



**HAL**  
open science

**Nouvelles stratégies thérapeutiques des affections articulaires du cheval : évaluation du potentiel thérapeutique des chondrocytes autologues et des cellules souches de cordon ombilical (sang et gelée de Wharton) : vers l'industrialisation de cellules médicaments.**

Rodolphe Rakic

► **To cite this version:**

Rodolphe Rakic. Nouvelles stratégies thérapeutiques des affections articulaires du cheval : évaluation du potentiel thérapeutique des chondrocytes autologues et des cellules souches de cordon ombilical (sang et gelée de Wharton) : vers l'industrialisation de cellules médicaments.. Biochimie, Biologie Moléculaire. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMC406 . tel-02357951

**HAL Id: tel-02357951**

**<https://theses.hal.science/tel-02357951v1>**

Submitted on 11 Nov 2019

**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.



Normandie Université

## THESE

### Pour obtenir le diplôme de doctorat

**Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**  
**Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie**

Nouvelles stratégies thérapeutiques des affections articulaires du cheval. Evaluation du potentiel thérapeutique des chondrocytes autologues et des cellules souches de cordon ombilical (sang et gelée de Wharton) : Vers l'industrialisation de cellules médicaments.

### Présentée et soutenue par Rodolphe RAKIC

Thèse soutenue publiquement le 5 septembre 2017  
devant le jury composé de

M <sup>me</sup> Françoise REDINI	Directeur de Recherche INSERM - Université de Nantes	Rapporteur
M. Jean-Thomas VILQUIN	Directeur de Recherche CNRS - Université Pierre et Marie Curie, Paris	Rapporteur
M. Jean-Luc CADORE	Professeur des Ecoles Vétérinaires - Vetagro-Sup, Campus Vétérinaire de Lyon 1	Examineur
M <sup>me</sup> Nathalie SAULNIER	Directeur Scientifique - Docteur - Vetbiobank, Marcy l'Etoile	Examineur
M. Stéphane MADDENS	Dirigeant - Docteur - Vetbiobank, Marcy l'Etoile	Examineur
M <sup>me</sup> Magali DEMOOR	Maître de conférences, HDR - Université de Caen Normandie	Examineur
M. Philippe GALERA	Professeur des Universités - Université de Caen Normandie	Directeur de Thèse

**Thèse dirigée par Philippe GALERA, laboratoire BioTARGen (Biologie, Génétique et Thérapies ostéoArticulaires et Respiratoires).**



UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE



EdNBISE  
Ecole doctorale Normande  
Biologie Intégrative,  
Santé, Environnement







Ces travaux de thèse ont été menés au sein de l'équipe OErAGen (ossification endochondrale et anomalies génétiques du développement) du laboratoire BioTARGen (Biologie, génétique et thérapies ostéoarticulaires et respiratoires).



Mon contrat doctoral a été financé par l'entreprise Vetbiobank par le biais d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche délivrée par l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie.



L'ensemble des travaux a pu être mené, au delà du concours de l'équipe OErAGen, grâce à l'indispensable soutien financier de Vetbiobank, de la Fondation Hippolia, du Fonds Eperon, de la Région Normandie, du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, ainsi que de l'Union Européenne par le biais du Fonds Européen de Développement Economique et Régional (FEDER).



*Projet cofinancé par l'Union Européenne.*

*Fonds européen de développement régional (FEDER).*



# Remerciements

---

# Remerciements

---

Cette thèse vient finaliser mes études, mais pas ma passion pour la biologie. Elle n'est pas une finalité en soit, mais une période marquante de ma vie professionnelle et surtout personnelle. En effet, malgré une échéance de trois ans, à la fois courte et longue, une thèse ne se résume pas à un manuscrit, une soutenance ou un diplôme. C'est l'ensemble du processus qui la rend difficile, l'ensemble des doutes et des étapes qui se succèdent qui la rend éreintante. Après avoir compris qu'il ne s'agit pas d'une bataille contre la thèse mais plutôt une bataille contre soi-même, l'inquiétude laisse place à une nouvelle façon de penser, de travailler et d'avancer. Je ne suis pas heureux de terminer cette thèse, mais plutôt de voir ce qu'elle m'a apportée et la tournure passionnante qu'elle a pu prendre. Ce qui me rend heureux, c'est de voir ce qu'elle m'a permis de réaliser et surtout les rencontres qu'elle a pu occasionner. Ce sont ces dernières qui ont fait de moi ce que je suis maintenant et qui m'ont permis de tenir dans les moments les plus difficiles. De part le caractère académique et industriel de cette thèse, ainsi que les différentes structures auxquelles j'ai été rattaché, la liste des personnes à remercier est longue. C'est pourquoi, de façon non exhaustive, je vais consacrer ces quelques lignes à leur égard.

Je remercie premièrement et de tout coeur cette personne si humble qu'est mon directeur de thèse, le **Professeur Philippe Galéra**. Merci de m'avoir accompagné et encadré pour cette thèse. Merci de t'être investi pour que je puisse la commencer et que je puisse la terminer, nous savons tous deux que cela n'a pas été des plus simples. Merci de m'avoir toujours laissé la place de m'exprimer et de m'avoir systématiquement écouté et conseillé. Tu m'as toujours accordé toute ta confiance du début jusqu'à la fin, alors que la mienne me faisait cruellement défaut au commencement de cette thèse. Et c'est notamment dans les moments les plus difficiles que tu as été le plus présent et rassurant. Je mets ainsi dans cette thèse toute ma reconnaissance envers toi et tes valeurs.

Merci au Président et Fondateur de Vetbiobank, le **Docteur Stéphane Maddens**. Tu as fait le pari de m'accepter dans cette jeune entreprise avec cette convention CIFRE. Après trois ans, j'ai eu la chance de voir cette aventure et famille qu'est Vetbiobank, se transformer et évoluer de façon considérable. Nous ne nous connaissions quasiment pas avant mon contrat et je sors de cette entreprise avec l'impression d'avoir eu bien plus qu'un responsable hiérarchique. Au cours de nos entretiens, j'ai appris à connaître ta spontanéité, ton enthousiasme et ton optimisme. Par tes conseils et nos débats, j'ai rencontré une personnalité aux grandes valeurs faisant échos avec celles de Philippe. Tu restes pour moi un exemple professionnel et humain.

Merci au **Docteur Françoise Rédini** et au **Docteur Jean-Thomas Vilquin** d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'au **Professeur Jean-Luc Cadoré** d'avoir accepté de faire parti de mon jury. Je suis conscient que cette période n'est pas des plus accommodante pour évaluer un travail de thèse et je vous suis reconnaissant de prendre de votre temps pour ce dernier. Je souhaite en retour, que ce travail vous apporte satisfaction et puisse générer des perspectives scientifiques entre nos différentes thématiques de recherche.

Je remercie de tout coeur le **Docteur Nathalie Saulnier**. Je ne compte plus nos rendez-vous téléphoniques, nos réunions et nos mails échangés à 540 km de distance. Malgré cette distance, tu ne m'as pas seulement encadré de façon exemplaire pour le projet industriel de la thèse, mais tu as apporté une dimension bien plus grande à mon projet de recherche. J'ai pu voir en toi une personne attachante et passionnée par son travail. C'est avec beaucoup d'émotion que je vois cette aventure se terminer et dont tu as fais partie intégrante.

Merci au **Docteur Magali Demoor** pour tes conseils, ton enthousiasme et ton investissement pour faire du laboratoire ce qu'il est. Tu as su être là pour gérer les situations difficiles que le laboratoire a pu connaître et t'investir personnellement pour les solutionner.

Je souhaite remercier l'inimitable **Docteur Florence Legendre** au professionnalisme exemplaire avec qui j'ai passé ces années au laboratoire. Merci surtout pour tout l'investissement personnel et le temps que tu as consacré avec Romain et moi lors de la période du déménagement, qui restera un souvenir très sympathique en ta compagnie, pour une tâche draconienne. Merci également à **Marie-Christine Enos** avec son sourire inflexible et sa gentillesse, tu manqueras indéniablement au laboratoire.

Je tiens à laisser quelques lignes pour l'**équipe de Vetbiobank** qui s'est vue agrandir d'année en année. Plus qu'un travail, j'ai le sentiment que c'est une philosophie et une éthique qui est apportée aux stagiaires et employés. Un grand merci à **Fabrice Labadie** avec qui j'ai partagé mes soirées sur Marcy l'Etoile. Je remercie chaleureusement **Clément Robert** et **Marine Fèbre** qui ont vu leur travail débiter en même temps que le mien. Je ne vous voyais que quelques fois par an et pourtant, grâce à vous, je me suis senti à chaque fois chez moi au sein de Vetbiobank. Je ne serai pas sans revenir, mais je vous souhaite le plus bel avenir à vous et vos petites familles récemment agrandies.

Concernant le **Docteur Thomas Branly**, un simple remerciement dans une thèse ne suffirait pas à représenter ce qu'il m'a apporté durant ces années. Plus qu'un voisin de paillasse et un collègue, c'est un Ami que je remercie. Comme tu l'as si bien dit, nos points de vue et nos idées divergent sur quelques points, néanmoins, nos innombrables débats m'ont permis de mieux réfléchir et mieux appréhender des problèmes bien plus larges que ceux de la recherche académique. Toujours de bon conseil, j'ai trouvé en toi quelqu'un de confiance et un ami exceptionnel qui sera toujours présent au moindre souci. Malgré la fin de ma thèse et tout ce que tu penses, tu n'as pas fini d'entendre parler de moi. Merci également à **Romain Contentin** (futur docteur). Derrière ta personnalité d'une grande timidité, se cache un humour décapant qui t'es propre. Je constate que tu as énormément changé entre tes stages et maintenant. Tu débordes de passion pour ton travail et tu sais transmettre cette dernière à autrui. Merci pour ces moments que l'on a partagé au C.H.U et à la plateforme. Un grand merci au **Docteur Mélanie Desancé**, nous avons parcouru beaucoup de chemin depuis ces 5 années. Discrète durant les premières années, j'ai découvert une personne affirmée, courageuse et pleine de sympathie. Je te souhaite le meilleur pour ta vie professionnelle et personnelle.

Merci à tous les stagiaires qui se sont succédés et qui viennent ou sont partis aux quatre coins du monde. A mon ami **Thibaud Jacquiel** qui restera une légende au laboratoire. Au chaleureux **Clément Veys** et ses récentes réussites professionnelles. A **Miranda Concari** notre extraordinaire italienne. A **Abderrahim Benmoussa** parti dans les contrées nord-américaines, ainsi qu'à **Victor Ferment**. A **Amandine Duchemin**, partie quant à elle en Belgique. Merci à nos derniers stagiaires **Julien Pestel**, **Maëlhia Guery**, **Valentin Platel** et **Charlotte Celant**. Merci à la remarquable **Camille Noblet** ainsi qu'à **Manon Jammes**. Merci tout particulièrement à **Bastien Bourdon** (organisateur de soirées à ses heures perdues) et sa personnalité hors normes, mon premier stagiaire avec qui j'ai passé tellement de journées en compagnie de son humour et de sa propagande havraise. Je te souhaite le meilleur pour ta thèse et pour ton futur. Merci à nos anciens collègues et désormais Amis **Mouloud Bouyoucef**, **Tangni Gomez-Leduc** et **Séverine Cruet Hennequart**. Merci également au **Docteur Julie Gall** à qui je souhaite la plus belle réussite.

Merci aux personnes qui ont cohabité avec nous à la plateforme et qui se sont très vite montrées proches de nous. Merci à **Marie Orard**, **Côme Thieulent** et **Alexandre Champin** avec qui nous avons partagé nos bureaux. Un merci en particulier à **Christine Fortier**, **Marie-Pierre Toquet**, le **Docteur Erika Hue** et **Sophie Castagnet** qui nous ont aidées à aménager les nouveaux locaux et à nous habituer à notre nouvel environnement. Merci également au **Docteur Eric Richard** pour ses conseils et au **Docteur Stéphane Pronost** pour sa gentillesse et ses discussions en fin de journée au laboratoire. Merci au joyeux groupe de filles du **RESPE** avec qui

nous discussions au moment des repas et qui ont fait preuve de beaucoup de bienveillance envers nous.

Merci à mes deux Amies, les **Docteurs Stéphanie Fougerolle** et **Nathalie Kin** dont les parcours de recherche se sont faits en parallèle de ceux de Thomas et moi. Vous représentez le parfait exemple de belles rencontres que l'on peut avoir au cours d'une thèse.

Merci à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer aux cours des congrès, comme les nancéens, le **Docteur Arnaud Bianchi** et le **Docteur Emily Velot**. Merci beaucoup à l'équipe de l'ANRT et aux organisateurs des 24 h chrono de l'entrepreneuriat, au **Docteur Clarisse Angelier**, au **Docteur Renaud Redien-Collot**, à **Madjid Yahiaoui** (si je monte mon entreprise, je te promets de faire appel à toi) ainsi qu'à **Anne-Sophie Mendes**. Je souhaite remercier du fond du coeur mes Amis qui ont composé l'équipe du concours : **Julie Zaworski**, **Nadia Yacoubi**, **Marine Bittel**, **Morgane Chinesa** et **Aurelia Cophignon**. Vous ne pouvez pas savoir à quel point cet événement a été un tournant dans ma thèse et ma future vie professionnelle.

Merci à mes Amis de Caen qui m'ont permis de m'évader loin des tracasseries quotidiennes et qui m'ont toujours accueillis à bras ouverts : **Docteur Romain Goulay**, **Matthieu Schwalm**, **Pauline Horvath**, **Thibault Souef** et **Jérémy Bronssard**.

A mes Amis d'enfance qui sont toujours restés dans mon coeur tout au long de ces années, qui m'ont encouragé, aidé, conseillé et avec qui je garde pleins de souvenirs. Je leur adresse la plus grande des gratitudes. Malgré la distance, le manque de temps, nos activités professionnelles, vous êtes toujours restés à mon écoute et m'avez soutenu dans les moments les plus durs. **Benjamin Lair**, **Romain Le Dortz**, **Justine Bonté**, **Emmanuel Halbout**, **Laurène Courvoisier-Clément** et **Matthieu Tirel**, je ne saurais vous remercier comme il se doit.

Je désire remercier du plus profond du coeur **Louise Debris** sans qui je ne serais pas allé jusqu'au bout de cette thèse. Qui a encaissé tous mes moments de doutes et mes difficultés à avancer. Qui m'a toujours orientée vers la bonne voie quand je me perdais et avec qui j'ai partagé les moments les plus difficiles, mais également les plus beaux de ces trois années.

Merci à toute **ma famille** des quatre coins de la France qui m'a accompagnée jusqu'à cette étape de ma vie.

**Je dédie cette thèse à mes parents et à ma soeur.** Les dernières années n'ont pas été des plus faciles. Je sais que la porte de vos maisons reste toujours ouverte pour moi à n'importe quelle heure de la journée ou de la nuit. Merci de m'avoir apporté l'éducation que j'ai eue. Merci à ma Mère, à Mon père et à ma Soeur de m'avoir permis de faire ces longues études et d'avoir toujours insisté sur le fait d'être guidé par mes passions. Merci de m'avoir transmis votre créativité, votre optimisme, votre indulgence et votre regard sur le monde. Merci de m'avoir, dès mon plus jeune âge, inculqué les valeurs scientifiques, un esprit critique et une curiosité pour tous les aspects de la vie, quels qu'ils soient. Il y a une grande partie de vous dans cette thèse et c'est grâce à vous qu'elle a cette couleur et saveur.

Il n'y a rien de noble à être supérieur à vos semblables. La vraie noblesse est d'être supérieur à celui que vous avez été auparavant.

Ernest Hemingway



# Sommaire

---

# Sommaire

---

Remerciements	5
Sommaire	11
Liste des abréviations	19
Liste des figures et tableaux	23
Liste des figures et tableaux	24
Avant-propos	27
Introduction	31
Chapitre 1. Le cartilage en tant que tissu squelettique.	33
I. Le cartilage : un tissu de soutien.	34
A. Généralités sur le cartilage.	34
B. Les différents types de cartilage.	35
1. Le cartilage élastique.	35
2. Le fibrocartilage.	35
3. Le cartilage hyalin.	35
C. L'articulation.	36
II. Le cartilage articulaire : un tissu conjonctif hautement spécialisé.	37
A. L'organisation tissulaire du cartilage articulaire.	37
4. Le cartilage articulaire : un tissu segmenté.	38
a. La zone tangentielle.	38
b. La zone transitionnelle.	38
c. La zone radiale.	39
d. La zone calcifiée.	39
B. La composition cellulaire et moléculaire du cartilage articulaire.	39
1. Le chondrocyte.	39
2. La matrice extracellulaire.	39
a. Les collagènes.	41
i. Le collagène de type II.	43
ii. Les collagènes de types IX, XI et les fibrilles hétérotypiques.	45
iii. Le collagène de type X.	46
iv. Les autres collagènes du cartilage.	46
b. Les protéoglycanes.	46
i. L'agrécan.	48
ii. Les « Small Leucin Rich Proteoglycans ».	48
iii. Les autres types de protéoglycanes.	49
c. Les protéines non collagéniques.	49
3. Le chondron et la mécanotransduction.	49
C. L'articulation et le cartilage articulaire équin : le cheval comme sujet d'étude.	51
III. Le cartilage articulaire : d'un tissu provisoire vers un tissu permanent.	52
A. La matrice cartilagineuse en tant que siège de l'ossification.	52
1. La condensation des cellules souches mésenchymateuses.	52

2. La chondrogenèse.	53
3. L'hypertrophie des chondrocytes.	54
4. L'ossification endochondrale.	55
5. La plaque de croissance.	56
6. Le devenir du chondrocyte hypertrophique.	56
B. Le cartilage articulaire en tant que tissu persistant : rôle de l'homéostasie.	57
1. L'homéostasie du cartilage : un équilibre entre le versant anabolique et le versant catabolique.	59
2. La régulation de l'homéostasie du cartilage.	60
a. Les facteurs de croissance.	61
i. Le TGF- $\beta$ 1.	61
ii. Les BMP.	62
iii. Les autres facteurs de croissance.	63
b. L'hypoxie.	64
Chapitre 2. Les affections du cartilage articulaire : de la pathologie à l'ingénierie tissulaire du cartilage.	67
I. Le cartilage articulaire pathologique.	68
C. Les atteintes cartilagineuses : causes et conséquences chez l'Homme et le cheval.	69
D. L'arthrose : une arthropathie dégénérative chronique.	71
E. L'épidémiologie et le coût économique de l'arthrose chez l'humain et chez l'équidé.	71
II. L'inflammation et la perte d'homéostasie.	72
A. La réponse cellulaire du chondrocyte suite aux traumatismes.	72
B. La composante inflammatoire.	73
C. Le catabolisme et le remodelage de la MEC.	74
1. Le catabolisme au détriment de l'anabolisme.	74
2. « High-temperature requirement serine protease a1 ».	76
3. Le collagène de type I.	77
D. Les traitements de l'arthrose dans les modèles humain et équin.	78
1. Le diagnostic de l'arthrose.	78
2. Les traitements médicamenteux et préventifs de l'arthrose.	79
Chapitre 3. Le chondrocyte et la transplantation de chondrocytes autologues : « un gold standard ».	81
I. Le principe de la TCA.	82
A. Les origines de la TCA.	82
B. Les limites de la TCA.	82
C. La dédifférenciation chondrocytaire.	83
II. De la TCA à la MACI.	83
A. La seconde génération de TCA.	83
B. La troisième génération de TCA : la MACI.	83
III. Une nouvelle génération d'ingénierie tissulaire du cartilage.	84
A. Vers la maîtrise du microenvironnement et le contrôle du phénotype chondrocytaire.	85
1. Le biomatériau.	86
2. BMP-2 et redifférenciation chondrocytaire.	87
3. La stratégie d'interférence par l'ARN.	87
4. L'hypoxie.	88
5. Les autres acteurs de la redifférenciation chondrocytaire.	88
B. La MACI dans le modèle équin : vers la preuve de concept dans le modèle gros animal.	88
Chapitre 4. Les cellules souches mésenchymateuses et l'ingénierie tissulaire du cartilage : une source cellulaire alternative.	91

I. Les cellules souches et plasticité cellulaire.	92
II. Les cellules souches mésenchymateuses.	94
A. Les caractéristiques des CSM et leur rôle physiologique.	94
1. Les caractéristiques des CSM.	94
a. La morphologie, la capacité d'adhésion au plastique et la prolifération.	95
b. Les marqueurs de surface membranaires en tant que déterminants cellulaires.	95
c. Le potentiel de différenciation des CSM.	96
d. L'immunomodulation en tant que caractéristique des CSM.	97
2. Les propriétés biologiques et le rôle physiologique des CSM.	98
a. Les CSM en tant que support de l'hématopoïèse.	99
b. Les CSM et l'aspect multifacette de leur fonction.	100
B. Les applications des CSM.	101
III. Les CSM et l'ingénierie tissulaire du cartilage.	103
A. Le contrôle de la chondrogenèse.	104
1. La culture en 3D et la condensation des CSM.	104
2. Les facteurs de croissance : acteurs de la chondrogenèse.	105
3. L'hypoxie : un rôle bivalent.	106
B. Les différentes sources de CSM.	106
IV. Les cellules souches mésenchymateuses néonatales.	106
A. Le cordon ombilical.	107
B. Les cellules souches de sang placentaire (CSM-SPL).	107
C. Les cellules souches de gelée de Wharton (CSM-GW).	108
V. Les CSM néonatales : une source alternative dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage.	109
A. Les CSM de sang placentaire et l'ingénierie tissulaire du cartilage.	110
B. Les CSM de gelée de Wharton et l'ingénierie tissulaire du cartilage.	111
C. D'une source de CSM à une thérapie.	112
Objectifs de l'étude	113
Résultats	115
Chapitre 1 : Premier article	117
I. RNA interference and BMP-2 stimulation allows equine chondrocytes redifferentiation in 3D-hypoxia cell culture model: Application for matrix-induced autologous chondrocyte implantation.	118
A. Objectifs de l'article : La MACI, de l'Homme au cheval. Vers l'obtention d'un « gold standard ».	118
B. Premier article.	119
1. Abstract.	119
2. Introduction.	120
3. Results.	121
a. Loss of equine articular chondrocyte phenotype during amplification.	121
b. Combination of 3D-cell culture, hypoxia, and BMP-2 treatment allows the recovery of cartilage specific markers expression by eAC, but does not abolish the fibrotic and catabolic components.	122
c. Design of siRNA.	122
d. RNA interference targeting Col1a1 improves eAC specific phenotypic profile during the MACI process.	123
e. RNA interference targeting Htra1 can modulate the eAC catabolic process during chondrocyte redifferentiation.	123
f. RNA interference during the MACI process increases the quality of the ECM synthesized by eAC.	123
g. Chondrocyte redifferentiation mediated by BMP-2 can be modulated by both Col1a1 and Htra1 siRNAs.	124
4. Discussion.	124
5. Material and Methods.	127

a. eACs isolation and cell culture.	127
b. eACs dedifferentiation.	127
c. Cryopreservation.	128
d. 3D inclusion and hypoxia cell culture.	128
e. siRNA transfection and in silico analysis.	128
f. RNA extraction and RTqPCR analysis.	128
g. Protein extraction and Western-blot.	128
h. Statistical analysis.	129
6. Bibliography	130
7. Figure legends	134
8. Supplementary information	136
9. Figures	139
C. Conclusion de l'article.	149
Chapitre 2 : deuxième article	151
I. Major differences in the intrinsic chondrogenic potential of equine umbilical cord matrix and umbilical cord blood mesenchymal stromal stem cells: Comparison of MSC sources for the use in cartilage regeneration.	152
A. Objectifs de l'article : à la recherche de types cellulaires alternatifs pour l'ingénierie tissulaire du cartilage.	152
B. Deuxième article.	153
1. Abstract.	153
2. Introduction	154
3. Results	156
a. UCM-MSCs are characterized by high proliferation and long-term amplification potentials	156
b. IFN- stimulation induces changes in the transcriptomic profiles of UCM-MSCs and UCB-MSCs	156
c. Evaluation of the multipotency potential of neonatal MSCs	157
d. Strong expression of cartilage-specific markers after chondrogenic differentiation for UCB-MSCs, but not for UCM-MSCs	157
e. UCB-MSCs express a hyaline-like cartilage ECM under BT treatment, whereas UCM-MSCs do not	158
f. UCB-MSCs and UCM-MSCs differ not only in chondrogenic properties, but also in intrinsic characteristics	158
g. Hypoxia induces a time-dependent effect on transcript expression profile in UCM-MSCs and UCB-MSCs during chondrogenesis induction	159
h. Hypoxia decreases the amount of hyaline-cartilage ECM synthesized by UCB-MSCs	160
4. Discussion	160
5. Materials and methods.	163
a. Equine mesenchymal stem cell samples.	163
b. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood.	163
c. Isolation of equine umbilical cord mesenchymal stem cell from Wharton jelly.	164
d. Culture of equine UCM-MSCs and UCB-MSCs.	164
e. Cryopreservation of MSCs.	164
f. Evaluation of the growth rate of MSCs.	164
g. IFN-γ treatment.	164
h. Flow cytometry.	165
i. Evaluation of MSC multipotency.	165
j. Chondrogenic differentiation on a 3D scaffold.	165
k. RNA analysis.	166
l. Protein extraction and western-blot.	166
m. Histochemical analysis.	166
n. Statistical analysis.	167

o. Statistical analysis.	167
6. Bibliography	168
7. Figure legends	172
8. Supplementary information	176
9. Figures	178
C. Conclusion du deuxième article	196
Discussion et Perspectives	199
I. Rappel des enjeux et des résultats de l'étude.	200
II. De l'Homme au cheval : le modèle équin, un sujet d'étude à part entière.	201
A. Avantages et contraintes liées à la biologie des cellules équines.	201
B. Entre homologies et divergences moléculaires.	201
C. Le cheval : contexte hippique et contexte scientifique.	202
III. Le chondrocyte articulaire équin : un outil thérapeutique et de compréhension des mécanismes cellulaires du cartilage.	203
A. Les spécificités des chondrocytes articulaires équins.	203
1. Du prélèvement à la production de matériel cellulaire.	203
2. La prolifération du chondrocyte articulaire équin.	204
B. Vers un modèle d'étude du développement du cartilage et du chondrocyte sain.	205
C. La MACI et ses limites chez le modèle équin.	206
1. La stratégie de redifférenciation des CAE.	206
2. Le phénotype chondrocytaire : Le cas particulier d'Htra1.	207
3. Une persistance des limites d'application de la MACI à partir des chondrocytes.	209
4. Les limites d'application de la MACI chez le cheval.	211
IV. Les cellules souches en MACI.	211
A. Les avantages dans l'industrialisation des CSM en tant que cellules médicaments.	211
B. Le potentiel chondrogénique des sources de CSM.	212
C. Le potentiel chondrogénique des CSM-SPL.	214
D. L'hypoxie : un facteur qui influence la différenciation chondrogénique des CSM-SPL.	216
E. Les eAC, « gold standard » de la MACI, en comparaison avec les CSM-SPL.	218
V. De nouvelles stratégies thérapeutiques apportées par les CSMs en médecine régénérative.	219
A. Le traitement de la composante inflammatoire de l'arthrose et les thérapies combinées.	219
B. De l'ingénierie tissulaire à l'organogenèse.	221
1. La maîtrise des paramètres microenvironnementaux.	222
2. La chondrogenèse : un processus temporel.	222
3. Le futur de l'ingénierie tissulaire.	224
VI. L'hétérogénéité des populations de cellules souches.	226
A. La mise en évidence de l'hétérogénéité entre les populations de CSM-SPL et CSM-GW.	227
1. Des différences entre les sources de CSM.	227
2. Cellule indifférenciée, progéniteur cellulaire et cellule différenciée : de la caractérisation à la recherche de marqueurs prédictifs.	228
3. De l'hétérogénéité inter-sources à l'hétérogénéité intra-population.	229
a. L'origine de l'hétérogénéité inter-sources.	229
b. De la variabilité inter-clonale à l'hétérogénéité intra-population des CSM.	231
VII. La cellule souche mésenchymateuse : une classification pour plusieurs types de cellules.	232
A. Les populations de CSM-SPL et de CSM-GW sont-elles hétérogènes?	232
B. L'influence des paramètres d'hétérogénéité intra-population des CSM néonatales sur le potentiel chondrogénique.	233
C. L'étude de la variété des progéniteurs cellulaires au sein d'une population.	235

D. Les limites de la caractérisation des CSM : l'exemple des CSM de gelée de Wharton.	236
Bibliographie	239
Annexes	259
I. Publications.	260
II. Communications affichées.	260
III. Communications orales.	261
IV. Formations et bénévolats.	262
V. Encadrement de stage.	262



# Liste des abréviations

---

# Liste des abréviations

---

3D	3 Dimensions
aa	Acide Aminé
ACVR1A	« Activin A Receptor type I »
ADAM	« proteins with A Disintegrin And Metalloproteinase »
ADAMTs	« A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs »
ANRT	Association nationale de la recherche et de la technologie
ARNm	Acide RiboNucléique
BioTARGen	Biologie, Génétique et Thérapies ostéoArticulaires et Respiratoires
BMP	« Bone Morphogenetic Protein »
BMPR	« BMP Receptor »
C-ter	COOH-terminale
CAE	Chondrocyte Articulaire Equin
CAH	Chondrocyte Articulaire Humain
CD	« Clusters of Differentiation »
CD	« Cluster of Differentiation »
CE	Conformité Européenne
CFU-F	« Fibroblast Colony-Forming Units »
CIFRE	Convention Industrielle de Formation par la REcherche
CIRALE	Centre d'Imagerie et de Recherche sur les Affections Locomotrices Equines
COMP	« Cartilage Oligomeric Matrix Proteins »
COMP	« Cartilage Oligomeric Matrix Protein »
CS	Cellule Souche
CSF	Chondroïtine Sulfate
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
CSM	Cellule Souche Mésenchymateuse
CSM-GW	CSM de Gelée de Wharton
CSM-MO	CSM de Moelle Osseuse
CSM-SPL	CSM de Sang Placentaire
CSM-TA	CSM de Tissu Adipeu
DDR-2	« Discoidin Domain-Containing Receptor 2 »
DRO	Dérivé Réactif de l'Oxygène
DS	Dermatane Sulfate
FACIT	« Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple helix »
FDA	« Food and Drug Administration »
FGF	« Fibroblast Growth Factor »
GAG	GlycosAminoGlycane
GDF-5	« Growth/Differentiation Factor 5 »
GDF5	« Growth Differentiation Factor 5 »
GMP	« Good Manufacturing Practice »
GW	Gelée de Wharton
GW	Gelée de Wharton
HGF	« Hepatocyte Growth Factor »

Hif-1 $\alpha$	« Hypoxia-inducible factor - 1 $\alpha$ »
HRE	« Hypoxia Response Element »
HS	Héparane Sulfate
Htra1	« High-temperature requirement serine protease a1 »
IBSP	« Integrin-Binding SialoProtein »
ICM	« Incomplet Chondrogenic Medium »
ICRS	« International Cartilage Research Society »
IDO	Indoleamine-pyrrole 2,3-DiOxygenase
IFCE	Institut Français du Cheval et de l'Equitation
IFN- $\gamma$	InterFéroN- $\gamma$
IGF1	« Insulin-Like Growth Factor-1 »
IHH	« Indian HedgHog »
Il-1 $\alpha$	Interleukine 1 $\alpha$
Il-10	Interleukine 10
Il-6	Interleukine 6
iNos	« Inducible Nitric Oxide Synthases »
IRAP	« Interleukin Receptor Antagonist Protein »
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
ISCT	« International Society for Cellular Therapy »
JAK	« Janus kinases »
KGF	« Keratinocyte Growth Factor »
KS	Kéراتane Sulfate
L-Sox-5	« Long-SRY-Box 5 »
MACI	« Matrix-induced Autologous Chondrocyte Implantation »
MAPK	« Mitogen-Activated Protein Kinases »
MEC	Matrice Extra Cellulaire
MILPAT	Microenvironnement Cellulaire et Pathologies
MIPDF	Microenvironnement des Pathologies Dégénératives et Fibrotiques
miRNA	« micro RNA »
MMP	« Matrix Metalloproteinase »
MO	Moelle Osseuse
MTI	Médicaments de Thérapie Innovante
N-Cam	« Neural Cell Adhesion Molecule »
N-ter	NH2-terminale
NF- $\kappa$ B	« Nuclear Factor-Kappa B »
NG2	« Neural/Glial antigen 2 »
NK	« Natural Killers »
Notch-1	« Notch homolog 1, translocation-associated »
NSAID	« NonSteroidal Anti-Inflammatory Drugs »
OErAGen	Ossification Endochondrale et Anomalies Génétiques du développement
Pax	« PAired boX protein »
Pax	« Paired box protein »
PG	ProtéoGlycane
PGE2	ProstaGlandin E2
Pref-1	« Preadipocyte factor 1 »
PRELP	« Leucine-Rich Repeat Protein »
PTHrP	« ParaThyroid Hormone-Related Protein »
QALY	« Quality-Adjusted Life Year »

RISC	« RNA-induced Silencing Complex »
RNAi	« RiboNucleic Acid interference »
Runx2/CBF $\alpha$ 1	« Runt-related transcription factor 2 » / « Core-Binding Factor subunit alpha-1 »
SCA	« Single Cell Analysis »
SHH	« Sonic HedgeHog »
siRNA	« small interfering RNA »
SLRP	« Small Leucin Rich Protéoglycans »
Snorc	« Small novel rich in cartilage »
Sox	« SRY-Box »
SPL	Sang Placentaire
STAT	« Signal Transducers and Activators of Transcription »
T3	Triiodothyronine
TA	Tissu Adipeux
TCA	Transplantation de Chondrocytes Autologues
TGF- $\beta$ 1	« Transforming Growth factor- $\beta$ 1 »
Th	Cellules « T-helper »
TIMP	« Tissue Inhibitors of Metalloproteinases »
TNF	« Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ »
Tr	Cellules « T-regulatory »
UCN	Université de Caen Normandie
VEGF	« Vascular Endothelial Growth Factor »
VEGF	« Vascular Endothelial Growth Factor »
Wnt	« Wingless integration site »

# Liste des figures et tableaux

---

# Liste des figures et tableaux

Figure	Titre
1	Représentation schématique de la localisation du tissu cartilagineux chez l'homme et sa correspondance chez le modèle équin.
2	Coupe histologique de cartilage élastique.
3	Coupe histologique de fibrocartilage.
4	Coupe histologique de cartilage hyalin.
5	Représentation schématique des articulations des membres antérieur et postérieur du cheval.
6	Représentation schématique de la classification des diarthroses synoviales.
7	Représentation schématique de la structure d'une diarthrose ou articulation synoviale.
8	Coupe histologique longitudinale de cartilage articulaire hyalin sain.
9	Représentation schématique de la composition moléculaire et cellulaire du cartilage.
10	Photographie de microscopie électronique de chondrocyte articulaire.
11	Pourcentages de composition moléculaire et biologique du cartilage.
12	Organisation de la MEC synthétisée par le chondrocyte.
13	Représentation schématique des domaines protéiques composant les différents collagènes.
14	Représentation schématique des arrangements supramoléculaires pouvant être formés par les collagènes.
15	Composition en collagène du cartilage.
16	Deux représentations schématiques du modèle en arcade.
17	Représentation schématique de la structure moléculaire du collagène de type IIA et IIB.
18	Profil de migration électrophorétique en « Western-blot » du collagène de type II extrait à partir de cartilage articulaire humain et équin.
19	Structure supramoléculaire formée par les collagènes de types II, XI et IX.
20	Hybridation <i>in situ</i> du collagène de type II et de type X sur section histologique de tibia proximal de souris.
21	Représentation schématique de différentes structures des unités disaccharidiques des GAG.
22	Structure de liaison des GAG au corps protéique.
23	Structure de l'agrécane au sein du cartilage.
24	Structure moléculaire des SLRP.
25	Représentation schématique de coupe transversale d'un chondron.
26	Représentation schématique de l'influence des contraintes mécaniques sur le chondron.
27	Microphotographies permettant la visualisation du cil primaire du chondrocyte.
28	Photographie illustrant les contraintes sportives subies par le cheval.
29	Représentation schématique des transferts de forces au niveau de l'articulation du carpe.
30	La condensation des CSM au cours de l'initiation de la chondrogenèse.
31	Les intervenants et les différentes étapes de la chondrogenèse.
32	Représentation schématique de la boucle de régulation Ihh/PTHrP dans l'évolution de la zone hypertrophique.
33	Représentation schématique de l'ossification endochondrale.
34	Représentation schématique de la plaque de croissance.
35	La transdifférenciation du chondrocyte hypertrophique en ostéoblaste.
36	L'influence du microenvironnement sur le phénotype cellulaire.
37	Représentation schématique des membres de la superfamille du TGF- $\beta$ .
38	Représentation schématique de la signalisation cellulaire des BMP.
39	Représentation schématique des structures tétramériques des récepteurs de type I à la BMP.
40	Représentation schématique des gradients en nutriments et oxygène au sein du cartilage.
41	Représentation schématique de trois types supposés de gradients en oxygène.
42	La double fonction d'HIF-1 $\alpha$ chez le chondrocyte.
43	Représentation schématique de l'action d'HIF-1 $\alpha$ .
44	Les facteurs de risque de l'arthrose.
45	La classification des lésions chondrales par l'ICRS.
46	Les événements survenant suite à un traumatisme du cartilage et menant à la dégradation du cartilage.
47	Diagramme de l'évolution de l'arthrose.
48	L'évaluation des coûts de l'arthrose chez l'homme et le cheval.
49	Représentation schématique de l'aspect inflammatoire de l'arthrose.
50	Représentation schématique de la régulation de l'homéostasie du cartilage.
51	Etude de la transcription des gènes des protéases matricielles et de leurs inhibiteurs.
52	Implications de MMP-13 et de la voie NF- $\kappa$ B dans l'hypertrophie du chondrocyte.
53	Structure moléculaire d'Htra1.
54	Rôle d'Htra1 dans les désordres squelettiques.

Figure	Titre
55	Implication d'Htra1 dans le changement phénotypique du chondrocyte.
56	Marquage du collagène de type I sur une coupe histologique de cartilage sain (A) et de modèle d'arthrose expérimentale (B).
57	Classification et évaluation des grades d'arthrose chez le cheval.
58	La technique originale de TCA.
59	Photographie d'une membrane de ChondroGide®.
60	Représentation schématique des techniques de thérapie tissulaire et cellulaire du cartilage.
61	Les nouvelles modalités de la médecine régénérative du cartilage.
62	Le paradigme de l'IT tel qu'il est perçu à l'heure actuelle.
63	La différence de comportement cellulaire entre la culture 2D et 3D.
64	Structure macroscopique et microscopique des éponges de collagène de types VIII.
65	Une technique d'impression cellulaire en 3D.
66	L'interférence par l'ARN exercée par les siRNA.
67	Chronologie des différentes étapes de l'implantation MACI chez le cheval.
68	Les caractéristiques des cellules souches.
69	La différenciation cellulaire à partir de cellules souches.
70	Le concept de spécialisation.
71	Liste non exhaustive de marqueurs de surface utilisés pour la caractérisation des CSM.
72	La plasticité des CSM.
73	Chronologie des événements majeurs dans l'étude du caractère immunomodulateur des CSM.
74	L'immunomodulation des CSM.
75	L'effet différentiel des CSM sur les cellules immunitaires.
76	La formation de la moelle osseuse.
77	Représentation schématique des interactions opérant entre les CSM et les CSH au sein de la moelle osseuse.
78	Le phénomène d'« homing » cellulaire par les CSM.
79	L'effet trophique des CSM.
80	Les deux fonctions des CSM exploitées dans le cadre de leurs applications.
81	Nombre de maladies répertoriées par Clinicaltrials.gov faisant l'objet d'une thérapie à base de CSM.
82	Représentation schématique du principe de « hanging drop ».
83	L'implication des TGF-β et des BMP dans la chondrogenèse.
84	Représentation schématique des flux sanguins entre le fœtus et le placenta.
85	Représentation schématique de la structure du cordon ombilical.
86	Représentation schématique d'une coupe transversale de cordon ombilical.
87	Comparaison des potentiels thérapeutiques entre CSM-SPL et CSM-MO.
88	Les différentes sources de CS et leurs applications.
89	Potentiel thérapeutique en fonction du coût de l'application de différentes sources de cellules souches.
90	Représentation schématique du caryotype d' <i>Homo sapiens</i> et d' <i>Equus caballus</i> .
91	Observation microscopique de biopsies de cartilages humain et équin.
92	Prélèvement de bloc ostéochondral de condyle fémoral équin.
93	Evaluation de la prolifération des CAE sur 11 passages.
94	Exemple de système de bioréacteur oscillateur.
95	Inhibition de l'effet de la BMP-2 par le siRNA <i>Htra1</i> sur les CAE cultivés en 3D - hypoxie durant 7 jours.
96	Inhibition de l'effet de la BMP-2 au niveau des taux de transcrits par le siRNA <i>Htra1</i> sur les chondrocytes articulaires équins cultivés en 3D - hypoxie durant 7 jours.
97	Représentation schématique de l'implication d'Htra1 dans les lignages cellulaires ostéo-chondraux.
98	Estimation du coût thérapeutique de la TCA.
99	Estimation du coût thérapeutique de la TCA et de la MACI en coût par QALY.
100	Figure 100 : Photographie illustrant la mise en place d'une banque d'échantillons biologiques ou « biobanking ».
101	Expression du collagène de type IIB par les CSM-SPL différenciées en chondrocytes.
102	Expression des facteurs de transcription Runx-2 et Sox-9 au cours de la différenciation chondrogénique des CSM-SPL.
103	Représentation schématique d'un modèle de différenciation ostéochondrale à 3 lignages.
104	Représentation schématique de l'implication de l'hypoxie dans le métabolisme des cellules souches.
105	Représentation schématique de la variation de population de cellules souches en fonction du microenvironnement oxygène.
106	Représentation schématique des mécanismes d'immunomodulation dépendants de l'activité d'iNos et d'Ido.
107	Représentation schématique de trois types de bioréacteurs.
108	Représentation schématique de la notion de temps au cours de la différenciation d'une population de CSM.

Figure	Titre
109	Représentation schématique des traitements séquentiels au cours de la différenciation.
110	Graphique de la relation entre l'expression de BMPRIIB et celle de l'ARNm du collagène de type IIB au cours de la chondrogenèse.
111	Représentation schématique de l'effet paracrine.
112	Illustration schématique de la génération d'un organoïde <i>in vitro</i> .
113	Frise chronologique des différentes études concernant l'organogenèse <i>in vitro</i> .
114	Représentation sous forme de radar de la comparaison des taux moyens d'ARNm avant et après différenciation chondrogénique des CSM-GW et CSM-SPL.
115	Représentation schématique de deux exemples d'hétérogénéité inter-sources des CSM.
116	Représentation schématique de deux exemples de modèles hiérarchiques appliqués aux populations de CSH.
117	Représentation schématique des modèles hiérarchiques établis par Phinney en 2012 et Sarugaser et coll. en 2009.
118	Expression des marqueurs membranaires servant à caractériser les CSM-GW.
119	Représentation schématique de deux profils de différenciation à partir de deux populations distinctes de cellules souches.
120	Représentation schématique de deux profils chondroprogéniteurs hypothétiques.
121	Représentation schématique de la méthodologie employée pour l'élaboration de techniques de SCA.

Tableau	Titre
1	Les différents isotypes collagéniques.
2	Les métalloprotéases matricielles.
3	Les ADAMTS.
4	Les principaux facteurs impliqués dans l'arthrose.
5	Les traitements pharmacologiques utilisés pour l'arthrose humaine.
6	Essais cliniques utilisant les CSM.
7	Couverture et homologie de séquences protéiques de la BMP-2 et du TGF- $\beta$ 1 entre le cheval et l'Homme.
8	Conservation des séquences de miRNA entre l'Homme et le cheval.
9	Analyse bibliographique du potentiel chondrogénique des CSM-GW.
10	Différences majeures observées entre les CSM-SPL et les CSM-GW.

# Avant-propos

---

# Avant-propos

---

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE) délivrée par l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) et subventionnée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Ces travaux n'auraient jamais pu aboutir sans la collaboration du laboratoire de Biologie, Génétique et Thérapies Ostéoarticulaires et Respiratoires BioTARGen (anciennement laboratoire Microenvironnement Cellulaire et Pathologies - Microenvironnement des Pathologies Dégénératives et Fibrotiques (MILPAT-MIPDF)), l'entreprise VETBIOBANK et l'Université de Caen Normandie (UCN).

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif hautement spécialisé. Il est formé durant les premières phases du développement embryonnaire de l'organisme et perdure, à l'âge adulte, à l'extrémité des os longs. Son rôle est d'assurer la fonction de l'articulation par une double capacité à résister aux chocs qu'elle subit et à permettre le mouvement des pièces osseuses entre elles.

Le cartilage présente la particularité d'être non vascularisé, non innervé et alymphatique. Il est faiblement cellularisé et est composé principalement d'un type cellulaire majoritaire : le chondrocyte. Ce dernier synthétise et régule l'intégrité d'une abondante matrice extracellulaire (MEC) qui fournit au cartilage ses propriétés biomécaniques spécifiques. Néanmoins, la faible diffusion d'oxygène et de nutriments au sein de ce tissu impose au chondrocyte un microenvironnement particulier. Du fait de sa faible cellularité et face aux traumatismes qu'il peut subir, le cartilage est pourvu d'une capacité de réparation intrinsèque restreinte.

Une sur-sollicitation du cartilage aboutit à l'émergence de lésions focales et d'une réaction inflammatoire localisée. Le diagnostic des atteintes cartilagineuses de faible ampleur est difficile. Indubitablement, cette inflammation localisée va évoluer vers une inflammation généralisée de l'articulation. C'est dans ce contexte que le chondrocyte va voir son statut de différenciation évoluer vers un phénotype pathologique. Dès lors, ce chondrocyte va être incapable de réguler sa synthèse matricielle. L'homéostasie du cartilage, normalement régulée par le chondrocyte, est alors perdue. Ce tissu devenu pathologique va progressivement se dégrader, laissant place à un tissu fibrotique de mauvaise qualité, cassant et incapable d'assurer son rôle natif, on parle alors d'arthrose. Dans les stades tardifs de cette maladie, la perte du volume matriciel aboutit au contact des os entre eux au sein de l'articulation. L'os sous-chondral étant innervé, les mouvements de l'articulation provoquent alors de fortes douleurs.

Comme chez l'Homme, le cartilage articulaire du cheval est soumis à d'énormes contraintes mécaniques. Ces contraintes sont d'autant plus importantes lorsque l'on replace le cheval dans sa pratique sportive. Chez l'équidé, plus de 60% des troubles locomoteurs sont dus à l'arthrose. Les traitements actuels de l'arthrose ne sont que palliatifs : ils visent l'atténuation de la composante inflammatoire mais ne permettent en aucun cas une réparation tissulaire. Ainsi, l'arthrose équine provoque généralement un arrêt prématuré de la carrière du cheval sportif générant un important déficit financier pour la filière équine.

Ces dernières années, chez l'Homme, énormément d'espoirs ont émergé sur les thérapies basées sur la génération en laboratoire d'un substitut biologique néo-cartilagineux hyalin. Cette thérapie de médecine régénérative a été décrite pour la première fois en 1994 par l'équipe de Mats Brittberg. Ce procédé nommé « transplantation de chondrocytes autologues » (TCA) se base sur l'utilisation d'une biopsie et l'isolement de chondrocytes articulaires d'une zone non portante de l'articulation et macroscopiquement saine du cartilage. Ces chondrocytes sont amplifiés *in vitro* afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules qui seront par la suite réimplantées au sein des lésions cartilagineuses sous une membrane de périoste. Initialement définie comme une thérapie

cellulaire, la TCA a progressivement évolué vers une thérapie d'ingénierie tissulaire. Cette évolution a eu pour objectifs le perfectionnement des méthodes chirurgicales (telles que le remplacement de l'arthrotomie par l'arthroscopie), l'amélioration de l'implantation des chondrocytes (*via* le remplacement du support implantatoire par un biomatériau en trois dimensions (3D)) et le perfectionnement des méthodes de cultures cellulaires (favorisant un phénotype chondrocytaire stable).

C'est dans ce contexte que le projet ANR PROMOCART (2007-2012) a permis, en 2012, le dépôt d'un brevet par l'unité BioTARGen sur une technique de génération d'un substitut néo-cartilagineux de type hyalin à partir de chondrocytes humains. Les premiers travaux sur l'application de l'ingénierie tissulaire du cartilage ont été réalisés chez le cheval. Les résultats montrent qu'il est ainsi possible de réaliser une preuve de concept pour ces nouvelles stratégies innovantes chez ce modèle gros animal dont la biologie du cartilage est analogue au modèle humain. C'est dans cette optique que ce projet de thèse s'inscrit dans la poursuite du projet HIPPOCART 1 (FEDER, N°33535, 2012-2013) et dans le développement d'HIPPOCART 2 visant à développer une approche intégrée pour le traitement de l'ostéo-arthropathie chez le cheval. Car en effet, en plus d'un intérêt financier pour la filière équine, ces travaux menés chez l'équidé pourraient s'orienter vers des essais cliniques chez ce modèle gros animal et ainsi permettre une continuité vers des essais cliniques chez l'Homme.

Ainsi, la première partie de cette thèse est consacrée à la validation de l'obtention d'un patch de néo-cartilage à partir de chondrocytes équins sur la base du brevet déposé en 2012 en santé humaine. Ce patch de cartilage doit être de haute qualité biologique. De ce fait, il est indispensable d'évaluer la qualité de la MEC néo-formée ainsi que le statut phénotypique des chondrocytes après génération du substitut cartilagineux *in vitro*. Afin de valider ces pré-requis, l'expression des marqueurs spécifiques du cartilage hyalin sera confrontée à l'expression des marqueurs atypiques du cartilage. L'utilisation du chondrocyte dans le cadre de la thérapie autologue est considéré à l'heure actuelle comme un « gold-standard » parmi les stratégies d'ingénierie tissulaire du cartilage. C'est sur cette base que le patch de chondrocytes équins sera utilisé comme outil de comparaison pour l'utilisation de sources cellulaires alternatives pour l'ingénierie tissulaire du cartilage.

Malgré les bons retours cliniques des nouvelles générations de TCA en santé humaine et son application possible en santé équine, des limites techniques et biologiques, inhérentes au type cellulaire persistent. Dans cette optique, ces vingt dernières années, les efforts se sont tournés vers l'utilisation de sources cellulaires alternatives pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. Parmi ces sources cellulaires, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont les plus étudiées.

