'IL-6. *In vivo*, la glace était plus efficace sur les paramètres cliniques et mieux tolérée. Les deux techniques réduisaient la transcription des gènes codant pour IL-6, IL-17A et IL-1 β dans les pattes arrières après 14 jours de traitement. Les deux modalités réduisaient significativement les niveaux plasmatiques d'IL-17A et la glace réduisait en outre les taux d'IL-6 et de VEGF. Nous n'avons observé aucun effet de la cryothérapie locale sur la voie du TNF- α chez l'homme ni chez l'animal.

Conclusion. Nos résultats démontrent pour la première fois un effet thérapeutique et anti-inflammatoire de la cryothérapie locale dans l'arthrite. Les effets biologiques étaient IL-6/IL-17 dépendants et TNF- α indépendants. Des études complémentaires permettront de mieux caractériser les mécanismes moléculaires sous-jacents et de déterminer si la cryothérapie locale pourrait être une alternative aux AINS et corticoïdes dans les rhumatismes inflammatoires.

Mots-clés: cryothérapie – IL-6 – IL-17 – arthrite de genou – arthrite à l'adjuvant.

ABSTRACT.

Introduction. Cryotherapy is widely and empirically used in an adjuvant setting in inflammatory rheumatic diseases, with a low level of evidence. We performed a systematic review of the literature and, by pooling data from 6 non-controlled studies, we could show that local cryotherapy (local or whole-body cryotherapy) applied twice a day for 7-15 days significantly reduced the pain VAS and the DAS28 activity score in rheumatoid arthritis. Furthermore, local cryotherapy (ice packs or cold gas) showed significantly greater intra-class effect-sizes compared to whole-body cryotherapy.

The aim of this work was to measure the effects of local cryotherapy on pain, synovial and systemic inflammation in arthritic patients and in the murine model of adjuvant-induced arthritis.

Materials and Methods. First, in the CDRI and ALGGAR randomized studies, we evaluated the effects of 2 local cold applications (ice versus cold gas) on pain, power Doppler activity and intra-joint cytokine protein levels in 46 patients suffering from non-septic knee arthritides. Contralateral arthritic knees were used as controls. Secondly, we studied the *in vitro* effects of mild hypothermia (30°C for 2 hours) on cytokine protein expression in a model of cultured arthritic rat patellae. Thirdly, we studied the *in vivo* effects of sub-chronically applied ice or cold gas (twice a day for 14 days versus non-treated arthritic controls) on the arthritis score, the ankle diameter, pro-inflammatory cytokine gene transcription levels in hind paws (Q-RT-PCR) and cytokine plasma protein levels (Multiplex and ELISA) after 14 days of treatment.

Results. In the CDRI study, local cryotherapy (ice and cold gas) significantly reduced the pain VAS and the power Doppler score in treated knees, and these effects remained significant the day after the 2 cold applications. In an intermediate analysis of the ALGGAR study results, by pooling the 2 treatment groups, we could show significant decreases in IL-6, IL-1 β and VEGF synovial fluid protein levels after 2 cold applications. In arthritic rat patella explant culture experiments, punctual hypothermia significantly reduced IL-6 protein levels. *In vivo*, ice was more efficient on the clinical parameters and better tolerated compared to cold gas. Both techniques significantly reduced IL-6, IL-17A and IL-1 β gene transcription levels in hind paws after 14 days of treatment. Both techniques reduced IL-17A plasma protein levels, while ice also reduced IL-6 and VEGF plasma protein levels. Conversely, we observed no effect of local cryotherapy on the TNF- α pathway, neither in patients nor in our animal model.

Conclusion. Here we demonstrate for the first time therapeutic and anti-inflammatory effects of local cryotherapy in arthritis. The biological effects were IL-6/IL-17-driven and TNF- α independent. Further studies will help elucidate the underlying molecular mechanisms involved and determine whether local cryotherapy might be a safer alternative to NSAIDs and corticosteroids in inflammatory rheumatic diseases.

Key-words: Cryotherapy – IL-6 – IL-17 – knee arthritis – adjuvant-induced arthritis.