Parmi leurs caractéristiques biologiques, leur capacité à s'engager dans différents lignages cellulaires est largement exploitée dans le cadre thérapeutique. La faculté qu'ont les CSM à générer un tissu spécialisé, et notamment du cartilage, est l'un des principaux axes de recherche dans leur utilisation en ingénierie tissulaire du cartilage et permet ainsi de s'affranchir de l'utilisation des chondrocytes. Les CSM peuvent être isolées à partir de différents tissus ou liquides biologiques. Parmi ces sources, la moelle osseuse (MO) et le tissu adipeux (TA) sont des sources de CSM adultes chez lesquelles le potentiel chondrogénique a été le plus étudié. Néanmoins, ces CSM possèdent un potentiel de différenciation dépendant des facteurs intrinsèques (âge) et extrinsèques (environnement) liés au sujet chez lequel elles sont isolées. D'autres sources de CSM échappent en partie à l'influence de ces paramètres, il s'agit des CSM néonatales. Ces dernières peuvent être isolées à partir du cordon ombilical. Elles sont décrites dans la littérature comme ayant un potentiel de différenciation accru par rapport aux CSM adultes, une prolifération plus importante elles sont tolérées par l'organisme. De plus, leur isolement est facilité par le caractère non-invasif du prélèvement de cordon ombilical. Au sein du cordon ombilical, deux types de CSM peuvent être isolés. Il s'agit de CSM issues de Gelée de Wharton (GW) qui correspond à un tissu de soutien du cordon ombilical et de CSM issues de sang de cordon ombilical appelé aussi sang placentaire (SPL). Les CSM-GW sont originaires d'un tissu conjonctif embryonnaire entourant les artères et la veine ombilicale, elles pourraient présenter un intérêt thérapeutique et industriel car elles possèdent un énorme potentiel prolifératif. Les CSM-SPL sont, quant à elles,

présentes en suspension dans le plasma ombilical et co-localisent avec les autres types cellulaires composant le sang placentaire.

Les CSM, indépendamment de leur origine, possèdent des caractéristiques communes servant à les discriminer par rapport aux autres types cellulaires indésirables en culture cellulaire *in vitro*. Ces caractéristiques se basent sur leur capacité à adhérer au plastique, sur l'expression spécifique de marqueurs membranaires, leur prolifération, leur capacité à moduler le comportement des cellules immunitaires ainsi que leur capacité à se différencier en types cellulaires spécialisés. Afin de réaliser ce projet de thèse, ces pré-requis ont tous été étudiés avant l'utilisation des CSM pour les expérimentations.

Ces caractéristiques communes sont à nuancer avec les spécificités inhérentes à chaque sources de CSM. Les nouvelles générations de thérapies basées sur l'utilisation des CSM s'orientent vers la recherche d'une source spécifique de CSM pour une application thérapeutique spécifique. En effet, malgré leurs spécificités communes, les différents types de CSM n'ont pas le même potentiel de différenciation et/ou de prolifération. Ainsi, leur potentiel thérapeutique est à adapter à la nature du traitement désiré.

C'est dans ce contexte scientifique que la deuxième et la troisième partie de la thèse s'organisent. Dans le deuxième axe, l'objectif est de substituer l'utilisation des chondrocytes articulaires équins par les CSM néonatales issues de SPL et de GW pour la génération d'un substitut cartilagineux. C'est par l'induction de la chondrogenèse que les CSM-SPL et les CSM-GW vont ensuite s'orienter vers un phénotype chondrocytaire mature et stable. Il est essentiel de maîtriser cette chondrogenèse par un contrôle du microenvironnement cellulaire afin de stabiliser le statut de différenciation, le phénotype chondrocytaire étant étroitement lié au phénotype ostéoblastique.

Dans une démarche d'optimisation des techniques d'ingénierie tissulaire du cartilage, la finalité de ce projet aura ainsi pour but de comparer le potentiel chondrogénique de CSM-SPL et de CSM-GW dans le cadre de telles thérapies.

L'ensemble des résultats obtenus durant cette thèse a pour vocation, d'une part de mieux comprendre les processus cellulaires et moléculaires gouvernant la différenciation chondrogénique chez différents types de CSM et plus précisément le phénotype chondrocytaire mature. D'autre part, la comparaison des trois types cellulaires d'étude laisse envisager des voies d'optimisation du procédé de fabrication d'un substitut cartilagineux *in vitro*. Ces résultats ont également pour but d'approfondir les connaissances sur le cartilage équin, ce modèle n'étant pas à considérer comme unique sujet d'expérimentation mais également comme sujet d'étude. D'un point de vue plus global, ces avancées chez le modèle équin permettront d'aborder les essais cliniques chez ce modèle gros animal pour, *in fine*, envisager les essais cliniques chez l'Homme.

# Introduction

---



# **Chapitre 1. Le cartilage en tant que tissu squelettique.**

---

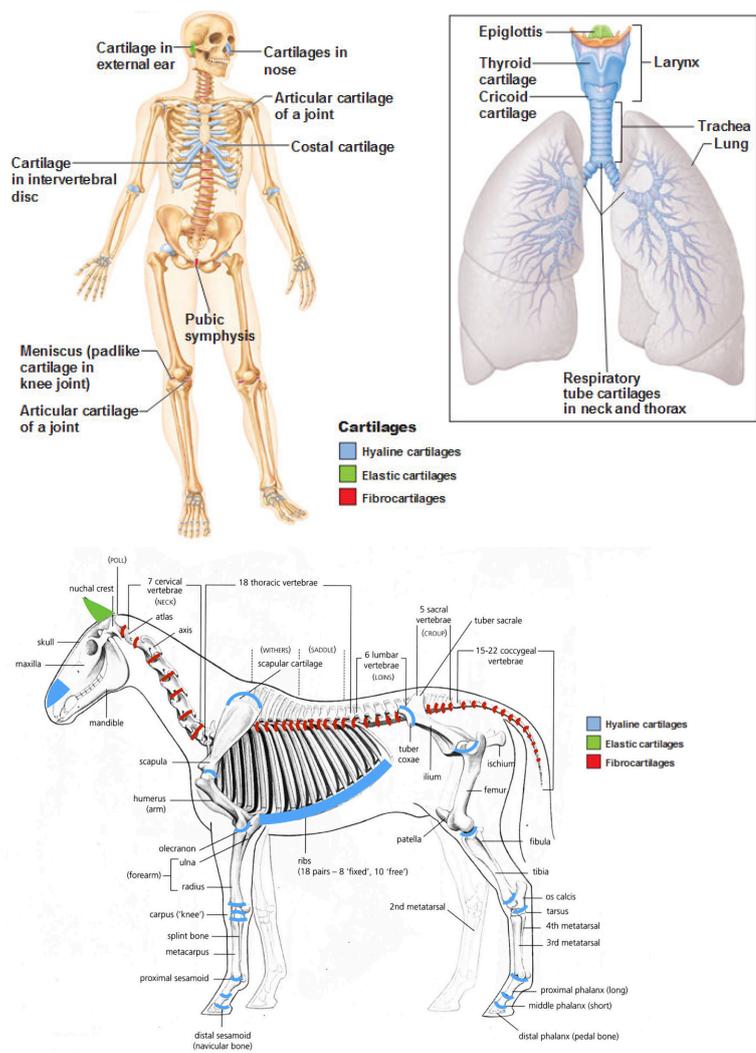
# Chapitre 1. Le cartilage en tant que tissu squelettique.

## I. Le cartilage : un tissu de soutien.

### A. Généralités sur le cartilage.

La première mention du mot cartilage a été attribuée à Aristote au IV<sup>ème</sup> siècle avant Jésus-Christ en citant sa présence au sein de l'oreille et du nez. Mais la notion de cartilage articulaire n'est apparue qu'en 175 (Benedek, 2006). Il a été décrit en premier lieu comme un tissu situé aux extrémités osseuses au sein d'une articulation et dont la principale fonction est la protection de cette dernière. C'est au XX<sup>ème</sup> siècle que la fonction du cartilage, ses caractéristiques et sa composition ont été rigoureusement étudiées et ont fait l'objet d'une forte activité de publication dans la communauté scientifique.

Le cartilage est un tissu conjonctif retrouvé chez tous les Vertébrés et l'ensemble des mammifères. Chez ces derniers, il est présent à la fois durant le stade embryonnaire comme tissu de transition et à l'âge adulte comme tissu spécialisé. Il existe différents types de cartilage mais ils répondent à des caractéristiques communes. Il s'agit d'un tissu hautement spécialisé, avasculaire à la fois résistant et élastique. Ces deux propriétés, d'apparences antinomiques, confèrent au cartilage un rôle de protection mais également des fonctions physiologiques plus complexes. Il est composé principalement d'un type cellulaire faiblement représenté au sein du tissu : le chondrocyte. Ce dernier synthétise une importante MEC de composition variable mais comportant une forte proportion de molécules de type collagéniques et de polymères glycosylés. La composition de cette MEC confère au cartilage les propriétés qui lui sont propres [Figure 1].



**Figure 1 : Représentation schématique de la localisation du tissu cartilagineux chez l'Homme et sa correspondance chez le modèle équin.**

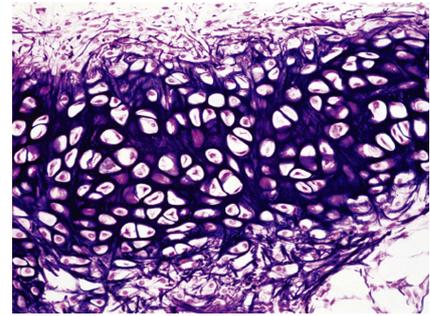
(<http://antranik.org/wp-content/uploads/2011/09/locations-of-hyaline-elastic-cartilage-and-fibrocartilages.png>).

Le cartilage est présent sous différentes formes et dont la typologie est dépendante de sa composition, de sa localisation et de sa fonction.

## B. Les différents types de cartilage.

### 1. Le cartilage élastique.

Le cartilage élastique est un tissu faiblement représenté dans l'organisme. Il est retrouvé au niveau de l'oreille externe, de la trompe auditive, dans le larynx et au niveau du nez. Comme son nom l'indique, il possède la capacité de se déformer tout en retrouvant sa conformation initiale en absence de contraintes physiques. Ces propriétés sont assurées en grande partie par la forte proportion de collagène de type II, d'élastine et de polymères de protéoglycanes (PG) [Figure 2] (Ross & Pawlina, 2011 ; Cox & Peacock, 1977).

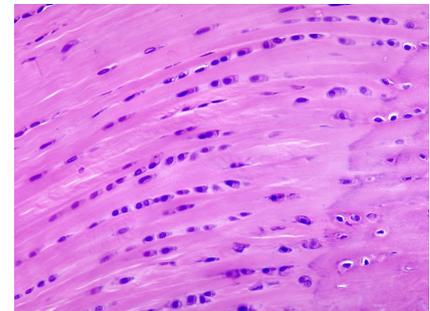


**Figure 2 : Coupe histologique de cartilage élastique.**

([http://medcell.med.yale.edu/histology/connective\\_tissue\\_lab/images/elastic\\_cartilage.jpg](http://medcell.med.yale.edu/histology/connective_tissue_lab/images/elastic_cartilage.jpg)).

### 2. Le fibrocartilage.

Le fibrocartilage est un type de cartilage extrêmement rigide et dont les propriétés élastiques sont moindres par rapport aux autres types de cartilage. Ce cartilage fibreux restreint la mobilité d'un complexe de deux tissus solides. Il se retrouve au sein des disques intervertébraux, de la symphyse pubienne, à la jonction du tendon et de l'os ainsi qu'au niveau du ménisque. Le fibrocartilage est également un tissu transitoire observé lors de la réparation osseuse suite à une fracture. Il compose le *bonus callus* (cal osseux) et représente un tissu d'accueil pour l'ossification endochondrale. Cette fonction physiologique est assurée par une forte proportion de collagène de type I qui s'organise autour d'un réseau protéique et collagénique dense [Figure 3] (Ross & Pawlina, 2011).

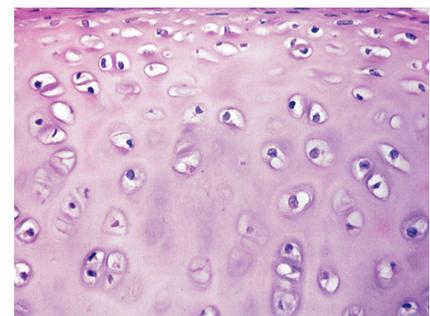


**Figure 3 : Coupe histologique de fibrocartilage.**

([http://medcell.med.yale.edu/histology/connective\\_tissue\\_lab/images/fibrocartilage.jpg](http://medcell.med.yale.edu/histology/connective_tissue_lab/images/fibrocartilage.jpg)).

### 3. Le cartilage hyalin.

D'apparence translucide, le cartilage hyalin est le cartilage majoritairement présent chez les Vertébrés. Il compose l'ensemble du squelette embryonnaire mais ne perdure qu'à des endroits spécifiques à l'âge adulte. Il est principalement localisé aux extrémités distales et proximales des os longs en lieu et place de l'articulation. Néanmoins, il est également retrouvé à l'âge adulte dans la cloison nasale, au niveau du larynx et aux extrémités ventrales des côtes. Il possède des propriétés biomécaniques uniques apportées par la prépondérance du collagène de type II et d'agrécane (polymère de PG). Il est capable d'emmagasiner une grande quantité d'eau lui conférant un fort pouvoir d'absorption de chocs [Figure 4] (Ross & Pawlina, 2011).



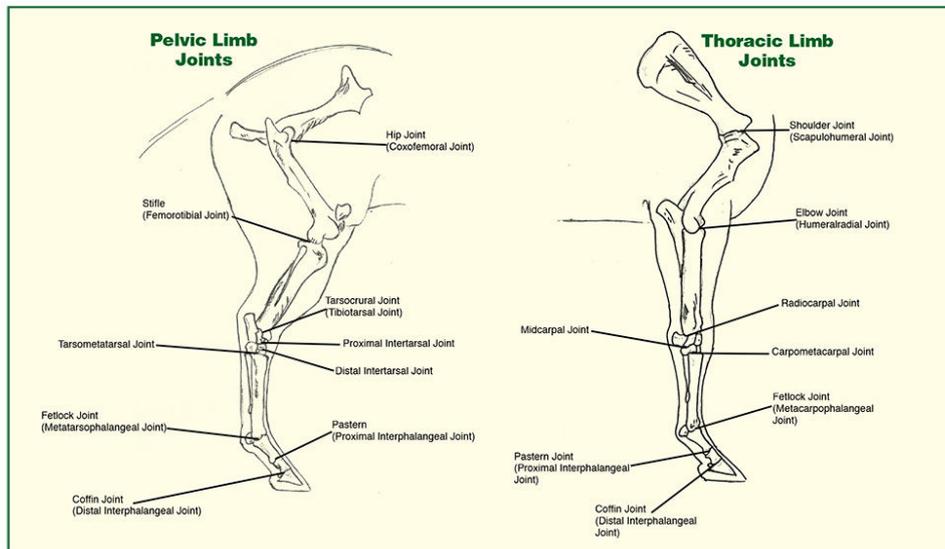
**Figure 4 : Coupe histologique de cartilage hyalin.**

[http://medcell.med.yale.edu/histology/connective\\_tissue\\_lab/images/fibrocartilage.jpg](http://medcell.med.yale.edu/histology/connective_tissue_lab/images/fibrocartilage.jpg).

Cette typographie ne peut être exhaustive concernant les différentes formes que peut prendre le cartilage. Outre le cartilage de croissance et hypertrophique (définis par la suite), pour chaque type, la composition matricielle et cellulaire varient. Cette variation est visible au cours du développement ainsi qu'au sein même du tissu sous forme de gradients cellulaires et moléculaires. Les chondrocytes sont présents sous forme hiérarchisée et la micro-architecture est hétérogène. Il en est ainsi de même concernant les propriétés biomécaniques du cartilage.

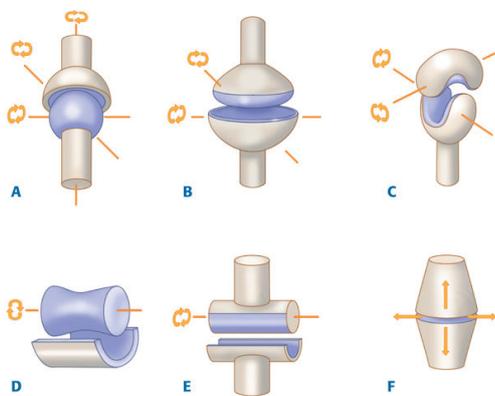
## C. L'articulation.

L'articulation peut être considérée comme un organe à part entière [Figure 5]. Parmi les différents types d'articulation, la diarthrose permet un mouvement de grande amplitude entre plusieurs pièces osseuses [Figure 6].



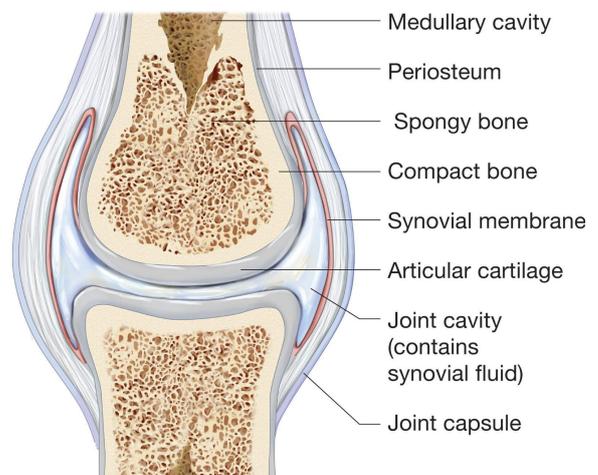
**Figure 5 : Représentation schématique des articulations des membres antérieur et postérieur du cheval.**

(Gregory, 2011. *Gregory's textbook of farriery*. Heartland Horseshoeing School).



**Figure 6 : Représentation schématique de la classification des diarthroses synoviales.**

Les diarthroses sont classifiées en fonction de leur degré de liberté : (A) articulation sphéroïde, (B) articulation ellipsoïde, (C) articulation sellaire, (D) articulation trochléenne, (E) articulation trochoïde, (F) articulation plane (<http://www.blog-elsevier-masson.fr/wp-content/uploads/2016/10/fig54big.jpg>).



**Figure 7 : Représentation schématique de la structure d'une diarthrose ou articulation synoviale.**

Une diarthrose se compose de plusieurs extrémités osseuses positionnées en apposition. Elles sont protégées au niveau des zones de contacts par le cartilage articulaire hyalin. L'ensemble est cloisonné au sein d'une capsule synoviale contenant le liquide synovial (<https://www.pdhpe.net/wp-content/uploads/2017/02/structure-of-Synovial-joints-1.jpg>).

Appelée aussi articulation synoviale, elle se compose de deux extrémités osseuses (ou plus) enfermées dans une capsule synoviale [Figure 7]. Cette capsule synoviale comprend une capsule articulaire, une membrane synoviale et le liquide synovial. Les ligaments intra-articulaires

permettent une limitation des mouvements des pièces osseuses et le maintien des surfaces articulaires de façon apposée. Le frottement des pièces osseuses entre elles est prévenu par la présence d'un cartilage hyalin présent sur les surfaces articulaires.

La diarthrose peut contenir des pièces fibrocartilagineuses afin d'assurer la congruence de l'articulation.

La fonction principale de l'articulation est de permettre un mouvement contrôlé autour d'un axe imposé par sa structure. C'est l'action des muscles qui permet le mouvement. Le contrôle de ce mouvement est quant à lui assuré par l'action combinée des différents muscles, l'agencement des tendons et ligaments ainsi que par la structure même de l'articulation. Ce contrôle articulaire est également dépendant d'un degré de liberté propre à chaque articulation. L'ensemble assure la stabilité de cette dernière.

En plus de cette fonction active, l'articulation synoviale est un organe de protection des membres, répartissant les charges corporelles, amortissant les chocs voir redistribuant ces forces subies par l'articulation telle l'action d'un ressort.

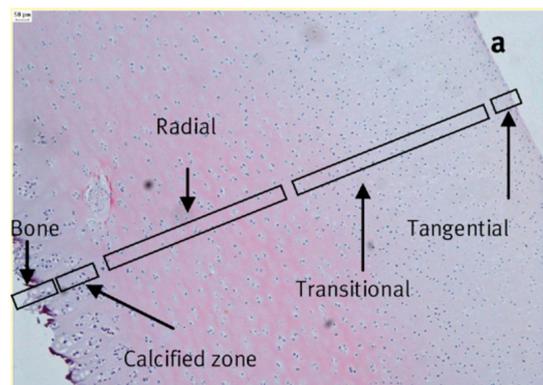
La faculté d'élasticité et de résistance de l'articulation est assurée en partie par la cavité synoviale (et le liquide synovial) mais surtout par la présence du cartilage articulaire à la surface des os.

## II. Le cartilage articulaire : un tissu conjonctif hautement spécialisé.

### A. L'organisation tissulaire du cartilage articulaire.

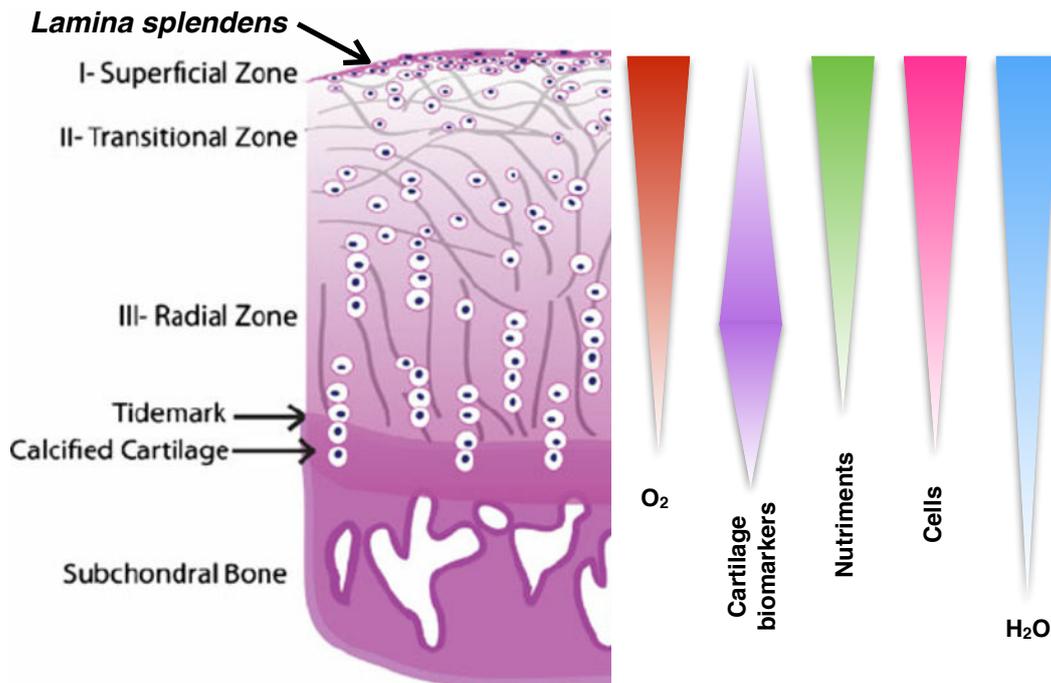
Les propriétés de lubrification, de résistance aux frottements et de répartition des charges du cartilage articulaire dépendent de son organisation tissulaire et de sa composition. Il s'agit d'un tissu faiblement cellularisé dont le principal type cellulaire est le chondrocyte. Ce dernier est ancré au sein d'une abondante MEC représentant 98% du volume tissulaire chez l'Homme (Lohmander, 1988). A la fois dense et fortement hydraté, il a la particularité d'être alymphatique, non-innervé et dépourvu de système vasculaire. Sa surface translucide, capable de faciliter les forces de friction, procure au cartilage un aspect nacré. Ainsi, le cartilage articulaire est également nommé cartilage hyalin.

Le cartilage articulaire est hétérogène et possède une composition stratifiée et orientée de façon centripète de sa surface vers l'os sous-chondral. Cette microarchitecture implique la présence de multiples gradients chimiques, structurels et moléculaires. Ainsi, le cartilage articulaire peut être défini selon plusieurs zones microscopiquement discernables [Figure 8] : la zone tangentielle, la zone transitionnelle, la zone radiale et la zone calcifiée (Kheir & Shaw, 2009). D'une zone à l'autre, la composition de la MEC et l'organisation cellulaire varient. Au sein de l'ensemble du cartilage peut être observé un gradient de concentration de PG, d'oxygène et d'eau [Figure 9].



**Figure 8 : Coupe histologique longitudinale de cartilage articulaire hyalin sain.**

Le cartilage articulaire hyalin sain est un tissu composé de différentes zones. De la surface à l'os sous-chondral, on distingue la zone tangentielle, transitionnelle, radiale et calcifiée. Coloration hématoxyline et éosine, grossissement x40 (Kheir & Shaw, 2009).



**Figure 9 : Représentation schématique de la composition moléculaire et cellulaire du cartilage.**

Le cartilage articulaire hyalin est un tissu orienté dont la composition structurale varie en fonction de sa profondeur. On y distingue plusieurs gradients chimiques et biologiques. Ainsi, il est observé une variation de la cellularité, de l'hydratation, de la teneur en oxygène, en composants macromoléculaires et en nutriments (adaptation de Gadjanski *et al.*, 2012).

## 4. Le cartilage articulaire : un tissu segmenté.

### a. La zone tangentielle.

Fortement hydratée, cette zone est également appelée couche superficielle et est en contact direct avec le liquide synovial. C'est la zone la plus soumise aux contraintes mécaniques de l'articulation. De ce fait, il s'agit également de la zone la plus exposée aux atteintes articulaires. Elle est dotée à sa surface d'une fine matrice translucide acellulaire nommée *lamina splendens*. Cette fine couche matricielle jouant le rôle de lubrifiant est composée principalement de petits PG et de courtes fibrilles de collagène. La zone tangentielle représente 10-20% du volume total du cartilage articulaire. Les chondrocytes, nombreux et discoïdes, sont organisés parallèlement à la surface. Des fibres de collagène de types II et IX y sont alignées de façon tangentielle à la limite cartilage/liquide synovial (Sophia Fox *et al.*, 2009).

### b. La zone transitionnelle.

La zone tangentielle recouvre la zone transitionnelle (ou couche moyenne). C'est la plus épaisse des différentes zones (40-60% du volume cartilagineux). Cette zone correspond à la première ligne de résistance du cartilage face aux forces de compression (Sophia Fox *et al.*, 2009). La cellularité est plus faible et la morphologie des chondrocytes est sphérique. Les chondrocytes ne sont plus individualisés mais se présentent sous forme de groupes cellulaires syngéniques.

### c. La zone radiale.

Cette zone profonde (30-40% du cartilage) est composée d'une MEC plus compacte que les couches externes. Elle est plus riche en PG et en larges fibrilles de collagène. La proportion d'eau au sein de cette couche est réduite. Il s'agit de la zone la plus résistante aux forces de compression. Les chondrocytes sont disposés sous forme de colonnes perpendiculaires à la surface du cartilage (Sophia Fox *et al.*, 2009).

### d. La zone calcifiée.

Cette zone a pour rôle de séparer le cartilage articulaire de l'os sous-chondral. Elle est composée d'une MEC rigide et dont la frontière avec la zone radiale (« Tidemark ») est bien visible en microscopie (Lane *et al.*, 1977). Cette matrice est riche en collagène de type X permettant une forte calcification de cette dernière. Les chondrocytes, rares, possèdent un cytoplasme proéminent et sont qualifiés d'hypertrophiques.

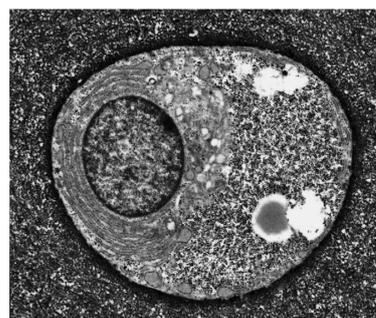
## B. La composition cellulaire et moléculaire du cartilage articulaire.

Une relation étroite existe entre la composition moléculaire de la MEC et la fonctionnalité du cartilage. C'est le chondrocyte qui synthétise et régule cette abondante MEC.

### 1. Le chondrocyte.

Le chondrocyte représente seulement 2% du volume du cartilage. Il s'agit d'une cellule généralement arrondie voir polygonale [Figure 10] (Archer & Francis-West, 2003). Elle possède un noyau proéminent et montre des caractéristiques typiques d'une cellule métaboliquement active. Cette activité métabolique est essentiellement consacrée à la synthèse d'une importante MEC dans laquelle le chondrocyte est ancré. En effet, les chondrocytes sont inclus au sein de compartiments tissulaires nommés chondroplastes. On y distingue des groupes de 2-3 cellules issues de la division d'une même cellule.

Malgré cette forte activité de synthèse, les chondrocytes sont des cellules relativement quiescentes. En plus d'évoluer dans un tissu non vascularisé, les chondrocytes tirent essentiellement leur énergie de la glycolyse dont l'apport énergétique est le glucose. L'apport en nutriments et en oxygène s'exerçant exclusivement par diffusion à partir du liquide synovial, le chondrocyte évolue au sein d'un microenvironnement « stringent ».



**Figure 10 : Photographie de microscopie électronique de chondrocyte articulaire.**

Le chondrocyte est caractérisé par une morphologie sphérique et un important appareil de Golgi et réticulum endoplasmique. Le cytoplasme du chondrocyte fait l'objet d'un important dépôt de glycogène (Archer & Francis-West, 2003).

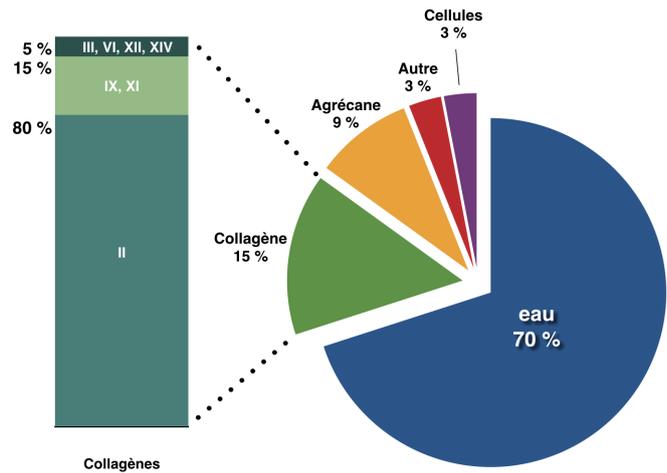
Le chondrocyte, en plus de synthétiser la MEC spécifique au cartilage, régule finement cette dernière. En effet, outre une activité anabolique fournissant les macromolécules et protéines structurales, le chondrocyte renouvelle les composants de la MEC *via* une activité catabolique contrôlée. Cet équilibre fragile qu'est l'homéostasie est régulé par une importante interaction entre le chondrocyte, sa MEC, son microenvironnement et un ensemble de protéines de signalisation que sont les facteurs de croissance et les cytokines.

### 2. La matrice extracellulaire.

L'eau est une importante composante de la MEC. Elle représente entre 60% et 80% du poids total du cartilage. Ce liquide interstitiel intervient, à plus de 90% dans la résistance de l'articulation face à la compression (Chen *et al.*, 2006). C'est la composition de la MEC qui permet une telle rétention hydrique tout en étant capable de libérer cette eau sous l'effet de l'augmentation

de la pression exercée sur le cartilage. L'eau représente également un véhicule pour l'ensemble des nutriments par leur diffusion de la surface du cartilage jusqu'au chondrocyte, diffusion pouvant être dépendante des mouvements de l'articulation. Pour assurer cette hydratation, la MEC du cartilage doit être à la fois perméable et conserver l'eau à l'image d'un gel. Ainsi, cette double spécificité est apportée principalement par deux macromolécules : le collagène de type II et l'agrécane [Figure 11].

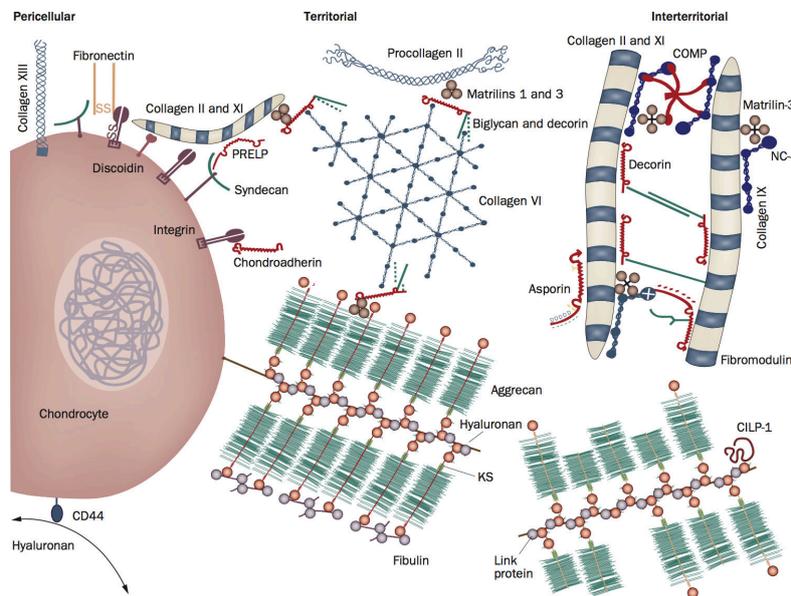
Néanmoins, comme vu précédemment, la composition et la microarchitecture de la MEC varie en fonction d'une stratification verticale en sein du cartilage. De surcroît, cette MEC possède également une hétérogénéité circonférentielle autour du chondrocyte. On distingue ainsi trois types de matrices proximales à ce chondrocyte.



**Figure 11 : Pourcentages de composition moléculaire et biologique du cartilage.**

La MEC du cartilage est fortement hydratée et principalement composée de deux marqueurs moléculaires : le collagène de type II et l'agrécane. Sa composition lui confère ses propriétés biomécaniques spécifiques (Aigner & Stöve, 2003).

- La matrice péri-cellulaire représente la plus étroite relation entre le chondrocyte et sa MEC. Elle représente l'interaction directe cellule-MEC (*via* les intégrines du chondrocyte), importante à la fois pour le phénotype chondrocytaire et pour la communication du chondrocyte avec son microenvironnement [Figure 12]. La matrice péri-cellulaire permet également la transduction des signaux mécaniques jusqu'au chondrocyte, influençant ainsi le comportement cellulaire de ce dernier. Ce phénomène est appelé mécano-



**Figure 12 : Organisation de la MEC synthétisée par le chondrocyte.**

La MEC proximale du chondrocyte peut être séparée en 3 zones en fonction de la distance de cette dernière par rapport à la cellule. En fonction de l'éloignement, on distingue la MEC péri-cellulaire, la MEC territoriale et la MEC inter-territoriale. Leur composition moléculaire, leur microarchitecture ainsi que leur fonction varie d'une zone à l'autre. CILP-1 : « cartilage intermediate layer protein 1 » ; COMP : « cartilage oligomeric matrix protein » ; CS : « chondroïtin-sulfate » ; KS : « keratan-sulfate » ; PRELP : « proline-arginine-rich and leucine-rich repeat protein » (Heinegård & Saxne, 2011).

transduction (Guilak *et al.*, 2006). Cette matrice est principalement composée de collagène de type VI, d'acide hyaluronique, de courtes fibrilles de collagène de type IX (Poole 1997) et de petits PG (biglycane, décorine, fibromoduline et fibronectine). La matrice péricellulaire joue également un rôle d'interface entre le chondrocyte et la matrice territoriale.

- La matrice territoriale facilite l'ancrage des chondrocytes à la MEC. Elle englobe une cellule ou des groupes isogéniques de cellules formant ainsi des complexes cellulaires au sein même de cette MEC. Elle a un rôle de médiateur entre la matrice inter-territoriale et la matrice péricellulaire permettant indirectement au chondrocyte d'interagir avec l'ensemble de la MEC. Elle est concentrée en agrécane, en chondroïtine-sulfate et est formée de larges et denses fibrilles de collagène de type II (Poole, 1997).

- La matrice inter-territoriale comble les espaces interstitiels présents entre les groupes de chondrocytes. Elle est riche en PG de type kératane-sulfate et comprend les plus importantes fibrilles de collagène de types II et IX (Poole, 1997 ; Heinegård & Saxne, 2011). D'autres molécules non collagéniques permettent l'organisation du réseau protéique comme la « Cartilage Oligomeric Matrix Protein » (COMP), la décorine, la matriline-3 et la fibromoduline.

### a. Les collagènes.

Les collagènes forment le groupe de protéines le plus abondant chez les mammifères et composent la grande majorité de la MEC des tissus conjonctifs. Le cartilage n'échappe pas à cette règle, à la différence près que certains types de collagènes retrouvés au sein du cartilage sont hautement spécifiques de ce tissu.

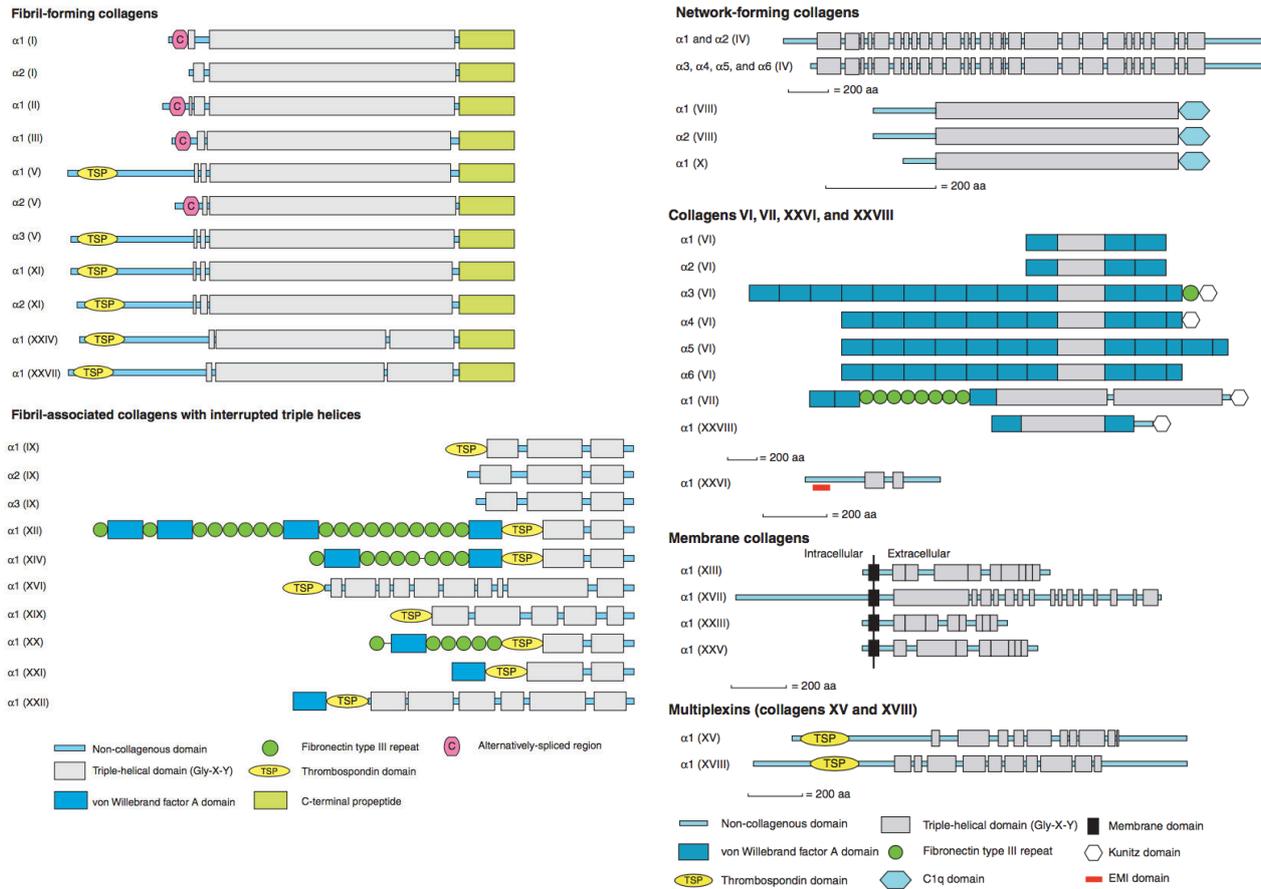
Les chaînes protéiques des collagènes (chaînes  $\alpha$ ) se caractérisent généralement par leur prédisposition à former des polymères fibrillaires pour constituer des supramolécules fournissant une résistance élastique et une stabilité structurelle aux tissus. Au niveau tissulaire, ces collagènes forment un réseau complexe servant de matrice de base à la MEC. Cette capacité à s'agglomérer est apportée par la répétition de motifs protéiques (Glycine-X-Y)<sub>n</sub> où X et Y représentent respectivement et en grande majorité la proline et la 4-hydroxyproline/5-hydroxylysine. Cette allitération de séquences d'acides aminés permet la mise en place d'une structure protéique quaternaire trimérique appelé tropocollagène (combinaison de 3 chaînes  $\alpha$ ). La stabilité du tropocollagène est assurée par des liaisons hydrogènes entre les glycines et les hydroxyprolines (Gelse *et al.*, 2003).

Type	Class	Composition	Distribution
I	Fibrillar	$\alpha 1[I]_2\alpha 2[I]$	Abundant and widespread: Dermis, bone, tendon, ligament
II	Fibrillar	$\alpha 1[II]_3$	Cartilage, Vitreous
III	Fibrillar	$\alpha 1[III]_3$	Skin, Blood Vessels, Intestine
IV	Network	$\alpha 1[IV]_2\alpha 2[IV]$ $\alpha 3[IV]\alpha 4[IV]\alpha 5[IV]$ $\alpha 5[IV]_2\alpha 6[IV]$	Basement membranes
V	Fibrillar	$\alpha 1[V]_3$ $\alpha 1[V]_2\alpha 2[V]$	Widespread: Bone, dermis, cornea, placenta
VI	Network	$\alpha 1[V]\alpha 2[V]\alpha 3[V]$ $\alpha 1[VI]\alpha 2[VI]$ $\alpha 3[VI]^*$	Widespread: Bone, dermis, cornea, cartilage
VII	Anchoring fibrils	$\alpha 1[V]\alpha 2[V]\alpha 4[VI]$ $\alpha 1[VII]_2\alpha 2[VII]$	Dermis, Bladder
VIII	Network	$\alpha 1[VIII]_3$ $\alpha 2[VIII]_3$ $\alpha 1[VIII]_2\alpha 2[VIII]$	Widespread: Dermis, brain, heart, kidney
IX	FACIT	$\alpha 1[IX]\alpha 2[IX]\alpha 3[IX]$	Cartilage, Cornea, Vitreous
X	Network	$\alpha 1[X]_3$	Cartilage
XI	Fibrillar	$\alpha 1[XI]\alpha 2[XI]\alpha 3[XI]$	Cartilage, Intervertebral disc
XII	FACIT	$\alpha 1[XII]_3$	Dermis, Tendon
XIII	MACIT	-	Endothelial cells, Dermis, Eye, Heart
XIV	FACIT	$\alpha 1[XIV]_3$	Widespread: Bone, dermis, cartilage
XV	MULTIPLEXIN	-	Capillaries, Testis, Kidney, Heart
XVI	FACIT	-	Dermis, Kidney
XVII	MACIT	$\alpha 1[XVII]_3$	Hemidesmosomes in epithelia
XVIII	MULTIPLEXIN	-	Basement membrane, Liver
XIX	FACIT	-	Basement membrane
XX	FACIT	-	Cornea (chick)
XXI	FACIT	-	Stomach, Kidney
XXII	FACIT	-	Tissue junctions
XXIII	MACIT	-	Heart, Retina
XXIV	Fibrillar	-	Bone, Cornea
XXV	MACIT	-	Brain, Heart, Testis
XXVI	FACIT	-	Testis, ovary
XXVII	Fibrillar	-	Cartilage
XXVIII	-	-	Dermis, Sciatic nerve

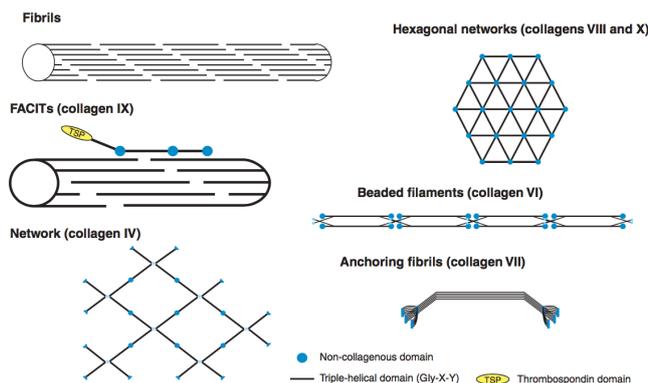
**Tableau 1 : Les différents isotypes collagéniques.**

Les collagènes sont regroupés par classes en fonction de leur prédisposition à former différentes structures quaternaires et notamment leur capacité à former des fibrilles. Les collagènes sont retrouvés dans une grande variété de tissus de l'organisme. FACIT : « fibril associated collagen with interrupted triple helices » ; MACIT : « membrane associated collagens with interrupted triple helices » (Jain *et al.*, 2014).

La famille des collagènes se compose de 28 types qui sont classifiés en fonction de la structure et des propriétés des collagènes. Chaque isotype possède sa propre distribution au sein de l'organisme. La diversité des collagènes est assurée par la présence d'un grand nombre de gènes codants les chaînes  $\alpha$ , les modifications post-traductionnelles de ces dernières et de leur arrangement supramoléculaire en triples hélices [Tableau 1]. Néanmoins, la classification est essentiellement basée sur la faculté de chaque type à former des triples hélices continues, interrompues ou partielles. Ainsi, deux grandes familles sont représentées : les collagènes fibrillaires et non fibrillaires. Les collagènes fibrillaires, au sein de la MEC, permettent la structuration du réseau matriciel tandis que les collagènes non-fibrillaires, s'associant aux fibrillaires, servent d'ancrage protéique ou cellulaire à cette MEC ainsi qu'à sa modulation fonctionnelle [Figures 13 et 14] (Ricard-Blum, 2011).



**Figure 13 : Représentation schématique des domaines protéiques composant les différents collagènes.** Les différents collagènes sont tous constitués de domaines hélicoïdaux formés d'une triple hélice. Pour autant, ils diffèrent par leur structure supramoléculaire, leur composition et leur fonction (Ricard-Blum, 2011).



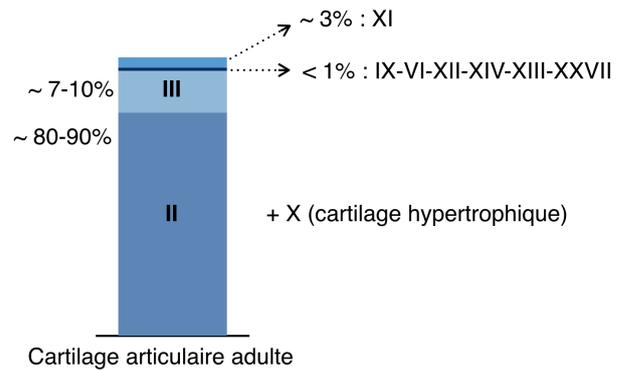
**Figure 14 : Représentation schématique des arrangements supramoléculaires pouvant être formés par les collagènes.** (Ricard-Blum, 2011).

Dans le cartilage articulaire, on distingue 10 isotypes collagéniques dont certains sont exclusivement présents dans ce tissu comme les collagènes de types II et X [Figure 15] (Eyre *et al.*, 2006 ; Plumb *et al.*, 2011). Néanmoins, le collagène de type II est le collagène spécifique et primordial au cartilage articulaire sain.

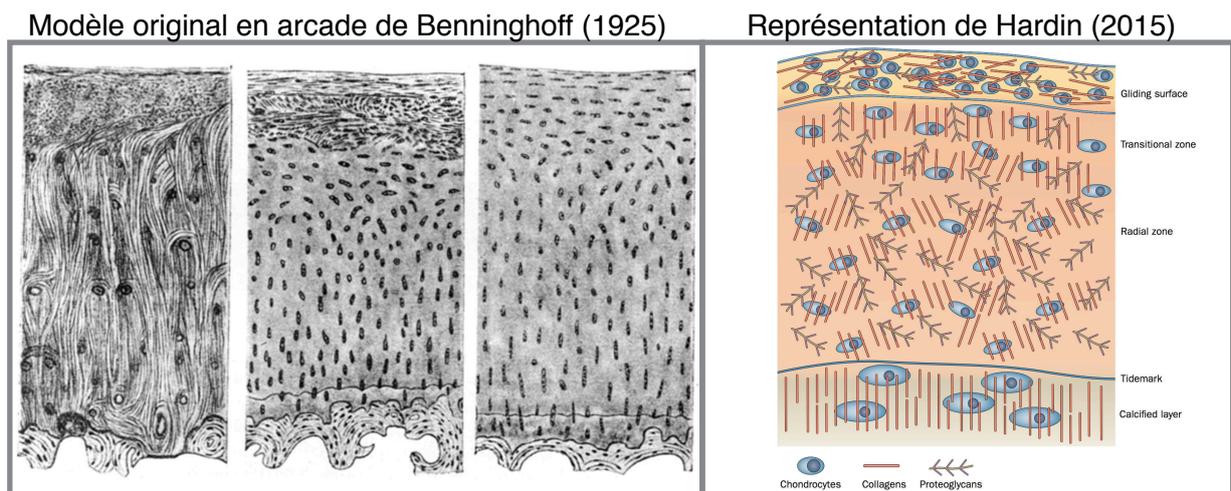
La complexe association de ces collagènes apporte à la fois les propriétés biologiques du cartilage mais également son hétérogénéité. Au niveau ultrastructural, la disposition des fibrilles de collagènes répond à une organisation précise. L'orientation, la densité et la micro-architecture du réseau fibrillaire est en étroite relation avec la typographie du cartilage décrite précédemment. Alfred Benninghoff décrivit un concept d'organisation des fibres de collagènes au sein du cartilage. Ce concept est appelé « modèle en arcade » en référence aux fibres de collagène organisées tangentiellement à la surface du cartilage et verticalement en profondeur du cartilage, à l'image d'une arcade architecturale [Figure 16] (Benninghoff, 1925). Ce concept, datant pourtant de 1925, est toujours d'actualité (Hardin *et al.*, 2015).

#### i. Le collagène de type II.

Le collagène de type II représente 80% des collagènes et 40% des protéines totales du cartilage. Il apporte une capacité de déformation au cartilage et est capable de résister aux forces compressives mais également aux forces de cisaillement. Il est indispensable à la fonction du cartilage. Malgré le fait que le collagène de type II soit également exprimé dans l'humeur vitrée de l'oeil, divers types cellulaires au cours du développement et les CSM (Sandell *et al.*, 1994), son



**Figure 15 : Composition en collagène du cartilage.** Proportion approximative en pourcentage des différents isotypes collagéniques au sein de la MEC du cartilage articulaire adulte (Aigner et Stöve, 2003, Eyre *et al.*, 2006, Plumb *et al.*, 2011).



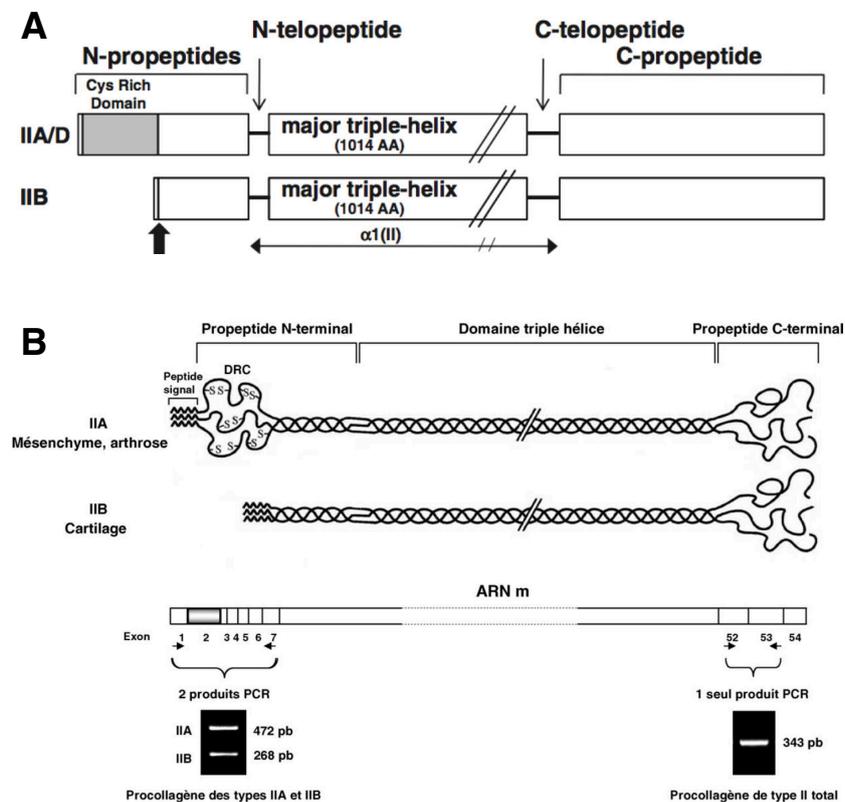
**Figure 16 : Deux représentations schématiques du modèle en arcade.**

Le modèle en arcade décrit par Benninghoff fait référence à la structure architecturale des arcades d'un bâtiment. Ce modèle vise à expliquer l'orientation des fibres de collagène au sein du cartilage en fonction de la profondeur dans le tissu. L'orientation de ces fibres est parallèle à la surface du cartilage en zone superficielle pour devenir verticale en profondeur. Elle est en relation avec la disposition des chondrocytes au sein du cartilage (Benninghoff, 1925 et Hardin *et al.*, 2015).

importance est telle au sein du cartilage qu'il est considéré comme biomarqueur phénotypique (Miller & Matukas, 1969 ; Galéra *et al.*, 1992).

Il s'agit d'un homotrimère de chaînes  $\alpha 1(\text{II})$  codées par le gène *COL2A1*. Du fait de sa glycosylation et de son importante hydroxylation, les fibrilles de collagène de type II possèdent une plus importante capacité d'élongation et de déformation que ses analogues, les collagènes de types I et III. Le collagène de type II est principalement retrouvé sous deux formes au sein de l'organisme, la forme IIA et la forme IIB. D'autres isoformes, IIC et IID, sont retrouvées de façon mineure (McAlinden *et al.*, 2008). L'Acide Ribonucléique messager (ARNm) IIC inclut 34 nucléotides de l'exon 2 et ne semble pas traduit. Quant à l'ARNm IID, il comporte la totalité de l'exon 2 ainsi que 3 nucléotides supplémentaires, ce qui lui confère 1 acide aminé surnuméraire par rapport à l'isoforme IIA, avec qui il est co-exprimé lors de la chondrogenèse des CSM humaines *in vitro*.

La forme IIB du collagène de type II est issue de l'épissage alternatif de l'acide ribonucléique messager (ARNm) *Col2a1*. A la différence de la forme IIA, la forme IIB est synthétisée à partir d'un ARNm *Col2a1* (53 exons) délété de l'exon 2. Cet exon codant pour un domaine protéique de 69 acides aminés (aa) riche en cystéine du pro-peptide amino-terminal, la forme IIB est donc plus courte que son analogue [Figure 17].



**Figure 17 : Représentation schématique de la structure moléculaire du collagène de type IIA et IIB.**

(A) Le collagène de type IIB est issu de l'épissage alternatif de l'ARNm *Col2a1* codant pour la forme IIA/D. L'ARNm codant la forme IIB est dépourvu de l'exon 2 codant pour une partie du propeptide N-terminal de la molécule. (B) La détection des isoformes IIA et IIB par RT-PCR permet d'évaluer leur proportion au sein du cartilage et de déterminer la qualité biologique de ce dernier (Salentey *et al.*, 2009 et Aubert-Foucher *et al.*, 2014).

Au cours du développement, la forme IIA du collagène de type II est essentiellement exprimée par les progéniteurs chondrocytaires. Cette forme IIA pourrait avoir un rôle de réservoir

de facteurs de croissance au cours de la différenciation chondrocytaire du fait de la présence des 69 aa codés par l'exon 2 (Zhu *et al.*, 1999).

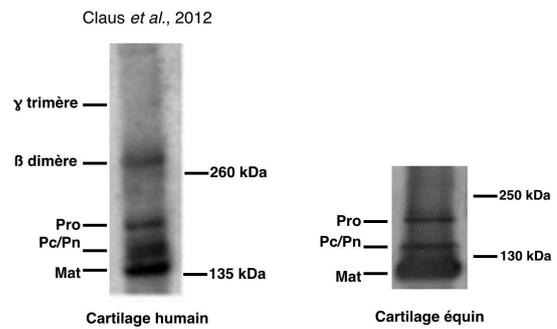
La forme IIB, quant à elle, est exprimée exclusivement chez le chondrocyte mature. Ainsi, il représente un biomarqueur spécifique de ce phénotype et témoigne de la qualité du cartilage hyalin. Le passage de la forme IIA à la forme IIB est utilisé comme indicateur de la chondrogenèse.

Le collagène de type II fait l'objet d'une maturation post-traductionnelle. A l'état de procollagène, il comporte, à ses extrémités COOH-terminale (C-ter) et NH<sub>2</sub>-terminale (N-ter), des propeptides pouvant être clivés et permettant la maturation du collagène de type II. Les trois composantes, propeptides C-ter et N-ter, ainsi que la forme mature du collagène de type II, ont chacune un rôle biologique au niveau matriciel et notamment dans la formation des fibrilles de collagène (Gelse *et al.*, 2003 ; Sandell *et al.*, 2014) [Figure 18].

ii. Les collagènes de types IX, XI et les fibrilles hétérotypiques.

Les fibres de collagène du cartilage correspondent à un agencement de fibrilles hétérotypiques composées de collagènes de types II, IX et XI.

Le collagène de type IX, de la sous famille des « fibril associated collagen with interrupted triple helix » (FACIT), est capable de se lier de façon covalente à la surface des tropocollagènes

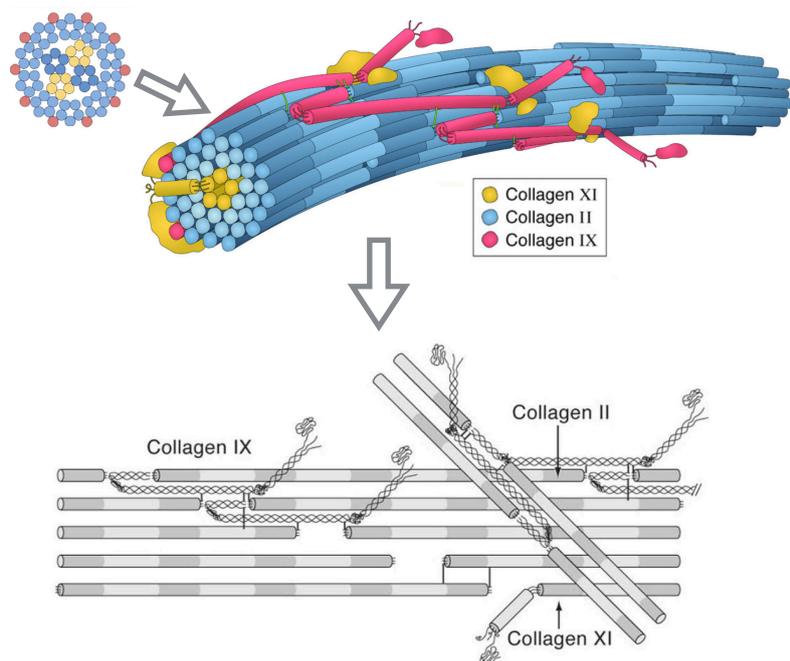


**Figure 18 : Profil de migration électrophorétique en « Western-blot » du collagène de type II extrait à partir de cartilage articulaire humain et équin.**

Le collagène de type II subit des modifications post-traductionnelles pour atteindre sa forme mature. Ces modifications se traduisent par le clivage des télopeptides C-terminal et N-terminal. Pro : procollagène de type II ; Pc : Procollagène de type II dépourvu du télopeptide C-terminal ; Pn : Procollagène de type II dépourvu du télopeptide N-terminal ; Mat : Collagène de type II mature ;  $\beta$  dimère : cross-link de deux molécules de collagène de type II ;  $\gamma$  trimère : cross-link de trois molécules de collagène de type II (Claus *et al.*, 2012).

**Figure 19 : Structure supramoléculaire formée par les collagènes de types II, XI et IX.**

L'organisation du réseau de collagène de type II du cartilage dépend de l'interaction étroite entre ce dernier et les collagènes de types XI et IX. Cette interaction régule la microarchitecture du réseau collagénique, sa mise en place et sa maturation (Eyre, 2004, Kadler *et al.*, 2008 et Eyre *et al.*, 2008).

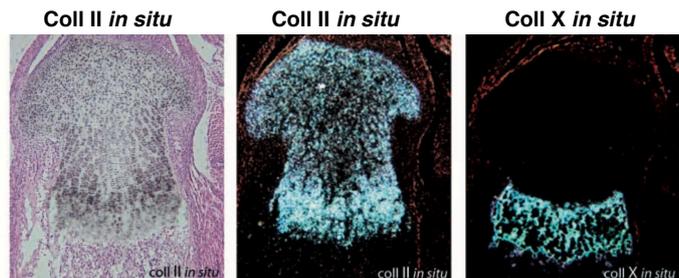


de type II. Il participe à l'organisation du réseau collagénique en liant deux fibrilles de collagène entre elles.

Le collagène fibrillaire de type XI est quant à lui situé à l'intérieur des fibrilles de collagène de type II. Il joue un rôle dans l'enroulement de la fibrille dite hétérotypique et D-périodique. En se liant de façon covalente au collagène de type IX, il forme une gaine protéique autour du collagène de type II. Ce complexe assemblage est un outil de stabilisation et de régulation de la MEC. Les interactions entre ces trois collagènes permettent à la fois l'organisation de la MEC collagénique, sa mise en place et son remodelage (Kadler *et al.*, 2008 ; Eyre, 2004) [Figure 19].

### iii. Le collagène de type X.

Le collagène de type X est un collagène fibrillaire homotrimérique. Il est composé de 3 chaînes courtes  $\alpha 1(X)$  codées par *Col10a1*. Il correspond à un marqueur spécifique du cartilage articulaire et plus précisément de la zone hypertrophique calcifiée. Il est exprimé par les chondrocytes hypertrophiques. Il a un rôle prépondérant au cours de la croissance et au cours du développement embryonnaire (Magee *et al.*, 2005). Il représente 18% des collagènes de la plaque épiphysaire (plaque de croissance). Son rôle est de permettre la minéralisation de la matrice cartilagineuse à partir d'un dépôt de vésicules matricielles contenant des minéraux et de la phosphatase alcaline. De par sa structure, le collagène de type X permet le dépôt des vésicules matricielles par son interaction avec l'annexine V située à la surface membranaire de ces dernières (Shen, 2005). Beaucoup de suppositions ont été faites concernant le rôle du collagène de type X dans l'ossification endochondrale. Néanmoins, même s'il est omniprésent dans ce phénomène biologique, sa fonction précise et son implication n'ont pas été clairement identifiées (Mackie *et al.*, 2008) [Figure 20].



**Figure 20 : Hybridation *in situ* du collagène de type II et de type X sur section histologique de tibia proximal de souris.**

Le collagène de type X est localisé au niveau de la plaque de croissance et dans le cartilage hypertrophique. Il représente ainsi un marqueur du chondrocyte hypertrophique (Pfander *et al.*, 2004).

### iv. Les autres collagènes du cartilage.

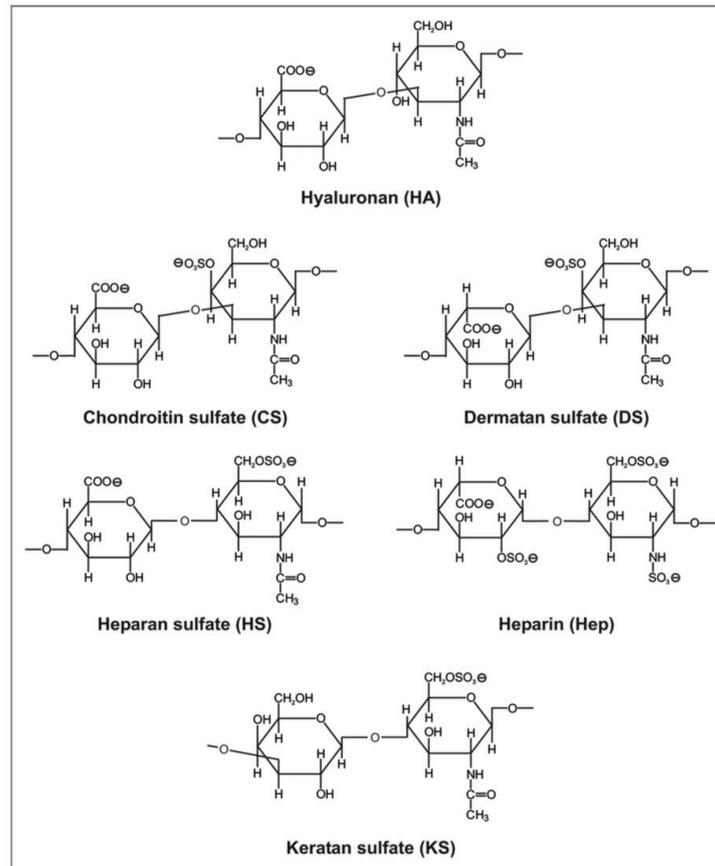
D'autres types de collagènes sont retrouvés dans le cartilage articulaire. Ils représentent une proportion mineure et pour la plupart leur fonction précise au sein du tissu n'est que peu décrite dans la littérature.

Le collagène de type VI est un collagène microfibrillaire très important dans la composition et la fonctionnalité de la MEC péricellulaire du chondrocyte. Capable de s'associer à un grand nombre de protéines matricielles et aux intégrines membranaires du chondrocyte, il joue un rôle de senseur pour la transduction des signaux biologiques et mécaniques au chondrocyte (Guilak *et al.*, 2006). D'autres collagènes comme les isotypes III, XII, XIV et XVI composent la MEC du cartilage (Aigner & Stöve, 2003). Plus récemment, un nouveau membre de la famille des collagènes, le collagène de type XXVII, a été décrit comme jouant un rôle dans l'organisation et le développement de la plaque épiphysaire (Plumb *et al.*, 2011).

### b. Les protéoglycanes.

Tandis que le réseau de collagène assure la structuration de la MEC et son élasticité, les PG, quant à eux, assurent une capacité de rétention hydrique, permettent un maillage de la MEC et participent à la régulation de cette dernière. Au sein du cartilage, les PG représentent un composant non collagénique majeur. Les PG correspondent à un assemblage de chaînes

polysaccharidiques et d'une protéine appelée corps protéique. Les chaînes polysaccharidiques sont formées d'une succession d'unités dissaccharidiques non ramifiées, de nature et de taille variable : il s'agit de glycosaminoglycanes (GAG). Les PG sont présents en abondance dans tout l'organisme et tout particulièrement dans le cartilage.

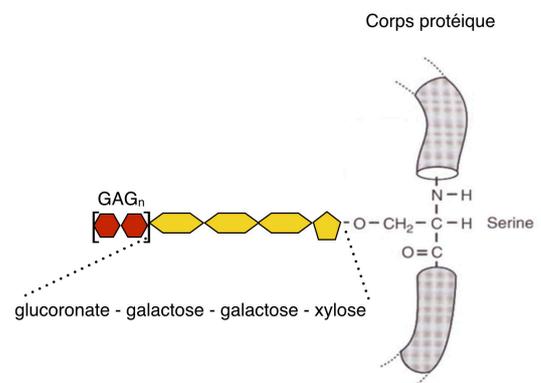


**Figure 21 : Représentation schématique de différentes structures des unités dissaccharidiques des GAG.**

(Schiller & Huster, 2012).

**Figure 22 : Structure de liaison des GAG au corps protéique.**

Les GAG sont généralement liés de façon covalente au corps protéique par une unité tétrasaccharidique sur une sérine. (adaptation de <https://classconnection.s3.amazonaws.com/694/flashcards/597694/png/proteoglycan1310928304019.png>)

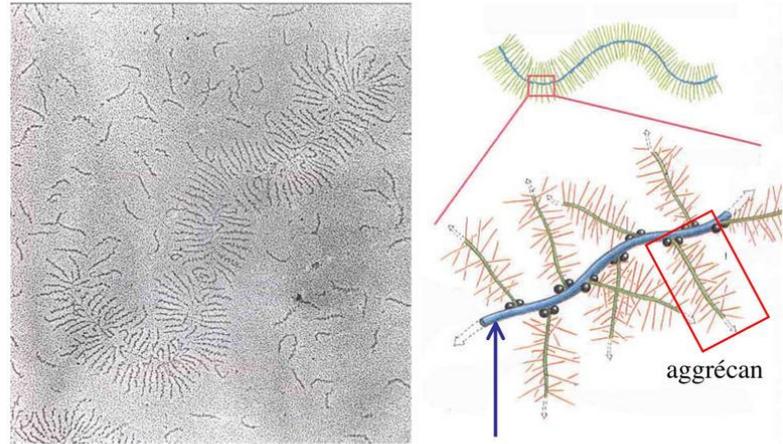


Les PG sont caractérisés par la nature de leur corps protéique ainsi que la nature et la taille des GAG qui les composent. Les unités dissaccharidiques des GAG se composent d'hexosamines (N-acétylglucosamine/N-acétylgalactosamine) et généralement d'un acide uronique (glucuronique ou iduronique). Ces GAG ont la particularité de pouvoir fixer des résidus sulfate et procurent à cette molécule une importante charge négative pouvant ainsi interagir avec des molécules positives (protéines et cations) et fixer de grandes quantités d'H<sub>2</sub>O. En fonction de la combinaison

des deux saccharides, ces GAG peuvent être du type chondroïtine-sulfate (CSF), dermatane-sulfate (DS), héparane-sulfate (HS) ou encore kératane-sulfate (KS) [Figure 21]. Les chaînes de GAG sont généralement liées de façon covalente au corps protéique. Cette liaison est réalisée au travers d'une succession tétrasaccharidique sur un résidu sérine du corps protéique [Figure 22].

i. L'agrécan.

L'agrécan est le PG primordial du cartilage articulaire. Il est, en effet, spécifique de ce tissu et est considéré comme l'un des marqueurs du cartilage au même titre que le collagène de type II (Kiani *et al.*, 2002). C'est un PG de la classe des CSF dont le corps protéique est codé par le gène *Acan*. Il représente 90% des PG du cartilage et fournit au cartilage son caractère visco-élastique de par son hydratation.



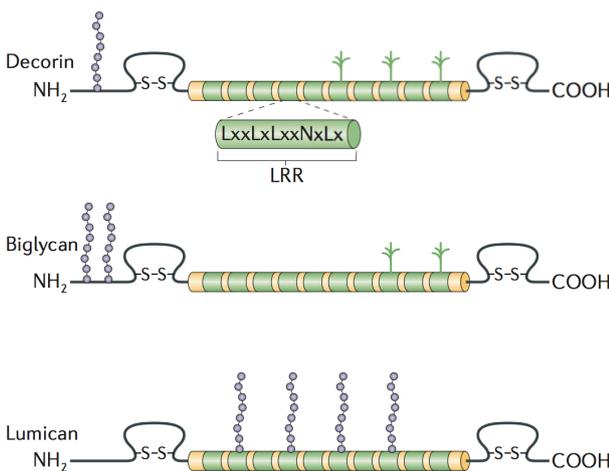
acide hyaluronique

Il s'agit d'un PG de très haut poids moléculaire composé d'un corps protéique sur lequel se greffe une centaine de longues chaînes de KS et de CSF. L'agrécan est capable, *via* son extrémité N-ter, de se lier à une « link-protein » le fixant de façon

**Figure 23 : Structure de l'agrécan au sein du cartilage.**

Les agrégats d'agrécan se composent de centaines de chaînes d'agrécan reliées à une molécule d'acide hyaluronique *via* des protéines de liaison (Alberts, 2002 Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science).

non covalente à une molécule d'acide hyaluronique. Ainsi, des centaines d'agrécanes sont capables de se lier à l'acide hyaluronique et former l'un des plus grands complexes macromoléculaires de l'organisme pouvant atteindre 200 000 kDa (Mörgelin *et al.*, 1988 ; Lohmander, 1988) [Figure 23]. Les longues chaînes de GAG font de l'agrécan une molécule sensible à l'action des glucosidases. Suite à l'action stochastique de ces protéines de dégradation, chaque molécule d'agrécan diffère l'une de l'autre.



ii. Les « Small Leucin Rich Proteoglycans ».

**Figure 24 : Structure moléculaire des SLRP.**

Les SLRP possèdent une structure commune caractérisée par une importante répétition d'acides aminés (généralement des leucines). Ils participent à la formation de la MEC du cartilage et à sa fonction biologique. LRR : « leucine-rich repeats » (Mouw *et al.*, 2014).

D'autres PG minoritaires détiennent un rôle majeur dans le cartilage. C'est le cas des « small leucin rich protéoglycans » (SLRP). Les SLRP ont pour caractéristique commune un corps protéique pourvu de séquences répétées d'acides aminés dont la plupart sont des leucines. Cette séquence répétée est flanquée aux extrémités N-ter et C-ter par des « clusters » de quatre et deux cystéines respectivement (Schaefer & Iozzo, 2008) [Figure 24]. Les clusters de cystéines forment alors des ponts disulfures sur le corps protéique. Les SLRP les plus communs retrouvés au sein du cartilage sont la décorine, la fibromoduline, le « leucine-rich repeat protein » (PRELP), le

biglycane et la chondroadhérine (Heinegård, 2009). Les SLRP sont capables de se fixer aux molécules de collagène et participent à la formation des fibrilles collagéniques (Heinegård, 2009). Une autre fonction des SLRP est d'organiser la MEC par l'agencement des fibres de collagène. Ainsi, le biglycane et la décorine se lient au collagène péricellulaire de type VI pour favoriser son organisation en réseau (Wiberg *et al.*, 2001). La fibromonuline est quant à elle capable d'interagir avec des facteurs de croissance comme le « fibroblast growth factor-2 » (FGF-2) (Heinegård, 2009).

### iii. Les autres types de protéoglycanes.

D'autres protéoglycanes sont présents dans le cartilage. Au niveau de la *lamina splendens* est retrouvée la lubricine ou protéoglycane 4. Ce protéoglycane est capable d'assurer une lubrification au niveau de la surface articulaire pour minimiser les forces de frottement (Coles *et al.*, 2010). Au niveau de la membrane plasmique du chondrocyte est retrouvée une variété de protéoglycanes transmembranaires ayant pour rôle la transduction du signal issu de son microenvironnement proximal vers le compartiment intra-cellulaire. On peut notamment citer certains récepteurs membranaires comme le « Clusters of Differentiation » CD-44 (récepteur de l'acide hyaluronique), le « neural/glial antigen 2 » (NG2) ou d'autres PG-HS capables de réguler l'activité de facteurs de croissance comme le syndécane, ou le bétaglycane (Hardingham & Fosang, 1992).

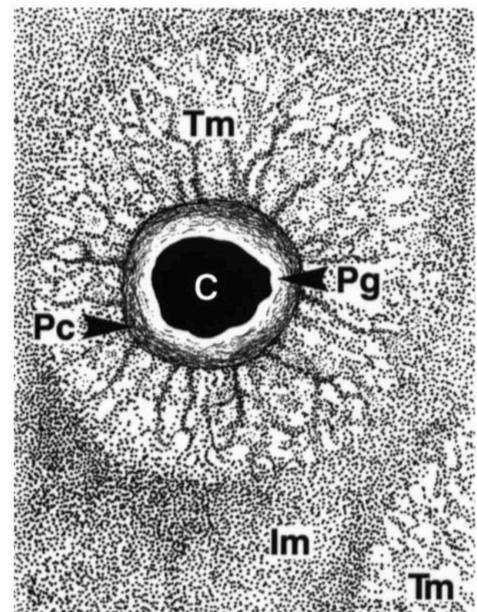
### c. Les protéines non collagéniques.

D'autres protéines n'appartenant ni à la famille des collagènes, ni au groupe des PG ont une grande importance dans la structuration et la fonctionnalité de la MEC. Nous pouvons citer la « cartilage oligomeric matrix protein » (COMP) qui correspond également à un marqueur caractéristique du cartilage. La COMP appartient à la famille des thrombospondines et est composé de cinq sous-unités identiques. La COMP a une très forte affinité pour les collagènes de types I et II. *Via* ses cinq unités, elle peut ainsi interagir avec cinq molécules de collagène simultanément, permettant ainsi la création d'un réseau collagénique en participant à la formation des fibrilles (Halász *et al.*, 2007). Parmi les protéines non collagéniques du cartilage, la matriline, l'annexine V, la thrombospondine, la tétranectine, la ténascine et la fibronectine sont en relation étroite avec le chondrocyte. Le chondrocyte exprime également des protéines membranaires du type anchorine CII ou les intégrines jouant le rôle de médiateurs entre la cellule et sa matrice environnante ou entre deux cellules (Söder *et al.*, 2002).

## 3. Le chondron et la mécanotransduction.

Parler de la MEC du cartilage sans prendre en compte le chondrocyte correspondrait à un non-sens biologique au vu de l'interdépendance de ces deux structures. Cette étroite relation est parfaitement illustrée par le chondron.

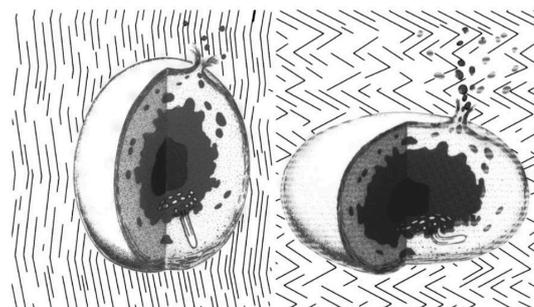
Le concept de chondron a été utilisé pour la première fois par Benninghoff en 1925 (Benninghoff, 1925) pour parler du chondrocyte et de son environnement péricellulaire. Il ne s'agissait que d'une simple observation



**Figure 25 : Représentation schématique de coupe transversale d'un chondron.**

Le chondron correspond à une structure cellulaire et moléculaire composée du chondrocyte entouré par son glycocalyx péricellulaire (Pc) et de sa matrice territoriale (Tm). Im : matrice interterritoriale (Poole, 1998).

histologique. Au fil des années et de l'évolution des technologies, le concept de chondron a évolué vers une structure biologique à part entière définie par le chondrocyte, son glycocalyx et la membrane péricellulaire [Figure 25]. Ce chondron est polarisé au sein du cartilage et est présent de façon verticale dans la zone radiale du cartilage. Cette structure a premièrement été décrite comme étant un outil de protection du chondrocyte face aux forces de compression mais son rôle d'unité mécanique est plus complexe (Pool, 1997). Sous l'effet des forces mécaniques, le chondron est capable d'assurer le transfert de vésicules, de molécules matricielles ou de molécules de communication vers la matrice territoriale et inter-territoriale. Le chondrocyte n'étant pas capable de migrer au sein de la MEC compacte du cartilage, le chondron joue un rôle important dans le remodelage et l'évolution de la MEC [Figure 26]. Cette relation entre l'unité biologique et l'action mécanique permet par exemple l'exportation de l'agrécane néosynthétisé par le chondrocyte vers la matrice territoriale *via* le collagène de type VI composant la matrice péricellulaire du chondron (Poole, 1997).

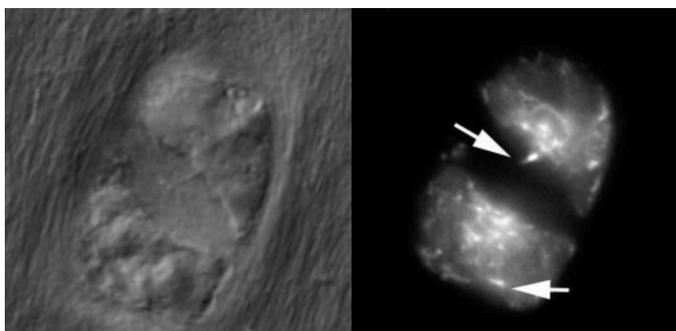


**Figure 26 : Représentation schématisque de l'influence des contraintes mécaniques sur le chondron.**

Le chondron joue un rôle biologique au sein du cartilage. Il est notamment capable d'assurer le transfert de composants matriciels synthétisés par le chondrocyte vers l'ensemble de la MEC. Ce transfert est dépendant des contraintes mécaniques subies par le cartilage (schématisées par les lignes directrices) (Poole, 1997).

Outre cette communication cellule-MEC, le chondron est également impliqué dans la communication MEC-cellule (Guilak *et al.*, 2006). Les intégrines et des récepteurs tels que le « neural/gliaal antigen 2 » (NG2) sont présents sur la membrane des chondrocytes et en contact avec la MEC. Ils servent de mécanorécepteurs. Ces protéines se fixent aux composants matriciels et sont capables de traduire un signal extracellulaire en signal intracellulaire *via* l'activation de voies de signalisation spécifiques. Lorsqu'une force est appliquée à la MEC, le signal mécanique est traduit *in fine* en réponse cellulaire par le biais de différentes strates physiques, chimiques et biologiques appelées phases de couplages (Millward-Sadler & Salter, 2004). La réponse cellulaire du chondrocyte à la mécanostimulation se traduit par la maintenance de la synthèse matricielle et notamment l'expression de PG. Néanmoins, cette réponse varie et peut devenir délétère en fonction de la fréquence et de l'intensité des stimulations.

Une grande partie de cette réponse cellulaire est assurée par le cil primaire du chondrocyte, une structure cellulaire correspondant à un long prolongement cytoplasmique et agissant comme un véritable senseur du microenvironnement cellulaire. Ce dernier est protégé par la matrice péricellulaire au sein du chondron [Figure 27]. La mécanotransduction au sein du chondron est un processus indispensable au maintien du phénotype du chondrocyte. Son altération au cours d'affections induit de profondes modifications du comportement du chondrocyte ainsi que de la composition de la MEC du cartilage (McGlashan *et al.*, 2008 ; Millward-Sadler & Salter, 2004).



**Figure 27 : Microphotographies permettant la visualisation du cil primaire du chondrocyte.**

L'empreinte du chondrocyte peut être visualisée à gauche par microscopie à contraste interférentiel. À droite, un marquage de l' $\alpha$ -tubuline permet d'observer une concentration de cette protéine sur certaines structures cellulaires. Ces structures représentent le flagelle sensoriel du chondrocyte, il s'agit du cil primaire (McGlashan *et al.*, 2008).

## C. L'articulation et le cartilage articulaire équin : le cheval comme sujet d'étude.

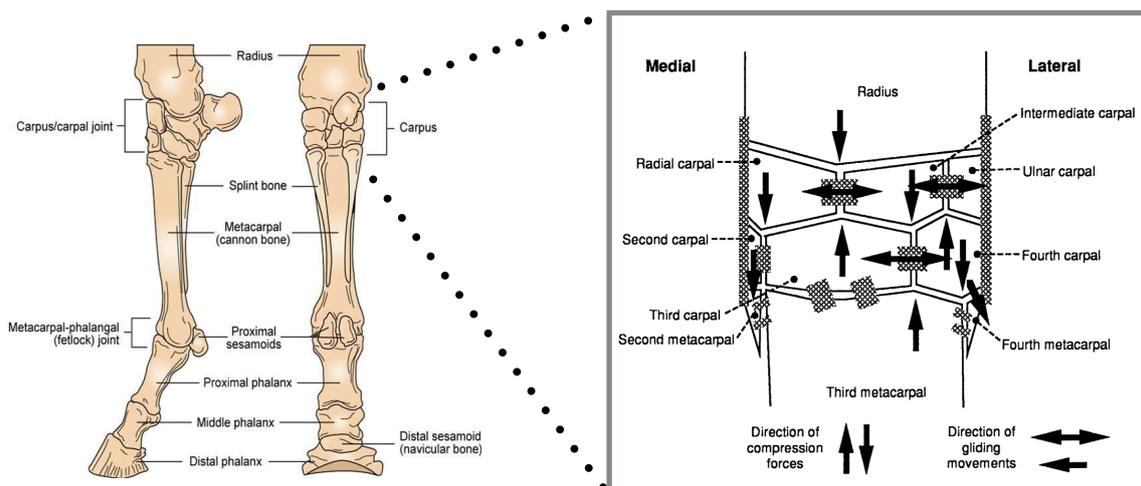
205 os sont présents chez le cheval, dont 80 sont concentrés sur les membres porteurs. Comme pour tout mammifère, les mouvements des membres sont assurés par les articulations. Néanmoins, dans le cas du cheval, les contraintes imposées à l'articulation sont énormes. Le cheval possède une activité physique soutenue et un nombre restreint d'articulations doit être capable de supporter ponctuellement la masse totale de l'animal allant d'une moyenne de 500 kg jusqu'à 1500 kg pour les plus massifs [Figure 28].



**Figure 28 : Photographie illustrant les contraintes sportives subies par le cheval.** Les articulations, les tendons et les muscles du cheval sont soumis à des charges et contraintes colossales dans le contexte sportif (Photo de Jim Beckel : <http://newsok.com/gallery/6030743/pictures/2850262>).

L'ensemble de la masse est soutenue par les quatre pattes du cheval et cela de façon symétrique par rapport à l'axe antéropostérieur. Néanmoins, cette masse n'est pas répartie de la même façon sur les 4 membres : il est estimé que 60-65% de la portance est faite par les membres antérieurs. Ainsi, les articulations de ces derniers sont les plus sollicitées. C'est notamment le cas lors d'activités physiques intenses où les forces de compression peuvent être poussées à leur paroxysme suite aux transferts de masse de l'arrière vers l'avant de l'animal. Dans le cadre sportif, le cheval athlète voit la sollicitation de ses articulations sensiblement augmentée et ceci durant l'ensemble de sa carrière (Adams, 1966).

Les importantes contraintes articulaires chez le cheval peuvent être mises en relation avec la complexité anatomique. A titre d'exemple, c'est le cas de la structure du genou du cheval (se positionnant sur les membres antérieurs). Ce carpe, s'apparentant au poignet mobile de l'Homme, voit sa fonction détournée en structure résistante et élastique au sein du cheval. Il est composé de 8 os imbriqués au sein d'une importante capsule fibreuse et maintenu par plusieurs ligaments. En



**Figure 29 : Représentation schématique des transferts de forces au niveau de l'articulation du carpe.**

Le carpe tire ses propriétés de résistances aux forces mécaniques de la composition de l'articulation (ligament, cartilage et liquide synovial) mais également de sa structure osseuse permettant la répartition des forces au sein de l'articulation (image de gauche : <https://s3.amazonaws.com/classconnection/204/flashcards/1558204/jpg/picture171360020731978-14FFFCC23D1624BBCDB.jpg>) (Deane & Davies, 1995).

plus de jouer un rôle dans l'absorption des chocs, cette articulation résiste aux forces compressives, latérales et d'extension. Sa composition et sa structure permettent de se servir à la fois de la capacité biomécanique du cartilage, de l'élasticité des ligaments mais aussi d'utiliser la forte résistance des 8 os (Deane & Davies, 1995) [Figure 29]. Parmi les autres articulations les plus importantes du modèle équin, nous pouvons citer l'articulation du boulet, du coude, scapulo-humérale, du grasset et du jarret.

Comme chez l'Homme, le cartilage articulaire joue un rôle prépondérant dans la réponse mécanique de l'articulation et dans la protection des os sous-chondraux.

Parmi les mammifères, le cheval présente un cartilage articulaire proche de celui de l'Homme, à la fois dans sa fonction, sa structure et sa biologie. L'épaisseur du cartilage équin et humain est comparable. Par exemple, au niveau du condyle fémoral, l'épaisseur est comprise entre 0,96 mm et 3,13 mm pour le cheval et 0,65 mm et 3,52 mm pour l'Homme (Malda *et al.*, 2012). Il en est de même pour la cellularité du tissu (Aigner *et al.*, 2010).

Les similarités biologiques et génétiques font du modèle équin un modèle de choix dans l'étude du cartilage. Comme nous le verrons dans la partie suivante, les cartilages équin et humain possèdent également une physiopathologie très similaire. Ainsi, cette dernière analogie ne restreint pas le cheval en tant que simple modèle expérimental mais comme un réel sujet d'étude à part entière où se mêlent intérêt scientifique, médical, vétérinaire et économique.

### **III. Le cartilage articulaire : d'un tissu provisoire vers un tissu permanent.**

#### **A. La matrice cartilagineuse en tant que siège de l'ossification.**

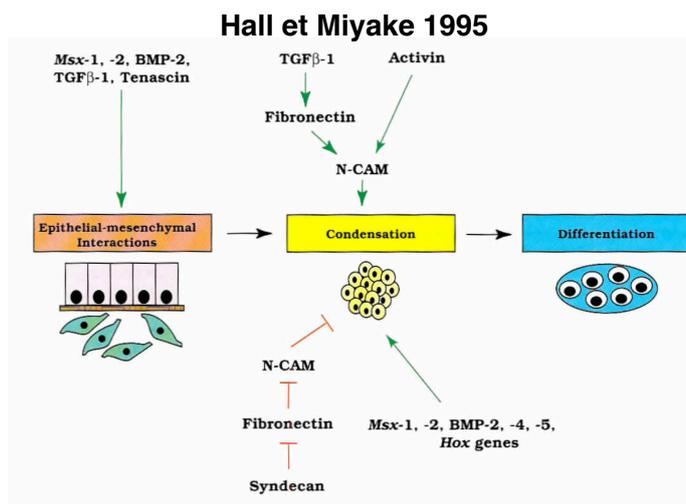
La formation du cartilage se déroule durant les premiers stades du développement embryonnaire à partir de progéniteurs cellulaires. Ce processus est appelé chondrogenèse.

Comme d'autres tissus, la présence au sein de l'organisme et la fonction du tissu cartilagineux est en évolution constante durant les premiers stades embryonnaires et cela jusqu'au stade adulte. Néanmoins, le cartilage a la particularité de représenter la totalité du tissu squelettique durant les premiers stades du développement. Paradoxalement, le cartilage ne perdure qu'au niveau de localisations précises et restreintes à l'âge adulte. Ainsi, la majorité du cartilage mis en place au cours de l'embryogenèse est voué à disparaître et a un rôle d'ébauche ou de patron pour la formation du squelette. Ce processus biologique aboutissant à la formation de l'os est nommé ossification endochondrale. Il fait l'objet d'une fine régulation et est le témoin de la transition d'une prédominance du cartilage vers sa raréfaction.

#### **1. La condensation des cellules souches mésenchymateuses.**

La condensation des CSM est une étape-clé pour la formation du cartilage et de l'os (Hall & Miyake, 2000). Le phénomène a été observé pour la première fois en 1925 par Fell *et al.* (Fell, 1925) mais n'a été étudié que 70 ans plus tard.

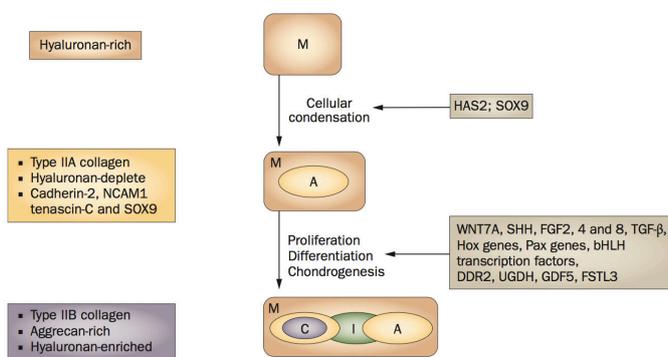
Le développement d'un membre débute par une migration de cellules progénitrices vers le site d'ébauche squelettique. Sous l'effet d'une stimulation de l'épiderme (interaction épithélio-mésenchymateuse) régulée par l'action du « Transforming growth factor- $\beta$ 1 » (TGF- $\beta$ 1) et de la fibronectine, s'ensuit la condensation des CSM [Figure 30]. Cette condensation mésenchymateuse correspond à une adhésion cellule-cellule *via* l'interaction des N-cadhérines, des « neural cell adhesion molecule » (N-CAM) membranaires et de la fibronectine, induisant un ensemble de voies



**Figure 30 : La condensation des CSM au cours de l'initiation de la chondrogenèse.**

Le contact cellule-cellule est à la base de la condensation mésenchymateuse. Elle est régulée par des facteurs de croissance exprimés au cours du développement comme le TGF-β1. L'induction de l'accumulation de N-CAM est un facteur clef de la réponse des CSM aux facteurs chondrogéniques comme la BMP-2 et donc à la chondrogenèse. L'ensemble est régulé, entre autres, par le facteur de transcription Sox-9. M : Agrégation du mésenchyme ; A : ébauche squelettique ; C : Chondrocyte ; I : interzone (Hall & Miyake, 1995, Pitsillides & Beier, 2011).

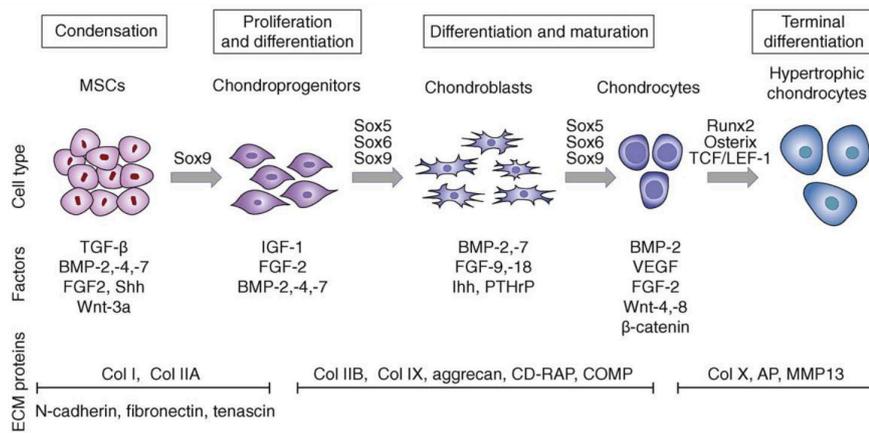
**Pitsillides & Beier, 2011**



de signalisation et modifiant le phénotype cellulaire (Singh & Schwarzbauer, 2014). Lors de cette condensation, une forte activité hyaluronidase est présente, induisant la dégradation de l'acide hyaluronique exprimé au niveau basal par les CSM. La modification du phénotype passe par l'expression concomitante de facteurs de transcription tels que « Paired box protein » 1 et 2 (Pax-1, Pax-2) et « SRY-Box 9 » (Sox-9) induisant l'expression de facteurs autocrines et paracrines responsables de la différenciation chondrogénique. Cette étape faisant intervenir plusieurs boucles de rétrocontrôle moléculaire, est indispensable à la différenciation chondrogénique *in vitro* et *in vivo* (Ghone & Grayson, 2012). A ce stade, les CSM synthétisent une matrice composée essentiellement de collagène de type I, de fibronectine et de collagène de type IIA. Les cellules sont alors capables de répondre à des *stimuli* chondrogéniques comme l'action des « Bone morphogenetic protein » (BMP) qui vont, en plus de favoriser la différenciation en chondrocyte, participer au recrutement d'autres progéniteurs mésenchymateux faisant ainsi évoluer la structure cellulaire.

## 2. La chondrogenèse.

La chondrogenèse se traduit par le passage des CSM d'un stade indifférencié vers un stade de chondrocyte mature [Figure 31]. La formation de cartilage implique un dépôt matriciel de collagène de type II et d'agrécan. Elle est également structurée par des marqueurs moins majoritaires comme la COMP et les collagènes de types IX et XI. La transcription de ces gènes est dépendante de l'activité de Sox-9, facteur prépondérant de la différenciation chondrogénique, qui est exprimé par les CSM au cours de la condensation. Néanmoins, Sox-9 ne peut pas enclencher seul la différenciation chondrogénique. En effet, pour activer l'expression des marqueurs phénotypiques du cartilage, deux autres facteurs de transcription, Sox-6 et L-Sox5, vont participer à la liaison de Sox-9 sur les séquences de régulation des gènes cibles (Lefebvre & Crombrughe, 1998).



**Figure 31 : Les intervenants et les différentes étapes de la chondrogenèse.**

La chondrogenèse se traduit par la spécialisation de cellules indifférenciées en chondrocytes. Elle est principalement sous la gouverne de trois facteurs de transcription : Sox-6, Sox-9 et L-Sox-5. Un effet temporel de différents facteurs de croissance permet l'initiation, la maturation et la différenciation terminale des cellules lors de la chondrogenèse. Lors des différentes étapes, divers composants matriciels sont exprimés. La structure de la MEC varie ainsi en fonction du phénotype cellulaire (Vinatier *et al.*, 2009).

Les phénomènes régulant l'initiation de la synthèse de ces facteurs de transcription et de l'initiation de la chondrogenèse ne sont pas tout à fait élucidés. Néanmoins, ils correspondent à une chronologie d'évènements faisant intervenir l'action de plusieurs facteurs de croissance issus des CSM mais également des tissus avoisinant comme les « fibroblast growth factor » (FGF), « sonic hedgehog » (SHH), les BMP-2, 4 et 7, « growth/differentiation factor 5 » (GDF-5), et l'« insulin-like growth factor-1 » (IGF-1) (Vinatier *et al.*, 2009). La MEC proximale des progéniteurs chondrocytaires va également réguler la différenciation en pré-chondrocytes. Des intervenants comme les intégrines et le « discoidin domain-containing receptor 2 » (DDR-2), récepteur collagénique, régulent l'induction de la chondrogenèse, le phénotype chondrocytaire, et son devenir (Pitsillides & Beier, 2011). Cette induction va alors permettre aux progéniteurs chondrocytaires d'atteindre le stade de pré-chondrocytes.

Une étape cruciale de la formation du cartilage et de la chondrogenèse correspond à la commutation du collagène de type IIA vers le collagène de type IIB, étape de transition vers le phénotype chondrocytaire mature. Cette transition est sous la gouverne des trois facteurs de transcription Sox-9, Sox-6 et L-Sox5. Cette transition est accompagnée d'une forte expression de la MEC par les chondrocytes en cours de maturation. Les chondrocytes matures expriment alors des collagène de types IX et XI et la COMP, marqueurs typiques du cartilage articulaire.

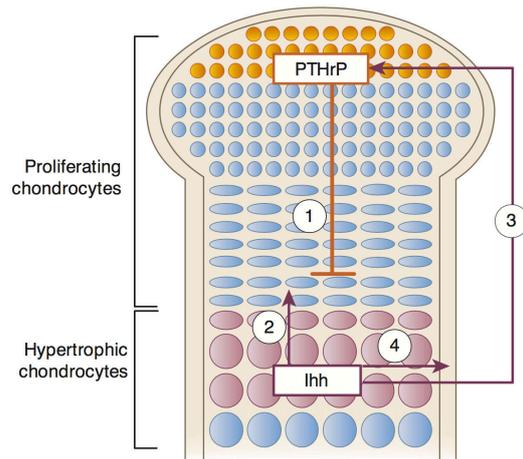
### **3. L'hypertrophie des chondrocytes.**

Durant la croissance du cartilage, il est observé une poursuite du lignage chondrocytaire vers un stade prolifératif. La balance entre l'action des FGF et des BMP régule la vitesse de prolifération, la synthèse matricielle des chondrocytes et la croissance de l'ébauche squelettique (Goldring & Tsuchimochi, 2006). En parallèle, les chondrocytes prolifératifs expriment la « parathyroid hormone-related protein » (PTHrP). Cette dernière inhibe l'évolution des chondrocytes vers le stade hypertrophique. Du fait de l'éloignement de l'amas cartilagineux, les chondrocytes arrêtent de proliférer et entrent en phase de pré-hypertrophie. Ces cellules échappant au contrôle hormonal de PTHrP commencent alors à synthétiser « indian hedgehog » (IHH) qui est impliqué dans le développement de l'os à partir des cellules péri-chondrales mais également dans l'inhibition de l'hypertrophie. IHH et PTHrP représentent tous deux un rétrocontrôle négatif de l'hypertrophie et régulent ainsi la croissance du cartilage.

En absence de PTHrP, les chondrocytes ayant arrêté de proliférer expriment « Runt-related transcription factor 2 » (Runx2), aussi connu sous le nom de « core-binding factor subunit

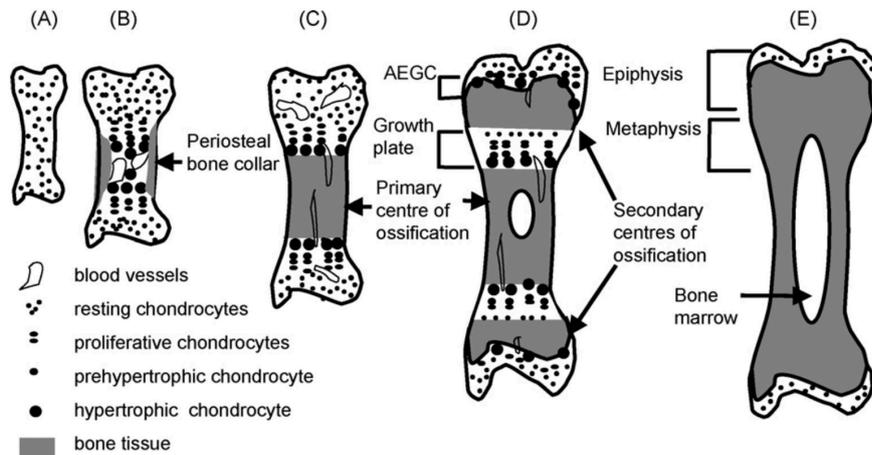
**Figure 32 : Représentation schématique de la boucle de régulation Ihh/PTHrP dans l'évolution de la zone hypertrophique.**

L'hormone PTHrP est sécrétée par les chondrocytes prolifératifs aux extrémités des os en cours de formation. PTHrP inhibe la différenciation terminale ainsi que la synthèse d'Ihh et favorise la prolifération des chondrocytes (1). En fonction de la croissance de la zone de prolifération des chondrocytes, il y a une perte de l'action à distance de PTHrP. Les chondrocytes qui ne sont plus stimulés voient alors leur synthèse d'Ihh augmenter (2). Ihh favorise à la fois la prolifération et la production de PTHrP aux extrémités des os (3) et inhibe l'hypertrophie. Ihh va ainsi amplifier le phénomène d'éloignement spatial des chondrocytes de l'action stimulante des deux hormones et aboutir à l'hypertrophie des chondrocytes (4) (Kronenberg, 2003).



alpha-1 » ( $CBF\alpha 1$ ). Runx2 (inhibiteur de PTHrP) est le facteur de transcription impliqué dans l'hypertrophie mais également la différenciation ostéoblastique. Il est capable d'inhiber l'expression de Sox-9, d'induire l'expression du collagène de type X, de la « matrix metalloprotéine »-13 (MMP13) et de la phosphatase alcaline, biomarqueurs du cartilage hypertrophique. Cette complexe régulation à la fois spatiale et temporelle induit la différenciation hypertrophique et la calcification du centre de l'esquisse cartilagineuse qui deviendra ainsi le centre d'ossification primaire (Mackie *et al.*, 2008) [Figure 32].

#### 4. L'ossification endochondrale.



**Figure 33 : Représentation schématique de l'ossification endochondrale.**

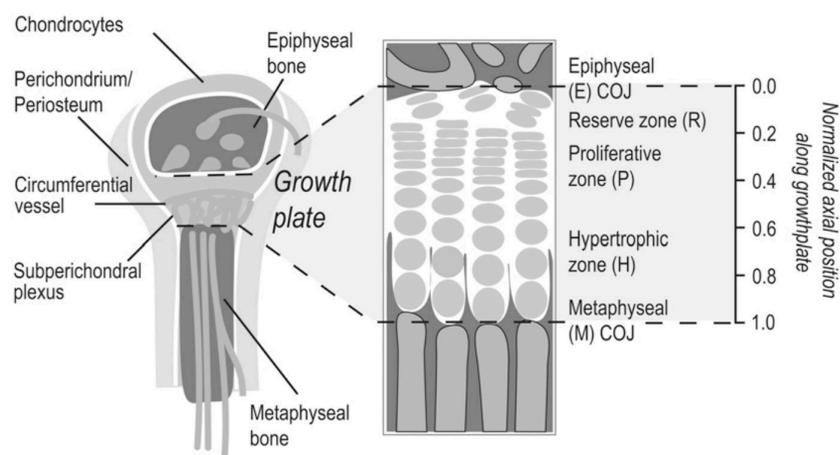
La formation de cartilage au cours du développement participe à la formation de l'os. Une esquisse cartilagineuse est formée à la base du développement squelettique (A). Un premier centre d'ossification prend forme en lieu et place de la zone hypertrophique du membre en cours de formation (B et C). Aux extrémités distales des os en formation, un centre d'ossification secondaire est créé (D). Ce phénomène biologique complexe aboutit à la formation de l'os et à la disparition de la maquette cartilagineuse pour ne laisser qu'une fine couche de cartilage articulaire aux extrémités des os longs (E) (Mackie *et al.*, 2008).

La formation d'un cartilage hypertrophique implique une dégradation progressive de la matrice cartilagineuse par MMP-13, ciblant les collagènes, et par les agrécanases comme les « a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs » (ADAMTs) (Mackie *et al.*, 2008). Le chondrocyte hypertrophique est un type cellulaire instable et a tendance à s'orienter vers l'apoptose.

Les lacunes générées par ce profond remodelage tissulaire permettent une invasion angiogénique puis la migration de progéniteurs ostéoblastiques. L'angiogenèse est induite par l'expression du « vascular endothelial growth factor » (VEGF) par les chondrocytes hypertrophiques et du FGF-18 exprimé par le périchondre (Kronenberg, 2003). La dégradation complète de la matrice hypertrophique est alors assurée par l'invasion d'ostéoclastes. Les zones vacantes générées par l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques vont, quant à elles, servir d'accueil aux progéniteurs ostéoblastiques. Ces derniers vont procéder à un remaniement de la MEC extracellulaire et à la formation d'un dépôt d'une matrice calcifiée puis osseuse et former l'os sous-chondral [Figure 33].

## 5. La plaque de croissance.

Durant la croissance du centre d'ossification primaire, les zones de prolifération des chondrocytes restent actives aux extrémités distales et proximales de l'os trabéculaire en formation. Les fronts prolifératifs et hypertrophiques migrent simultanément par rapport à la progression de l'ossification. Aux extrémités des ébauches cartilagineuses en cours d'ossification et de façon distante par rapport au centre d'ossification primaire, un centre d'ossification secondaire se forme également. La zone cartilagineuse intermédiaire résultante, formée principalement de chondrocytes hypertrophiques est appelée cartilage de conjugaison et compose la plaque de croissance épiphysaire (Shapiro *et al.*, 2005). Ce cartilage assure la croissance de l'os et donc des membres de la naissance à l'adolescence. Son évolution est étroitement dépendante de l'activité hormonale et notamment de l'action de PTHrP et d'IHH. La plaque de croissance disparaît à l'âge adulte après un pic hormonal durant la puberté [Figure 34].



**Figure 34 : Représentation schématique de la plaque de croissance.**

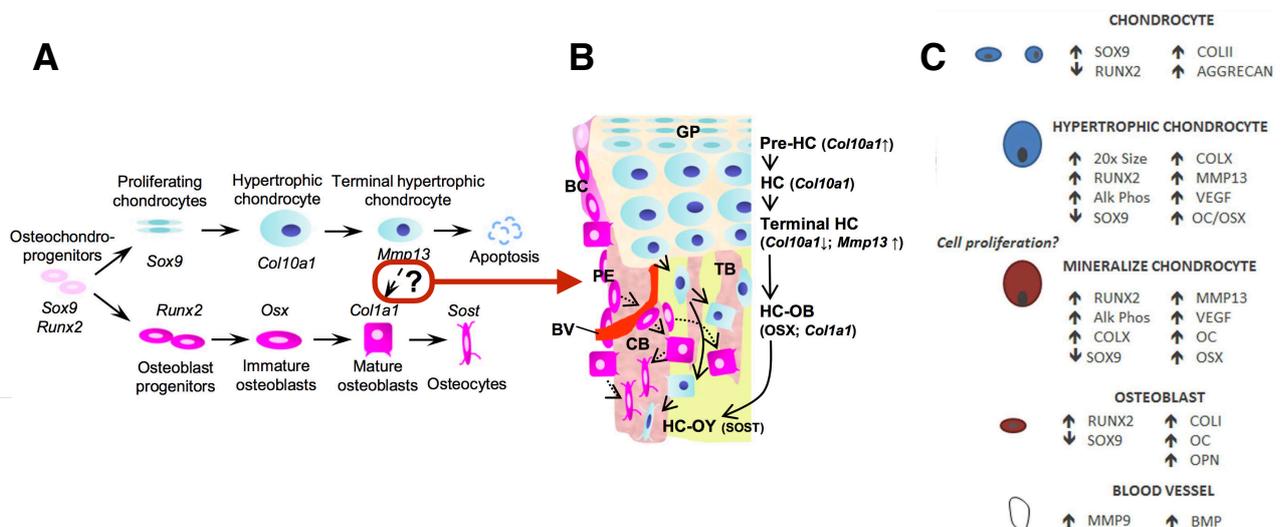
La plaque de croissance est formée au cours du développement de l'os et perdue jusqu'à la fin de la formation de l'os juvénile. Cette plaque de croissance cartilagineuse progresse en fonction de la croissance du membre et permet l'avancée du front d'ossification. Elle permet la formation et la progression d'une matrice cartilagineuse et hypertrophique d'accueil à l'ossification endochondrale au niveau de la jonction chondro-osseuse métaphysaire (COJ) (Williams *et al.*, 2007).

## 6. Le devenir du chondrocyte hypertrophique.

La situation physiologique de la plaque de croissance pose forcément la question de l'implication des chondrocytes hypertrophiques dans la formation de l'os mais surtout de leur devenir.

Depuis presque 100 ans, l'hypothèse que le chondrocyte puisse servir de source cellulaire à la construction de l'os a été avancée de façon récurrente mais jamais clairement vérifiée. Néanmoins, depuis quelques années, cette hypothèse est en passe d'être vérifiée.

L'orientation des progéniteurs ostéo-chondrogéniques est sous la gouverne des deux facteurs de transcription majeurs que sont Sox-9 et Runx-2. La balance d'activité entre Sox-9 et Runx-2 oriente les progéniteurs dans le lignage chondrogénique ou ostéogénique (Eames *et al.*, 2004). Au cours de la différenciation chondrogénique, Sox-9 régule négativement Runx-2 (Yamashita *et al.*, 2009). Néanmoins, au cours de la différenciation terminale, ce dernier est exprimé pour orienter le chondrocyte vers le stade hypertrophique. En 2014, Liu Yang *et al.* de l'Université de Hong Kong ont montré que le chondrocyte hypertrophique, généré au cours du développement des membres mais également au cours de la réparation osseuse, pouvait s'orienter vers le lignage ostéoblastique et participer de manière significative à l'ossification endochondrale. Ainsi, il a été montré que le lignage chondrocytaire peut évoluer vers le stade hypertrophique pour aboutir soit à une mort cellulaire par apoptose soit à une différenciation ostéoblastique (Yang *et al.*, 2014). Cette étude et le contrôle étroit du lignage ostéo-chondrogénique par Sox-9/Runx-2 montre la proximité phénotypique du chondrocyte et de l'ostéoblaste [Figure 35].



**Figure 35 : La transdifférenciation du chondrocyte hypertrophique en ostéoblaste.**

La différenciation chondrocytaire et la différenciation ostéoblastique sont régulées par la balance d'activité des facteurs de transcription Sox-9 et Runx-2 (A). *In vivo*, le chondrocyte peut participer à la formation et à la reconstruction osseuse par un phénomène de transdifférenciation en ostéoblaste (B). HC : « hypertrophic chondrocytes » ; GP : « growth plate » ; TB : « trabecular bone » ; CB : « cortical bone » ; OB : « osteoblast » ; OY : « osteocyte » ; BV : « blood vessel » ; PE : « periosteum » ; BC : « bone collar » (Yang *et al.*, 2014). Liste des marqueurs exprimés durant le lignage ostéochondral (C) (Bahney *et al.*, 2015).

## B. Le cartilage articulaire en tant que tissu persistant : rôle de l'homéostasie.

Comme nous l'avons vu, le chondrocyte a un statut particulier au cours du développement et son devenir oscille entre éphémérité et pérennité. Pourtant, ce dernier est retrouvé tout au long de la vie aux extrémités osseuses au sein de l'articulation. La localisation du site articulaire est déterminée de façon précoce au cours du développement, mais les mécanismes impliqués sont peu renseignés (Pacifi *et al.*, 2005). C'est à la frontière entre l'os et la cavité synoviale que va perdurer une fine couche de cartilage articulaire.

Enzyme	MMP	ECM substrate
<b>Collagenases</b>		
Collagenase-1	MMP-1	Collagens (I, II, III, VII, VIII and X), gelatin, proteoglycan link protein, aggrecan, versican, tenascin, entactin
Collagenase-2	MMP-8	Collagens (I, II, III, V, VII, VIII and X), gelatin, aggrecan
Collagenase-3	MMP-13	Collagens (I, II, III, IV, IX, X, XIV), gelatin, aggrecan, perlecan, large tenascin-C, fibronectin, osteonectin
Collagenase-4	MMP-18	ND
<b>Gelatinases</b>		
Gelatinase A	MMP-2	Collagens (I, IV, V, VII, X, XI and XIV), gelatin, elastin, fibronectin, laminin-1, laminin-5, galectin-3, aggrecan, decorin, hyaluronidase-treated versican, proteoglycan link protein, osteonectin
Gelatinase B	MMP-9	Collagens (IV, V, VII, X, and XIV), gelatin, elastin, galectin-3, aggrecan, fibronectin, hyaluronidase-treated versican, proteoglycan link protein, entactin, osteonectin
<b>Stromelysins</b>		
Stromelysin-1	MMP-3	Collagens (III, IV, V and IX), gelatin, aggrecan, versican, hyaluronidase-treated versican, perlecan, decorin, proteoglycan link protein, large tenascin-C, fibronectin, laminin, entactin, osteonectin
Stromelysin-2	MMP-10	Collagens (III, IV and V), gelatin, casein, aggrecan, elastin, proteoglycan link protein
Stromelysin-3	MMP-11	aggrecan, elastin, proteoglycan link protein, Casein, laminin, fibronectin, gelatin, collagen IV and carboxymethylated transferrin
<b>Membrane type MMPs</b>		
MT1-MMP	MMP-14	Collagens (I, II and III), casein, elastin, fibronectin, gelatin, laminin, vitronectin, large tenascin-C, entactin, proteoglycans
MT2-MMP	MMP-15	Large tenascin-C, fibronectin, laminin, entactin, aggrecan, perlecan
MT3-MMP	MMP-16	Collagen-III, gelatin, casein, fibronectin
MT4-MMP	MMP-17	ND
MT5-MMP	MMP-24	ND
MT6-MMP	MMP-25	ND
<b>Others</b>		
Matrilysin	MMP-7	Collagens IV and X, gelatin, aggrecan, decorin, proteoglycan link protein, fibronectin, laminin, insoluble fibronectin fibrils, entactin, large and small tenascin-C, osteonectin, $\beta_4$ integrin, elastin, casein, transferrin
Matrilysin-2	MMP-26	Collagen IV, gelatin, fibronectin
Metalloelastase	MMP-12	Collagen IV, gelatin, elastin, casein, laminin, proteoglycan monomer, fibronectin, vitronectin, enactin
No trivial name	MMP-19	Gelatin
Enamelysin	MMP-20	Amelogenin
No trivial name	MMP-23	ND
XMMP (Xenopus)	MMP-21	ND
CMMP (Chicken)	MMP-22	ND

### Tableau 2 : Les métalloprotéases matricielles.

Les métalloprotéases peuvent être classées en fonction de leurs substrats. Elles ont pour rôle, entre autres, de dégrader les composants de la MEC aboutissant au remodelage tissulaire (Chakraborti *et al.*, 2003).

# 1. L'homéostasie du cartilage : un équilibre entre le versant anabolique et le versant catabolique.

Comme tout tissu de l'organisme, le cartilage articulaire est soumis aux facteurs exogènes et endogènes. Il évolue au cours du temps et répond à un paradoxe biologique entre la stabilité et le renouvellement. Néanmoins, à la différence d'une majorité de tissus, son évolution et son renouvellement sont extrêmement lents, comme figés dans le temps. A titre d'exemple, le collagène de type II est une molécule d'une grande stabilité. Le collagène de type II articulaire a une demi-vie de 115 ans alors qu'elle est seulement de 15 ans pour le collagène de type I épithélial (Verzijl *et al.*, 2000).

Physiologiquement, peu de variations dans la composition du cartilage sont observables. Le chondrocyte exerce une synthèse constante des composés matriciels mais sa faible représentation et sa faible prolifération au sein du tissu ne permet pas une formation *de novo* du cartilage. C'est néanmoins ce chondrocyte qui régule la composition matricielle. Il est capable de synthétiser les composants spécifiques du cartilage comme le collagène de type II, l'agrécane ou la COMP. A l'opposé, par la synthèse de molécules protéolytiques, le chondrocyte est capable de dégrader sa propre matrice et d'assurer un remodelage tissulaire du cartilage. Ces molécules sont de différentes natures et répondent au nom de protéases matricielles.

On compte parmi les protéases du cartilage principalement les MMP, les ADAMTS et les « proteins with a disintegrin and metalloproteinase » (ADAM). Ces enzymes ciblent des substrats spécifiques par l'intermédiaire de leur site catalytique.

La conformation quaternaire des MMP comporte une structure protéique et un ion métallique qui participent à la catalyse protéique. Les MMP regroupent un ensemble de collagénases, de gélatinases, de stromelysines et de MMP membranaires [Tableau 2] (Chakraborti *et al.*, 2003). Elles se classent selon le type de protéolyse engendré, leur structure et leur substrat. Dans le cas du cartilage, les principales représentantes des MMP sont les MMP-1, 3, 9 et 13 (Lee *et al.*, 2013). Elles interviennent dans la dégradation de la matrice collagénique et dans une partie de celle des PG. Elles sont régulées à la fois au niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel (clivage d'un pro-peptide). L'activité catalytique des MMP est inhibée par les « tissue inhibitors of metalloproteinases » (TIMP) qui représentent un autre niveau de régulation agissant sur la fonctionnalité même de ces enzymes. Dans la matrice cartilagineuse, TIMP-2, 3 et TIMP-4 jouent un rôle de médiateur de la dégradation de la MEC. Outre le fait d'inhiber l'action des MMP, les TIMP régulent l'action des agrécánases ou ADAMTs/ADAM.

Découvertes pour la première fois en 1999 (Tortorella *et al.*, 1999), les ADAMTS sont des métalloprotéinases possédant un noyau à zinc. Les ADAM, quant à elles, présentent un domaine transmembranaire et se lient à la membrane cellulaire. Concernant la dégradation des composants matriciels, l'agrécane est l'une des cibles principales des agrécánases. C'est notamment le

Enzyme	Substrate	Activity
ADAMTS-1	Aggrecan, versican, $\alpha_2$ -macroglobulin	Cleavage of proteoglycan core proteins, anti-angiogenic
ADAMTS-2	Procollagen I, procollagen II	Processing of N-propeptide of procollagen
ADAMTS-3	Procollagen II	Processing of N-propeptide of procollagen
ADAMTS-4	Aggrecan, versican, brevican	Cleavage of proteoglycan core proteins
ADAMTS-5	Aggrecan	Cleavage of aggrecan core protein
ADAMTS-8		Anti-angiogenic
ADAMTS-13	von Willebrand factor	Reduced activity results in thrombotic Thrombocytopenic purpura
ADAMTS-14	Procollagen I	Procollagen N-proteinase

**Tableau 3 : Les ADAMTS.**

Les ADAMTS participent au remodelage matriciel et à la maturation de la MEC (Nagase & Kashiwagi, 2003).

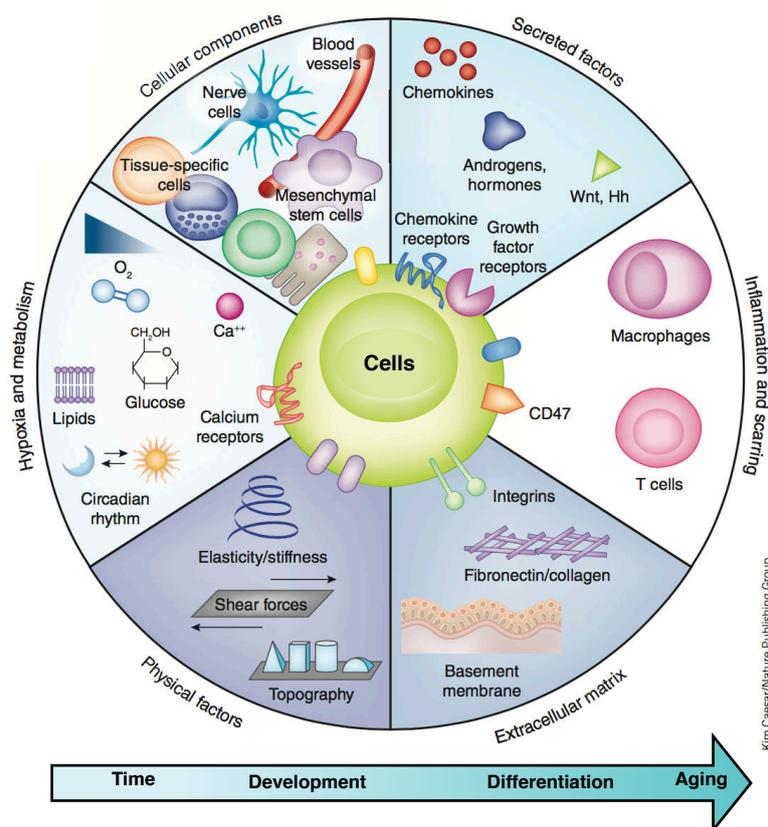
substrat des ADAMTS-1, 4 et 5 [Tableau 3], néanmoins, ce n'est pas le seul rôle des ADAMTS. Parmi elles, les ADAMTS-2 et les ADAMTS-3 participent à la maturation du collagène de type II par clivage des pro-peptides en N-ter (Nagase *et al.*, 2006).

Ces deux composantes anabolique et catabolique fonctionnent en interaction. L'une assure un approvisionnement suffisant en matériel moléculaire concourant à la formation de la MEC tandis que l'autre assure son renouvellement par dégradation des composés endommagés ou assure la maturation des composés néo-synthétisés. L'intégrité du cartilage réside dans un équilibre entre ces deux versants.

## 2. La régulation de l'homéostasie du cartilage.

Le microenvironnement du chondrocyte a une influence majeure sur le comportement de ce dernier. Au sein du cartilage, afin d'assurer son rôle, le chondrocyte doit capter les signaux biologiques et physiques de son microenvironnement. Cela passe à la fois par l'action de facteurs de croissance et de cytokines, par une interaction étroite avec la MEC mais également par les conditions oxiques ainsi que par l'impact des contraintes mécaniques. L'ensemble de ces acteurs sont également impliqués dans la différenciation chondrogénique et le statut phénotypique du chondrocyte.

Il est difficile d'évaluer précisément l'impact de chaque acteur de l'homéostasie du cartilage.



**Figure 36 : l'influence du microenvironnement sur le phénotype cellulaire.**

Le phénotype cellulaire est en relation étroite avec le microenvironnement cellulaire. Ce dernier est multiparamétrique et son impact sur la cellule varie en fonction du temps, du stade de développement, du stade de différenciation de la cellule et des facteurs extrinsèques liés à l'âge (adaptation de Lane *et al.*, 2014).

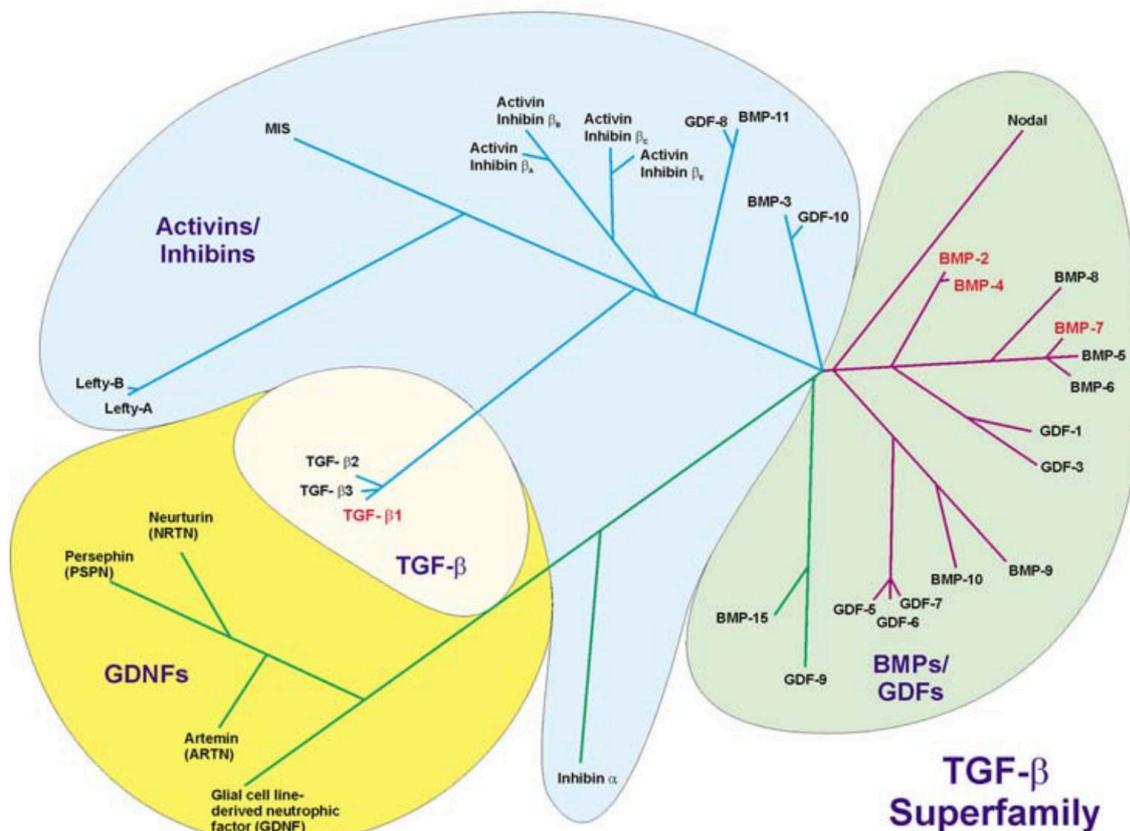
Il existe, de surcroît, une importante temporalité d'action et de mode d'activité de ces facteurs : l'effet de chaque paramètre ou acteur biologique dépend à la fois du développement de l'organisme ou de la différenciation cellulaire, du contexte physiopathologique de la cellule au tissu et de l'action isolée, combinée ou multifactorielle de chaque facteur [Figure 36]. Ainsi, il est impossible de restreindre la fonction d'un facteur microenvironnemental à un rôle unique pour un type cellulaire unique. Les paramètres biologiques et physico-chimiques décrits par la suite ont été généralement étudiés, dans un premier temps, dans le tissu adulte ou *in vitro*. Néanmoins, ils ont tous un rôle au cours de la différenciation cellulaire et lors du développement embryonnaire.

### a. Les facteurs de croissance.

Les facteurs de croissance jouent à la fois un rôle de communication entre les différents types cellulaires mais également un rôle de stimulation pour les chondrocytes, induisant ainsi une réponse cellulaire de ces derniers. Ils sont qualifiés de facteurs chondrogéniques.

#### i. Le TGF-β1.

Le TGF-β1 appartient à la sous-famille des TGF-β qui appartient elle-même à la superfamille des TGF-β [Figure 37]. Il a été caractérisé pour la première fois en 1983 (Assoian *et al.*, 1983) et est impliqué dans un grand nombre de processus cellulaires comme la croissance cellulaire, le système immunitaire, la différenciation, le développement tumoral, la migration ou l'apoptose. Il joue un rôle pivot dans les processus cellulaires et tissulaires et sert de médiateur



**Figure 37 : Représentation schématique des membres de la superfamille du TGF-β.**

La superfamille du TGF-β représente un ensemble de facteurs de croissance regroupant les Activines/inhibines, les GDF (« growth and differentiation factors »), les BMP, les « glial cell-derived neurotrophic factor » (GDNF) et les TGF-β (Weiskirchen *et al.*, 2009).

biologique au cours du développement, pour l'homéostasie et au cours des affections tissulaires et cellulaires.

Au sein du cartilage, il est exprimé par les chondrocytes sous une forme homodimérique inactive de 390 acides aminés. Le TGF- $\beta$ 1 est néanmoins ubiquitaire dans l'organisme. Il existe de nombreux activateurs du TGF- $\beta$ 1 comme la variation de pH, une action protéolytique, une activité de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) ou encore une interaction avec les intégrines membranaires.

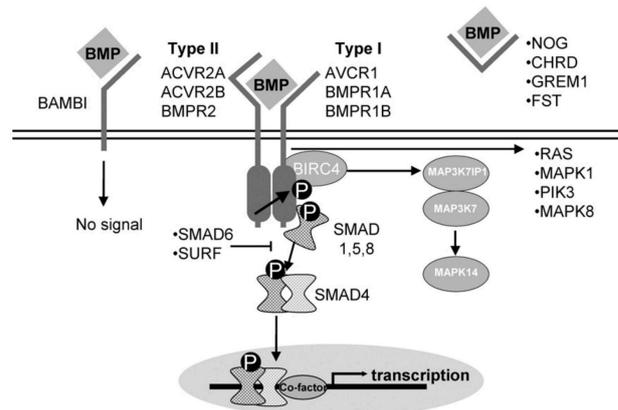
Le TGF- $\beta$ 1 se fixe à des récepteurs de type sérine-thréonine kinase pour déclencher une cascade de phosphorylations et de signalisation impliquant Smad-2/3 et Smad-4 qui s'associent à Sox-9 pour la transcription de gènes cibles (Furumatsu *et al.*, 2009). Ainsi, il est capable d'induire la synthèse de collagène de type II sous sa forme IIA et d'agrécan par les chondrocytes cultivés *in vitro*. Néanmoins, l'utilisation de TGF- $\beta$ 1 sur des chondrocytes cultivés en monocouche les oriente dans le lignage hypertrophique (Narcisi *et al.*, 2012). Le TGF- $\beta$ 1 possède ainsi un rôle ambivalent dans le phénotype chondrocytaire.

Le TGF- $\beta$ 1 est également impliqué dans la condensation mésenchymateuse et il est indispensable à l'engagement chondrogénique des cellules progénitrices. En combinaison avec la BMP-2, il est notamment capable d'inhiber le phénotype ostéogénique (Alliston *et al.*, 2001 ; Demoor *et al.*, 2014).

## ii. Les BMP.

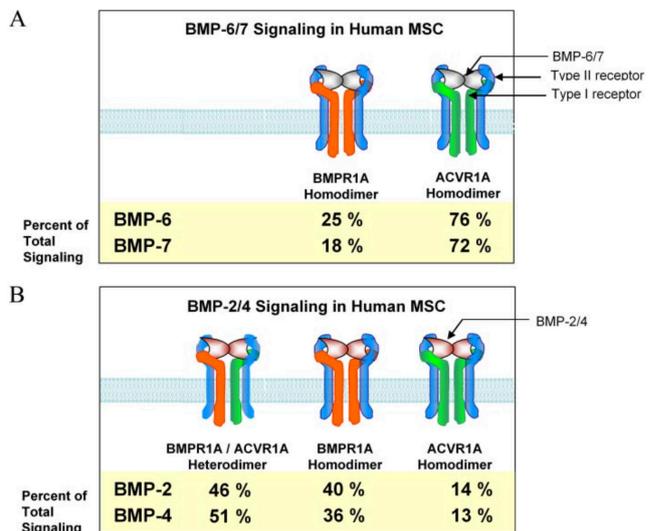
Les BMP sont des facteurs de croissance impliqués majoritairement dans la formation des tissus squelettiques et plus généralement dans l'organisation tissulaire et matricielle. Elles appartiennent également à la superfamille des TGF- $\beta$  (excepté pour BMP-1 qui est une métalloprotéinase). Parmi les BMP, la plus impliquée dans le développement et l'homéostasie du cartilage est la BMP-2. Néanmoins, les BMP-4 -6 et -7 jouent également un rôle dans la mise en place du cartilage.

La BMP-2 se fixe à des récepteurs sérine-thréonine kinases qui sont de deux types : les récepteurs de type I et les récepteurs de type II. Ensemble, les deux types de récepteurs forment un complexe tétramérique induisant la signalisation cellulaire en aval *via* la transphosphorylation du type I par le type II (van Wijk *et al.*, 2007) [Figure 38]. La signalisation intracellulaire est gouvernée par les Smad-1, -5, -8 et -4. Les BMP ont une forte affinité pour les récepteurs



**Figure 38 : Représentation schématique de la signalisation cellulaire des BMP.**

Les membres de la famille des BMP se lient à un jeu de deux types de récepteurs. C'est leur affinité pour les deux types de récepteurs qui implique une cascade de signalisation dépendante principalement de la voie des SMAD (van Wijk *et al.*, 2007).



**Figure 39 : Représentation schématique des structures tétramériques des récepteurs de type I à la BMP.**

Outre une affinité différente des BMP pour leurs récepteurs, leur liaison implique la formation de tétramères de récepteurs différents. Ce sont principalement les dimères de récepteurs de type I qui influencent les différentes signalisations induites par les BMP-6, -7 (A) et BMP-2, -4 (B) (Lavery *et al.*, 2008).

de type I. Il y a 3 types de récepteurs de type I : le « BMP Receptor 1A » (BMPRIA), le « BMP Receptor 1B » (BMPRIB) et l'« Activin A receptor type I » (AVCR1). Ce sont eux qui régulent principalement l'activité de la BMP-2 sur le chondrocyte ou sur les progéniteurs ostéo-chondrogéniques.

Les couples de récepteurs de type I peuvent varier en fonction de l'affinité de la liaison BMP-2/récepteurs ou récepteur/récepteur (Lavery *et al.*, 2008) [Figure 39]. Il semble que BMPR1A soit impliqué dans la différenciation et la réponse des chondrocytes tandis que BMPR1B est impliqué dans l'initiation de la chondrogenèse (Sanyal *et al.*, 2002).

La BMP-2 détient un rôle bivalent dans la physiologie ostéo-chondrale. *In vitro* et à faible concentration (50 ng/ml), elle est capable d'induire la différenciation chondrogénique tandis qu'à plus forte concentration (100, 200 ou 400 ng/ml), elle inhibe cette dernière et oriente les chondrocytes vers l'hypertrophie (Valcourt *et al.*, 1999 ; De Luca *et al.*, 2001). Elle est également impliquée dans le lignage ostéogénique (Rosen *et al.*, 1994).

La BMP-2, en combinaison avec le TGF- $\beta$ 1, est capable d'induire la chondrogenèse et d'assurer la maturation du pré-chondrocyte. La BMP-2 est également capable de réguler l'activité de synthèse du chondrocyte mature. Elle agit par induction de l'activité de Sox-9, Sox6 et L-Sox5. Elle est également capable, à la différence du TGF- $\beta$ 1, d'induire le changement isotypique du collagène de type IIA en type IIB au cours de la maturation chondrocytaire. Chez le chondrocyte, la BMP-2 a la faculté de stimuler une synthèse matricielle de meilleure qualité par rapport au TGF- $\beta$ 1, avec une pré-dominance de la synthèse des biomarqueurs du cartilage et notamment de l'isoforme IIB par rapport à la forme IIA (Demoor *et al.*, 2014).

Le rôle de la BMP-4 est très similaire à celui de la BMP-2. Sa signalisation passe également par les mêmes jeux de récepteurs et elle a un effet similaire sur le lignage chondrocytaire à la différence près qu'elle induit une plus forte hypertrophie et une plus faible synthèse de collagène de type II *in vitro* (Valcourt *et al.*, 1999 ; Lavery *et al.*, 2008).

BMP-7 et BMP-6 quant à elles, semblent avoir un impact sur le lignage ostéo-chondral. Leur signalisation passe préférentiellement par leur interaction avec les récepteurs de type I ACVR1A. BMP-7 est capable d'orienter les progéniteurs ostéochondraux dans le lignage chondrogénique mais également ostéogénique. Combinée avec le TGF- $\beta$ 3, elle est capable d'initier la différenciation chondrogénique et ostéogénique. Elle favorise l'expression du collagène de type II mais également des marqueurs osseux (Shen *et al.*, 2010). Elle aurait également un rôle anti-fibrotique (Weiskirchen *et al.*, 2009). Néanmoins, son rôle précis est méconnu au sein du cartilage.

Concernant BMP-6, elle semble avoir la même fonction que la BMP-7, néanmoins, son utilisation semble nécessaire à la différenciation des CSM du tissu adipeux (CSM-TA) en chondrocytes (Hennig *et al.*, 2007).

### iii. Les autres facteurs de croissance.

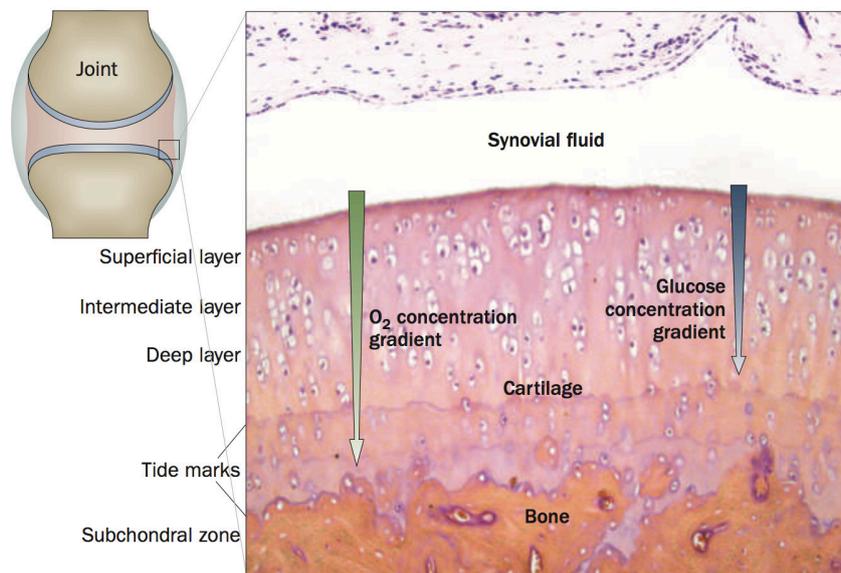
D'autres facteurs de croissance peuvent être qualifiés de facteurs chondrogéniques. C'est le cas notamment de l'IGF-1 impliqué dans l'anabolisme du chondrocyte. En effet, il est capable d'augmenter la synthèse de PG et des collagènes du chondrocyte par la stimulation de l'activité de liaison de Sox-9, Sox-6 et L-Sox-5. Néanmoins, ce dernier induit également les marqueurs non spécifiques du cartilage comme le collagène de type I et les marqueurs d'hypertrophie (Legendre *et al.*, 2013).

Le FGF-2 a fait l'objet de beaucoup de travaux ces dernières années et il a été montré une certaine ambiguïté dans son activité chondrogénique. Il est une composante essentielle à l'homéostasie du cartilage et semble favoriser la prolifération chondrocytaire plutôt que l'anabolisme (Goldring & Tsuchimochi, 2006). Utilisé durant l'amplification des chondrocytes *in vitro*, il permet néanmoins de favoriser la réponse à la BMP-2 (Claus *et al.*, 2012). D'autre part, il pourrait avoir un rôle dans le catabolisme des chondrocytes par une régulation positive de la

MMP-13 et de l'ADAMTS-5. Le FGF-2 semble également surexprimé au sein du liquide synovial de patients atteints d'arthrose (Im *et al.*, 2007 ; Yan *et al.*, 2011).

### b. L'hypoxie.

Le cartilage est en permanente interaction avec les tissus qui l'entourent. De part et d'autre, il est en contact direct avec le liquide synovial et l'os sous-chondral. Cette situation a une influence dans le contrôle de son homéostasie. Il existe des échanges hormonaux entre le cartilage, la zone hypertrophique et l'os sous-chondral. Mais le principal impact vient du liquide synovial. Du fait de la non vascularisation du tissu, l'apport en glucide et en oxygène se fait par diffusion hydrique du liquide synovial vers le cartilage. Ainsi, un gradient de concentrations s'impose au sein du tissu cartilagineux [Figure 40]. Ce gradient confère au cartilage une physioxie de nature hypoxique allant de 6% à 1% d'oxygène en fonction de la profondeur du cartilage. Souvent, dans la littérature, seule l'influence du liquide synovial est détaillée. Ceci s'explique par un apport mineur en oxygène de la part de l'os sous-chondral, de l'ordre de 10% contre 90% pour

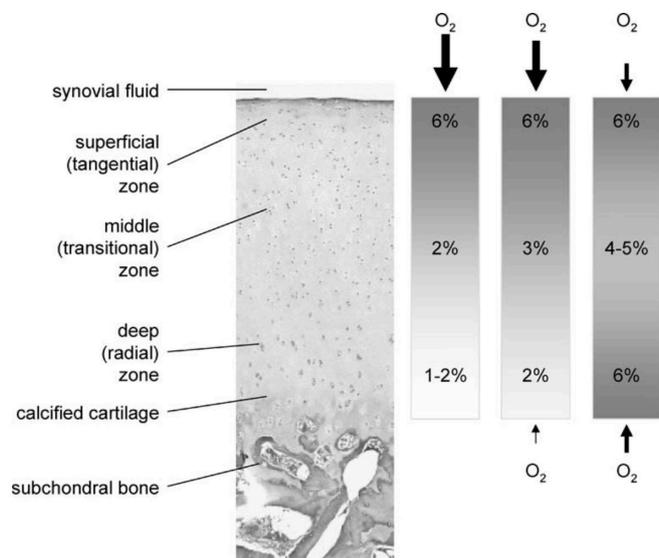


**Figure 40 : Représentation schématique des gradients en nutriments et oxygène au sein du cartilage.**

La concentration en nutriments et en oxygène varie de la surface du cartilage à l'os sous-chondral. Ainsi, ces deux gradients opérant au sein du cartilage imposent un métabolisme particulier au chondrocyte (Blanco *et al.*, 2011).

**Figure 41 : Représentation schématique de trois types supposés de gradients en oxygène.**

L'apport en oxygène au sein du cartilage se fait par le liquide synovial et l'os sous-chondral. Néanmoins, l'implication de l'os sous-chondral reste mineure. La concentration estimée d'oxygène est probablement comprise entre 6% à la surface et 1-2% en profondeur (Gibson *et al.*, 2008).

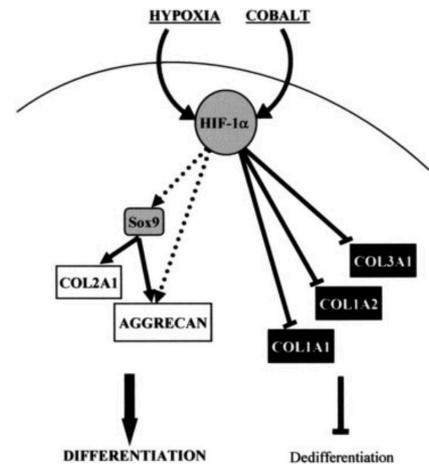


le liquide synovial (Gibson *et al.*, 2008) [Figure 41]. Ainsi, le paramètre hypoxique est prépondérant dans la définition du phénotype du chondrocyte de même que dans l'homéostasie du cartilage.

L'hypoxie provoque une sensibilité accrue des chondrocytes aux radicaux oxygénés mais également aux troubles d'activité mitochondriale (Fermor *et al.*, 2007 ; Blanco *et al.*, 2011). La faible teneur en oxygène oblige le chondrocyte à tirer parti de son activité glycolytique au détriment de la phosphorylation oxydative pour son métabolisme.

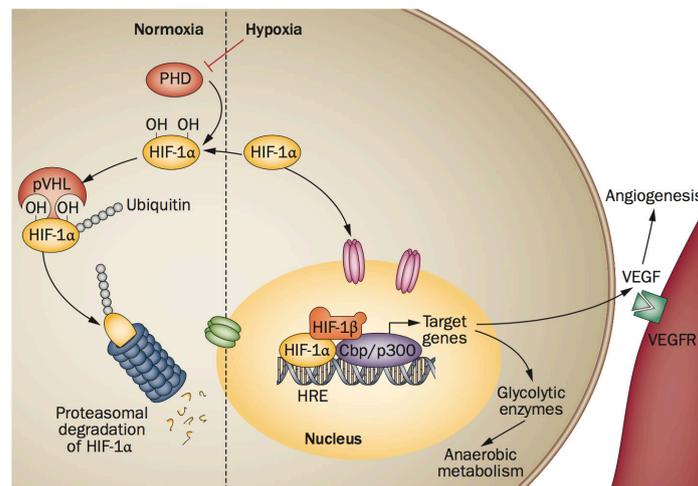
L'acteur principal de la régulation dépendante de l'oxygène est l'« hypoxia-inducible factor - 1 $\alpha$  » Hif-1 $\alpha$  [Figure 42]. Il s'agit d'un facteur de transcription dont la dégradation est dépendante de la concentration en oxygène [Figure 43]. En normoxie, Hif-1 $\alpha$  subit une ubiquitination l'orientant vers une dégradation par le protéasome. A l'inverse, en hypoxie, cette ubiquitination est inhibée. Hif-1 $\alpha$  est alors transloqué dans le noyau et par association avec HIF-1 $\beta$ , il va activer la transcription de gènes « hypoxia response element » (HRE) dépendants. La cible la plus connue de l'action de Hif-1 $\alpha$  est le « Vascular endothelial growth factor » (VEGF) impliqué dans la vascularisation, mais son expression est paradoxalement réprimée dans le cartilage sain adulte (Murata *et al.*, 2008).

Cette hypoxie est tout de même indispensable à la synthèse matricielle du cartilage et à la survie du chondrocyte (Schipani *et al.*, 2001). En effet, les marqueurs du cartilage tels que le collagène de type II et l'agrécan, ainsi que les facteurs de transcription impliqués dans leur synthèse, sont eux mêmes régulés par l'hypoxie *via* l'activité de HIF-1 $\alpha$  (Duval *et al.*, 2009). L'hypoxie possède également un



**Figure 42 : La double fonction d'HIF-1 $\alpha$  chez le chondrocyte.**

HIF-1 $\alpha$  est capable de contrôler le phénotype chondrocytaire en favorisant un phénotype de chondrocyte mature et en inhibant l'expression de marqueurs de dédifférenciation (Duval *et al.*, 2009).



**Figure 43 : Représentation schématisée de l'action d'HIF-1 $\alpha$ .**

HIF-1 $\alpha$  est un facteur de transcription capable de réguler l'expression de gènes cibles. Son action dépend de la concentration oxygène régulant sa dégradation (Maes *et al.*, 2012).

rôle dans la différenciation des CSM de moelle osseuse (CSM-MO) en chondrocytes matures (Galera *et al.*, 2012).

Ainsi, l'homéostasie du cartilage s'assimile à une capacité du chondrocyte à percevoir et à répondre aux facteurs micro-environnementaux. L'homéostasie du cartilage

**est un équilibre fragile. L'impact de chaque facteur peut être modulé au cours du temps et en fonction du nombre de facteurs totaux mis en jeu. Les facteurs exogènes et endogènes au tissu peuvent également modifier drastiquement cet équilibre. C'est notamment le cas lorsqu'un stress est induit au tissu ou lors de dysfonctionnements cellulaires. Un dérèglement trop profond de l'homéostasie du cartilage aboutit à une perte totale et inéluctable de cette dernière et engendre un contexte pathologique.**

# **Chapitre 2. Les affections du cartilage articulaire : de la pathologie à l'ingénierie tissulaire du cartilage.**

---

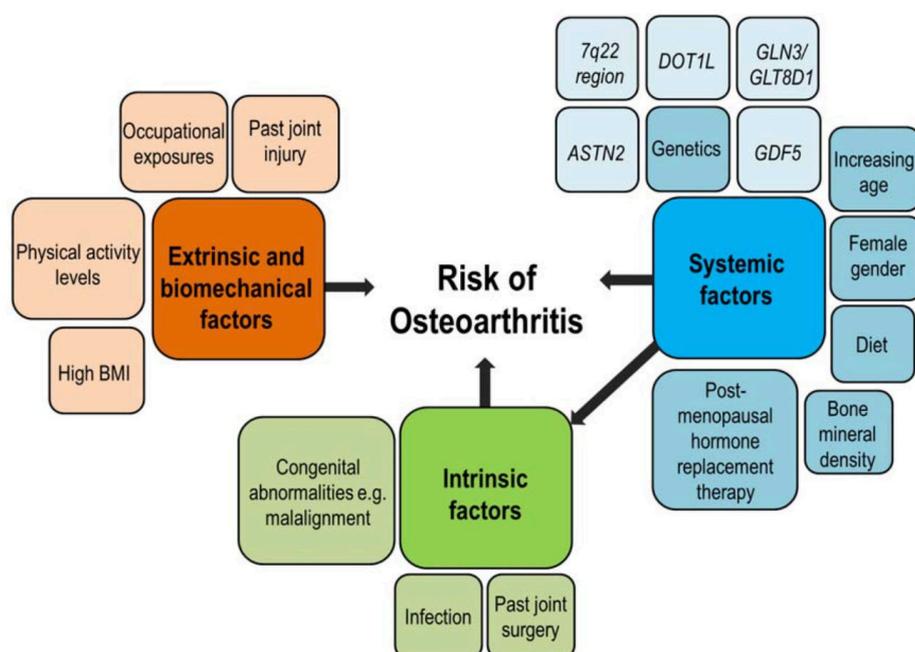
# Chapitre 2. Les affections du cartilage articulaire : de la pathologie à l'ingénierie tissulaire du cartilage.

## I. Le cartilage articulaire pathologique.

Le cartilage articulaire est la première ligne de résistance aux mouvements et chocs subis par l'articulation. Sa fonction, son intégrité et son activité sont directement dépendantes des facteurs exogènes de l'articulation. Néanmoins, des facteurs intrinsèques à l'organisme peuvent influencer le devenir du tissu.

L'impact sur le cartilage de ces deux types de facteurs est étroitement dépendant des contextes environnementaux et sociaux dans lesquels se trouve l'organisme. L'intégrité du cartilage est ainsi dépendante de l'environnement (facteurs biotiques et abiotiques) de l'organisme, des propres caractéristiques de son cartilage et de la sollicitation de celui-ci au cours de la vie de l'organisme.

Ainsi, la compréhension des affections touchant ce tissu nécessite de mettre en relation les facteurs intrinsèques et extrinsèques avec les mécanismes biologiques et moléculaires qui régissent l'homéostasie du cartilage [Figure 44].



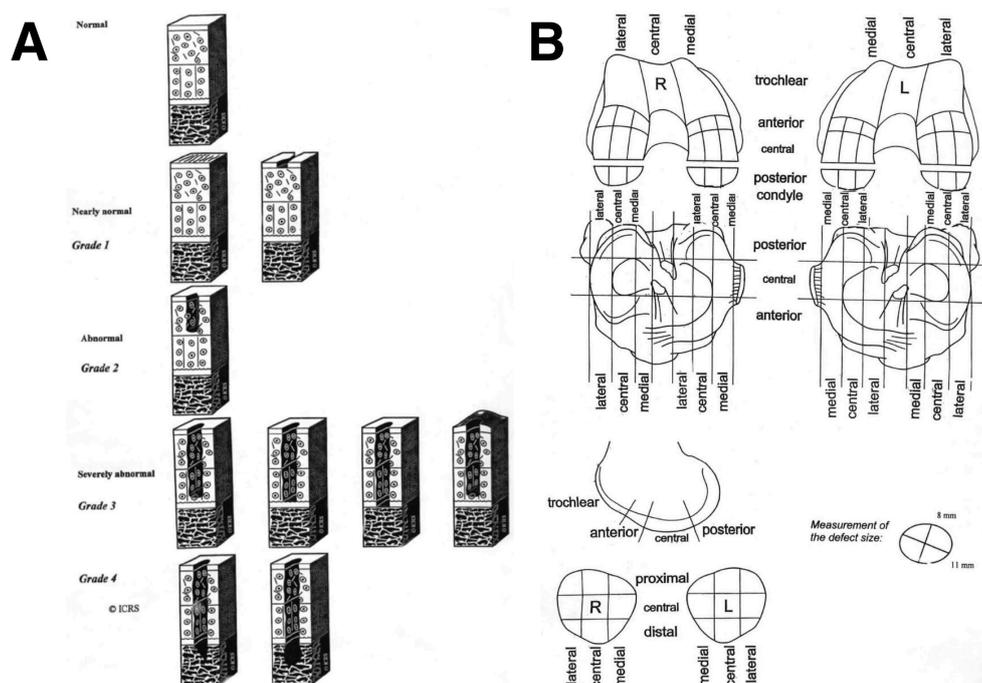
**Figure 44 : Les facteurs de risque de l'arthrose.**

L'émergence de l'arthrose dépend de facteurs intrinsèques et extrinsèques. L'influence de ces facteurs est également dépendante de facteurs systémiques (Warner & Valdes, 2016).

## C. Les atteintes cartilagineuses : causes et conséquences chez l'Homme et le cheval.

Les atteintes du cartilage sont en grande majorité physiques et directement liées aux contraintes mécaniques. Elles sont soit accidentelles, soit provoquées par l'activité articulaire sur le long terme. La gravité des atteintes est généralement déterminée par la douleur générée *a posteriori*. Le cartilage articulaire étant non-innervé, cette douleur vient de l'os sous-chondral. Ainsi, il est important d'ajouter une notion de « profondeur » lors que l'on traite des atteintes cartilagineuses.

Afin d'envisager une évaluation des atteintes cartilagineuses, une classification des lésions chondrales a été mise en place. Néanmoins, la difficulté diagnostic, l'impact hétérogène et la difficulté d'appréciation des lésions rend difficile une homogénéité des classifications. Chez l'Homme, c'est ainsi que sur 60 publications scientifiques, 52 systèmes de mesure ont été utilisés, rendant difficile l'harmonisation des résultats cliniques au niveau international (Oakley & Lassere, 2003). Néanmoins, entre 2002 et 2007, une classification validée par l'« International Cartilage Research Society » (ICRS) a vu le jour (van den Borne *et al.*, 2007). Elle se base à la fois sur la profondeur de la lésion du cartilage mais également sur sa localisation au niveau de la surface articulaire. De ce fait, ce dernier paramètre prend en compte l'hétérogénéité de la portance de la surface cartilagineuse pour la classification des lésions (Brittberg & Winalski, 2003) [Figure 45].



**Figure 45 : La classification des lésions chondrales par l'ICRS.**

Ces classifications des lésions chondrales se basent à la fois sur la taille et la profondeur de la lésion cartilagineuse (A) ainsi que sur sa localisation au niveau de la surface articulaire (B) (Brittberg & Winalski, 2003).

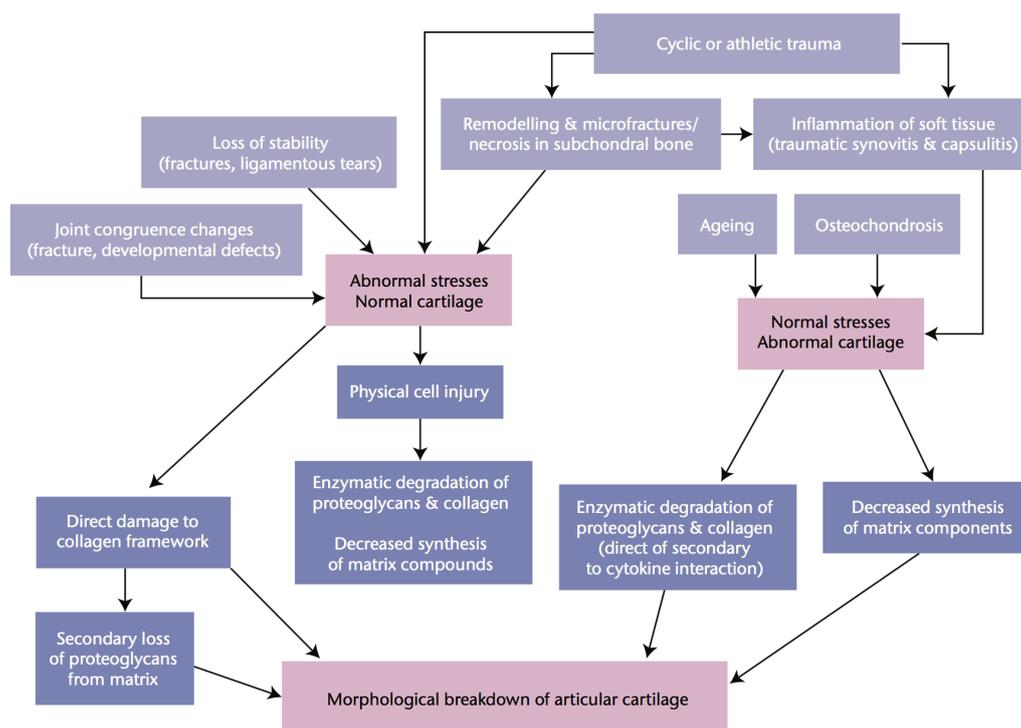
Même si beaucoup d'efforts ont été consacrés à l'évaluation de ces deux derniers paramètres, la difficulté du diagnostic persiste. En effet, se pose la question du caractère asymptomatique des lésions mineures. Seul des examens préventifs peuvent les mettre en évidence par imagerie ou scanner au niveau de la surface articulaire. Pourtant ces lésions mineures, bien qu'asymptomatiques dans un premier temps, ne sont pas à négliger puisqu'à long terme, elles feront le nid de l'arthrose.

Nous avons vu précédemment la particularité du cartilage à ne détenir qu'une très faible proportion de cellules peu prolifératives. Ainsi, des lésions focales cartilagineuses ne sont que peu résorbées par les propriétés de réparations intrinsèques du cartilage. Pire encore, la succession de telles lésions au cours de la vie d'un sujet peut laisser émerger un contexte inflammatoire généralisé au sein de l'articulation, modifiant drastiquement la physiologie du cartilage et des tissus avoisinants.

De ce fait, le cartilage articulaire détient en quelques sortes un capital de résistance aux traumatismes. Ce capital s'amenuise par la sollicitation de l'articulation au cours de la vie et de l'activité du sujet.

Ainsi, l'ensemble des facteurs pouvant porter atteinte au cartilage articulaire sont nommés facteurs de risque.

Chez le cheval, comme cité précédemment, beaucoup de similarités avec l'Homme ont été observées d'un point de vue physiologique. De même, le cartilage articulaire équin subit des contraintes physiques comparables à celles du cartilage humain, quoique exacerbées par rapport à la taille de l'animal [Figure 46]. Ainsi, l'activité sportive du cheval de course est tout à fait comparable à celle d'un athlète humain de haut niveau. Un cheval de trait implique des forces de résistance énormes appliquées aux articulations et aux muscles. L'intérêt économique dans la filière équine contraint souvent l'organisme équin à accuser des charges et des contraintes mécaniques anormales, associées à des sollicitations trop régulières et trop lourdes de l'articulation, sans repos ou prise en charge.



**Figure 46 : Les évènements survenant suite à un traumatisme du cartilage et menant à la dégradation du cartilage.**  
(McIlwraith *et al.*, 2012).

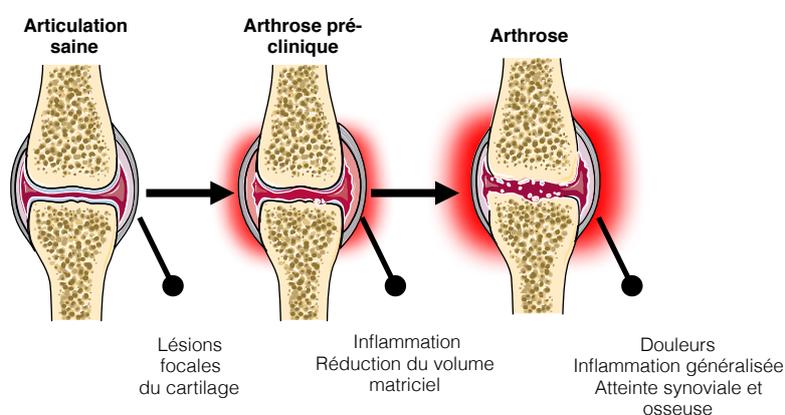
Une évolution anormale de l'atteinte articulaire peut notamment être observée chez le cheval athlète. Suite aux sollicitations physiques cycliques de l'articulation, des inflammations (dites primaires) des tissus avoisinants (capsule synoviale, os sous-chondral) peuvent être observées. Ces dernières peuvent alors générer une inflammation dite secondaire du cartilage

menant à un stade pathologique (McIlwraith & Frisbie, 2012). De ce fait, comme chez l'athlète humain, certains événements pathologiques peuvent être chronologiquement inversés.

## D. L'arthrose : une arthropathie dégénérative chronique.

Les capacités de réparation tissulaire du cartilage, la répétition de traumatismes, la prise en charge tardive et la sur-sollicitation de l'articulation engendrent un contexte inflammatoire au sein de l'articulation. Cette inflammation, par le biais de cytokines, va modifier drastiquement l'homéostasie du cartilage. Cette perte d'homéostasie engendre une réduction de la qualité et du volume matriciel du cartilage aboutissant à une dégénération du tissu. Cette maladie, nommée arthrose, génère de fortes douleurs et comporte une importante prévalence chez l'Homme et chez le cheval [Figure 47]. Elle est multifactorielle mais aussi étroitement liée à l'âge de l'individu.

L'émergence du contexte arthrosique résulte de deux processus : une forme mécanique dépendante d'une surpression sur le cartilage sain et une forme structurale (souvent liée à l'âge) liée à la faible capacité de résistance intrinsèque du cartilage d'origine ne pouvant assurer pleinement son rôle face à des pressions normales.



**Figure 47 : Diagramme de l'évolution de l'arthrose.**

L'arthrose est une maladie dégénérative touchant le cartilage. Elle émerge suite à une succession de traumatismes du cartilage et évolue vers une dégradation inéluctable du tissu cartilagineux ([www.servier.fr](http://www.servier.fr)).

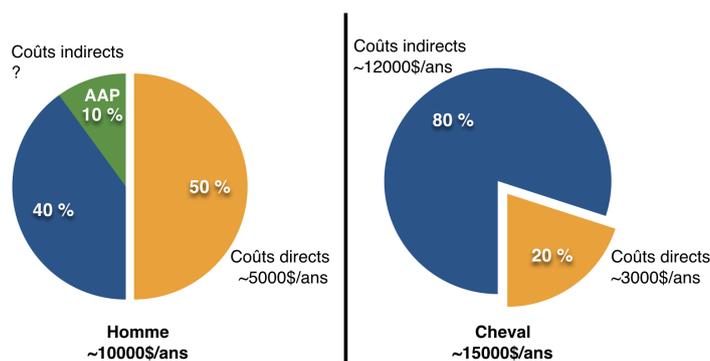
## E. L'épidémiologie et le coût économique de l'arthrose chez l'humain et chez l'équidé.

Chez l'Homme, le surpoids, l'âge et les pratiques sportives intensives sont les premières causes d'atteintes cartilagineuses et d'arthrose (Brandt *et al.*, 2008). D'autres facteurs de risque ont été décrits comme des causes génétiques ou les désordres hormonaux (comme par exemple lors de la ménopause). L'arthrose est un problème majeur de santé publique humaine. On estime que 70 à 80% des personnes âgées de 60 à 80 ans sont touchées par cette arthropathie. On estime à 100 millions, le nombre de personnes touchées par l'arthrose en Europe (Altman *et al.*, 2006). En 2001, le coût de l'arthrose pour la société française s'est élevé à 1,64 milliard d'euro (Le Pen *et al.*, 2005). Elle représente ainsi la maladie au plus fort taux de morbidité au monde.

Chez le cheval, l'arthrose a été pour la première fois caractérisée en 1938 (Callender & Kelser, 1938). Selon une étude américaine, elle représente 60% des causes de boiterie et affecte ainsi plusieurs millions d'individus aux Etats-Unis (Oke & McIlwraith, 2010). Ainsi, elle représente l'une des principales causes d'arrêt de carrière dans le monde sportif que cela soit en concours de saut d'obstacles, courses de galop ou de trot. A ce jour, aucun traitement durable de l'arthrose n'est disponible sur le marché. Ainsi, les chevaux atteints d'arthrose voient leur carrière s'arrêter prématurément et de façon irrémédiable. Ce manque à gagner provoque un important déficit

financier pour la filière équine. A titre d'information, on estime à 10,49 milliards d'euros les flux financiers générés par les courses hippiques dans la filière équine en France, dont 90% correspondent aux paris sportifs (Chiffres de l'Institut Français du Cheval et de l'Equitation (IFCE) de 2014). La perte de gains sportifs représente ainsi un des coûts indirects de l'arthrose équine qui englobe également la perte d'emploi et l'absence de bonne prise en charge vétérinaire (diagnostics faussés). Le coût direct, quant à lui, représente les dépenses en soins à apporter au cheval (consultations, dispositifs médicaux et prescriptions médicamenteuses). On estime à 3000 \$ par an les coûts directs de l'arthrose pour un cheval et à 15000 \$ par an la globalité des coûts. Chez l'Homme, le coût direct et indirect s'élève à 10000 \$ par an et par patient (Oke & McIlwraith, 2010) [Figure 48].

Ainsi, l'étude des atteintes cartilagineuses et de l'arthrose représente un fort intérêt économique mais également une nécessité sanitaire et vétérinaire.



**Figure 48 : L'évaluation des coûts de l'arthrose chez l'Homme et le cheval.**

Le coût de l'arthrose se matérialise par des coûts directs (prix de la médication, coûts des consultations ou coûts des analyses) et des coûts indirects. Chez le cheval, les coûts indirects représentent les manques à gagner, la perte d'emploi, ou encore les faux diagnostics. Chez l'Homme, l'évaluation du coût indirect est imprécise du fait de l'incapacité à évaluer le coût de l'assistance à la personne (AAP) (Oke & McIlwraith, 2010).

## II. L'inflammation et la perte d'homéostasie.

### A. La réponse cellulaire du chondrocyte suite aux traumatismes.

Dès 1742, William Hunter qualifia les dommages subits au cartilage comme étant problématiques du fait de l'incapacité de ce dernier à se régénérer (Hunter, 1742). Ce n'est que bien plus tard que ce constat fût expliqué. Du fait de la faible cellularité du cartilage et du dérèglement phénotypique du chondrocyte, ce dernier va être dans l'incapacité de combler les lésions par un tissu fonctionnel.

Suite aux lésions focales, une première réponse catabolique des chondrocytes peut être observée.

La première étape se traduit d'abord par une dégradation des fines fibres de collagène de type II péri-cellulaire et une augmentation de la synthèse de PG dans l'espace proximal du chondron (McGlashan *et al.*, 2008). Un remaniement péri-cellulaire est réalisé et passe par un remodelage du collagène de type VI qui semble représenter un facteur central dans la réponse proliférative du chondrocyte. En effet, suite à ce remodelage, les chondrocytes vont combler l'espace péri-cellulaire par une augmentation de la synthèse matricielle et de leur prolifération, laissant place à la formation d'un « cluster » de chondrocytes (Söder *et al.*, 2002). Même si ces mécanismes sont décrits dans la littérature, l'implication de cette réponse primaire dans la progression de l'arthropathie reste à élucider. Il est néanmoins important de préciser que la synthèse d'acteurs cataboliques majeurs comme la MMP-13 est dépendante de la signalisation MEC-cellule et de l'activation de récepteurs membranaires comme DDR-2 (Xu *et al.*, 2014).

La modification structurale du chondron implique un changement phénotypique du chondrocyte. Ce dernier va ainsi perdre son rôle de médiateur de l'homéostasie. S'ensuit alors un important bouleversement physiologique du cartilage menant à la dégradation de la matrice cartilagineuse puis à l'arthrose.

A l'échelle du cartilage, la succession de micro-traumatismes engendre la « clustérisation » des chondrocytes, majoritairement au niveau de la surface articulaire, rendant le chondrocyte plus sensible au microenvironnement synovial, que cela soit vis-à-vis des facteurs de croissance, des espèces réactives de l'oxygène ou des cytokines. Avec l'âge, une accumulation de lésions focales va ainsi drastiquement augmenter la sensibilité des chondrocytes aux facteurs extrinsèques. En parallèle, le chondrocyte va surexprimer le TGF- $\beta$ 1 et l'IGF-1 et voit son phénotype se modifier, il va alors synthétiser une MEC altérée. Il commence par synthétiser du collagène de type IIA, de type I et de type III. Ces deux derniers sont atypiques au cartilage hyalin et de nature cassante et fibrotique en comparaison avec la MEC hyaline du cartilage (Miosge *et al.*, 2004). Cette modification qualitative et quantitative de la MEC cartilagineuse se fait au détriment de la synthèse de collagène de type II, et notamment de type IIB. Ce phénomène de dédifférenciation représente une tentative de réparation du cartilage par la cellule. Néanmoins, ce cartilage altéré néo-formé s'érode avec l'activité articulaire, libérant de nombreux fragments collagéniques et de PG au sein du liquide synovial (Demoor *et al.*, 2014 ; Struglics *et al.*, 2006). De surcroît, un phénomène d'apoptose est également observé chez les chondrocytes dès les premiers stades d'arthrose au niveau des clusters, laissant au niveau matriciel des zones vacantes (Lotz *et al.*, 1999).

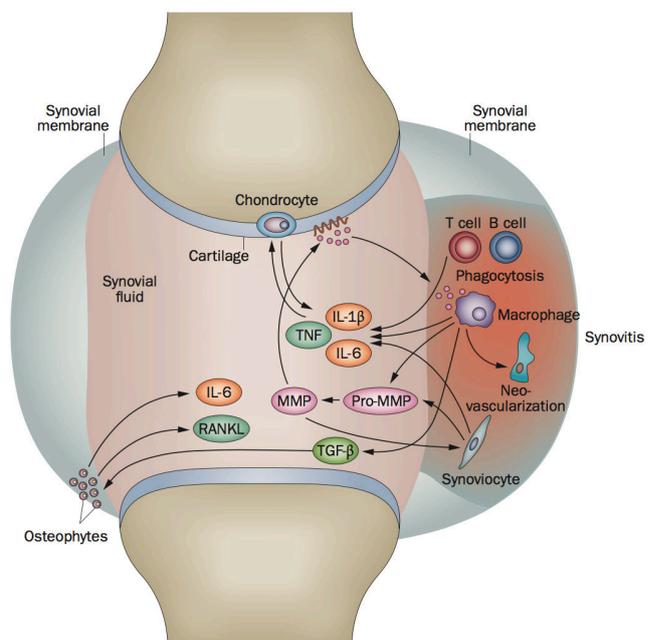
## B. La composante inflammatoire.

Les aspects moléculaires et cellulaires de l'arthrose sont relativement bien renseignés dans la littérature. Néanmoins, la succession des événements menant à cette maladie dégénérative reste incertaine. A l'heure actuelle, il est difficile d'évaluer les facteurs initiateurs de l'arthrose en dehors des facteurs de risque. Tout comme il est difficile de connaître l'impact de l'os sous-chondral et du liquide synovial dans le processus arthrosique pourtant touchés par cette affection.

La seule constante observée au cours de l'arthrose chronique et entre ces différents tissus est une prépondérance de la composante inflammatoire (Lee *et al.*, 2013 ; Chevalier *et al.*, 2013) [Figure 49]. L'inflammation visible à la fois au niveau cartilagineux, synovial et osseux au cours de l'arthrose est le principal perturbateur homéostatique et le médiateur catabolique de la maladie. Cette inflammation est générée à la fois par le système immunitaire et les tissus avoisinants. De ce fait, l'arthrose ne peut être simplifiée à une unique pathologie du cartilage car elle représente plutôt une maladie plus globale touchant plusieurs tissus et organes avec une multitude d'intervenants cellulaires, autres que le chondrocyte.

**Figure 49 : Représentation schématique de l'aspect inflammatoire de l'arthrose.**

Au cours de l'arthrose, des cytokines pro-inflammatoires sont exprimées par les chondrocytes et les autres types cellulaires de l'articulation. Ces cytokines vont participer à la réquisition de cellules immunitaires et aboutir à une inflammation généralisée qui amplifie la dégradation du cartilage (Chevalier *et al.*, 2013).



L'inflammation est gouvernée par les cytokines. Durant le processus arthrosique, de nombreuses cytokines sont sécrétées et jouent chacune un rôle spécifique dans la maladie [Tableau 4]. On distingue néanmoins 3 acteurs majeurs dans la progression de cette arthropathie : l'interleukine 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), l'interleukine 6 (IL-6) et le « Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  » (TNF- $\alpha$ ) (Kapoor *et al.*, 2011).

Suite à un stress biologique ou mécanique, le chondrocyte, les cellules du tissu synovial, de l'os ainsi que les cellules immunitaires sont capables d'exprimer ces cytokines inflammatoires. Elles sont produites à de forts taux dès les premiers stades de l'arthrose. Au cours de cette affection, les récepteurs à IL-1 $\beta$  et au TNF- $\alpha$  sont sur-exprimés à la surface du chondrocyte, ainsi,

l'action de ces cytokines en est exacerbée. Concernant l'IL-6, son activité est dépendante à la fois de la présence de son récepteur membranaire et/ou de son récepteur soluble hautement présent dans le liquide synovial pathologique (Kaneko *et al.*, 2000). L'action de l'IL-1 $\beta$  et du TNF- $\alpha$  passe par plusieurs voies de signalisation intracellulaires (Bottini & Firestein, 2013). Parmi elles, la voie « nuclear factor-kappa B » (NF- $\kappa$ B) est impliquée dans l'expression de facteurs assurant la progression de l'arthrose (Lianxu *et al.*, 2006). Concernant l'IL-6, elle est impliquée dans l'activation de la voie « Janus kinases » / « Signal transducers and activators of transcription » (JAK/STAT) afin de stimuler ou réprimer la transcription de gènes cibles (Legendre *et al.*, 2003).

Sous l'effet de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$ , le chondrocyte voit sa capacité de synthèse matricielle drastiquement réduite et particulièrement l'expression du collagène de type II et de l'agrécan (Saklatvala, 1986 ; Goldring *et al.*, 1994 ; Porée *et al.*, 2008). L'action de ces cytokines va également entretenir l'inflammation issue des cellules et des tissus environnants (Kapoor *et al.*, 2011).

Les cytokines pro-inflammatoires sont les effecteurs primaires du catabolisme du cartilage articulaire. Par leur action, elles forment une boucle d'induction catabolique ayant pour finalité la destruction progressive du tissu sans capacité de rétrocontrôle négatif. C'est la perte inéluctable de l'homéostasie du cartilage.

## C. Le catabolisme et le remodelage de la MEC.

### 1. Le catabolisme au détriment de l'anabolisme.

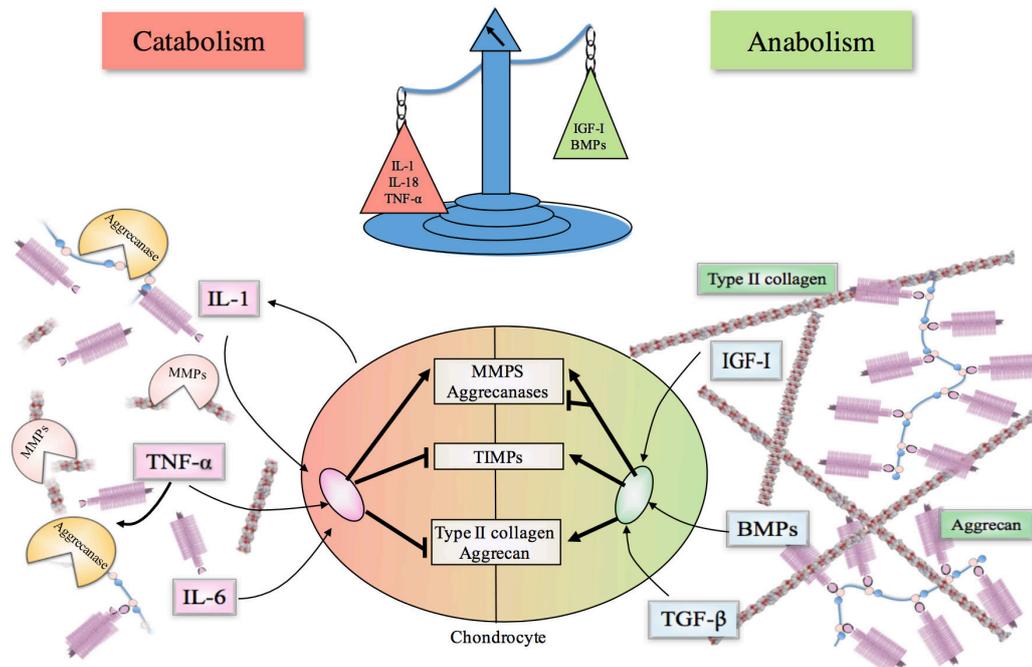
Les transcrits induits par les cytokines inflammatoires sont principalement ceux des ADAMTS et des MMP. L'action de ces protéases sur le chondrocyte, la MEC et les tissus avoisinants provoque une exacerbation de la composante catabolique au détriment de l'anabolisme (Demoor *et al.*, 2014) [Figure 50].

En condition physiologique, l'activité basale des protéases matricielles du cartilage est relativement basse. Au cours de l'arthrose, en parallèle de l'inhibition de la synthèse matricielle, l'expression des acteurs cataboliques est anormalement élevée et aboutit à une dégradation progressive des composants de la MEC cartilagineuse (Lee *et al.*, 2013). Parmi les protéases, on distingue un rôle majeur des MMP-1, -3, -9 et -13 ainsi que des ADAMTS. D'autres protéases au spectre d'action plus large sont également induites au cours de l'arthrose. C'est notamment le cas de la « High-temperature requirement serine protease a1 » (Htra1) (Troeborg & Nagase, 2012).

Inflammatory mediators	Signaling Mediators	Proteases
<ul style="list-style-type: none"> <li>• TNF</li> <li>• IL-1<math>\beta</math></li> <li>• IL-6</li> <li>• IL-8</li> <li>• IL-15</li> <li>• IL-17</li> <li>• IL-21</li> <li>• PGE2</li> <li>• Substance P</li> <li>• NGF</li> <li>• EGF</li> <li>• VEGF</li> <li>• FGF-2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NF<math>\kappa</math>B</li> <li>• ERK1/2</li> <li>• p38</li> <li>• JNK</li> <li>• PKC<math>\delta</math></li> <li>• TLRs</li> <li>• <math>\beta</math>-catenin</li> <li>• Gli1</li> <li>• Ptch</li> <li>• HHIP</li> <li>• HIF-2<math>\alpha</math></li> <li>• iNOS</li> <li>• RUNX2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MMP-1</li> <li>• MMP-3</li> <li>• MMP-9</li> <li>• MMP-13</li> <li>• ADAMTS-4</li> <li>• ADAMTS-5</li> <li>• TACE</li> </ul>

**Tableau 4 : Les principaux facteurs impliqués dans l'arthrose.**

(Lee *et al.*, 2013).



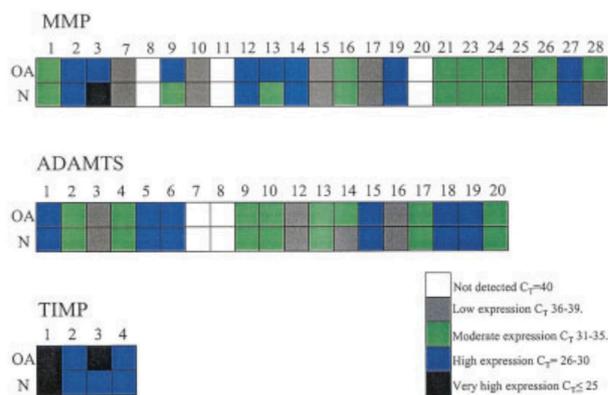
**Figure 50 : Représentation schématique de la régulation de l'homéostasie du cartilage.**

L'homéostasie représente un équilibre biologique entre l'activité anabolique du chondrocyte et l'activité catabolique des protéases matricielles. Au cours de l'arthrose, le catabolisme prend le pas sur l'anabolisme et fait ainsi perdre cet équilibre homéostatique (Demoor *et al.*, 2014).

L'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  sont capables d'induire l'expression des MMP-1, -2, -3, -8, -9, -13 et -17 ainsi que les ADAMTS-4 et -5 ayant pour cible la structure collagénique de la MEC ainsi que les PG et notamment l'agrécane (Tetlow *et al.*, 2001 ; Nagase & Kashiwagi, 2003). D'un autre côté, l'inflammation au sein du cartilage va diminuer d'expression du TIMP-3, permettant ainsi l'action catalytique des protéases (Kevorkian *et al.*, 2004) [Figure 51].

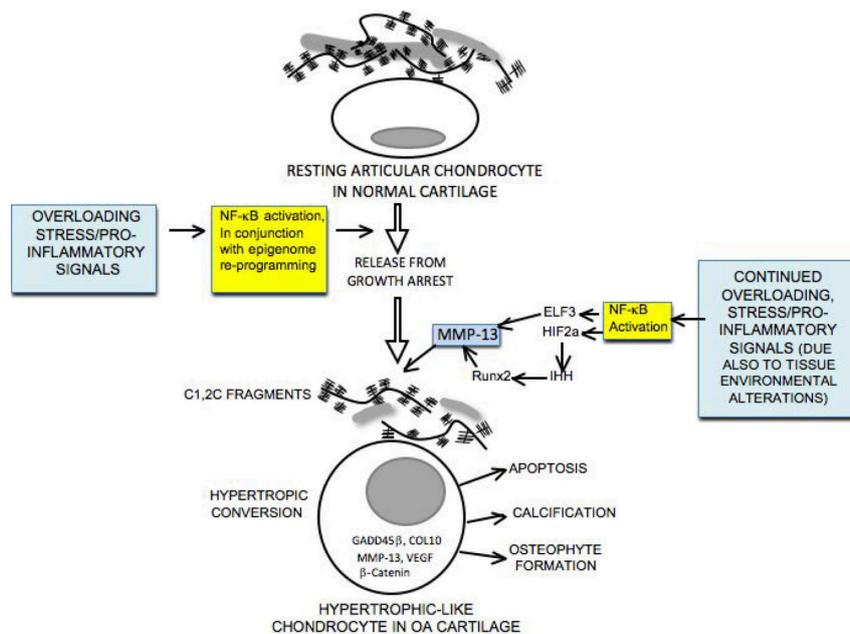
La libération des fragments de dégradation de la MEC va jouer un rôle d'amplificateur du signal inflammatoire. L'apport en acteurs cataboliques n'est pas restreint au chondrocyte. Dans ce cadre, les synoviocytes présents dans la membrane synoviale, les ostéoblastes et les macrophages vont pousser le catabolisme du cartilage à son paroxysme.

Alors que le rôle du chondrocyte hypertrophique dans la progression de l'arthrose est sujet à débat, un marqueur pré-hypertrophique représente un inducteur majeur de l'arthrose. Il s'agit de la MMP-13. Cette MMP, dont la synthèse est dépendante de l'activation de la voie du NF- $\kappa$ B, est la principale responsable de la dégradation du collagène de type II. Elle est surexprimée par les chondrocytes sous l'effet de contraintes mécaniques, oxiques, inflammatoires et par l'absence de contact avec la matrice péricellulaire du chondrocyte. Elle pourrait jouer



**Figure 51 : Etude de la transcription des gènes des protéases matricielles et de leurs inhibiteurs.**

Au cours de l'arthrose (OA), il a été constaté qu'il y avait une sur-expression des acteurs cataboliques tels que certaines MMP et ADAMTS. En parallèle, une sous-expression de TIMP-3 est également observée en comparaison avec le cartilage normal (N) (Kevorkian *et al.*, 2004).



**Figure 52 : Implications de MMP-13 et de la voie NF-κB dans l'hypertrophie du chondrocyte.**

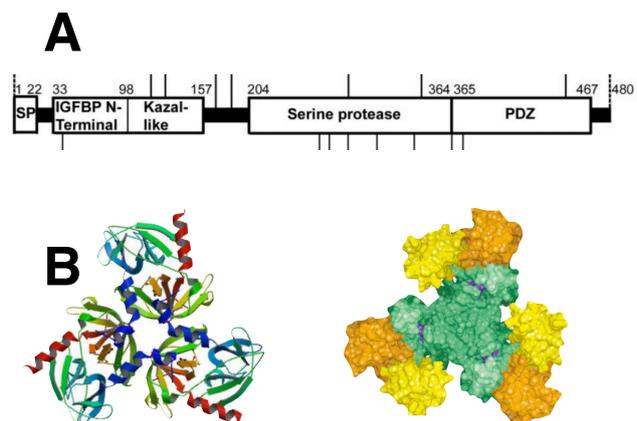
La voie de signalisation NF-κB est une voie majeure sollicitée par le microenvironnement inflammatoire ou lors de stress mécaniques du chondrocyte. Cette voie est capable d'induire l'expression de MMP-13 qui va alors dégrader la matrice proximale du chondrocyte. Cette perte de contact cellules-MEC va aboutir à la modification phénotypique du chondrocyte qui se transforme en chondrocyte hypertrophique (Goldring *et al.*, 2011).

un rôle dans la priorisation du phénotype pré-hypertrophique des chondrocytes au cours de l'arthrose, dans l'apoptose de ces derniers et dans la calcification du cartilage arthrosique (Goldring *et al.*, 2011) [Figure 52].

## 2. « High-temperature requirement serine protease a1 ».

Htra1 a été caractérisée initialement chez les bactéries comme étant une protéase à sérine [Figure 53]. Elle est beaucoup étudiée en cancérologie car elle est impliquée dans la malignité tumorale ainsi que dans la dégénérescence maculaire (Chien *et al.*, 2004 ; Yang *et al.*, 2006). Il a été montré qu'Htra1 était surexprimée dans les désordres musculo-squelettiques et qu'elle pourrait jouer un rôle dans l'émergence des affections touchant ces tissus (Tiaden & Richards, 2013) [Figure 54]. Elle a également un impact sur la différenciation cellulaire et la formation de la matrice calcifiée lors de l'ossification endochondrale (Tiaden *et al.*, 2012).

Au cours de l'arthrose, cette protéase à sérine est surexprimée (Grau *et al.*, 2006). Elle a pour substrat un large spectre de protéines matricielles comme la fibronectine, la décorine, le biglycan, l' « Integrin-binding sialoprotein » (IBSP), la fibromoduline, l'agrécan et les collagènes (Murwantoko *et al.*, 2004). Elle est ainsi capable de dégrader à la fois la matrice péri-cellulaire du

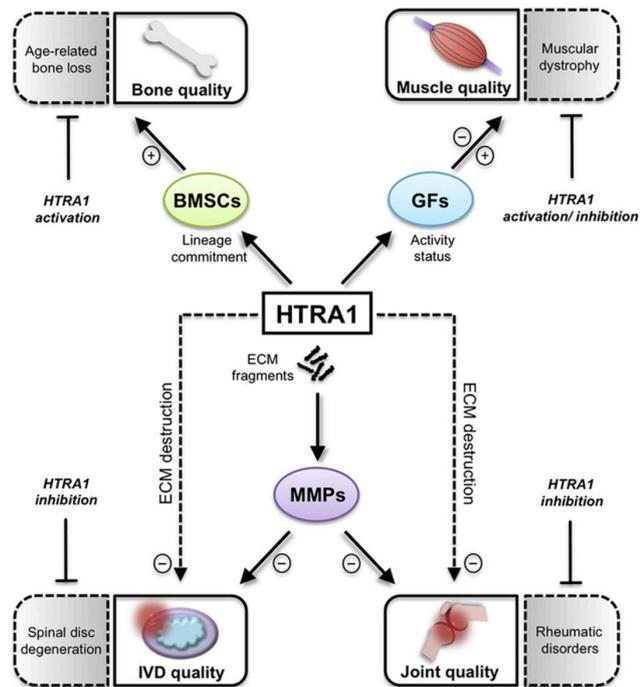


**Figure 53 : Structure moléculaire d'Htra1.**

Le gène *Htra1* code pour une protéase à sérine capable de dégrader plusieurs substrats *via* l'action de son domaine catalytique. (A) : domaines protéiques d'Htra1, (B) : structure protéique 3D d'Htra1 (Goldring *et al.*, 2011).

**Figure 54 : Rôle d'Htra1 dans les désordres squelettiques.**

Outre sa fonction catalytique, Htra1 semble avoir un rôle plus vaste dans la biologie de l'ensemble des tissus squelettiques. Elle est notamment impliquée dans les affections touchant ces tissus (Tiaden & Richards, 2013).



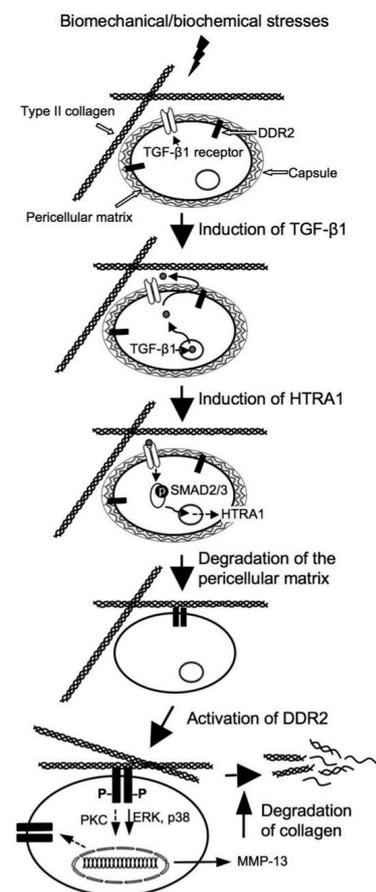
chondrocyte et le reste de la matrice cartilagineuse. Son implication n'est néanmoins pas limitée à la dégradation de la MEC. En effet, elle est également capable de dégrader les récepteurs de la famille des TGF- $\beta$ . Au niveau du chondrocyte et du lignage chondrocytaire, elle pourrait ainsi avoir un rôle dans la signalisation médiée par les TGF- $\beta$  et les BMP, faisant perdre la réponse cellulaire vis-à-vis de ces facteurs de croissance (Oka *et al.* 2004).

Dans la physiopathologie du cartilage, elle est impliquée dans l'expression de la MMP-13. Il a été montré qu'Htra1 était surexprimée sous l'effet du TGF- $\beta$ 1 chez le chondrocyte. *Via* l'activité catabolique d'Htra1, la dégradation de la matrice péri-cellulaire du chondrocyte permet le contact du récepteur membranaire DDR-2 avec la matrice collagénique. *Via* l'activation de ce récepteur, le chondrocyte va alors exprimer la MMP-13 (Xu *et al.*, 2014) [Figure 55].

### 3. Le collagène de type I.

Le collagène de type I est un collagène fibrillaire constitué de 2 chaînes  $\alpha$ 1(I) et d'une chaîne  $\alpha$ 2(I) respectivement codées par les gènes *Col1a1* et *Col1a2*. Il est le constituant principal de la matrice des tissus conjonctifs et est majoritairement retrouvé dans la peau et l'os. Il assure un rôle de soutien et de résistance. Néanmoins, à la différence du collagène de type II, il ne possède pas les mêmes propriétés biomécaniques.

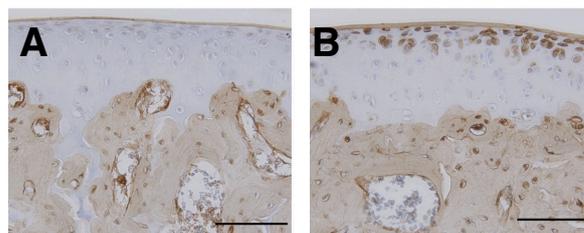
Au cours de l'arthrose, il a été montré que le chondrocyte voyait son phénotype et son profil d'expression modifié. Cette modification peut passer par une expression du collagène de type I. Durant le processus arthrosique, les chondrocytes expriment



**Figure 55 : Implication d'Htra1 dans le changement phénotypique du chondrocyte.**

Htra1 est capable d'induire l'expression de marqueurs hypertrophiques en favorisant l'interaction des récepteurs DDR2 par la dégradation de la matrice péri-cellulaire (Xu *et al.*, 2014).

fortement le gène *Col1a1* au niveau des clusters chondrocytaires (Martin *et al.*, 2001 ; Aigner *et al.*, 1993). Il a été montré que dans des modèles d'arthrose expérimentale, que les chondrocytes situés dans la zone tangentielle et transitionnelle expriment d'importantes quantités de collagène de type I (Moriyama *et al.*, 2008 ; Hagiwara *et al.*, 2010) [Figure 56]. La problématique posée par le collagène de type I est due au fait que, conjugué à une baisse de la synthèse de collagène de type II, la matrice néo-formée est de nature fibrotique et incapable de résister aux forces de tension. De ce fait, cette matrice est nommée fibrocartilage et implique une modification des propriétés biomécaniques du cartilage hyalin. Néanmoins, son rôle dans la progression de l'arthrose reste controversé (Hagiwara *et al.*, 2010). L'expression du collagène de type I est également visible lors de l'ossification endochondrale et de la réparation osseuse à proximité des chondrocytes au niveau du cal osseux (Yang *et al.*, 2014).



**Figure 56 : Marquage du collagène de type I sur une coupe histologique de cartilage sain (A) et de modèle d'arthrose expérimentale (B).**

Au cours de l'arthrose expérimentale, le collagène de type I est localement sur-exprimé par les chondrocytes et notamment au niveau de la zone tangentielle (souris de 12 semaines) (Moriyama *et al.*, 2008).

L'ensemble des modifications physiologiques du cartilage au cours de l'arthrose induisent la perte de son rôle premier : la résistance aux chocs et la protection des tissus squelettiques au cours du mouvement. Lors qu'il est détérioré, l'os sous-chondral peut être à la fois exposé aux frottements articulaires mais également à l'inflammation persistante. A la différence du cartilage et tout comme la membrane synoviale, l'os est innervé. Les stades tardifs d'arthrose génèrent ainsi de vives douleurs chroniques. Malheureusement, ces douleurs articulaires sont généralement les premiers symptômes observés chez le cheval, *via* l'émergence de boiteries handicapantes. Ce constat fait de l'arthrose une maladie chronique dont le dépistage est toujours trop tardif.

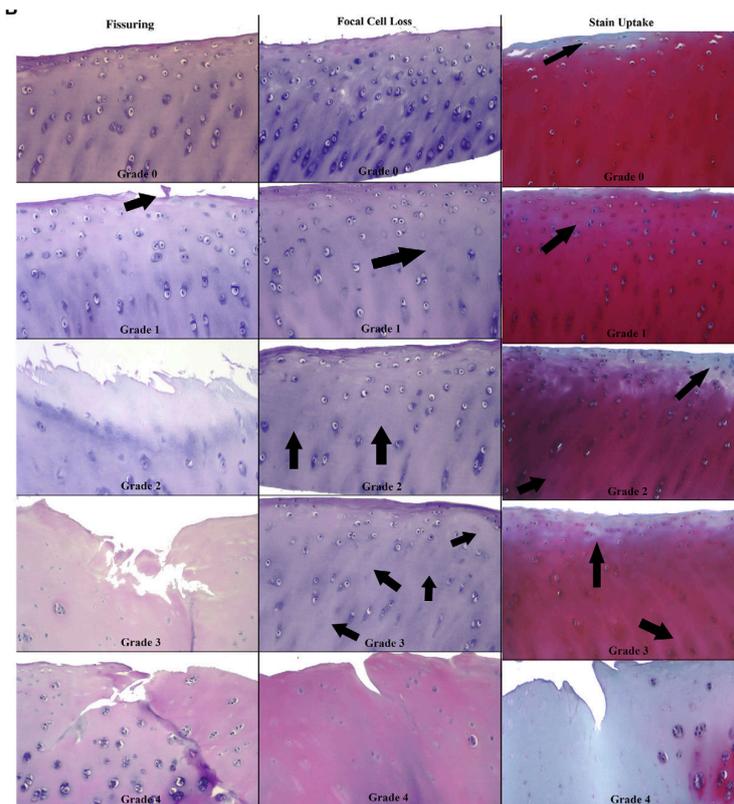
## **D. Les traitements de l'arthrose dans les modèles humain et équin.**

### **1. Le diagnostic de l'arthrose.**

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement durable de l'arthrose. Ceci est en partie dû au caractère multifactoriel de la maladie (versant dégénératif et inflammatoire) mais également à l'absence de diagnostic précoce.

Chez l'Homme, ce diagnostic peut être réalisé par radiographie, échographie, arthroscopie ou imagerie par résonance magnétique (IRM). Néanmoins, les observations morphologiques spécifiques du cartilage arthrosique permettent uniquement le constat des modifications pathologiques très avancées du cartilage ou de l'os : ostéophytes, amincissement du volume matriciel, zones de contact, vascularisation et/ou épanchement synovial [Figure 57]. Seuls des diagnostics préventifs suite à des accidents ou des affections secondaires de l'articulation (tendinites, rupture des ligaments ou inflammations primaires) peuvent permettre un diagnostic précoce. Néanmoins, uniquement les lésions macroscopiques restent observables et détectables.

D'autres techniques diagnostiques quantitatives peuvent être utilisées par le biais de l'utilisation de biomarqueurs. Il est ainsi possible de quantifier, par dosage sérique, la présence de télépeptides C-ter de collagène de type II et de télépeptides N-ter de collagène de type I libérés au cours du processus arthrosique. Néanmoins, il est impossible de déterminer une réelle localisation et les seuils de détection du dosage demeurent trop élevés, témoignant d'une arthrose à un stade tardif.



**Figure 57 : Classification et évaluation des grades d'arthrose chez le cheval.**

Exemple de colorations histologiques (éosine/ hématoxyline (H&E) et safranine-O (OS)) pour l'évaluation de l'arthrose équine. On y distingue les différents grades d'arthrose (1-4) ainsi que le caractère étudié comme les fissures et la perte cellulaire (H&E) ou l'intensité de coloration d'OS (McIlwraith *et al.*, 2010).

Chez le cheval, la morphologie de l'animal apporte une autre contrainte par la rareté du matériel d'imagerie mis à disposition pour l'éleveur. De plus, les symptômes sont plus difficiles à évaluer car ils demandent une attention toute particulière de la part du propriétaire ou du vétérinaire. Ainsi, il est nécessaire d'observer le plus rapidement possible des symptômes de défauts d'aplomb, de zones de chaleur articulaire, des gonflements, des déformations structurales de l'articulation, des stades précoces d'ankyloses ou encore une boiterie.

## 2. Les traitements médicamenteux et préventifs de l'arthrose.

Le traitement de l'arthrose n'est que symptomatique et palliatif. Il n'existe pas de traitement capable de traiter durablement l'arthropathie par inversion ou par arrêt de la dégénérescence du cartilage articulaire.

Les versants touchés par les traitements sont presque exclusivement restreints au caractère inflammatoire et aux douleurs chroniques. Ainsi, le traitement de l'arthrose passe essentiellement par la prescription d'antalgiques et d'anti-inflammatoires (Felson, 2006) [Tableau 5]. D'autres traitements comme les injections intra-articulaires de molécules assurant la lubrification ou encore les lavages synoviaux montrent une efficacité sur le court terme, constaté par le ralentissement de la dégénération tissulaire.

Chez le cheval, la majorité des traitements passe par l'administration d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, les « Nonsteroidal anti-inflammatory drugs » (NSAID). Ils jouent un rôle analgésique et anti-inflammatoire en diminuant l'action des chimiokines capables de mobiliser la réponse inflammatoire primaire. Outre les effets secondaires des NSAID, leur principale limite est une forte toxicité lorsque ces derniers sont mal dosés. L'« interleukin receptor antagonist protein »

Table 2. Pharmacologic Treatment for Osteoarthritis of the Knee.		
Treatment	Dosage	Comments
Acetaminophen	Up to 1 g 4 times a day	Patients with liver disease or alcoholism should avoid. Prolongs half-life of warfarin.
NSAIDs*		
Naproxen	375–500 mg twice a day	Take with food. High rates of gastrointestinal side effects, including ulcers and bleeding, occur. Patients at high risk for gastrointestinal side effects should also take either a proton-pump inhibitor or misoprostol.† There is an increased concern about side effects (gastrointestinal or bleeding) when taken with acetylsalicylic acid. Can also cause edema and renal insufficiency.
Salsalate	1500 mg twice a day	
Ibuprofen	600–800 mg 3 to 4 times a day	
Cyclooxygenase-2 inhibitors		
Celecoxib	100–200 mg per day	High doses are associated with an increased risk of myocardial infarction and stroke. Can cause edema and renal insufficiency.
Glucosamine	1500 mg per day	Side effects are similar to those with placebo.
Chondroitin	1200 mg per day	Side effects are similar to those with placebo.
Opiates	Various	Common side effects include dizziness, sedation, nausea or vomiting, dry mouth, constipation, urinary retention, and pruritus. Respiratory and central nervous system depression can occur.
Capsaicin	0.025–0.075% cream 3 to 4 times a day	Can irritate mucous membranes.
Intraarticular injections		
Hyaluronic acid	Varies from 3 to 5 weekly injections, depending on preparation	Mild to moderate pain at injection site.
Steroids		

**Tableau 5 : Les traitements pharmacologiques utilisés pour l'arthrose humaine.**  
(Felson, 2006).

(IRAP) est un traitement visant à court-circuiter la signalisation inflammatoire médiée par les interleukines. Il est régulièrement utilisé pour limiter le caractère inflammatoire de la maladie. L'injection intra-articulaire de glucocorticoïdes est également employée pour son effet anti-inflammatoire mais son utilisation tend à diminuer et à être remplacée par l'injection intra-articulaire d'acide hyaluronique (Goodrich & Nixon, 2006).

Chez l'équidé, le marché des traitements préventifs est en pleine expansion. Il s'agit principalement de la prise de compléments alimentaires. Une attention particulière est consacrée à l'alimentation équine dans le cadre de son activité sportive. L'impact de l'alimentation, des nutriments et des compléments alimentaires sur les performances sportives sont des pratiques populaires dans la filière équine. Il est montré que 34% des compléments alimentaires vendus aux Etats-Unis sont à visée préventive et curative des affections de l'articulation équine (Oke & McIlwraith, 2010).

L'ensemble des traitements connus à ce jour ne permet pas de traitement durable de l'arthrose. Le caractère dégénératif n'est que très peu impacté par les traitements conventionnels et totalement délaissé chez le cheval.

Néanmoins, des progrès significatifs sont réalisés chez l'Homme et le cheval dans l'utilisation de médicaments de thérapie innovante (MTI). Ils ont émergé chez l'Homme avec la mosaïque-plastie ayant pour principe d'implanter des carottages cartilagineux issus de zones non portantes de l'articulation sur des zones atteintes d'arthroses (préalablement débridées). L'un des premiers MTI ayant vu le jour dans le cadre de la thérapie du cartilage est une technique de thérapie cellulaire. Il s'agit de la technique de TCA initiée chez l'Homme et désormais applicable chez le cheval.

# **Chapitre 3. Le chondrocyte et la transplantation de chondrocytes autologues : « un gold standard » .**

---

# Chapitre 3. Le chondrocyte et la transplantation de chondrocytes autologues : « un gold standard ».

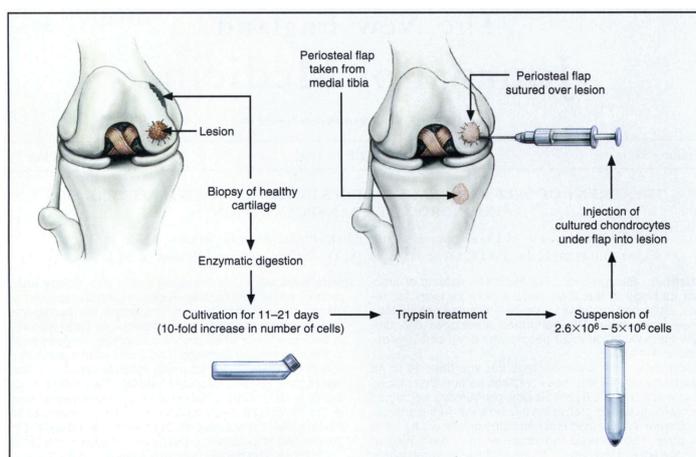
## I. Le principe de la TCA.

La TCA a pour vocation à remplacer une zone cartilagineuse détériorée ou perdue suite à un important traumatisme par un néo-cartilage. Ce dernier est généré à partir des chondrocytes de l'individu. Initialement décrite comme une approche de thérapie cellulaire, elle a progressivement évolué vers une thérapie d'IT.

### A. Les origines de la TCA.

C'est en 1994 que la TCA a été décrite pour la première fois par l'équipe de M. Brittberg. Au préalable, une biopsie du cartilage sur une zone non portante d'un patient est réalisée. Les chondrocytes sont isolés enzymatiquement à partir du prélèvement de cartilage et cultivés *in vitro*.

En parallèle, la zone cartilagineuse portante et macroscopiquement atteinte du même patient est débridée afin d'obtenir une surface opératoire homogène et délimitée. La zone débridée est recouverte par une membrane de périoste par suture. Les chondrocytes amplifiés en culture sont alors récupérés et ré-implantés par injection sous la membrane de périoste suturée (Brittberg *et al.*, 1994). Les chondrocytes issus du patient traité ne sont alors pas rejetés par l'hôte et sont alors capables de synthétiser une nouvelle matrice cartilagineuse [Figure 58]. Des résultats cliniques sur 10 ans montrent une possibilité de traitement sur le long terme des lésions macroscopiquement importantes (supérieures à 4 cm<sup>2</sup>) (Makris *et al.*, 2015). La TCA apporte un bénéfice certain face aux approches de microfracture ou de mosaïque-plastie utilisées auparavant.



**Figure 58 : La technique originale de TCA.**

La TCA consiste à prélever une biopsie de cartilage sain sur une zone non portante de l'articulation. Les chondrocytes sont alors isolés enzymatiquement, amplifiés puis réimplantés sous une membrane de périoste suturée au niveau de la lésion chondrale (Brittberg *et al.*, 1994).

### B. Les limites de la TCA.

La TCA, de part sa conception, présente des limites. Elle nécessite deux arthrotomies représentant des interventions chirurgicales lourdes pouvant endommager l'articulation et le cartilage du patient. La TCA nécessite également une importante période de convalescence allant de 6 à 12 mois. La limite la plus difficile à surmonter est la complexité du processus allant de l'extraction du chondrocyte à son implantation. Enormément d'étapes *in vitro* sont nécessaires à l'obtention d'un inoculum cellulaire viable et fiable. Dès la première génération de TCA, sa

réalisation peut être comparée à un processus de fabrication dont le caractère multiparamétrique implique une forte complexité d'application.

Les premiers retours négatifs de la thérapie ont été rapportés à propos du devenir de l'implant biologique. Dans un premier temps, il a été constaté qu'un des problèmes provenait de la membrane recouvrant les chondrocytes. En effet, après la TCA, la membrane de périoste s'oriente vers l'hypertrophie induisant ainsi la calcification de la surface cartilagineuse limitant à la fois la qualité du cartilage reconstruit et la stabilité du dispositif. Une seconde problématique a également été mise en évidence, la dédifférenciation des chondrocytes.

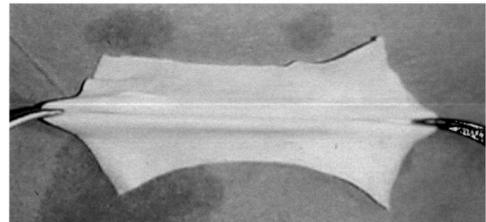
## C. La dédifférenciation chondrocytaire.

La nécessité de disposer d'un grand nombre de cellules (entre 12 et 48 millions) lors de la TCA implique une importante période d'amplification *in vitro* des chondrocytes isolés. Durant cette période d'amplification, il a été montré que les chondrocytes voyaient leur phénotype modifié. Ils acquièrent rapidement une morphologie de type fibroblastique et montrent une capacité de synthèse de collagène de type II et d'agrécanne drastiquement diminuée. De surcroît, le chondrocyte exprime un fibrocartilage composé essentiellement de collagène de type I. Cette modification phénotypique est appelée dédifférenciation chondrocytaire (Benya *et al.*, 1978) (Marlovits *et al.*, 2004). La faible expression des marqueurs cartilagineux et la persistance du collagène de type I conduit *in vivo* à la la génération d'un cartilage de faible qualité biologique par les chondrocytes dédifférenciés (Brittberg, 1999).

## II. De la TCA à la MACI.

### A. La seconde génération de TCA.

C'est pour faire face à ces limites mentionnées auparavant que la TCA a évolué au travers de plusieurs générations. Elle vise à améliorer d'une part, l'intervention chirurgicale par une standardisation et harmonisation de l'opération au sein du corps médical et d'autre part, le remplacement de l'arthrotomie par une arthroscopie. Rapidement, la membrane recouvrant les chondrocytes a été modifiée avec le remplacement de la membrane de périoste par une membrane à deux feuillets de collagène (ChondroGide®) limitant l'hypertrophie de la membrane suturée (Marlovits *et al.*, 2006) [Figure 59].



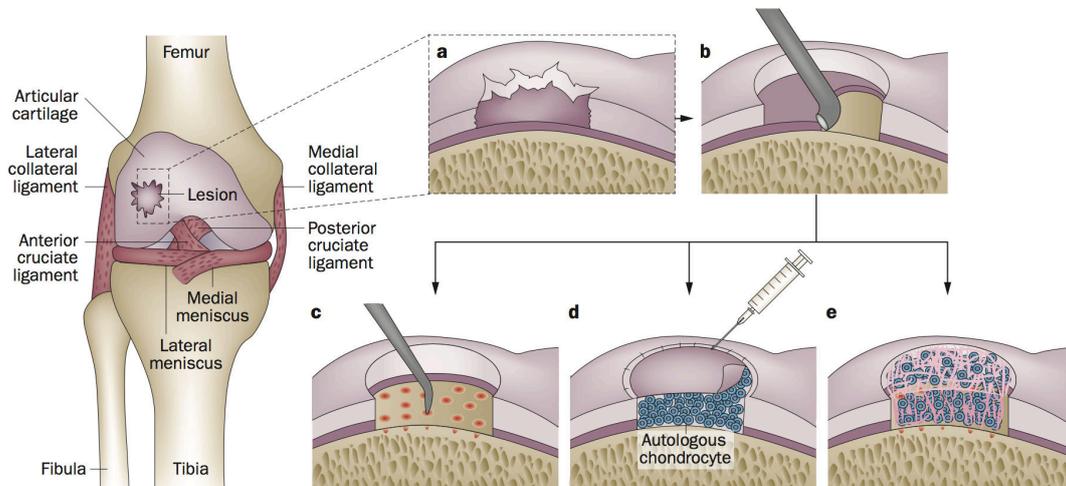
**Figure 59 : Photographie d'une membrane de ChondroGide®.**

L'utilisation de la membrane de ChondroGide® représente l'amélioration de la 1<sup>ère</sup> génération de TCA en 2<sup>ème</sup> génération par remplacement du périoste par une membrane implantatoire composée de collagènes de types I/III porcin (Haddo *et al.*, 2004).

### B. La troisième génération de TCA : la MACI.

L'autre voie d'amélioration du procédé de TCA est de contrôler le devenir du chondrocyte après implantation. La dédifférenciation des chondrocytes et la faible capacité de rétention des chondrocytes au sein des membranes suturées ont mené à l'utilisation d'un biomatériau d'implantation pour la thérapie autologue du cartilage. Dès lors, cette thérapie cellulaire a laissé place à l'ingénierie tissulaire. C'est en 1998 que les premiers essais de cette thérapie de troisième génération ont été réalisés (Behrens *et al.*, 2006). Elle se base sur l'inclusion des chondrocytes amplifiés au sein d'une matrice biologiquement inactive composée de collagènes de types I et III. Le biomatériau et les chondrocytes sont alors cultivés durant trois jours. Cette matrice permet une adhésion cellulaire des chondrocytes et donc une meilleure rétention *in vivo*. Elle permet également une meilleure personnalisation de la thérapie en adaptant les dimensions du biomatériau à celles de la lésion. L'implant biomatériau-cellule est alors placé dans la zone

débridée et fixé par une colle biologique composée de fibrine. Cette troisième génération a été baptisée « Matrix-induced autologous chondrocyte implantation » (MACI). La structure 3D a pour avantage de limiter la dédifférenciation des chondrocytes pour l'implantation et faciliter cette dernière par arthroscopie [Figure 60].



**Figure 60 : Représentation schématique des techniques de thérapie tissulaire et cellulaire du cartilage.**

(a) Lésion cartilagineuse. (b) Un débridement est nécessaire avant l'application de techniques de médecine régénérative afin d'obtenir une zone homogène servant de support. (c) Microfracture. (d) Premières générations de TCA : transplantation de chondrocytes autologues. (e) 3<sup>ème</sup> génération de TCA-MACI : « matrix-associated/induced autologous chondrocyte implantation » (Makris *et al.*, 2015).

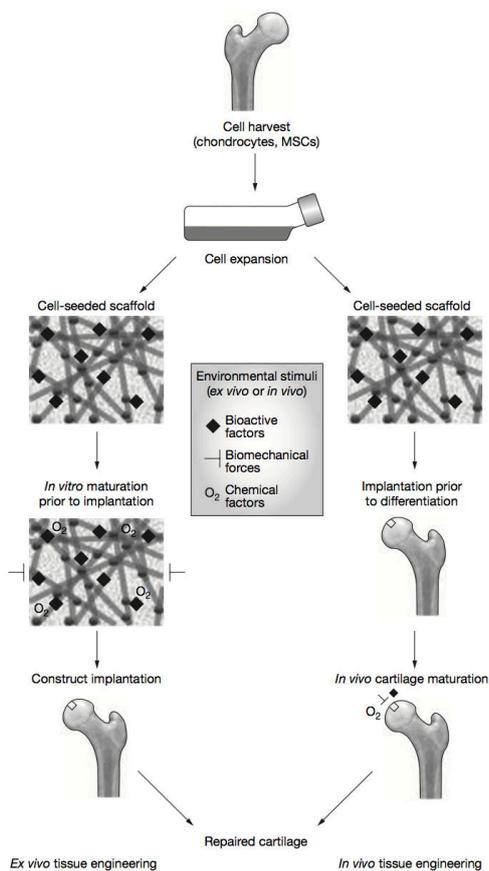
La MACI n'est encore qu'en phase d'essai clinique mais les résultats incitent la poursuite de l'amélioration de cette technique dans cette voie (Brittberg, 2010). Néanmoins, le peu de recul temporel sur cette technique ne permet pas de distinguer un bénéfice clinique entre la première et cette troisième génération de TCA (Behrens *et al.*, 2006). Elle a néanmoins le mérite de lever certaines contraintes techniques et permet un meilleur contrôle chirurgical, clinique et thérapeutique.

A l'heure actuelle, la TCA est la seule thérapie cellulaire et tissulaire du cartilage visant sa reconstruction. En ce sens et avec les retours cliniques positifs, le chondrocyte autologue représente un « gold standard » dans l'ingénierie tissulaire visant à traiter les lésions cartilagineuses.

L'avènement de la MACI dans le traitement des atteintes cartilagineuses ouvre la voie à une nouvelle génération d'ingénierie tissulaire du cartilage. Elle ouvre également la porte à l'utilisation de nouveaux outils biotechnologiques pour le procédé de fabrication du substitut cartilagineux. La complexité des procédés d'ingénierie tissulaire nécessite un regroupement de compétences telles que : les sciences du biomatériau, la médecine, la biologie cellulaire et moléculaire, la biochimie, l'ingénierie ou plus récemment l'étiologie. Le caractère pluridisciplinaire de la MACI en fait un formidable outil de recherche en médecine régénérative du cartilage.

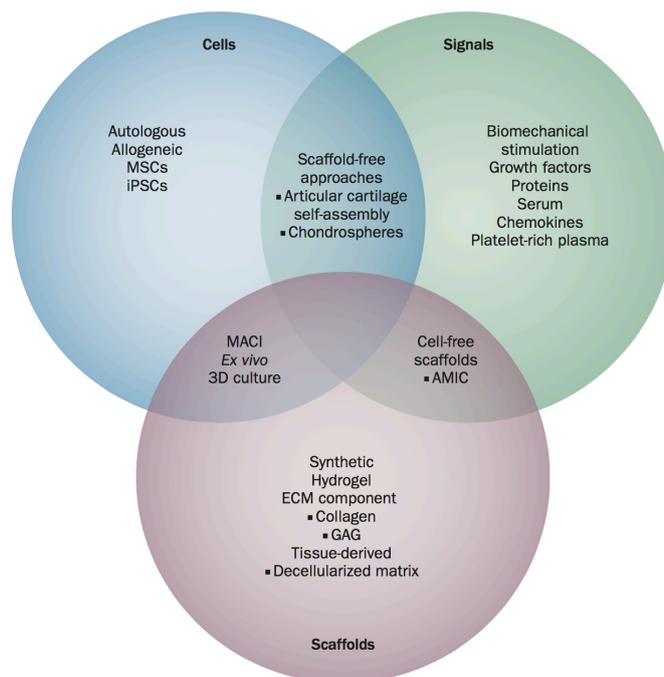
### III. Une nouvelle génération d'ingénierie tissulaire du cartilage.

Afin d'améliorer l'utilisation, la fabrication ou l'efficacité d'un dispositif d'ingénierie tissulaire, il est nécessaire d'en comprendre le concept. L'ingénierie tissulaire réside dans l'utilisation d'un



**Figure 61 : Les nouvelles modalités de la médecine régénérative du cartilage.**

Les nouvelles thérapies de médecine régénérative du cartilage se basent sur l'utilisation d'un biomatériau pour implanter des cellules *in vivo* ou sur la génération d'un substitut cartilagineux *ex vivo* (technique d'ingénierie tissulaire) (Chen *et al.*, 2006).



**Figure 62 : Le paradigme de l'IT tel qu'il est perçu à l'heure actuelle.**

A l'heure actuelle, l'IT se base conventionnellement sur la culture d'un type cellulaire spécifique en 3D qui est soumis à un/des signal(aux) capable(s) de générer une réponse cellulaire biologique d'intérêt thérapeutique. La modulation de ces divers paramètres permet une forte personnalisation des techniques de thérapie cellulaire et tissulaire (Makris *et al.*, 2015)

dispositif à visée médicale composé de cellules et d'un biomatériau. Cette structure hybride, cellulaire et acellulaire, permet la génération d'un substitut biologique *in vitro*. Elle est rendue possible par l'utilisation de facteurs exogènes physiques, chimiques, biochimiques ou biologique. Ce substitut est voué à être réimplanté pour améliorer ou remplacer un tissu.

Alors que la MACI et la TCA, telles qu'elles sont pratiquées aujourd'hui, sont considérées comme des thérapies *in vivo* où la reconstruction tissulaire se fait de manière post-implantatoire, les nouvelles générations d'ingénierie tissulaire se basent sur une reconstruction tissulaire *ex vivo* avant ré-implantation (Chen *et al.*, 2006) [Figure 61]. Ainsi, la génération d'un substitut biologique en ingénierie tissulaire vise à la fois à mimer un microenvironnement cellulaire assurant la survie, la prolifération, la différenciation ou la synthèse matricielle et d'autre part à stimuler les cellules de façon adéquate pour obtenir l'effet biologique escompté (Makris *et al.*, 2015) [Figure 62]. L'objectif général est donc de placer les cellules *in vitro* dans une situation pseudo-physiologique permettant la génération d'un tissu biologique fonctionnel.

## A. Vers la maîtrise du microenvironnement et le contrôle du phénotype chondrocytaire.

Au sein du laboratoire, une vingtaine d'années d'expertise et cinq ans d'études ont été nécessaires à l'obtention d'un brevet sur la génération d'un substitut cartilagineux en laboratoire à

partir de chondrocytes humains (Galéra *et al.*, 2012).

## 1. Le biomatériau.

En ingénierie tissulaire, le biomatériau fournit un support de fixation et de rétention aux cellules. Il a pour but de mimer un environnement 3D, conformation native des cellules au niveau physiologique. Cette conformation est essentielle au comportement et à la réponse cellulaire vis-à-vis d'une condition de culture. Elle stimule les contacts cellule-cellule et cellule-MEC tout en favorisant les stimulations autocrines et paracrines par sa réticulation dense [Figure 63]. Le biomatériau doit être biodégradable pour ne pas perdurer au sein du site implantatoire sur le long terme.

Dans le cadre de la MACI, le biomatériau le plus utilisé est une matrice biologiquement inactive composée de collagènes de types I et III [Figure 64]. Ce biomatériau de conformité européenne (CE) peut être facilement ajusté à la taille de la lésion à combler et est déjà utilisé dans d'autres types de thérapies tissulaires comme pour la reconstruction de peau ou de parois intestinales (Nakase *et al.*, 2006 ; Suzuki *et al.*, 2000). Le caractère biodégradable de la matrice se manifeste par une dégradation *in vivo* de 50% en deux semaines (Brittberg, 2010). Cette matrice de collagène de type I/III n'induit pas de réaction inflammatoire ou de rejet par l'hôte à la différence des matrices composées de collagène de type II, considéré comme immunogène (Cho *et al.*, 2007).

Beaucoup de progrès ont été réalisés durant ces dernières années dans la science des biomatériaux. Les travaux actuels s'orientent vers des biomatériaux moins coûteux et plus simples d'utilisation comme le Matrigel®, capable de se polymériser dans une fenêtre de température comprise entre 22°C et 35°C. Une nouvelle volonté scientifique est de travailler sur la fonctionnalité des biomatériaux de façon à ne plus représenter une structure inerte mais biologiquement active et jouant un rôle moteur dans le devenir de l'implant. Les progrès en impression 3D favorisent également l'émergence de la zonation ou de la

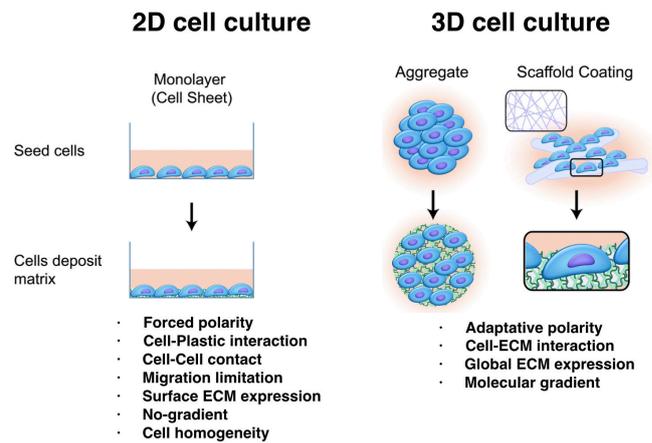


Figure 63 : La différence de comportement cellulaire entre la culture 2D et 3D. (Adaptation de Fitzpatrick & McDevitt, 2015).

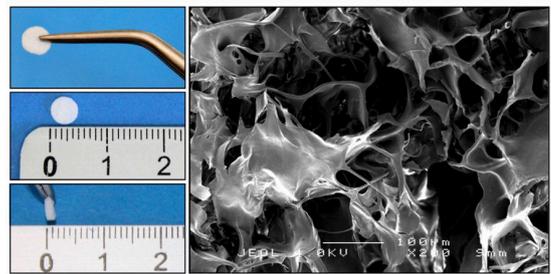
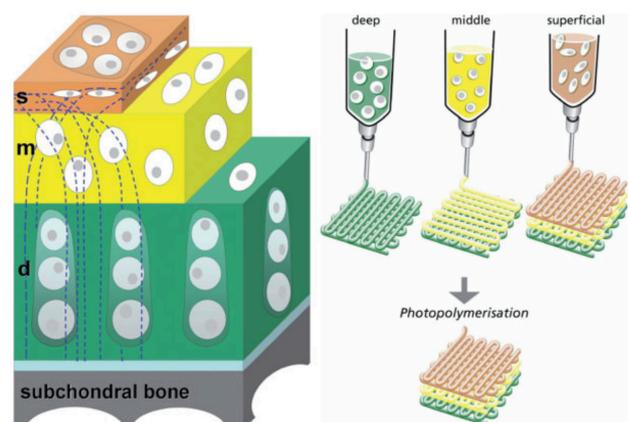


Figure 64 : Structure macroscopique et microscopique des éponges de collagène de types I/III.

Les éponges de collagène de types I/III de 5x2 mm représentent un biomatériau utilisable en clinique humaine et vétérinaire. Le diamètre moyen des pores est de 150 µm et permet l'inclusion de cellules.

Figure 65 : Une technique d'impression cellulaire en 3D.

L'impression 3D (ici par microextrusion) peut permettre la génération d'un cartilage fonctionnel et zonifié. Elle représente l'une des dernières avancées en IT (Klein *et al.*, 2009).



stratification d'un biomatériau, structures retrouvées dans la majorité des tissus (Klein *et al.*, 2009) [Figure 65].

## 2. BMP-2 et redifférenciation chondrocytaire.

Comme nous l'avons vu, l'une des principales limites de la MACI est la dédifférenciation des chondrocytes au cours de leur amplification *in vitro*. Cette contrainte biologique a poussé les laboratoires à développer plusieurs stratégies. Désormais, ces stratégies ont pour but, soit d'empêcher cette dédifférenciation au cours de l'amplification (Claus *et al.*, 2010), soit de redifférencier les chondrocytes après amplification. Dans ces objectifs, la BMP-2 a montré un avantage certain.

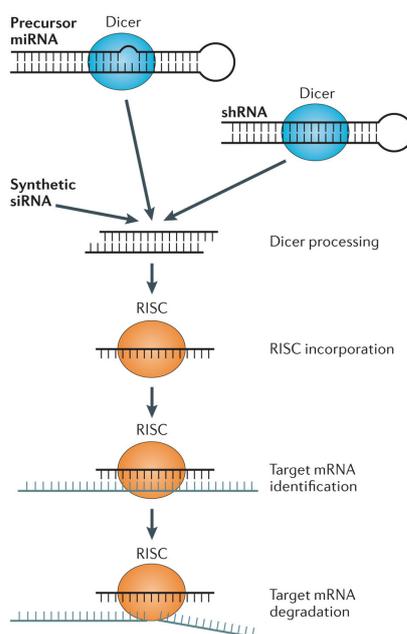
En effet, à faible concentration, elle est capable de maintenir ou de permettre le recouvrement de la synthèse des marqueurs chondrocytaires par les chondrocytes *in vitro*. En comparaison avec le TGF- $\beta$ 1 et l'IGF-1, également considérés comme des facteurs chondrogéniques, la BMP-2 permet la synthèse d'une MEC cartilagineuse de meilleure qualité en limitant l'hypertrophie et favorise notamment la forme IIB du collagène de type II (Valcourt *et al.*, 2003 ; Legendre *et al.*, 2013).

## 3. La stratégie d'interférence par l'ARN.

L'autre inconvénient de la dédifférenciation chondrocytaire est une synthèse matricielle de collagène de type I. Or, l'action de la BMP-2 ne permet pas de diminuer cette synthèse impliquant ainsi une diminution du rapport d'expression collagène de type II / collagène de type I, représentant un index de qualité de la matrice néoformée et qui est requis par les autorités de santé avant de pouvoir envisager des essais cliniques chez l'Homme. Par ailleurs, il a été constaté que dans certains cas, la BMP-2 était capable d'induire la synthèse de collagène de type I (Ollitrault *et al.*, 2015). Il a également été montré qu'au cours du processus de culture en éponge de collagène, la protéase Htra1 était exprimée de façon anormale, tout comme lors de l'arthrose, impliquant un fort catabolisme matriciel et/ou une inhibition de la signalisation de la BMP-2.

C'est sur cette base qu'une stratégie d'interférence par l'ARN a été mise au point afin de permettre la redifférenciation des chondrocytes (Ollitrault *et al.*, 2015). L'interférence par l'ARN, ou RNAi pour « ribonucleic acid interference » est un puissant outil d'inhibition de la traduction des ARNm. Cette technologie a notamment fait l'objet du prix Nobel en 2006 pour les Pr Fire et Mello. Afin d'assurer une spécificité d'inhibition et une incorporation transitoire de matériel génétique exogène à la cellule, des « small interfering RNA » (siRNA) peuvent être utilisés. Il s'agit de petits ARN composés d'une vingtaine de bases homologues à une séquence d'un ARNm cible. A l'aide du complexe « RNA-induced Silencing Complex » (RISC), le brin de siRNA complémentaire à un ARNm va se fixer sur sa cible et provoquer le clivage de ce dernier, inhibant ainsi sa traduction [Figure 66].

Au cours de la formation du néo-cartilage *in vitro*, il peut ainsi être réalisé une inhibition spécifique de l'expression du gène *Col1a1* codant la chaîne  $\alpha$ 1(I) du collagène de type I et d'*Htra1* codant la protéase Htra1.



**Figure 66 : L'interférence par l'ARN exercée par les siRNA.**

Le mode d'action des siRNA utilise de manière détournée les mécanismes impliqués dans l'activité des micro-ARN (miRNA). Un duplex siRNA est pris en charge par le complexe protéique RISC et l'ensemble dégrade un ARNm cible de manière spécifique (Wittrup & Lieberman, 2015).

#### 4. L'hypoxie.

Les conditions oxiques représentent un paramètre microenvironnemental majeur pour le chondrocyte mature. Concernant la redifférenciation des chondrocytes, l'usage de l'hypoxie s'avère largement bénéfique pour la synthèse matricielle. En effet, elle est capable d'induire à la fois les marqueurs chondrocytaires tout en inhibant l'expression des marqueurs atypiques du cartilage, comme les collagènes de types I et III (Duval *et al.*, 2016). Dans le cadre de l'utilisation de la BMP-2 à des fins de redifférenciation chondrocytaire, l'hypoxie a également un rôle potentialisateur sur l'effet de la BMP-2 sur la synthèse matricielle (Lafont *et al.*, 2016).

#### 5. Les autres acteurs de la redifférenciation chondrocytaire.

Les différents paramètres préalablement indiqués ne représentent qu'une partie des conditions microenvironnementales pouvant moduler le phénotype chondrocytaire. D'autres outils technologiques sont notamment utilisés aujourd'hui pour permettre la redifférenciation chondrocytaire. Nous pouvons citer l'utilisation de bioréacteurs permettant un meilleur contrôle de l'apport en nutriments et facteurs de croissance ainsi qu'une standardisation et un gain de production dans le procédé de fabrication des dispositifs d'ingénierie tissulaire (Mayer *et al.*, 2016). Il a également été montré que l'utilisation d'un cocktail de facteurs de croissance/hormones (BMP-2, insuline et hormone triiodothyronine (T3)) pouvait augmenter de façon significative l'expression des marqueurs spécifiques du cartilage par les chondrocytes (Liu *et al.*, 2007). Un facteur important dans le phénotype chondrocytaire est sa perception de signaux mécaniques par mécanotransduction. Ainsi, l'application d'une contrainte mécanique au chondrocyte selon une fréquence précise permettrait d'améliorer le phénotype chondrocytaire et la qualité de la MEC néo-synthétisée (Hilz *et al.*, 2014).

### B. La MACI dans le modèle équin : vers la preuve de concept dans le modèle gros animal.

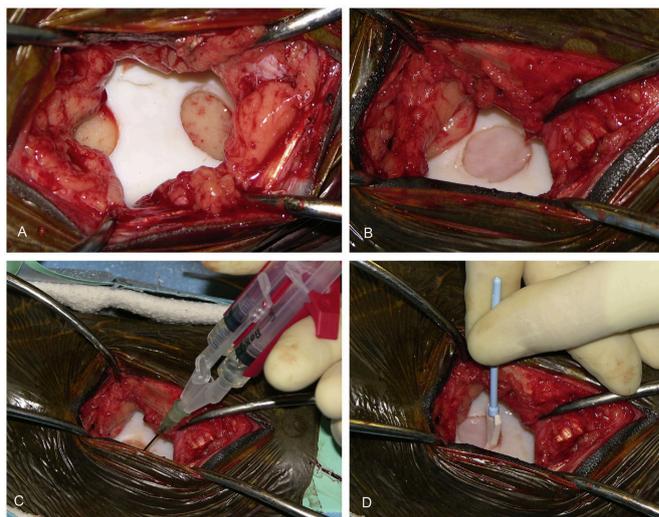
Depuis quelques années, la MACI développée chez l'Homme voit son intérêt progresser dans la filière équine. La forte morbidité des affections ostéo-articulaires et l'absence de thérapie, autres que palliatives, chez le modèle équin implique un attrait grandissant pour les thérapies innovantes et notamment initiées en médecine humaine.

Tout d'abord, l'Homme et le cheval sont deux mammifères phylogénétiquement proches. D'un point de vue génomique, le génome d'*Equus Caballus* (espèce domestiquée du cheval) est séquencé de façon relativement précise. Malgré une grande différence dans le nombre de chromosomes entre l'Homme et le cheval (46 (2n) pour l'humain et 64 (2n) pour le cheval) et la redondance de séquences répétées, on estime à 82% le nombre de gènes équins orthologues à l'Homme sur un total de 20322 gènes prédits et codants pour une protéine en 2009 (19313 gènes codants avérés chez l'Homme en 2012) (Wade *et al.*, 2009). Ces similarités génomiques font du cheval une espèce chez laquelle les applications biotechnologiques développées en médecine humaine sont tout à fait transposables.

De plus, les similarités structurales et cellulaires entre le cartilage équin et humain rendent possible le transfert technologique thérapeutique entre les deux espèces. D'une part, l'articulation équine est de taille importante et permet une application relativement simple de l'arthroscopie (Moran *et al.*, 2016). D'autre part, l'objectif de performance athlétique chez le cheval incite la filière équine à investir dans la recherche de traitements liés aux affections locomotrices comme les tendinopathies, l'inflammation de l'articulation ainsi que les lésions cartilagineuses (Ortved & Nixon, 2016). C'est dans cette optique que les premiers essais de MACI ont été réalisés chez le modèle équin. Ces derniers ont montré la faisabilité de la technique et, de surcroît, une augmentation de la qualité du cartilage suite à l'implantation après 8 semaines, 6 mois et 1 an [Figure 67] (Griffin *et al.*, 2015 ; Frisbie *et al.*, 2008).

Ainsi, la technologie développée chez l'Homme et les récentes avancées biotechnologiques en terme de MACI pourraient servir à la fois la filière équine mais également la médecine humaine. En effet, un transfert des technologies et des connaissances acquises en médecine humaine chez le cheval pourrait conduire à des premiers essais cliniques sur un modèle gros animal proche de l'Homme, tant sur le plan physiologique, que pathologique mais aussi dans le cadre de sa pratique sportive.

**Avec l'acquisition de nouvelles connaissances en biologie cellulaire et moléculaire, les thérapies d'ingénierie tissulaire sont en perpétuelle évolution. Concernant l'ingénierie tissulaire du cartilage et notamment la MACI, une limite technique semble atteinte. Il s'agit de l'utilisation même du chondrocyte. Ce dernier, peu prolifératif et dont le phénotype se modifie en cours d'amplification *in vitro*, rend difficile l'application de la MACI. En effet, cette MACI nécessite un nombre conséquent de cellules, antinomique par rapport à la faible quantité de cellules isolées à partir de biopsies et la difficulté de leur amplification. Ainsi, les laboratoires se sont penchés vers la recherche de types cellulaires alternatifs. Parmi ces types cellulaires, les CSM semblent être d'excellentes candidates.**



**Figure 67 : Chronologie des différentes étapes de l'implantation MACI chez le cheval.**

(A) La zone atteinte est préalablement débridée. (B) Un implant de type MACI contenant des chondrocytes cultivés *in vitro* durant 2 jours dans le dispositif est inséré au niveau de la zone débridée. (C) Une colle de fibrine est utilisée pour permettre l'adhésion du dispositif à la surface débridée. (D) Une finalisation d'adhésion est réalisée en recouvrant le dispositif de colle de fibrine (Nixon *et al.*, 2015).



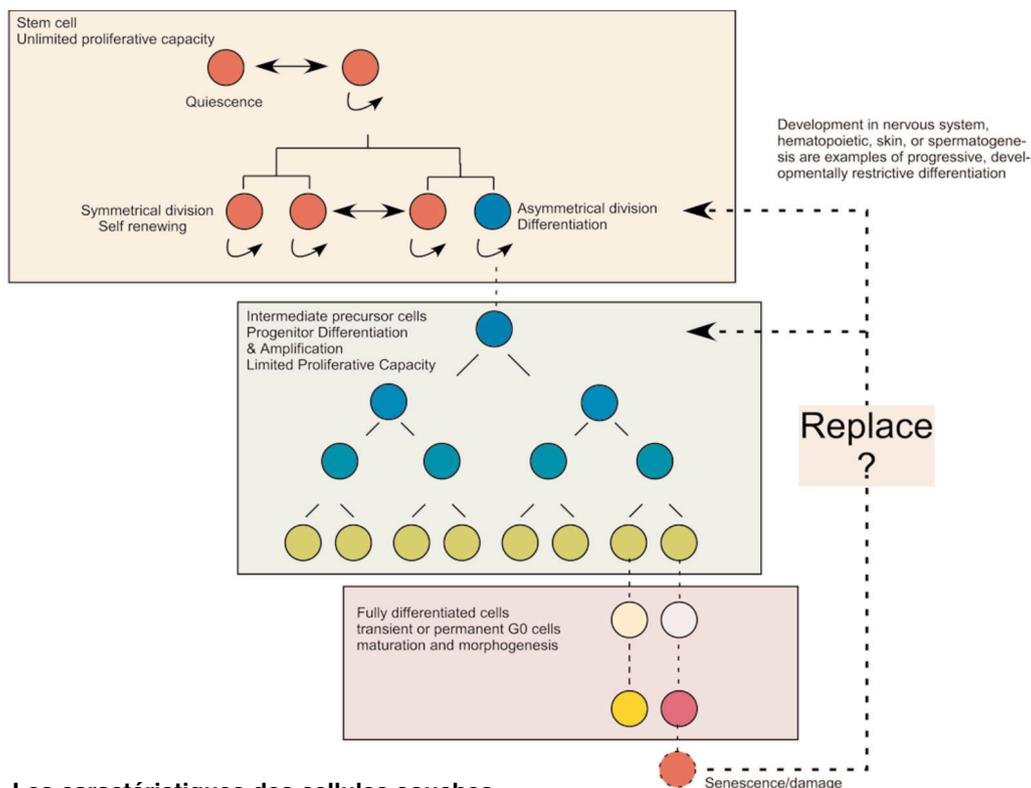
# **Chapitre 4. Les cellules souches mésenchymateuses et l'ingénierie tissulaire du cartilage : une source cellulaire alternative.**

---

# Chapitre 4. Les cellules souches mésenchymateuses et l'ingénierie tissulaire du cartilage : une source cellulaire alternative.

## I. Les cellules souches et plasticité cellulaire.

Par convention, une cellule souche (CS) peut se définir à partir de deux critères. Tout d'abord, une CS est douée d'auto-renouvellement par une division symétrique fournissant deux CS filles identiques à la CS d'origine. Le deuxième critère est la capacité d'une CS à se spécialiser par division asymétrique : une même CS peut alors fournir une cellule fille identique ainsi qu'une cellule ayant acquis des caractères spécifiques d'une cellule spécialisée, nommée alors cellule progénitrice (Weiss & Troyer, 2006) [Figure 68], ce phénomène est appelé différenciation. Le progéniteur peut alors poursuivre son lignage pour générer une cellule spécialisée. De part ces deux propriétés, découle un troisième processus propre aux CS qui est la capacité à reconstruire un tissu spécialisé. Il se traduit par le maintien de la population de CS d'origine et la génération de types cellulaires spécialisés par différenciation.



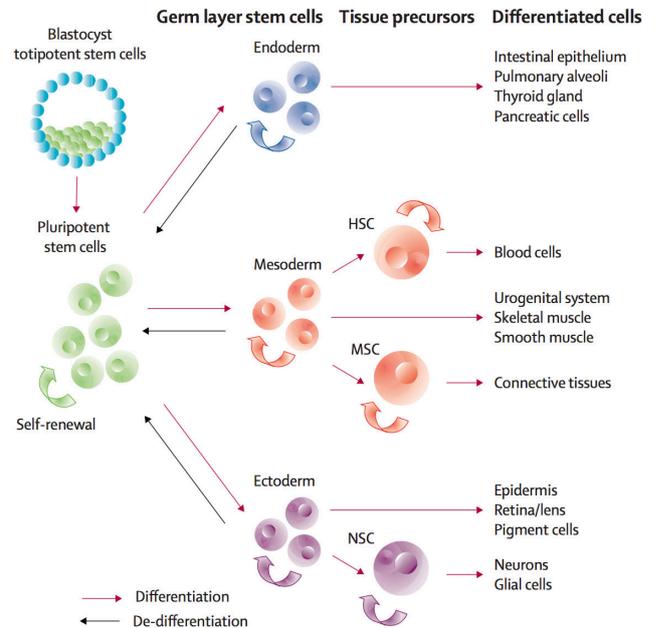
**Figure 68 : Les caractéristiques des cellules souches.**

Les cellules souches ont la double capacité à s'auto-renouveler par division symétrique et à se spécialiser par division asymétrique. Cette dernière capacité est appelée différenciation cellulaire. A partir d'une réserve de cellules souches, un tissu est donc capable de renouveler sa population cellulaire par le maintien de sa réserve de cellules souches et le remplacement des cellules vieillissantes ou à la fonction altérée (Weiss & Troyer, 2006).

*In vivo*, l'orientation de la CS dans l'auto-renouvellement ou la différenciation est régulée d'une part, par le microenvironnement cellulaire et, d'autre part, par la capacité de la CS à y répondre. Ce devenir cellulaire a été pour la première fois conceptualisé par Waddington en 1957 et interprété par Hochedlinger en 2009 après les récentes avancées dans la compréhension des mécanismes mis en jeu (Hochedlinger & Plath, 2009), parmi lesquels l'épigénétique semble détenir un rôle majeur.

On distingue différents types de cellules souches selon leur potentiel intrinsèque à former un spectre plus ou moins large de progéniteurs et de types cellulaires. On distingue ainsi :

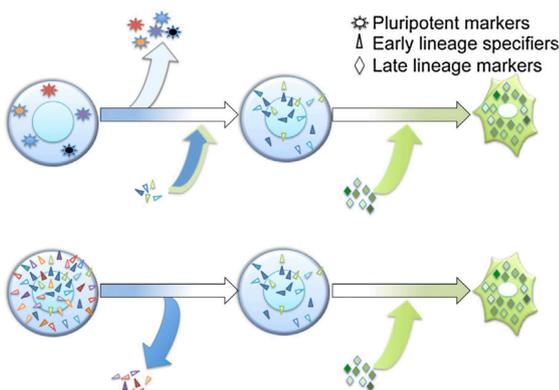
- les cellules totipotentes capables de générer l'ensemble des cellules d'un organisme, y compris celles des annexes embryonnaires (le zygote au stade morula);
- les cellules pluripotentes capables de générer l'ensemble des cellules d'un organisme hormis les annexes embryonnaires (les cellules de la masse interne du blastocyste, les cellules embryonnaires, les cellules pluripotentes induites);
- les cellules multipotentes capables de générer les cellules de différents tissus spécialisés avec un potentiel de différenciation restreint (les CSM, les cellules souches inhérentes à certains tissus adultes, les cellules souches hématopoïétiques);
- les cellules unipotentes capables de générer un seul type cellulaire spécialisé.



**Figure 69 : La différenciation cellulaire à partir de cellules souches.**

Une hiérarchie existe entre les différents types de cellules souches. Les types possédant la plus grande plasticité peuvent générer des sous-types possédant une plasticité moindre. Ainsi, à partir de chaque type de cellule souche, il peut être généré des types cellulaires spécialisés spécifiques de différents tissus (Corsten and Shah, 2008).

Au cours du développement embryonnaire, le type de CS qui possède la plus grande plasticité (capacité de différenciation) va générer l'ensemble des sous-types de CS. Nous pouvons ainsi parler de stades de différenciation. Cette chronologie d'événements cellulaires provoque une perte progressive de la plasticité des cellules tout en générant des gains dans leur spécialisation. Une cellule pluripotente peut générer les progéniteurs multipotents d'un feuillet embryonnaire, qui deviendront eux même des cellules capables de s'engager dans un lignage spécifique [Figure 69]. Cette genèse s'accompagne d'une



**Figure 70 : Le concept de spécialisation.**

La différenciation cellulaire regroupe un ensemble de concepts biologiques. L'un d'eux représente la spécialisation cellulaire ou l'évolution d'un stade de différenciation à un autre. La spécialisation cellulaire se traduit par la perte de caractères souches et l'acquisition de caractères spécialisés spécifiques d'un stade de différenciation. Dans le domaine de la recherche, cette spécialisation peut être évaluée et contrôlée *via* l'analyse de marqueurs cellulaires spécifiques/caractéristiques (Montserrat *et al.*, 2013).

perte et d'un gain de marqueurs cellulaires [Figure 70]. Parmi ces marqueurs, les facteurs de croissance sont les plus utilisés et étudiés car ce sont les acteurs principaux du devenir des CS (Montserrat *et al.*, 2013).

Depuis quelques années, les récentes avancées en terme de compréhension des mécanismes impliqués dans la plasticité des CS ont permis de montrer que cette chronologie n'était pas figée et pouvait être modulée par des facteurs endogènes et/ou exogènes. En 2006, Takahashi et Yamanaka ont réussi à réverser un stade différencié de cellules (fibroblastiques) vers un stade pluripotent par sur-expression *de novo* de certains facteurs de transcription (Takahashi *et al.*, 2007). D'autres preuves dans la littérature montrent des phénomènes de *transdifférenciation* (ou conversion de lignage) où une cellule au lignage déterminé s'oriente vers un lignage connexe.

Parmi l'ensemble de ces CS, une partie est utilisée pour les thérapies cellulaires et tissulaires. L'utilisation d'un type de CS dépend à la fois de ses propriétés intrinsèques exploitées, de leur facilité d'isolement et des difficultés techniques et éthiques de leur utilisation en laboratoire et en médecine.

## **II. Les cellules souches mésenchymateuses.**

La découverte des CSM s'est faite progressivement et indépendamment de la connaissance de leur rôle physiologique précis. Leur découverte émerge d'une suspicion de la présence d'un type cellulaire fibroblastique au sein de la MO, connue à l'origine pour inclure essentiellement des cellules hématopoïétiques. L'équipe de Friedenstein, autour des années 1970, a montré, dans la MO de souris, la présence des cellules capables de former des colonies par adhésion sur boîte de culture, colonies nommées CFU-F pour « fibroblast colony-forming units » (Friedenstein *et al.*, 1970). Il s'est ensuite avéré que ces cellules détenaient des propriétés tout à fait uniques.

Les CSM, pour cellules souches mésenchymateuses ou cellules stromales mésenchymateuses, sont des cellules souches multipotentes (Caplan, 1991). Elles possèdent une capacité d'auto-renouvellement et un potentiel de différenciation restreint par rapport aux cellules souches pluripotentes. Elles répondent à un ensemble de caractéristiques et sont retrouvées au niveau stromal dans divers tissus adultes et néonataux. Les CSM sont générées par l'organisme aux premiers stades du développement. Il est estimé que la majorité sont d'origine mésodermique. Néanmoins, quelques travaux montrent qu'elles pourraient également être issues de l'ectoderme (Takashima *et al.*, 2007).

### **A. Les caractéristiques des CSM et leur rôle physiologique.**

Les CSM sont énormément étudiées depuis une trentaine d'année. Ces études ont été menées dans leur majorité *in vitro* et *ex vivo*, et orientées par l'engouement généré par leur intérêt thérapeutique. Cette orientation scientifique a permis une description détaillée de leur isolement, leur caractérisation et leur utilisation. Néanmoins, la compréhension de leur rôle physiologique souffre de lacunes et d'imprécisions et ceci au sein même de l'aspect conceptuel de MSC (Bianco *et al.*, 2013).

#### **1. Les caractéristiques des CSM.**

Afin d'utiliser les CSM dans un cadre thérapeutique, il est indispensable de les caractériser, ces cellules co-localisant avec un grand nombre d'autres types cellulaires. Les critères requis pour la caractérisation des CSM sont en perpétuelle évolution. Ils sont souvent imposés par consensus au sein de la communauté scientifique et industrielle selon un principe de *bona fide*. Cette démarche est notamment nécessaire à l'élaboration des bonnes pratiques de fabrication dans l'industrialisation de MTI : les « good manufacturing practices » (GMP). Ces critères ont été, en majorité, issus de la caractérisation des CSM-MO, à l'heure actuelle encore considérées comme

un « gold-standard ». Ainsi, 3 principaux critères de sélection ont été retenus par l' « international society for cellular therapy » (ISCT) en 2005 (Horwitz *et al.*, 2005) et détaillés en 2006 (Dominici *et al.*, 2006) afin d'harmoniser les travaux sur les CSM.

**a. La morphologie, la capacité d'adhésion au plastique et la prolifération.**

Le premier critère de sélection des CSM est leur capacité d'adhésion au plastique et leur aptitude à former des colonies fibroblastiques (CFU-F). Ce critère se base sur leur propriété supposée d'auto-renouvellement. Les cellules, à titre d'unités, sont capables de générer une population clonale conséquente en condition de culture normale. Cette sélection par adhésion au plastique permet d'éliminer tous les types cellulaires non-adhérents comme les cellules hématopoïétiques ainsi que les cellules ayant une faible capacité de prolifération ou soumises à une sénescence précoce. Cette première sélection permet de mettre en évidence une population de type clonal capable de répondre aux autres critères qualifiants les CSM. Du fait de la forte prolifération des CSM, des analyses du caryotype sont encouragées par l'ISCT.

**b. Les marqueurs de surface membranaires en tant que déterminants cellulaires.**

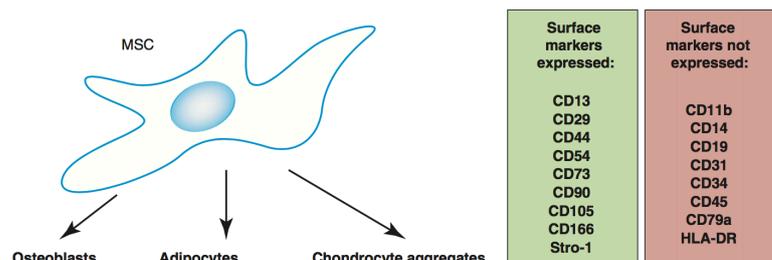
Ce deuxième critère se base sur la technologie employée initialement afin de caractériser les leucocytes, en utilisant l'expression de marqueurs cellulaires présents au niveau de la membrane plasmique des cellules, ou immunophénotypage. Cette caractérisation protéique est faite par cytométrie en flux et est préconisée par l'ISCT pour les cellules souches (Horwitz *et al.*, 2005). Elle utilise des anticorps capables de fixer les antigènes spécifiques afin de trier les cellules d'intérêt.

Les marqueurs de surface d'intérêt sont qualifiés de « cluster of differentiation » (CD) et représentent des protéines membranaires, jouant chacune un rôle cellulaire et généralement de signalisation. Ces protéines peuvent être des intégrines, des récepteurs ou encore des ligands couplés à des récepteurs. Il est nécessaire d'analyser un panel de CD car jusqu'à présent, aucun CD spécifique des CSM n'a été caractérisé. De même, la présence ou l'absence de CD est un argument de sélection cellulaire par immunophénotypage. La spécificité des CD pour un type cellulaire est corrélée avec un rôle généralement majeur de la protéine à laquelle il correspond.

Chez les cellules souches, un panel minimum de 9 CD est préconisé pour leur caractérisation par l'ISCT (Dominici *et al.*, 2006). Pour autant, d'autres CD et marqueurs de surface sont couramment utilisés et admis par la communauté scientifique pour augmenter la robustesse de la caractérisation. Les CD devant être absents (CD-) correspondent généralement à des marqueurs spécifiques des types cellulaires co-localisant *in vivo* avec les CSM : marqueurs des leucocytes (CD45-), hématopoïétiques (CD34-), des cellules endothéliales (CD34-), des macrophages (CD14- et CD11b-), des monocytes (CD14- et CD11b-) et des cellules B (CD79a- et CD19-).

Les CD caractéristiques à minima des CSM étaient au nombre de trois en 2006 : le CD105, le CD73, et le CD90. Entre autres, les CSM sont considérées comme naïves et ne sont généralement pas rejetées par un hôte lors qu'elles sont implantées. Ainsi, il est souvent nécessaire de suivre l'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité, le CMH-I et le CMH-II, pour affiner l'immunophénotypage.

Au fur et à mesure des investigations des CSM, d'autres marqueurs de surface se sont



**Figure 71 : Liste non exhaustive de marqueurs de surface utilisés pour la caractérisation des CSM.** (Gebler *et al.*, 2012).

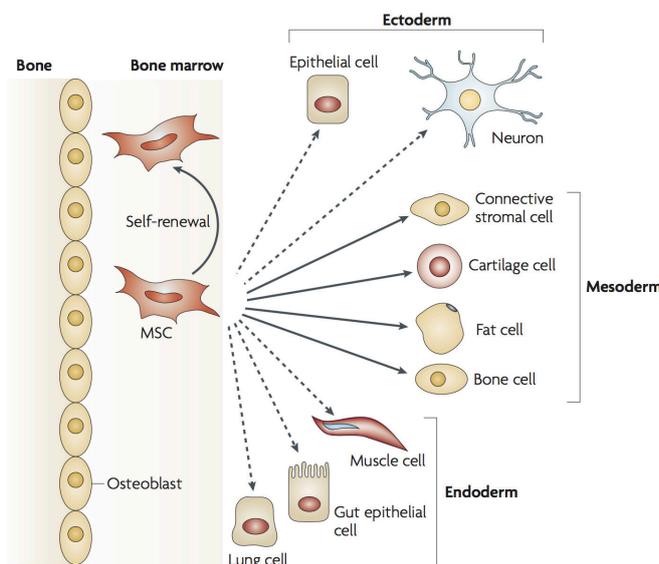
greffés à cette liste non-exhaustive [Figure 71] (Gebler *et al.*, 2012). A titre d'exemple, deux études récentes en haut débit ont respectivement montré la spécificité de 116 CD (Niehage *et al.*, 2011) et 137 CD (Billing *et al.*, 2016) pour les CSM-MO. Ces deux études montrent d'une part la spécificité du profil membranaire de CSM-MO par rapport à d'autres types de cellules différenciées, et d'autre part par rapport à d'autres cellules souches.

La présence de CD spécifiques des CSM et l'absence de CD spécifiques d'autres types cellulaires non désirés permettent d'envisager un comportement « MSC-like » et le potentiel thérapeutique des cellules isolées. En ce sens, l'immunophénotypage peut s'apparenter à une démarche prospective (Bianco *et al.*, 2013).

### c. Le potentiel de différenciation des CSM.

Le troisième critère est en lien étroit avec le potentiel thérapeutique des CSM dans le cadre de l'ingénierie tissulaire. Il s'agit de l'étude de leur potentiel de différenciation. La communauté scientifique s'accorde à qualifier les CSM de multipotentes afin de les distinguer des cellules souches pluripotentes au potentiel de différenciation plus large. Elles sont capables de s'engager dans différentes voies de différenciations spécifiques de différents feuilletts embryonnaires.

C'est en 1999 que l'équipe de Pittenger (Pittenger *et al.*, 1999) détailla de façon rigoureuse la capacité de différenciation des CSM dans trois lignages : le lignage ostéoblastique, adipogénique et chondrocytaire [Figure 72]. L'induction et la maturation des cellules dans un des lignages repose sur l'utilisation d'un milieu et de conditions de culture spécifiques à chacun, ainsi que sur la stimulation cellulaire par l'utilisation de facteurs de croissance, d'hormones ou de glucocorticoïdes (Caplan and Dennis, 2006). Cette démarche s'apparente à une stimulation microenvironnementale des cellules, faisant à la fois perdre le caractère souche des CSM tout en générant un gain cellulaire fonctionnel et spécifique. Pour chaque lignage, il est impératif d'évaluer ce gain fonctionnel. Ce pré-requis passe par l'étude de l'expression de biomarqueurs spécifiques des trois lignages, par analyse transcriptomique et protéomique. De même, il est nécessaire d'évaluer la capacité des cellules à générer un tissu spécialisé comprenant les cellules différenciées et leur MEC fonctionnelle, notamment par immunohistochimie.



**Figure 72 : La plasticité des CSM.**

Les CSM sont généralement caractérisées par une tripotence. Elles sont capables de se différencier en chondrocytes, ostéoblastes et adipocytes. Néanmoins, leur capacité de différenciation ne se limite pas à ces trois lignages (Uccelli *et al.*, 2008).

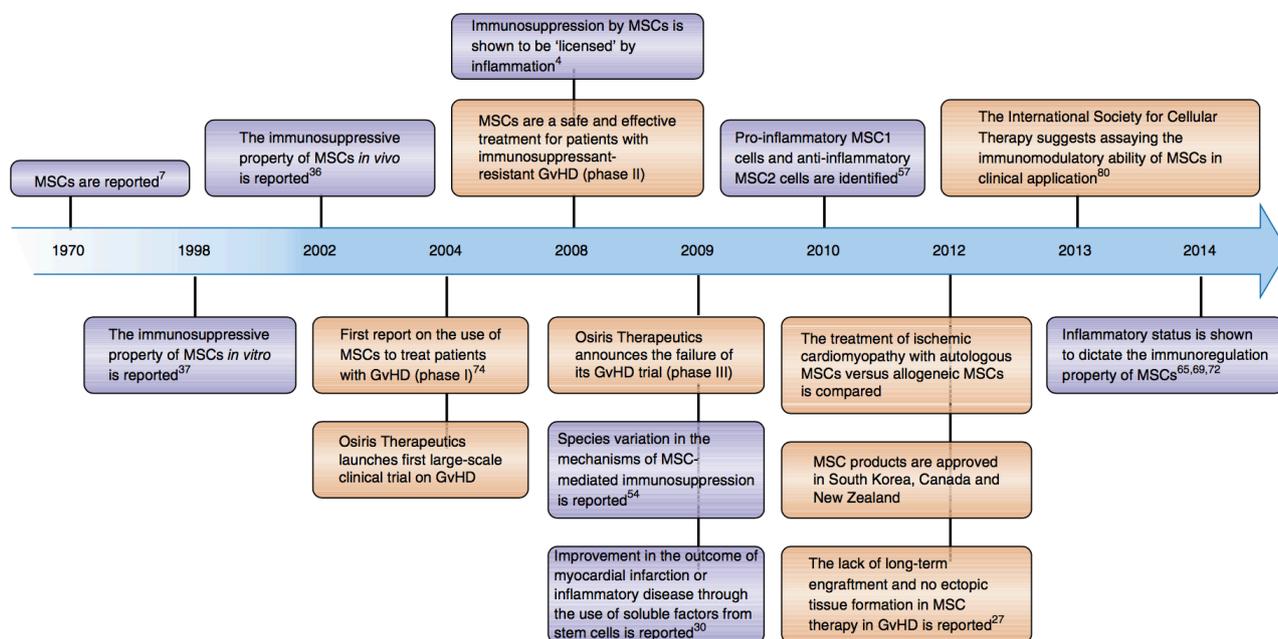
Dans le cadre de la caractérisation des CSM, l'ISCT préconise l'investigation de ces trois lignages ostéoblastique, adipogénique et chondrocytaire correspondant au tissu squelettique.

Pour autant, d'autres voies de différenciation peuvent être empruntées par les CSM. Elles sont notamment capables de s'orienter dans des lignages spécifiques des trois feuilletts embryonnaires : ectoderme, endoderme et mésoderme.

Ainsi, des équipes travaillant sur des thématiques différentes sont capables de générer à partir des CSM des cellules musculaires, des ténocytes, des neurones ou encore des cellules hépatiques (Uccelli *et al.*, 2008).

#### d. L'immunomodulation en tant que caractéristique des CSM.

Une propriété biologique des CSM vient s'ajouter à celles énoncées précédemment. Elle a directement découlé des applications thérapeutiques des CSM et n'a été découverte que trente ans après les travaux de Frieddenstein. Cette découverte a révolutionné l'intérêt thérapeutique des CSM ces vingt dernières années (Wang *et al.*, 2014) [Figure 73].



**Figure 73 : Chronologie des évènements majeurs dans l'étude du caractère immunomodulateur des CSM.**

Violet: études pré-cliniques; orange: études cliniques (Wang *et al.*, 2014).

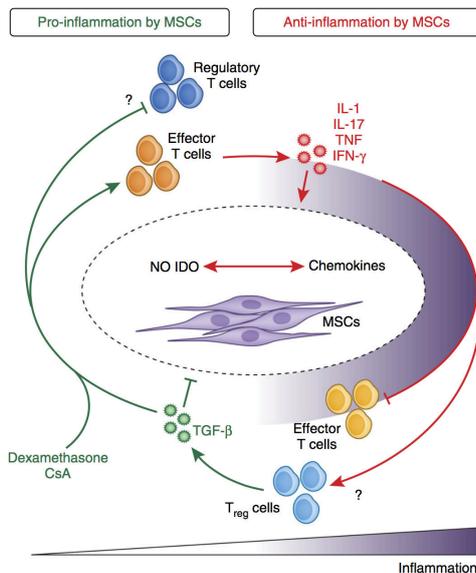
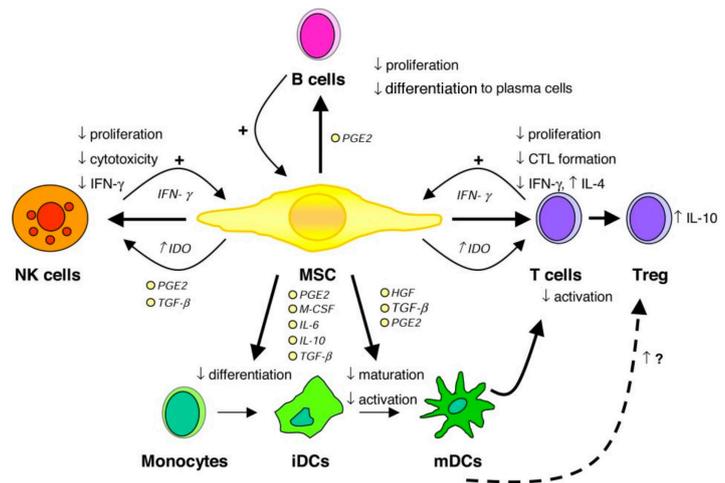
En 1998, McIntosh *et al.* déposent un brevet sous le nom de la société Osiris Therapeutics, Inc. (McIntosh *et al.*, 1998). Cette invention se base sur l'injection de CSM indifférenciées en parallèle d'une implantation de greffon. Les inventeurs désirent ainsi exploiter une propriété d'inhibition de rejet de greffe par les CSM ainsi que leur caractère naïf. Leur raisonnement s'appuie sur la preuve *in vitro*, de l'inhibition de prolifération et d'activation de lymphocytes T par des CSM (Di Nicola *et al.*, 2002). Par la suite, beaucoup de travaux ont été entamés sur la compréhension de cette possible inhibition de la réponse immunitaire et inflammatoire.

Il s'est avéré que les CSM pouvaient, *in vitro* et *in vivo*, se comporter comme des réservoirs à facteurs biologiques capables de réguler la réponse immunitaire innée (Gebler *et al.*, 2012). Par le biais de l'émission de facteurs paracrines, les CSM sont capables d'inhiber la prolifération et la différenciation des acteurs cellulaires responsables de la réponse immunitaire (les cellules T, les « natural Killers » (NK), les cellules dendritiques, les monocytes et les cellules B). En parallèle, elles sont capables de moduler la prolifération des cellules régulatrices (« cellules T-Helper » (Th)). L'inhibition de prolifération des cellules immunitaires est liée à l'action de cytokines anti-inflammatoires (IL-6, IL-10), d'enzymes (IDO, INOS), de médiateurs (PGE2) et de facteurs de croissance sécrétés par les CSM (TGF- $\beta$ , HGF, KGF) (Nauta & Fibbe, 2007) [Figure 74].

Il s'est avéré que cette capacité immunomodulatrice était dépendante du microenvironnement des CSM. En effet, *in vivo*, il a été montré que l'expression des facteurs immunomodulateurs par les CSM était dépendante d'une stimulation de ces dernières par des cytokines/facteurs pro-inflammatoires (comme l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ou le TNF- $\alpha$ ) ou encore dépendante de leur conformation en 3D (Ren *et al.*, 2008 ; Bartosh *et al.*, 2010). On parle alors de « priming » dans le cadre de leur utilisation thérapeutique. *In vivo* les CSM peuvent être recrutées

**Figure 74 : L'immunomodulation des CSM.**

Sous l'effet de cytokines pro-inflammatoires, les CSM sont capables de réguler l'activité, la prolifération et la différenciation des cellules immunitaires par l'expression d'effecteurs trophiques (Nauta & Fibbe, 2007).



**Figure 75 : L'effet différentiel des CSM sur les cellules immunitaires.**

En fonction du contexte inflammatoire du microenvironnement des CSM, ces dernières exercent un effet pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire (Wang *et al.*, 2014).

au niveau d'un site inflammatoire et répondre à ce contexte par une sécrétion paracrine impliquant une action biologique à distance et temporelle (Ponte *et al.*, 2007 ; Roddy *et al.*, 2011).

Le terme immunomodulation est préféré à l'immunosuppression car il a effectivement été montré que cette immunosuppression par les CSM n'était pas constante au cours du temps et pouvait varier, voire avoir un rôle opposé en fonction du microenvironnement des CSM. C'est notamment le cas lors d'une inflammation chronique localisée où la concentration en facteurs pro-inflammatoires peut varier et influencer sur l'activité des CSM (Wang *et al.*, 2014) [Figure 75].

Récemment découvertes, ces propriétés biologiques des CSM indifférenciées ont fait émerger de nouvelles thématiques de recherches (ou des thématiques émergentes) sur la thérapie cellulaire par injection des CSM. Il est important de noter qu'aucune corrélation n'a été faite à ce jour entre la capacité d'immunomodulation *in vitro* par les CSM et leurs autres propriétés biologiques et notamment *in vivo*. C'est une des raisons pour laquelle la communauté scientifique considère désormais les CSM comme un outil thérapeutique multifacettes. Cet aspect

augmente d'autant plus l'étendue scientifique des travaux sur ces dernières afin de comprendre leur rôle physiologique.

En 2013, l'ISCT déclare, par une dépêche dans la revue « Cytotherapy », la nécessité de la prise en compte de cet aspect immunomodulateur dans le cadre de la caractérisation des CSM (Krampera *et al.*, 2013). Cette recommandation montre bien l'impact de ce rôle biologique des CSM indifférenciées dans le cadre thérapeutique et scientifique. Néanmoins, elle pointe du doigt les difficultés de la communauté scientifique à lever les ambiguïtés générées par le concept de CSM.

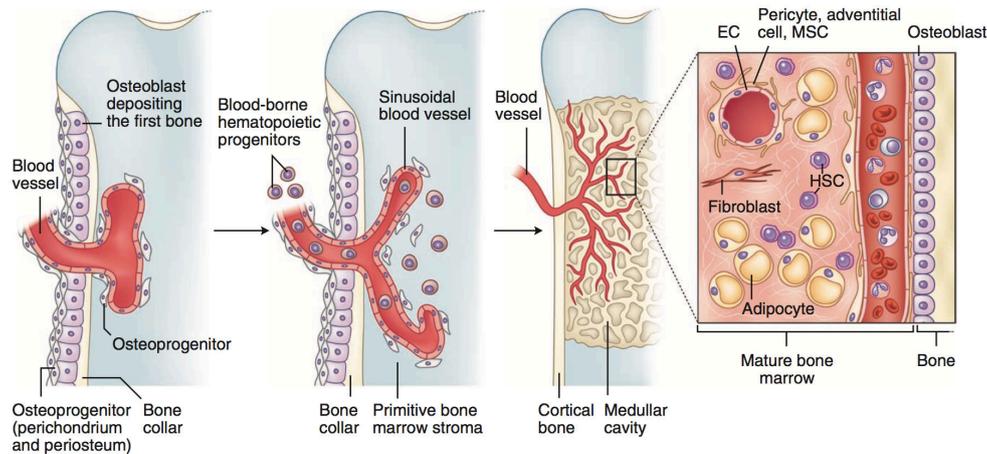
## 2. Les propriétés biologiques et le rôle physiologique des CSM.

Paradoxalement, le rôle précis des CSM au cours du développement et leur rôle physiologique dans les tissus adultes restent peu connus. Les premiers travaux sur leur rôle physiologique se sont basés sur la localisation des cellules au sein de l'organisme et du tissu

adulte. Seuls quelques versants biologiques sont relativement bien étudiés. La démarche scientifique à l'heure actuelle vise à extrapoler les résultats scientifiques issus des retombées de recherche appliquées vers l'implication des CSM dans les processus physiologiques de réparation tissulaire.

### a. Les CSM en tant que support de l'hématopoïèse.

Le premier rôle physiologique qui a été caractérisé chez les CSM est de représenter un support de l'hématopoïèse. Dans l'organisme, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) indifférenciées sont cloisonnées dans des niches stromales de la moelle osseuse. Lorsqu'elles sont stimulées, elles se différencient et migrent par le système vasculaire sinusoidal. Les niches stromales permettent l'auto-renouvellement et le maintien du caractère indifférencié des CSH par un contrôle microenvironnemental et cellulaire. Elles assurent également la différenciation et l'évacuation des progéniteurs dans le système vasculaire.

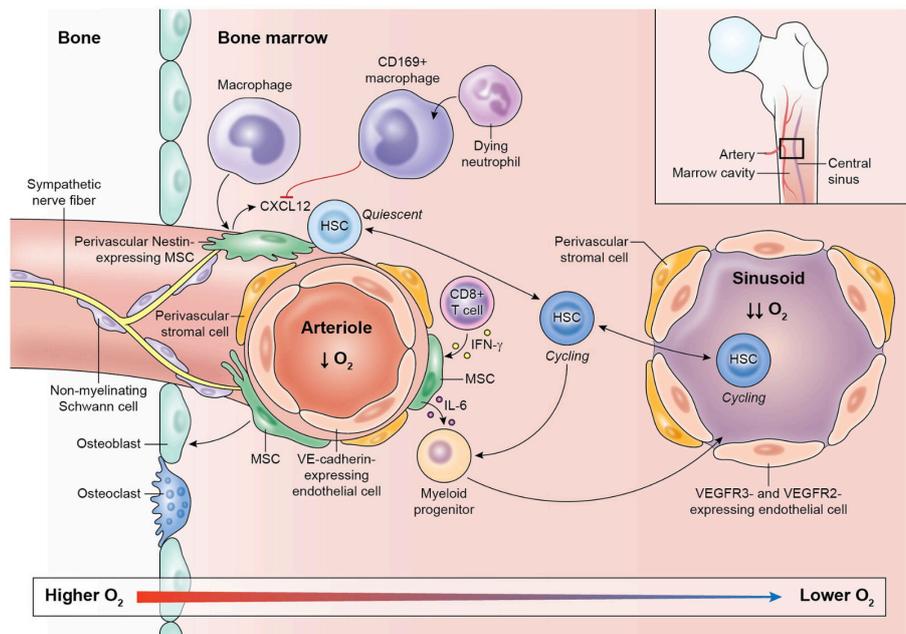


**Figure 76 : La formation de la moelle osseuse.**

La moelle osseuse est formée au cours du développement embryonnaire dans la cavité médullaire des os. Elle comporte une réserve de progéniteurs hématopoïétiques et des adipocytes. Elle inclut également une réserve de CSM jouant le rôle de cellules nourricières et de cellules régulatrices (Wang *et al.*, 2014).

**Figure 77 : Représentation schématique des interactions opérant entre les CSM et les CSH au sein de la moelle osseuse.**

Les CSM régulent le maintien des CSH au stade indifférencié ou leur différenciation. Via la sécrétion de cytokines, les CSM sont également capables d'induire la migration des progéniteurs hématopoïétiques vers la circulation systémique. Par leur capacité à se différencier, les CSM entretiennent le renouvellement de la moelle osseuse (Giles *et al.*, 2016).



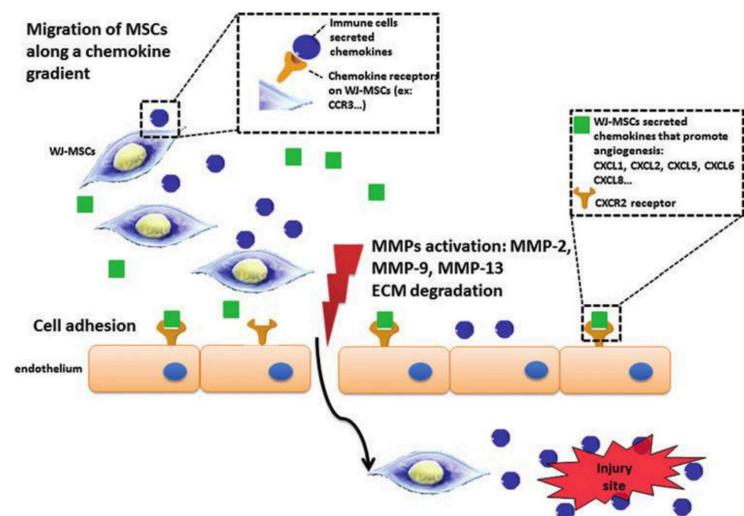
Les CSM co-localisent avec les CSH dans la moelle osseuse et forment la gaine de cellules stromales périvasculaires [Figure 76]. Il a été montré que les CSM assuraient la

constitution des niches par leur différenciation (Muguruma *et al.*, 2006). De plus, les CSM par le biais de leur activité paracrine et immunomodulatrice, sont capables d'exercer un contrôle de la prolifération des CSH ainsi que de moduler leur différenciation et leur relargage dans le système vasculaire [Figure 77]. Un marquage de la nestine permet notamment de visualiser la présence de CSM au sein des vaisseaux sinusoïdaux mais également au niveau endostéal, impliquant un rôle potentiel dans la construction globale des niches (Mendelson & Frenette, 2014).

Il a par ailleurs été montré que les CSM présentent des marqueurs cellulaires communs avec les péricytes localisés au niveau de l'endothélium des capillaires sanguins qui assurent la fonction vasculaire (CD146 et NG2). Les propriétés des CSM les rapprochent d'autant plus de la fonction des péricytes qui assurent un caractère nourricier, une régulation de l'immunité, une multipotence ainsi qu'une capacité de régénération tissulaire au niveau vasculaire. Néanmoins, toutes les CSM ne présentent pas ces caractères communs aux péricytes et tous les péricytes ne présentent pas toutes les fonctions biologiques apparentées aux CSM (Nombela-Arrieta *et al.*, 2011).

### b. Les CSM et l'aspect multifacette de leur fonction.

Les CSM sont quasiment omniprésentes dans tous les tissus de l'organisme. Outre leur localisation dans la MO, elles sont retrouvées en grand nombre dans certains tissus et présentes dans presque tous les tissus adultes. Leur capacité de différenciation et leur migration vers les sites de lésions sous-entend un rôle important (ou majeur) dans la reconstruction tissulaire. Les CSM sont notamment capables de migrer par chimiotaxisme vers les sites d'atteintes tissulaires. Ce phénomène est appelé « homing » cellulaire (El Omar *et al.*, 2014) [Figure 78] et s'exerce sûrement par le biais de la circulation des CSM dans les vaisseaux sinusoïdaux des niches et du système vasculaire systémique. Ce phénomène est vérifié dans le cadre de certaines maladies mais son implication systématique dans la réparation tissulaire est pour autant contestée.



**Figure 78 : Le phénomène d'« homing » cellulaire par les CSM.**

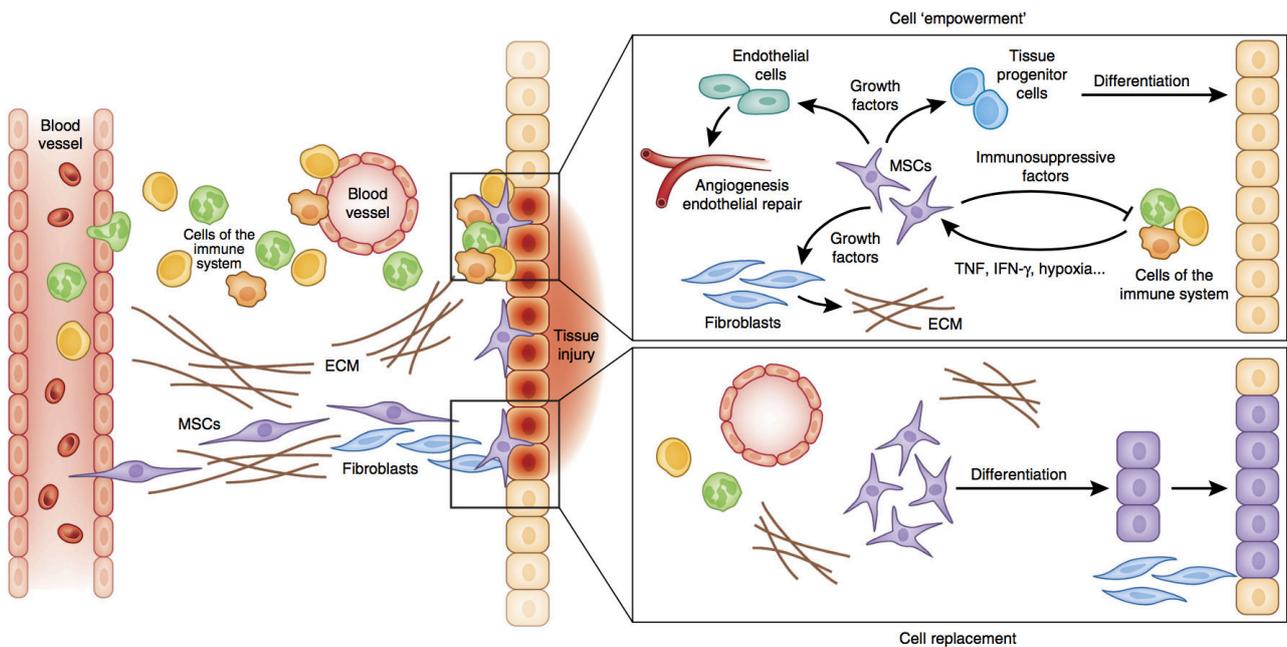
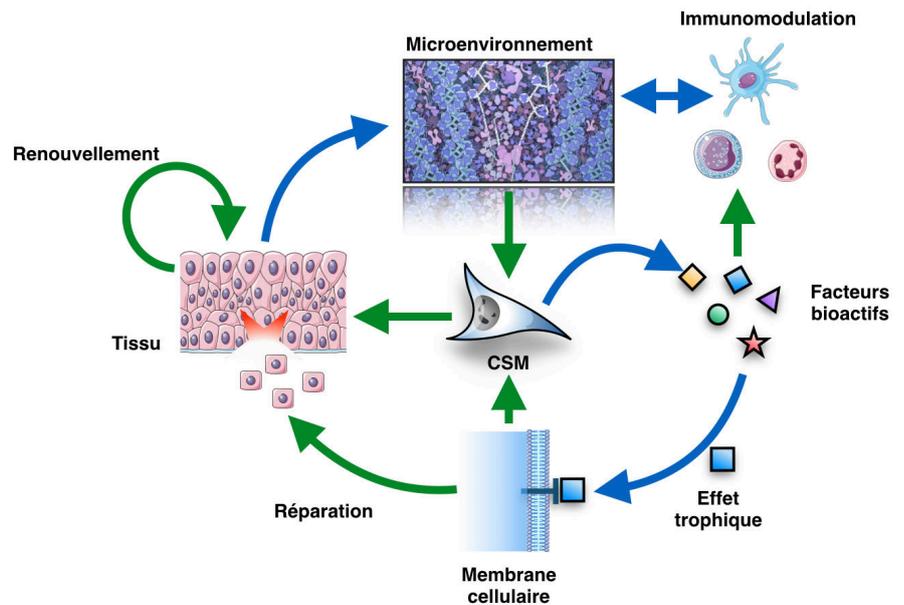
Les CSM sont douées de chimio-attraction grâce à l'interaction de ces dernières avec les chimiokines exprimées par d'autres types cellulaires. En passant par la circulation générale, les CSM sont capables de migrer vers les sites lésionnels où règne une importante inflammation. Les CSM pourraient alors réguler à la fois l'aspect inflammatoire de la lésion, mais également participer à la réparation du tissu (El Omar *et al.*, 2014).

Elles sont capables de communiquer avec tous les types cellulaires de l'organisme par l'expression de molécules ubiquitaires et utilisent un langage cellulaire commun à tout tissu. Elles peuvent notamment intervenir dans les fonctions d'angiogenèse, anti-apoptotiques et anti-fibrotique (Meirelles *et al.*, 2009). Leur rôle de réservoir à cytokines et facteurs de croissance ainsi que leur capacité de communication cellulaire représente le rôle trophique des CSM (Caplan & Dennis, 2006) [Figure 79]. Ce rôle trophique, additionné à leur capacité de différenciation, montre les deux grands versants physiologiques des CSM et sont allègrement exploités dans un objectif thérapeutique. Les CSM sont donc à ce titre impliquées dans le contrôle de l'homéostasie et du microenvironnement tissulaire tout en assurant un rôle de reconstruction. Ces deux versants ont été imagés par Wang *et al.* par le concept de « empowerment/replacement » (Wang *et al.*, 2014) [Figure 80].

## B.

**Figure 79 : L'effet trophique des CSM.**

Les CSM représentent un important réservoir de facteurs de croissance et de molécules bioactives. En fonction de leur microenvironnement, elles sont capables d'exercer des effets paracrines et autocrines sur les cellules environnantes. Cette communication cellulaire pléiotrope intervient dans une multitude de processus cellulaires et tissulaires (flèches vertes : effet/interaction cellulaire ; flèches bleues : sécrétion/modification) (Caplan & Dennis, 2006).



**Figure 80 : Les deux fonctions des CSM exploitées dans le cadre de leurs applications.**

Le concept de « empowerment/remplacement » représente les deux versants des activités biologiques des CSM dont les thérapies tirent partie. L'« empowerment » vise à optimiser la réponse cellulaire d'un tissu face à un dommage ou une inflammation par l'action trophique des CSMs. Le « remplacement » exploite la plasticité des CSM afin de combler ou résorber une lésion tissulaire par différenciation des CSM en cellules matures spécialisées au sein de ce dernier (Wang *et al.*, 2014).

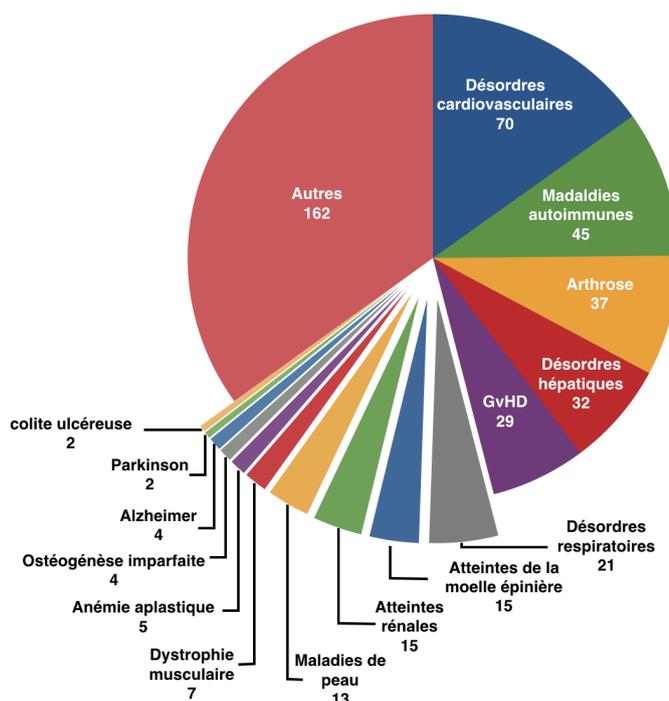
## C. Les applications des CSM.

La capacité de différenciation des CSM et leurs rôles paracrine/autocrine ont été exploités à des fins thérapeutiques [Figure 81]. Ces stratégies ont été employées dans de nombreuses maladies.

Cette utilisation des CSM tire largement parti de leurs propriétés trophiques et immunomodulatrices lorsqu'elles sont utilisées au stade indifférenciée. Il existe deux principaux modes d'administration des CSM indifférenciés : l'injection localisée et l'injection intraveineuse (systémique). Elles représentent les principales utilisations de ces CSM en clinique humaine et vétérinaire.

L'aspect trophique des CSM fait notamment l'objet d'importantes utilisations cliniques. Comme précédemment indiqué, elles sont employées dans le cadre de la limitation des rejets de greffons ou encore pour résorber un déficit immunitaire (Fouillard *et al.*, 2003). Leurs facultés à réguler la prolifération et la différenciation des cellules immunitaires peut être exploitée afin de traiter des maladies neurodégénératives telles que les maladies de Parkinson et d'Alzheimer. D'autre part, elles pourraient servir à diminuer les symptômes des maladies auto-immunes. Ainsi, l'injection intra-articulaire de CSM pourrait diminuer la progression de la polyarthrite rhumatoïde en régulant la différenciation des cellules T régulatrices par l'action de l'IL-10 sécrétée par les CSM.

L'injection localisée ou systémique de CSM pourrait permettre le traitement du tissu cardiaque. En effet, les CSM représentent une excellente source de progéniteurs de cardiomyocytes et pourraient permettre une augmentation de la vitesse de réparation du tissu cardiaque suite à un infarctus du myocarde (Ullah *et al.*, 2015).



**Figure 81 : Nombre de maladies répertoriées par Clinicaltrials.gov faisant l'objet d'une thérapie à base de CSM.** (d'après Ullah *et al.*, 2015).

Indication	Number of patients	Cells used and route of delivery	Result	Reference
Large bone defect	3	Autologous MSC mixed with hydroxyapatite scaffold	Improved bone repair	(Quarto, et al., 2001)
Osteogenesis imperfecta	3	Mixed allogenic bone marrow transplantation	New bone formation and some clinical improvement	(Horwitz, et al., 1999)
Myocardial infarct	60	Autologous mononuclear bone marrow cells (mixed hematopoietic and stromal cells)	Improved global left ventricle function in	(Wollert, et al., 2004)
Peripheral ischemia in lower extremities	22	Autologous mononuclear bone marrow cells (mixed hematopoietic and stromal cells)	Improved clinical parameters related to vascular supply	(Tateishi-Yuyama, et al., 2002)
Methchromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome	4/6	Allogenic MSC transplantation of HLA-identical sibling	Well tolerated and some improvement in neurological functions	(Koc, et al., 2002)
Severe idiopathic aplastic anemia	1	Allogenic MSC transplantation	Improved stromal functions	(Fouillard, et al., 2003)
Bone marrow transplantation of Breast cancer patients	28	Autologous MSC together with peripheral blood progenitor cells infusion	Well tolerated and improved haematological recovery	(Koc, et al., 2000)
Chronic non-healed skin wound	3	Autologous bone marrow (mixed hematopoietic and stromal cells) implantation	Dermal rebuilding and closure of non-healed wounds	(Badiavas, et al., 2003)

**Tableau 6 : Essais cliniques utilisant les CSM.**

Récapitulatif des études de cas et essais cliniques de phase I (Kassem, 2004).

C'est ainsi que plusieurs essais cliniques ont été menés en réparation osseuse, cardiaque, cérébrale, et cutanée (Millard & Fisk, 2013 ; Kassem, 2004) [Tableau 6].

On répertorie notamment l'utilisation d'injection de CSM indifférenciés dans des inflammations aiguës variées comme les inflammations de l'articulation (Saulnier *et al.*, 2015). Concernant ces affections locomotrices et les arthropathies, les injections intra-articulaires de CSM indifférenciés sont plébiscitées dans le modèle humain et mammifère. Leur utilisation permet d'une part de réduire l'inflammation de l'articulation et des tissus environnants et favorise d'autre part la reconstruction des tissus touchés.

Ainsi, il a été montré que l'injection intra-articulaire des CSM chez l'âne permettait d'améliorer les grades cliniques dans un modèle d'arthrose expérimentale (Mokbel *et al.*, 2011). De surcroît, une réparation tissulaire peut être observée ainsi qu'une localisation (post-injection) des CSM au niveau des sites lésionnels. L'injection intra-articulaire de CSM humaines marquées chez des cochons d'Inde montre que ces dernières migrent dans le cartilage articulaire lésé et participent à la réparation tissulaire (Sato *et al.*, 2012). Chez l'Homme, l'injection intra-articulaire de cellules souches fait l'objet d'un nombre conséquent d'essais cliniques (Barry & Murphy, 2013).

Souvent, l'objectif thérapeutique confond l'impact trophique des CSM indifférenciées et leur capacité de différenciation. Il est pour autant difficile de déterminer avec certitude l'implication de chacun de ces deux aspects dans les thérapie par injection de CSM.

Leur capacité de chimiotactisme est également exploitée. En effet, les CSM sont capables de s'orienter vers les sites lésés, inflammatoires ou tumoraux. Par cette capacité de migration, les CSM sont utilisées dans le cadre d'essais cliniques comme véhicules de molécules thérapeutiques (Komarova *et al.*, 2010).

La principale utilisation des CSM en clinique équine a pour but d'améliorer les résultats cliniques lors de troubles musculo-squelettiques et des affections locomotrices telles que les tendinopathies, les inflammations ligamentaires et les fourbures inflammatoires du pied (Schnabel *et al.*, 2013). Chez le cheval, dans un modèle d'arthrose expérimentale induite, l'injection intra-articulaire de CSM permet d'augmenter les taux synoviaux de PGE2 pouvant exercer un rôle anti-inflammatoire (Frisbie *et al.*, 2009). Les CSM sont également utilisées chez ce modèle pour le traitement ligamentaire. L'injection de CSM au sein d'une lésion tendineuse induite permet une amélioration de la structure histologique du tendon (Nixon *et al.*, 2008). Ainsi, à l'heure actuelle, dans le monde équin, l'utilisation des CSM est en plein essor en industrie vétérinaire (Frisbie & Smith, 2010).

En marge de ces thérapies *in vivo* et grâce aux propriétés de plasticité des CSM, ces dernières montrent un intérêt énorme dans les stratégies thérapeutiques d'ingénierie tissulaire *ex vivo*.

### **III. Les CSM et l'ingénierie tissulaire du cartilage.**

Face aux limites liées à l'utilisation de chondrocytes en ingénierie tissulaire du cartilage, une alternative consiste à utiliser la multipotence des CSM. En effet, la capacité de différenciation des CSM en chondrocytes permet d'envisager la génération d'un substitut biologique néo-cartilagineux ou patch cartilagineux à partir de ces dernières. De plus, les multiples sources de CSM et leur capacité de prolifération permet un approvisionnement en matériel cellulaire conséquent. Les propriétés spécifiques des CSM peuvent ainsi permettre de contourner les limites inhérentes à la TCA/MACI actuelle.

L'utilisation des CSM dans l'IT du cartilage se base sur leur capacité à générer un néo-cartilage *ex vivo* dans le but de le réimplanter ultérieurement. Cette capacité est supportée par le potentiel chondrogénique des CSM. De plus, l'absence de CMH-II chez les CSM pourrait fournir un avantage supplémentaire par la possibilité de greffes allogéniques.

A l'heure actuelle, ce type de thérapie est envisageable chez l'Homme. Elle fait l'objet de plusieurs essais cliniques et est en voie d'approbation par la FDA « Food and Drug Administration » (Djouad *et al.*, 2009).

Ces techniques s'appuient sur le même principe que la MACI. Ainsi, les CSM sont incluses dans un biomatériau puis engagées dans la chondrogenèse à l'aide de *stimuli*. On parle alors de thérapie « MACI-like ». La différence avec la MACI réside dans la nécessité de contrôler le lignage chondrocytaire afin de ne pas orienter les cellules vers l'hypertrophie ou l'ostéogenèse. Les

premiers résultats d'une étude pilote de 2009 montrent un gain histologique dans la reconstruction du cartilage, par l'utilisation des CSM, en comparaison avec une MACI classique qui présenterait un important aspect fibrotique. De surcroît, le score qualitatif du cartilage néo-formé par les CSM serait similaire au cartilage natif (Li *et al.*, 2009).

Afin d'utiliser les CSM comme source cellulaire alternative en IT du cartilage, il est nécessaire de maîtriser leur culture, leur différenciation mais également leur isolement.

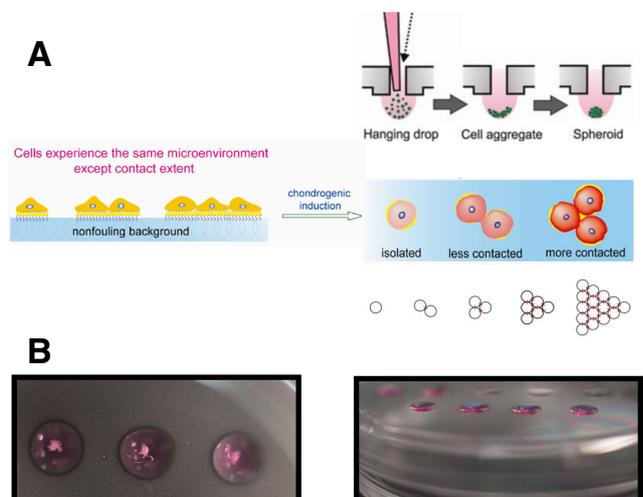
## A. Le contrôle de la chondrogenèse.

Le principal défi de l'IT utilisant les CSM est le contrôle de la chondrogenèse. En effet, il ne suffit pas seulement d'initier les prémices du lignage chondrocytaire. La stabilité du lignage chondrocytaire peut être entravée par une forte tendance à l'hypertrophie des cellules. De plus, le lignage chondrocytaire est étroitement lié au lignage ostéogénique. Il est ainsi indispensable d'obtenir par différenciation un phénotype de chondrocyte mature tout en stabilisant les CSM différenciées à ce stade.

Afin de tendre vers ces objectifs, il est nécessaire de s'inspirer des mécanismes moléculaires régissant le développement du cartilage et plus particulièrement l'ossification endochondrale. Les paramètres clés reposent ainsi sur la simulation *in vitro* des différentes étapes de la chondrogenèse, de la condensation des CSM, en passant par l'induction de la chondrogenèse jusqu'à la maturation. Une inhibition de la différenciation terminale est primordiale, avec l'absence de minéralisation de la MEC cartilagineuse du substitut. Ainsi, à l'image de la MACI, la génération de cartilage à l'aide des CSM est multiparamétrique.

### 1. La culture en 3D et la condensation des CSM.

La culture en 3D est indispensable à la chondrogenèse des CSM. En effet, en absence de contacts cellule-cellule et cellule-MEC, les CSM sont incapables d'initier la chondrogenèse (Ghone & Grayson, 2012). Dans cette optique, plusieurs techniques, souvent basées initialement sur le développement de modèles de culture de cellules cancéreuses, permettent la formation de structures 3D des CSM. Il peut être notamment cité l'utilisation de biomatériau à base de polymères biodégradables (Hutmacher, 2000) comme le collagène ou de polymères hydrophiles et hydrophobes (Miot *et al.*, 2005) (polyglycolide, polylactides, polycaprolactone, agarose). Ces biomatériaux peuvent être utilisés sous forme de gels ou sous forme de microarchitectures poreuses. L'une permet un contact omniprésent autour des cellules tandis que l'autre permet une plus grande modulation de la structure du biomatériau (contrôle de la réticulation et de la microarchitecture) ainsi que de ses propriétés biologiques et physiques.



**Figure 82 : Représentation schématique du principe de « hanging drop ».**

Afin de maximiser les interactions cellules-cellules, les CSM peuvent être cultivées en suspension dans des gouttes de milieu. L'effet de pesantier permet une agrégation des cellules à la base de la goutte (A). Au bout de 24 h, une micromasse est formée et représente un exemple de culture en 3D (B) (adaptation d'Asghar *et al.*, 2013 et Cao *et al.*, 2015).

D'autres travaux s'appuient uniquement sur le contact cellule-cellule par la formation de micromasses à haute cellularité. Il a en effet été montré que la réponse chondrogénique des CSM était proportionnelle au nombre d'interactions cellule-cellule (Cao *et al.*, 2015). Ces formations 3D à haute cellularité peuvent être réalisées par centrifugation en tubes coniques ou par simple gravité comme pour la technique des « hanging-drops » [Figure 82]. Les objectifs de cette culture

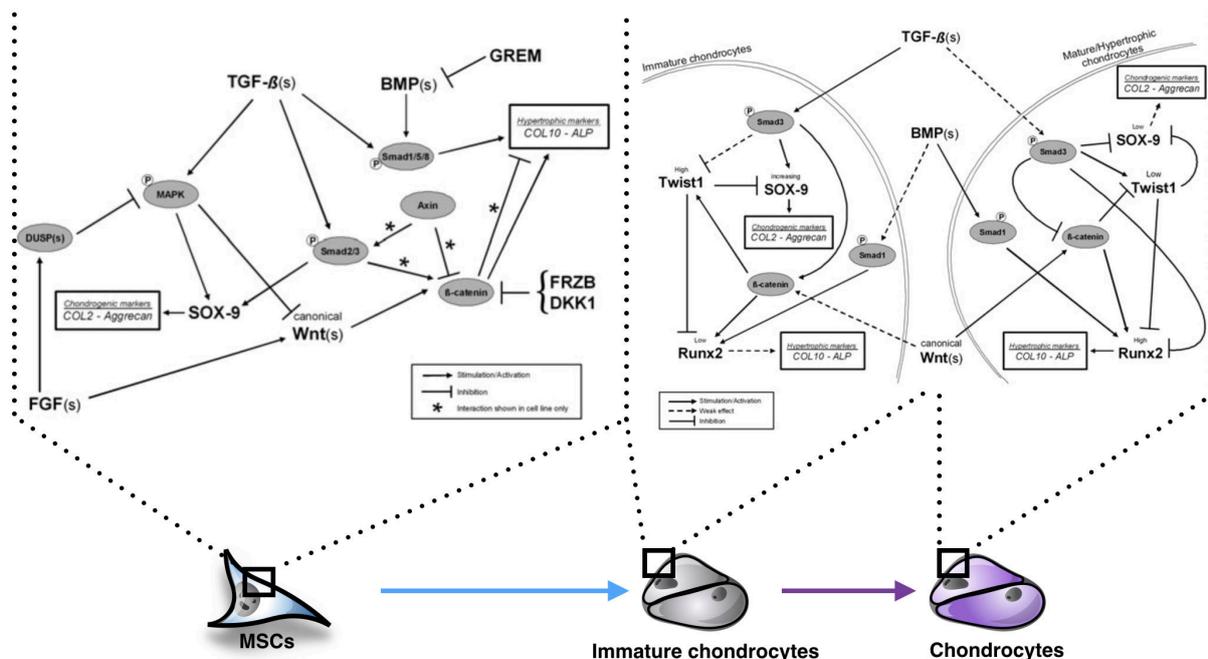
sont, d'une part, la possible application de ce procédé en thérapie d'IT du cartilage, et d'autre part, mimer la condensation des CSM à la base de la chondrogenèse *in vivo*. Les processus mis en jeu respectent tous l'induction des marqueurs chondrocytaires par l'activation du facteur de transcription Sox-9 *via* l'activation des médiateurs membranaires.

Il peut être précisé que la culture à haute densité cellulaire des CSM peut modifier leur phénotype en augmentant leurs propriétés biologiques intrinsèques (Bartosh *et al.*, 2010).

## 2. Les facteurs de croissance : acteurs de la chondrogenèse.

Alors que la BMP-2 suffit à elle seule à induire un recouvrement de la synthèse de marqueurs cartilagineux chez le chondrocyte, elle ne suffit pas à l'initiation de la chondrogenèse (Weiss *et al.*, 2010). En effet, l'initiation de la chondrogenèse est dépendante de l'activation de plusieurs voies de signalisation comme la voie des Smad 2/3 et 1/5, « wingless integration site » (Wnt) et des « Mitogen-activated protein kinases » (MAPK) (Cleary *et al.*, 2015) [Figure 83]. Chaque voie est dépendante de l'action d'un ou de plusieurs facteurs de croissance. Pour autant, dans la littérature, est retrouvée l'utilisation récurrente de certains : la BMP-2, -4, -6 et -7, le TGF-β1 et 3, le « Growth Differentiation Factor 5 » (GDF5), l'IGF-1 ou encore le PTHrP.

La BMP-2 est régulièrement combinée avec le TGF-β1 pour induire la chondrogenèse de



**Figure 83 : L'implication des TGF-β et des BMP dans la chondrogenèse.**

L'initiation de la chondrogenèse et la différenciation chondrogénique sont finement régulées par une variété de facteurs de croissance et voies de signalisation. Sur ce schéma sont présentés l'effet général des TGF-β et des BMP au cours de la chondrogenèse, en plus de l'implication de la voie Wnt/β-caténine. Il existe un grand nombre de communications entre les différentes voies de signalisation intracellulaires. Plusieurs voies/acteurs peuvent être impliqués dans un même processus et peuvent avoir des effets adverses en fonction du stade de différenciation (Cleary *et al.*, 2015).

par leur rôle respectif de médiateur et initiateur de la chondrogenèse. De plus, cette combinaison permet le changement isotypique du collagène de type IIA en type IIB (Demoor *et al.*, 2014). Le TGF-β3 est capable à lui seul d'induire la chondrogenèse et est régulièrement utilisé pour limiter l'utilisation de plusieurs facteurs de croissance. Des combinaisons simultanées ou temporelles plus complexes sont également utilisées afin de mimer la succession d'évènements biologiques observables durant le développement embryonnaire (Handorf & Li, 2014).

### 3. L'hypoxie : un rôle bivalent.

L'hypoxie a un rôle important sur le phénotype des CSM induites en chondrocytes. Comme vu précédemment, elle est capable de limiter l'entrée des chondrocytes vers le stade hypertrophique et ainsi inhiber la différenciation terminale des CSM différenciées en chondrocytes. L'hypoxie est, de plus, capable d'induire la synthèse d'une MEC chondrogénique de meilleure qualité chez les CSM-MO différenciées en chondrocytes (Lee *et al.*, 2013 ; Branly *et al.*, 2017 ; Legendre *et al.*, 2017). Pour autant, son implication reste discutable dans les premières étapes de la chondrogenèse et dans la différenciation d'autres sources de CSM telles que celles de SPL. L'hypoxie pourrait également être impliquée dans la plasticité des CSM et leur auto-renouvellement. En effet, au sein des niches de CSM/CSH, réside un microenvironnement fortement hypoxique (Cipolleschi *et al.*, 1993). Cette hypoxie pourrait favoriser d'une part la prolifération des CSM et d'autre part leur capacité d'engagement dans différents lignages cellulaires (Grayson *et al.*, 2006).

### B. Les différentes sources de CSM.

Les CSM-MO représentent l'exemple même des CSM et demeurent les plus étudiées à ce jour. Ayant permis d'établir les caractéristiques des CSM, elles sont encore considérées comme étant un « gold standard ». Pourtant, des CSM ou CSM-like sont retrouvées dans la quasi totalité des tissus somatiques adultes et néonataux. Outre la MO, des CSM ont été isolées à partir de tissu adipeux (Zuk *et al.*, 2002) et en proportion moindre au niveau de la membrane synoviale, du muscle, du périoste, du foie, du poumon, de la pulpe dentaire (Mafi *et al.*, 2011) (Chamberlain *et al.*, 2007 ; Huang *et al.*, 2009) ou encore du sang périphérique. Il a également été décrit la présence des progéniteurs chondrocytaires CSM-like au sein du cartilage articulaire mature adulte. Ces chondroprogéniteurs joueraient potentiellement un rôle dans la réparation précoce du cartilage suite à des dommages (Jiang & Tuan, 2015). En parallèle de ces CSM adultes, d'autres CSM ont été isolées à partir de tissus prénataux et néonataux (Weiss & Troyer, 2006). Ces différents tissus accueillant des populations de CSM-like correspondent au placenta, au système périvasculaire, au liquide amniotique et au cordon ombilical.

## IV. Les cellules souches mésenchymateuses néonatales.

Même si le type de CSM le plus utilisé dans le cadre thérapeutique reste les CSM-MO, il est admis dans la communauté scientifique que leur utilisation présente des limites. En effet, ces CSM adultes perdent leur potentiel biologique en fonction de l'âge du sujet chez lequel elles sont prélevées. D'une part, la quantité de CSM adultes isolées chez les sujets âgés est sensiblement diminuée et d'autre part, ces CSM entrent plus rapidement en sénescence répliquative à cause d'une diminution de la taille de leurs télomères (Mareschi *et al.*, 2006). Le phénotype des CSM adultes semble influencé par les facteurs intrinsèques et extrinsèques de l'organisme. En effet, chez un individu, l'administration chronique de NSAID pourrait affecter le potentiel de différenciation des CSM adultes issues du même individu. Il a, entre autres, été constaté que l'alimentation de l'individu avait également une grande influence sur le comportement des CSM *ex vivo* (Kalaszczynska & Ferdyn, 2015).

Pour limiter ces impacts sur les stratégies thérapeutiques, les recherches se sont orientées vers des sources cellulaires théoriquement non soumises aux phénomènes épigénétiques liés à l'âge, il s'agit des tissus néonataux.

Il a été décrit dans la littérature, autour des années 2000, que des progéniteurs mésenchymateux pouvaient être retrouvés dans les tissus foetaux, prénataux et postnataux (Campagnoli *et al.*, 2001 ; Erices *et al.*, 2000). Les cellules issues notamment des annexes embryonnaires et du cordon ombilical présentent un avantage considérable en terme d'isolement

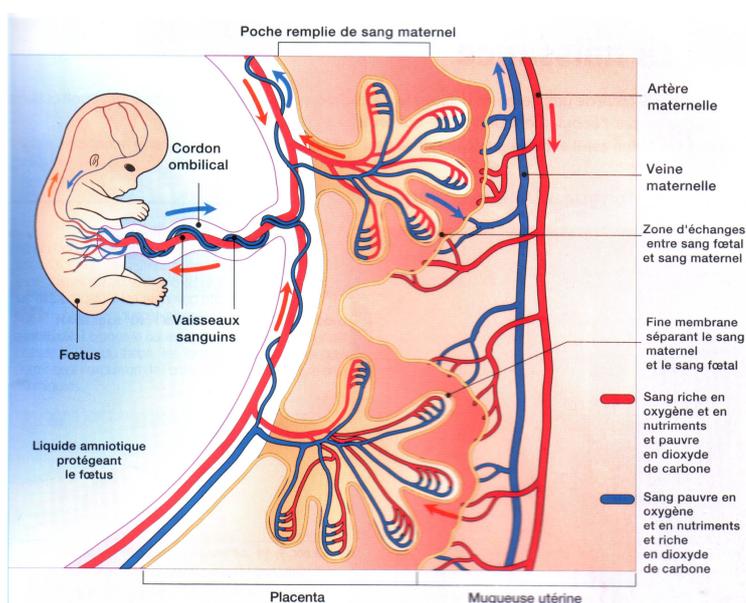
car ces tissus peuvent être récupérés sans intervention lors de la naissance des mammifères. Ces tissus représentent des réservoirs conséquents de CSM et de CSH au regard de leur importance dans la formation des cellules sanguines au cours du développement embryonnaire (Péault, 1996 ; Romanov et al., 2003).

D'un point de vu biologique, un débat existe sur le fait de considérer les CSM néonatales comme étant des CSM primitives. En effet, cette question peut être considérée à juste titre, étant donné que ces CSM sont générées durant les stades précoces du développement et qu'il est possible de les isoler à la fin de la gestation. Il a notamment été montré que les CSM néonatales étaient plus prolifératives et possédaient des télomères plus longs que les CSM adultes. Il semble également que les CSM néonatales soient plus naïves, immunologiquement parlant, dans la mesure où il y a une absence d'expression du CMH-II (Troyer & Weiss, 2008). Des suspicions d'expression de gènes de pluripotence ont également été soulevées (Carlin et al., 2006).

Le cordon ombilical, initialement considéré comme déchet opératoire avant 2011 (en santé humaine), représente une forte attractivité thérapeutique étant donné la présence de CSM. Cette attractivité est basée sur le fait que tout en répondant aux caractéristiques préconisées par l'ISCT, les CSM de cordon ombilical présenteraient des différences biologiques avantageuses par rapport aux CSM adultes.

## A. Le cordon ombilical.

Le cordon ombilical est un organe formé à la quatrième semaine du développement embryonnaire chez l'Homme et est constitué à partir de l'embryon lui-même. Il évolue en parallèle de l'embryon et permet principalement le transport du sang maternel et son plasma entre le placenta et l'embryon/foetus [Figure 84]. Il est entouré d'un épithélium amniotique et composé de deux artères organisées en spirale autour d'une veine, ancrées au sein d'une matrice appelée gelée de Wharton [Figure 85]. La veine ombilicale apporte au foetus un sang riche en nutriments et oxygène alors que les deux artères amènent le sang vers le placenta. Chez l'équidé, ce volume sanguin transitant par le cordon représente un tiers du volume sanguin total du poulain. Le cordon ombilical peut être séparé du nouveau-né une dizaine de minutes après la naissance, une fois la majorité du sang afférent transféré vers le poulain.



**Figure 84 : Représentation schématique des flux sanguins entre le foetus et le placenta.**

Le rôle du cordon ombilical est de permettre l'échange de sang entre la mère et le foetus. Ce sang transite par le placenta qui assure sa filtration (<http://svt.ghediri.com/upload/placenta.jpg>).

Le cordon ombilical est riche en CSM et ces dernières peuvent être isolées à partir de plusieurs zones du cordon chez les mammifères, y compris chez le cheval (Reed & Johnson, 2008 ; Hass et al., 2011).

## B. Les cellules souches de sang placentaire (CSM-SPL).

C'est en 2000 que les progéniteurs mésenchymateux ont été pour la première fois isolés dans le sang de cordon ombilical (Erices et al., 2000). En 2005, l'équipe de McGuckin est la première à décrire un protocole d'isolement reproductible de cellules « fibroblastiques » à partir de

sang de cordon ombilical ou sang placentaire (McGuckin *et al.*, 2005). Ces cellules répondent aux caractéristiques des cellules souches et représentent une alternative intéressante aux cellules souches embryonnaires qui imposent d'importantes contraintes éthiques. Le protocole se base sur un tri cellulaire afin d'exclure les cellules sanguines et immunitaires. Ce protocole a évolué et s'est simplifié (Kern *et al.*, 2006). Brièvement, le sang placentaire est récupéré à partir du cordon ombilical tout en empêchant sa coagulation. En laboratoire, ce sang est passé sur gradient de densité sous centrifugation afin d'en séparer les différentes phases et types cellulaires.

Le sang placentaire est composé de types cellulaires différents : des CSH, des granulocytes, des érythrocytes et de cellules fibroblastiques mononucléées. Sur le gradient de densité, la phase cellules mononucléées est récupérée. Les cellules sont isolées par leur capacité d'adhésion au plastique. Au bout de 10 à 20 jours, des CFU-F sont visibles.

Ces CSM-SPL présentent un fort potentiel de prolifération, supérieur aux CSM adultes (Kern *et al.*, 2006). Elles présentent les marqueurs spécifiques des CSM et sont dépourvues des marqueurs hématopoïétiques. Elles sont également capables de se différencier en chondrocytes et en ostéoblastes. Néanmoins, leur capacité à se différencier en adipocytes semble différente des CSM-MO. En effet, il semble difficile de les orienter vers ce lignage cellulaire (Karagianni *et al.*, 2013). Les CSM-SPL semblent capables de se différencier en d'autres types cellulaires comme les cellules musculaires, hépatocytes ou en neurones (Gang *et al.*, 2004 ; Hong *et al.*, 2005).

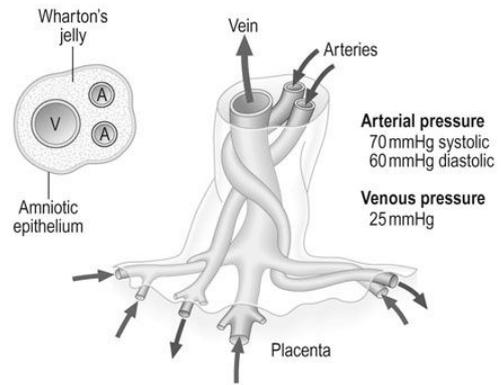
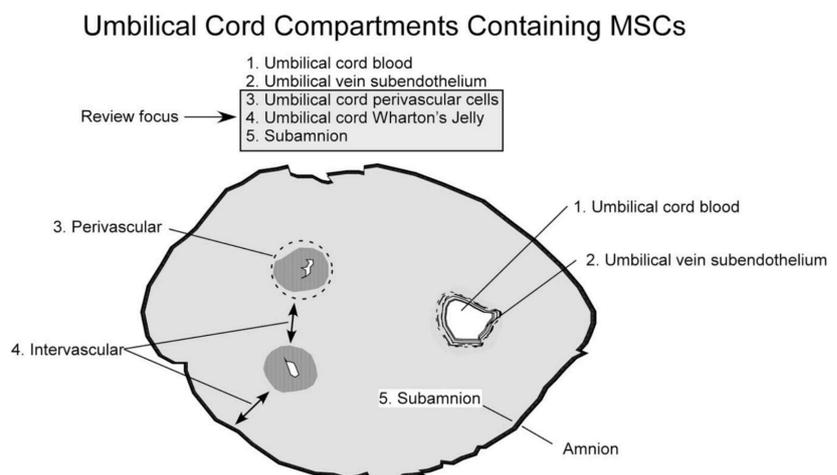
Les CSM-SPL représentent une source alternative de CSM, dont le prélèvement n'est pas invasif. La présence de certains marqueurs embryonnaires au sein des CSM-SPL suggère une alternative à l'utilisation de CSE qui reste controversée (McGuckin *et al.*, 2005).

### C. Les cellules souches de gelée de Wharton (CSM-GW).

Autour des veines et de l'artère du cordon ombilical, un tissu fibreux est présent et sert de gaine de protection au système vasculaire. Ce tissu est de nature hétérogène et la distinction des sous-types de tissus est difficile. On note néanmoins la présence d'une zone péri-vasculaire, inter-vasculaire et du sub-amnion [Figure 86].

**Figure 86 : Représentation schématique d'une coupe transversale de cordon ombilical.**

La matrice du cordon ombilical entoure les 2 artères et la veine ombilicale. Elle apporte une structure au cordon ombilical mais a également un rôle nourricier. Au sein de la matrice, les zones péri-vasculaire, inter-vasculaire et le sub-amnion constituent la gelée de Wharton (Troyer & Weiss, 2008).



**Figure 85 : Représentation schématique de la structure du cordon ombilical.**

Le cordon ombilical est un organe se composant de deux artères et d'une veine. Les trois vaisseaux sont entourés d'un tissu de soutien, la gelée de Wharton ([http://clinicalgate.com/wp-content/uploads/2015/03/B9780702030680000045\\_f004-005-9780702030680.jpg](http://clinicalgate.com/wp-content/uploads/2015/03/B9780702030680000045_f004-005-9780702030680.jpg)).

Ce tissu est également considéré comme étant la matrice ou matrice stromale du cordon ombilical. Au cours de la formation du cordon ombilical, cette matrice possède un rôle stromal et permet la migration et la maturation des cellules hématopoïétiques du cordon. Cette fonction nourricière vis-à-vis des CSH est assurée par les cellules progénitrices considérées comme CSM-like, communément appelées CSM-GW ou CSM de matrice de cordon ombilical. Il est possible d'isoler ces CSM-GW (Mitchell *et al.*, 2003), néanmoins il est difficile de connaître leur localisation précise au sein de la matrice du cordon.

Leur isolement est réalisé à partir de cordons ombilicaux pris en charges dans les 24 h suivant la naissance. Les cordons sont nettoyés, découpés en pièces de 3 à 5 cm de longueur et les vaisseaux sanguins sont retirés. Deux digestions enzymatiques successives assurent la dégradation de la matrice conjonctive afin de permettre la récupération des cellules. La sélection des cellules adhérentes est ensuite réalisée par culture en monocouche.

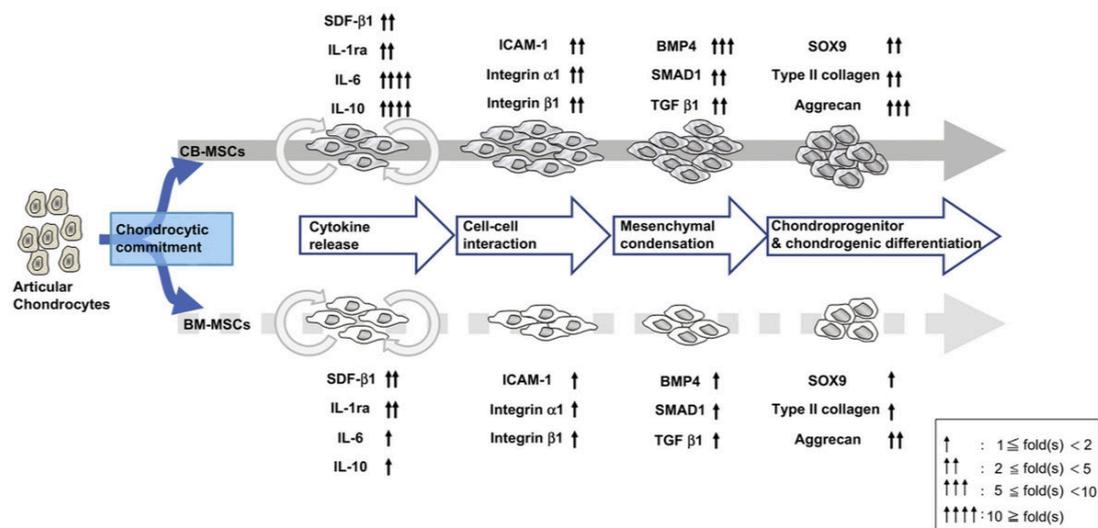
Les CSM-GW répondent aux caractéristiques des CSM. D'après la littérature, les CSM-GW sont très semblables aux CSM-SPL. Elles possèdent, en effet, une capacité de prolifération supérieure aux CSM adultes et voient leur capacité d'adipogenèse restreinte, à la différence de leur capacité de différenciation en chondrocytes et en ostéoblastes. En revanche, leur taux d'isolement semble largement supérieur aux CSM-SPL étant donné qu'il est proche de 100%, contre 67% pour les CSM-SPL (Bieback *et al.*, 2004 ; Weiss & Troyer, 2006).

L'accessibilité des CSM-GW, leur isolement, leur capacité de prolifération et le maintien de leur phénotype au cours des passages facilite la démarche de stockage cellulaire ou « banking » de ces CSM dans le cadre de leurs applications. A l'heure actuelle, les CSM-GW sont utilisées dans diverses thérapies et applications comme la maladie de Parkinson ou les ischémies cérébrales. Leur capacité de différenciation ne se limite pas à une tripotence. Elles servent entre autres de support à l'hématopoïèse *in vitro* ainsi qu'à la génération de neurones et de cellules cardiaques (Seshareddy *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2004).

## **V. Les CSM néonatales : une source alternative dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage.**

L'ingénierie tissulaire du cartilage doit faire face à certaines limites dont une partie réside dans le matériel cellulaire nécessaire pour cette application. En effet, à l'heure actuelle, le chondrocyte représente toujours le « gold standard » dans le cadre de la MACI. La dédifférenciation des chondrocytes, le caractère invasif de leur prélèvement, leur faible prolifération ainsi que le nombre de cellules nécessaires à l'application de la MACI font de cette dernière un défi thérapeutique. Par leur capacité à générer un néo-tissu *in vitro*, les CSM permettraient de contrecarrer ces limites techniques. Elles possèdent un potentiel prolifératif conséquent ainsi qu'un prélèvement simplifié par rapport à la ponction pour la MO ou une biopsie pour le tissu adipeux. De plus, les CSM adultes semblent perdre leurs capacités d'auto-renouvellement et de différenciation avec l'âge de l'individu et en fonction de la durée de leur culture, ceci rend difficile les démarches d'industrialisation de techniques de culture *ex vivo*.

Grâce à un prélèvement dépourvu de toutes contraintes éthique et chirurgicale, les CSM issues de cordon ombilical détiennent un intérêt certain. Leur forte capacité de division cellulaire permet la mise en place de modèles de culture industriels comme la culture « Scale-up » et le « bio-banking » (Nekanti *et al.*, 2010). Dans l'objectif de générer un cartilage *in vitro*, il est indispensable de s'intéresser au potentiel chondrogénique de ces CSM de SPL et de GW. Leur chondrogenèse peut être évaluée par la mise en évidence des marqueurs spécifiques du cartilage après induction de ce lignage chez les CSM. La caractérisation phénotypique passe par l'utilisation



**Figure 87 : Comparaison des potentiels thérapeutiques entre CSM-SPL et CSM-MO.**

Ce schéma récapitule les résultats acquis lors d'une étude visant à analyser le potentiel chondrogénique de CSM-SPL et CSM-MO co-cultivées avec des chondrocytes articulars. D'après cette étude, les CSM-SPL présentent un meilleur potentiel chondrogénique que les CSM-MO (Lo *et al.*, 2013).

de différents outils analytiques comme l'étude du transcriptome et du protéome, mais également par l'aspect morphologique (macro- et microscopique), l'aspect biomécanique ou fonctionnel.

Depuis leur découverte et grâce aux démarches de caractérisation des CSM, la différenciation chondrogénique est évaluée dans la plupart des travaux portant sur les CSM-SPL et CSM-GW. Néanmoins, cette différenciation est réalisée dans l'objectif de répondre aux pré-requis de l'ISCT. Cependant, l'analyse de la génération de cartilage *in vitro* à partir de CSM-GW et CSM-SPL est souvent réalisée par simple coloration histochimique (bleu alcian, bleu de toluidine ou safranine-O) ou *via* l'utilisation de quelques biomarqueurs au niveau de leur taux moyen d'ARNm. L'absence de certains contrôles et la faible puissance des résultats sur la qualité de la différenciation rendant difficile le fait de statuer sur le potentiel chondrogénique des CSM issues de différentes sources.

La différenciation chondrogénique fait intervenir beaucoup de paramètres de culture *in vitro*, comme la maîtrise des facteurs chondrogéniques, la structure en 3D ou les conditions oxiques. Bien souvent, les contraintes techniques, liées à la différenciation chondrogénique et aux analyses biochimiques et moléculaires, conduisent à des investigations pour le moins peu finalisées, poussées et donc critiquables (Kern *et al.*, 2006 ; Karahuseyinoglu *et al.*, 2007 ; Reed & Johnson, 2008 ; Wagner *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2015).

De plus, la plupart des études concernant les CSM néonatales visent à définir l'ensemble des caractéristiques de l'ISCT sans focalisation sur la voie chondrogénique en particulier.

Néanmoins, la communauté scientifique s'accorde à dire que ces CSM néonatales possèdent un fort potentiel chondrogénique. Ces résultats sont souvent issus de comparatifs cellulaires entre les CSM néonatales et les CSM adultes. Leur différenciation chondrogénique est le plus souvent réalisée par culture en micromasse à haute densité cellulaire et après 21 à 28 jours de culture en milieu chondrogénique supplémenté de facteurs de croissance ou à l'aide de milieux commerciaux.

## A. Les CSM de sang placentaire et l'ingénierie tissulaire du cartilage.

La communauté scientifique indique que les CSM-SPL sont capables de se différencier en chondrocytes (Kern *et al.*, 2006). En effet, il a été montré que les micromasses de CSM-SPL différenciées en chondrocytes présentaient une forte coloration par le bleu alcian et par la

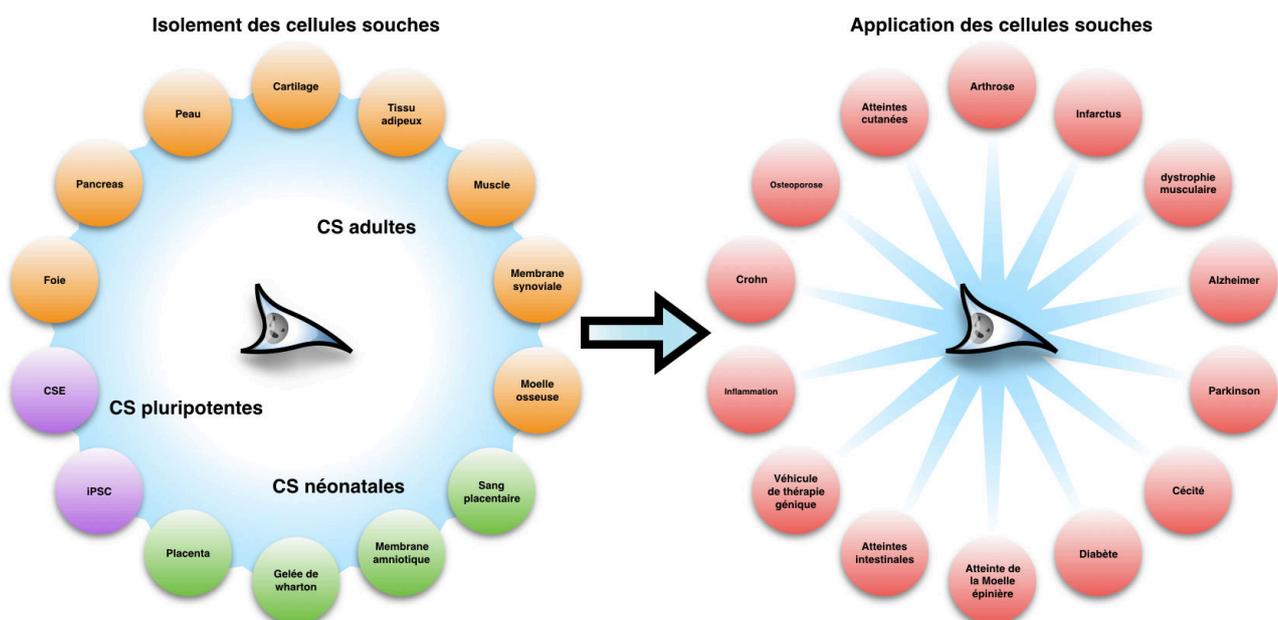
safranine-O (Lee *et al.*, 2015). De même, elles sont capables d'exprimer des marqueurs chondrocytaires au cours de leur différenciation (Lo *et al.*, 2013 ; Bosch *et al.*, 2012) [Figure 87]. Les marquages immunohistochimiques montrent une prépondérance du collagène de type II au sein des structures induites par la différenciation chondrocytaire des CSM-SPL (Zhang *et al.*, 2011). D'après ces derniers auteurs, l'expression des marqueurs spécifiques des chondrocytes est supérieure chez les CSM-SPL par rapport aux CSM-MO après chondrogenèse. Ceci sous-entendrait une utilisation préférentielle des CSM-SPL dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage.

Une étude récente au sein du laboratoire a évalué le potentiel chondrogénique de CSM-SPL incluses en éponges de collagène de type I puis implantées chez la souris *nude* en sous cutané. Les résultats ont montré la présence d'une MEC proche du cartilage hyalin avant et après implantation, validant ainsi leur utilisation *in vivo* chez le petit animal (Gomez-Leduc *et al.*, 2016).

## B. Les CSM de gelée de Wharton et l'ingénierie tissulaire du cartilage.

L'analyse bibliographique sur les CSM-GW est compliquée par le fait que les CSM-GW sont présentes sous plusieurs dénominations dans la littérature : CSM de gelée de Wharton, de cordon ombilical, de matrice de cordon ombilical, dérivées de cordon ombilical ou péri-vasculaires. Ces différentes appellations rappèlent l'imprécision de la zone du cordon à partir de laquelle les cellules son extraites.

Les premiers travaux sur les CSM-GW montrant leurs caractéristiques CSM-like indiquent un potentiel de différenciation chondrogénique. On distingue une positivité aux différentes colorations histologiques du cartilage et un marquage du collagène de type II (Wang *et al.*, 2004). Plus récemment, des publications montrent que les CSM-GW différenciées en chondrocytes expriment les marqueurs du cartilage à la fois au niveau transcriptionnel mais aussi protéique (Nirmal & Nair, 2013 ; Tanthaisong *et al.*, 2017 ; Karahuseyinoglu *et al.*, 2007 ; Fong *et al.*, 2011) (Reppel *et al.*, 2015 ; Liu *et al.*, 2014 ; Arufe *et al.*, 2011). La communauté scientifique considère que les CSM-GW représentent donc un type cellulaire alternatif utilisable en ingénierie tissulaire du cartilage.



**Figure 88 : Les différentes sources de CS et leurs applications.**

Liste non exhaustive des sources à partir desquelles peuvent être issues les cellules souches. Parallèlement, les stratégies thérapeutiques utilisant les cellules souches multiples sont présentées. Les travaux actuels sur les cellules souches cherchent à évaluer si une relation de causalité existe entre la source de CS et son potentiel thérapeutique pour une maladie donnée.

Paradoxalement, d'autres équipes montrent un potentiel chondrogénique restreint chez les CSM-GW. Notamment, Hildner *et al.*, montrent une différenciation moins effective chez les CSM-GW que chez les CSM-TA (Hildner *et al.*, 2010). Dans le même sens, le potentiel chondrogénique des CSM-GW est inférieur aux CSM-MO et CSM-SPL d'après Wang *et al.*, (Wang *et al.*, 2009). Malgré une différenciation en chondrocytes démontrée, certaines publications montrent de faibles expressions des marqueurs chondrocytaires au niveau transcriptionnel (Beeravolu *et al.*, 2016 ; Lee *et al.*, 2015).

A l'heure actuelle, il semble que les conclusions sur la possibilité de générer du cartilage hyalin à partir de CSM-GW restent incertaines du fait des contradictions de la littérature scientifique (Klontzas *et al.*, 2015).

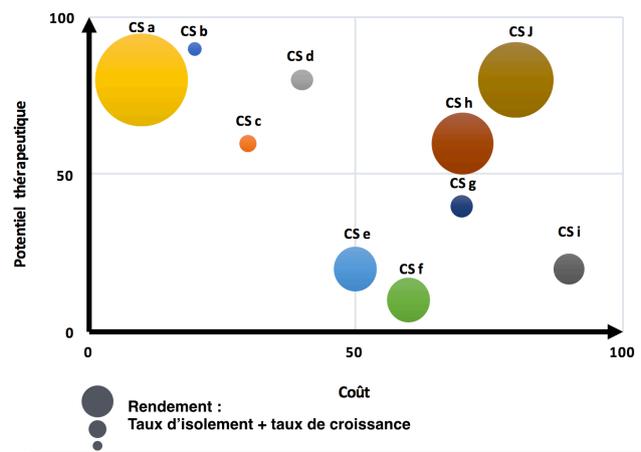
Chez le cheval, les résultats sont à l'image de ceux de la littérature en médecine humaine, comme en témoignent les études de Burk *et al.* et de Lovati et ses collaborateurs (Burk *et al.*, 2013 ; Lovati *et al.*, 2011). Néanmoins, la plupart des revues vétérinaires n'abordent que quelques facettes de la chondrogenèse et permettent difficilement d'évaluer le potentiel de différenciation chondrogénique des CSM-GW.

### C. D'une source de CSM à une thérapie.

L'ensemble des tissus présente une quantité variable de CSM. De plus, la proportion de CSM dans les tissus évolue avec l'âge. Pour chaque tissu, les protocoles d'isolement des CSM peuvent varier, passant d'une digestion enzymatique à un isolement par gradient de ficoll. Ces variables techniques et biologiques impliquent une importante hétérogénéité inter-population. Cette hétérogénéité implique potentiellement une différence phénotypique entre les différentes sources de CSM. Les différences phénotypiques se traduisent par des différences dans les propriétés biologiques.

Les nouveaux travaux de recherche sur l'application thérapeutique des CSM se tournent donc vers la prise en compte de cette variable inter-population. La communauté scientifique cherche alors à évaluer les différences entre les CSM, mieux les caractériser pour limiter ces différences, comprendre ces différences et ceci dans le but d'une personnalisation des applications utilisant ces CSM [Figure 88] (Russell *et al.*, 2010 ; Pevsner-Fischer *et al.*, 2011).

Pour autant, nous ne pouvons restreindre l'application thérapeutique d'une source cellulaire à son seul effet biologique [Figure 89]. Dans l'objectif de l'élaboration de technologies d'IT du cartilage à partir de CSM, ces variables doivent être évaluées et prises en compte. Ceci afin d'optimiser les procédés de génération des tissus *in vitro* mais également dans le but de comprendre les mécanismes régissant la différenciation chondrogénique et le comportement des CSM.



**Figure 89 : Potentiel thérapeutique en fonction du coût de l'application de différentes sources de cellules souches.**

Au vu du nombre de sources différentes à partir desquelles peuvent être issues les CS, l'index « potentiel thérapeutique/coût » doit être pris en considération pour élaborer une stratégie thérapeutique. Il tient compte du potentiel thérapeutique de chaque source pour une maladie donnée, le rendement d'isolement et de production ainsi que l'éventuel coût d'une telle thérapie. Ici, le type « CS a » pourrait représenter une source attractive car il possède l'un des meilleurs potentiel thérapeutique pour un faible coût et un fort rendement. Unités arbitraires.

# Objectifs de l'étude

---

# Objectifs de l'étude

---

Cette thèse CIFRE représente un partenariat entre le laboratoire académique BIOTARGEN et l'entreprise vétérinaire VETBIOBANK. La première équipe a apporté les connaissances, des ressources financières, et les technologies utilisées pour l'élaboration de l'étude et la seconde a fourni des moyens financiers, son expertise sur l'aspect trophique/immunomodulateur des CSM ainsi que les CSM de qualité industrielle nécessaires à l'étude.

Cette thèse a permis le développement d'un projet de recherche visant à améliorer les stratégies thérapeutiques d'ingénierie tissulaire du cartilage chez le modèle équin dans l'objectif de traiter les arthropathies équines. Elle fait l'objet notamment de l'évaluation du potentiel thérapeutique de cellules souches néonatales issues SPL et de GW.

Elle s'organise principalement autour de deux axes :

- Le premier axe vise à la mise au point d'une stratégie thérapeutique optimisée utilisant les chondrocytes articulaires équins. A l'heure actuelle, la TCA développée et utilisée chez l'Homme présente des limites biologiques comme la perte du potentiel d'expression d'une MEC hyaline par les chondrocytes ainsi qu'une sur-expression du collagène de type I. Cet axe a pour but, d'une part, de transposer un procédé breveté par le laboratoire chez l'Homme ([Galéra et al., 2012](#)) chez le cheval ainsi que l'élaboration *in fine* d'un « gold standard » utilisé comme outil de comparaison pour le deuxième axe.
- Du fait des limitations observées dans l'utilisation des cellules somatiques adultes en ingénierie tissulaire, les techniques de médecine régénérative s'orientent vers l'utilisation de cellules souches pour l'élaboration de nouvelles générations de thérapies. Le deuxième axe vise à une comparaison de potentiel thérapeutique des CSM néonatales équines issues de cordon ombilical : CSM-SPL et CSM-GW. Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage, c'est le potentiel chondrogénique de ces deux types de CSM qui a été évalué et plus particulièrement la possibilité de générer un substitut cartilagineux de haute qualité biologique. Les résultats ont alors été comparés au « gold standard » utilisant les chondrocytes articulaires équins.

Outre le caractère appliqué de ces deux axes, les résultats qui découlent de ce projet de recherche permettent une meilleure compréhension des mécanismes de maturation, de développement et de régulation du chondrocyte et de sa MEC. La comparaison du potentiel thérapeutique des cellules permet également d'aborder un aspect plus conceptuel des cellules souches par la mise en évidence d'hétérogénéités biologiques entre les sources de CSMs.

Le cheval, par son caractère sportif et son statut de modèle gros animal, permet d'envisager l'utilisation de telles thérapies chez ce dernier. Les similitudes biologiques entre l'Homme et le cheval permettent un transfert technologique entre ces deux modèles. Le contexte économique de l'arthrose chez le cheval a permis, ces dernières années, de voir émerger de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques notamment par le biais de traitements cellulaires utilisant les CSM. Les enjeux économiques et sanitaires de la recherche cellulaire et tissulaire du cartilage chez l'Homme et le cheval sont élevés. Outre les avancées dans le domaine vétérinaire, ces résultats permettraient ainsi un apport conjoint de technologie entre les deux modèles.

# Résultats

---



# **Chapitre 1 : Premier article**

---

# Chapitre 1 : Premier article

---

## **I. RNA interference and BMP-2 stimulation allows equine chondrocytes redifferentiation in 3D-hypoxia cell culture model: Application for matrix-induced autologous chondrocyte implantation.**

International Journal of Molecular Sciences; en révision.

Rodolphe Rakic (1,2), Bastien Bourdon (1), Magalie Hervieu (1), Thomas Branly (1), Florence Legendre (1), Nathalie Saulnier (2), Fabrice Audigié (3), Stéphane Maddens (2), Magali Demoor (1), Philippe Galéra\* (1).

1. Normandie Univ, UNICAEN, Laboratoire Microenvironnement Cellulaire et Pathologies (MILPAT), équipe Microenvironnement des Pathologies Dégénératives et Fibrotiques (MIPDF), EA 4652/BIOTARGEN EA 7450, Faculty of Medicine, Université de Caen Normandie, 14000 Caen, France.

2. Vetbiobank, Marcy l'Etoile, France.

3. Imaging and Research Centre of Equine Locomotor Disorders (CIRALE; Goustranville), Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort.

\* Corresponding author: philippe.galera@unicaen.fr

### **A. Objectifs de l'article : La MACI, de l'Homme au cheval. Vers l'obtention d'un « gold standard ».**

Chez le cheval, les affections locomotrices induisent une importante perte économique à la filière équine. Parmi ces affections locomotrices, l'arthrose serait responsable de 60% d'entre elles et représente ainsi un intérêt sanitaire majeur en médecine vétérinaire. Cette arthrose est induite par l'émergence de lésions focales à la surface du cartilage lors de sur-sollicitations ou lors de chocs traumatiques. Ces derniers facteurs extrinsèques sont exacerbés lorsqu'il s'agit du cheval sportif.

Chez l'Homme, les récentes avancées en terme de médecine régénérative ont permis l'émergence de thérapies cellulaires du cartilage et dont la principale représentante est la TCA. Cette dernière a évolué sous plusieurs aspects pour aboutir à une thérapie d'ingénierie tissulaire : la MACI. Cette évolution s'est basée sur la volonté de lever les verrous technologiques inhérents à l'intervention chirurgicale et à la stabilité phénotypique du chondrocyte en culture.

C'est dans cette optique qu'en 2012, le laboratoire a déposé un brevet sur une stratégie de redifférenciation du chondrocyte articulaire humain afin de recouvrir un phénotype chondrocytaire mature et stable, perdu au cours de la période d'amplification *in vitro* des cellules.

Des études récentes ont montré une faisabilité de la technique de TCA chez le cheval avec l'obtention de résultats bénéfiques sur le court et le moyen terme. Suite à ces avancées, notre volonté a été de transposer le protocole humain de redifférenciation des chondrocytes vers le modèle équin avec les contraintes techniques qui en découlent : limitation des outils moléculaires disponibles, démarche d'approvisionnement en matériel cellulaire et création d'un réseau scientifique dynamique.

Cet article résume l'ensemble du projet visant à l'obtention d'un phénotype chondrocytaire mature stable après dédifférenciation des chondrocytes amplifiés en culture.

Le processus de dédifférenciation de chondrocytes n'ayant pas été décrit chez le cheval, la perte du phénotype chondrocytaire avec l'amplification des cellules a été vérifiée dans un premier temps.

D'un point de vue méthodologique, le processus de redifférenciation se base sur une stimulation des chondrocytes dédifférenciés en culture par la BMP-2, au cours d'une culture en modèle 3D et hypoxique. Le premier objectif de l'article a été de montrer, d'une part, l'intérêt de la redifférenciation des chondrocytes équins, y compris chez des sujet jeunes, et d'autre part, de permettre un recouvrement de la synthèse de MEC par ces chondrocytes.

L'utilisation de la BMP-2 et de ce modèle de culture implique une expression de marqueurs atypiques du cartilage. Il s'agit du collagène de type I qui ne possède pas les mêmes propriétés mécaniques que son analogue, le collagène de type II. Une induction d'*Htra1* est également observée et est responsable de la dégradation de la MEC cartilagineuse ainsi que des récepteurs de la famille des TGF- $\beta$  tels que les récepteurs à la BMP-2. La dernière partie de cet article est consacrée à l'application d'une stratégie d'interférence par l'ARN ciblant le collagène de type I et *Htra1* afin d'inhiber l'expression de ces marqueurs atypique et aboutir à la synthèse d'une MEC de haute qualité biologique.

Outre le transfert de la stratégie de redifférenciation des chondrocytes de l'Homme vers le cheval, ces premiers travaux de thèse ont permis de construire la base technologique nécessaire à l'analyse moléculaire et cellulaire des cellules équines. Ils ont également pointé les différences et subtilités du modèle équin et, notamment, le comportement des cellules issues d'individus jeunes, difficiles à obtenir dans le modèle humain lorsqu'il s'agit de travailler sur le chondrocyte.

## **B. Premier article.**

### **1. Abstract.**

As in humans, osteoarthritis (OA) causes considerable economic loss to the equine industry. New hopes for cartilage repair have emerged with the matrix-associated autologous chondrocyte implantation (MACI). Nevertheless, its limitation is due to the dedifferentiation occurring during the chondrocytes amplification phase leading to the loss of its capacity to produce a hyaline ECM. To enhance the MACI therapy efficiency, we have developed a strategy for chondrocyte redifferentiation and demonstrated its feasibility in the equine model. Thus, to mimic the cartilage microenvironment, the equine dedifferentiated chondrocytes were cultured in type I/III collagen sponges for 7 days under hypoxia in the presence of BMP-2. In addition, chondrocytes were transfected by siRNA targeting *Col1a1* and *Htra1* mRNAs which are overexpressed during dedifferentiation and OA. To investigate the quality of the neo-synthesized ECM, specific and atypical cartilage markers were evaluated by RTqPCR and Western-blot.

Our results show that the combination of 3D hypoxia cell culture, BMP-2, and RNA interference increases the chondrocytes functional indexes (*Col2a1/Col1a1*, *Acan/Col1a1*) leading to an effective chondrocyte redifferentiation. These data represent a proof of concept for this process of application in vitro in the equine model, and will lead to the improvement of the MACI efficiency for cartilage tissue engineering therapy in preclinical/clinical trials, both in the equine and human medicines.

**Keyword:** Chondrocyte, tissue engineering, equine model, dedifferentiation, MACI, BMP-2, hypoxia, siRNA, Col1a1, HtrA1, type II collagen.

**Running head:** Chondrocyte redifferentiation by 3D culture in hypoxia, BMP-2 and siRNAs

## **2. Introduction.**

Cartilage defects caused by traumas, focal lesions, or articular overstress is the leading cause of osteoarthritis (OA) development. This incurable pathology generates pain, walking-related disability, and high morbidity. The poor intrinsic cartilage self-repair is not able to prevent the ineluctable tissue degradation. Chondrocytes, the major cartilage cell type, synthesize an abundant extracellular matrix (ECM), mainly composed of two specific phenotypic markers (type II collagen and aggrecan). During OA, the primary chondrocyte response to the inflammatory microenvironment is a change in its normal secretome leading to the decreased expression of cartilage specific markers and matrix metalloproteinases synthesis. ECM remodeling occurs resulting in an ineluctable homeostasis loss. In parallel, chondrocytes dedifferentiate and express the fibrotic type I collagen leading to a fibrocartilage of a poor quality.

As in humans, disorders of the equine musculoskeletal system cause considerable economic losses in equine industry (McIlwraith *et al.* 2012)<sup>1</sup>. The use of horses for sports makes this model one of the first targets of OA (McIlwraith *et al.*, 2010)<sup>2</sup>. OA is responsible for up to 60% of lameness and represents a direct and indirect cost of \$15,000/yr per horse in the U.S. (compared to \$10,000/yr per human) (Oke & McIlwraith, 2010)<sup>3</sup>. The similarity in epidemiology and physiopathology between humans and horses makes the latter an excellent study model (McIlwraith *et al.* 2012)<sup>1</sup>, (Aigner *et al.*, 2010)<sup>4</sup>. To treat OA, major medical and veterinary prescriptions are mainly composed of analgesic and anti-inflammatory drugs, but these treatments remain palliative. Additionally, advanced OA cannot be treated while early treatment of cartilage defects can stop its progression.

In the past decades, advances in regenerative medicine have led to the emergence and improvement of new generations of therapies based on tissue engineering (Marlovits *et al.*, 2006)<sup>5</sup>. Among these approaches, matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI) has been established as an attractive and hopeful therapy (Bartlett *et al.*, 2005)<sup>6</sup>, (Brittberg *et al.*, 2008)<sup>7</sup> for treating cartilage defects in horses (Moran *et al.*, 2016) (Nixon *et al.*, 2015) (Griffin *et al.*, 2015)<sup>8-10</sup>. Such therapy combining the use of chondrocytes and biomaterials is minimally invasive and shows promising results for cartilage healing, both in humans and horses (Ortved & Nixon, 2016)<sup>11</sup>. Although good outcomes have been reported, MACI still has some limitations and disadvantages. In particular, this technique requires a substantial number of chondrocytes that lose their phenotype during in vitro amplification, a phenomenon called dedifferentiation (Benya *et al.*, 1978)<sup>12</sup>. In this sense, during expansion in monolayers, the chondrocytes dedifferentiate into fibroblast-like cells and stop expressing cartilage specific markers such as type II collagen or aggrecan (Schnabel *et al.*, 2002) (Kiani *et al.*, 2002)<sup>13, 14</sup>. Concomitantly, they secrete catabolic mediators and regulators (Lin *et al.*, 2008) (Blaise *et al.*, 2009) (Pelttari *et al.*, 2008)<sup>15-17</sup>. The imbalance between anabolism and catabolism leads to cell homeostasis disruption (Demmer *et al.*, 2014)<sup>18</sup>. Furthermore, following long term culture, dedifferentiated chondrocytes produce fibrotic type I collagen in an exacerbated manner (Marlovits *et al.*, 2004)<sup>19</sup>. Consequently, the newly synthesized cartilage substitute does not own the same biomechanical and physiological properties compared to the hyaline articular cartilage (Huang *et al.*, 2016)<sup>20</sup>.

Two major in vitro strategies have been investigated in order to optimise the mature chondrocyte phenotype for MACI: the maintenance of the mature chondrocyte phenotype during extensive cell culture (Vinatier *et al.*, 2009)<sup>21</sup> or the chondrocyte redifferentiation after extensive cell culture. The present study particularly focused on the improvement of the redifferentiation process by finely controlling some cellular microenvironment parameters which are key regulators of chondrocytes behaviour (Vinatier *et al.*, 2009)<sup>21</sup>.

It was demonstrated that high cell density three-dimensional (3D) cultures in combination with hypoxia support redifferentiation of dedifferentiated articular chondrocytes. Hypoxia is known to act on type II and type X collagen expression (Duval *et al.*, 2009)<sup>22</sup>. Indeed, low oxygen tension during chondrocyte culture is able to stabilize cell phenotype by favouring the mature chondrocyte phenotype and preventing hypertrophy (Lee *et al.*, 2013)<sup>23</sup>, (Lafont *et al.*, 2016)<sup>24</sup>. Additionally, cell culture with selective growth factors and cytokines appropriately supplemented plays a major role in the regulation of anabolic and catabolic chondrocyte activities. In particular, members of the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily may exert a dual role on chondrocyte development. Among them, bone-morphogenetic-proteins (BMPs) such as BMP-2 is used as a pro-chondrogenic factor at low concentration (Hautier *et al.*, 2008)<sup>25</sup>, allowing the recovery of type II collagen and aggrecan syntheses by chondrocytes (Claus *et al.*, 2010)<sup>26</sup>, (Jiménez *et al.*, 2015)<sup>27</sup>. Although BMP-2 contributes to the redifferentiation of articular chondrocytes, it also simultaneously induces type I collagen chondrocyte expression (Ollitrault *et al.*, 2015)<sup>28</sup>. This overexpression of both collagen isoforms prevents high biological quality of extracellular matrix (ECM) synthesis.

On the other hand, BMP-2 cellular responses can be affected by High-temperature requirement A Serine Peptidase 1 (Htra1), a serine protease. Indeed, Htra1 is able to inhibit TGF- $\beta$  family signalling via proteolytic activity and can play a role on BMPs mediating the redifferentiation of chondrocytes (Demoor *et al.*, 2014)<sup>28</sup>, (Launay *et al.*, 2008)<sup>29</sup>, (Graham *et al.*, 2013)<sup>30</sup>. Furthermore, among the catabolic events, the serine-protease Htra1 seems to have important roles in OA development, ECM remodelling and cell fate (Launay *et al.*, 2008)<sup>29</sup>, (Chien *et al.*, 2004)<sup>31</sup>, (Tiaden *et al.*, 2012)<sup>32</sup>. This is corroborated by the fact that Htra1 is expressed by chondrocytes, it is up-regulated during OA and is present at high levels in the synovial fluid and seems as a consequence to contribute to OA development and change in cartilage composition (Grau *et al.*, 2006)<sup>33</sup>, (Polur *et al.*, 2010)<sup>34</sup>.

Autograft synthesis based on chondrocytes redifferentiation mediated by BMP-2 leads to fibrotic and pro-catabolic cartilage substitutes. To limit this problem, specific inhibition of atypical markers of fibrocartilage is necessary. Some studies have shown that RNA interference can finely modulate the chondrocyte phenotype in vitro, but these investigations are all based on the fundamental aspect of cell biology and not on the context of applied biology (Vonk *et al.*, 2014), (Zhou *et al.*, 2004), (Lianxu *et al.*, 2006)<sup>35-37</sup>. Here, we used a multifactorial strategy based on the use of 3D cell culture in type I/III collagen sponges and BMP-2 stimulation under hypoxia condition (Galera *et al.*, 2012)<sup>38</sup>. To counteract the up-regulation of type I collagen induced by BMP-2 and the Htra1 induction in culture, we used a specific and transient RNA interference approach targeting *Col1a1* and *Htra1* mRNA [Figure 1].

We have extensively analysed the expression of cartilage specific markers, catabolic enzymes, and particularly focused on the fibrotic aspect of chondrocytes during redifferentiation. Finally, the quality of the ECM cartilage synthesis was especially determined by the consideration of the functional indexes *Col2a1/Col1a1* and *Acan/Col1a1*. Our results demonstrated that this strategy allows type II collagen synthesis, while the level of type I collagen expression was drastically reduced in the horse model. This suggests that the use of siRNA could be a valuable approach for the tissue engineering of functional articular cartilage.

### **3. Results.**

#### **a. Loss of equine articular chondrocyte phenotype during amplification.**

To evaluate chondrocyte phenotype recovery after amplification, eACs isolated from equine cartilage were cultured for 11 passages. During the subculture, eACs lose their classical polygonal shape after only 2 passages, and exhibit cytoplasmic elongations characteristic of fibroblastic-like cells [Figure 2A and Figure B]. Concomitantly, the doubling time of eACs decreases drastically by

2.75-Fold at P3 compared to P0, and then remains constant until P7 [Figure 2C]. During the sub-cultures, the cartilage specific markers were lost. Indeed, the relative mRNA levels of *Col2a1*, *Acan* and *Sox9* decrease overall from P2 [Figure 2D, E, F] (respectively 33,3-fold, 10-fold, and 5-fold between P0 and P2) as well as *Col10a1* (16,7-fold between P0 and P2) [Figure 2H]. *Col2a1* mRNA becomes undetectable after P2. In parallel, the steady-state amounts of the atypical *Col1a1* mRNA strongly increase (42,9-fold at P1 versus P0) [Figure 2G]. The catabolic markers *Htra1* and *Mmp13* are transiently more expressed from P4 to P6 [Figure 2J, K]. Meanwhile, *Runx2* mRNA is strongly overexpressed after P4 [Figure 2I] whereas *Alpl* mRNA is not modulated [Figure 2L]. Only primary eACs (P0) are able to express type II procollagen [Figure 2M].

**b. Combination of 3D-cell culture, hypoxia, and BMP-2 treatment allows the recovery of cartilage specific markers expression by eAC, but does not abolish the fibrotic and catabolic components.**

Because the microenvironment strongly influences chondrocyte phenotype, our strategy intended to be closer to the cellular context observed in native hyaline articular cartilage. In the latter, oxygen tension oscillates between 6% and 1% O<sub>2</sub> (Fermor *et al.*, 2007)<sup>39</sup>. Thus, after chondrocyte dedifferentiation, cells were cultured for 7 days in type I/III collagen sponges under hypoxia (2-4% O<sub>2</sub>).

First, we observed that only *Htra1* mRNA expression is significantly enhanced by 3D/hypoxia cell culture compared to the 2D culture in normoxia (10-fold increase between 2D and 3D/hypoxia conditions) [Figure 3]. Differences between monolayer cultured cells and 3D basal culture condition show that the latter, which induces rapid *Htra1* mRNA increase, is reminiscent of its homology with stress-induced HtrA proteases family (Clausen *et al.*, 2002)<sup>40</sup>. Moreover, 3D culture weakly enhances the transcription of *Col2a1*, *Acan*, and *Col1a1*, even though it is not statistically significant, without modulating the steady-state amounts of *Col10a1* mRNA.

To try to allow for better recovery in the expression of chondrocyte-specific markers, eAC were incubated in the presence of BMP-2 (50 ng/ml) and 3D/hypoxia cultured cells were used as control (Ctrl). In these experimental conditions, BMP-2 strongly enhances the *Col2a1* and *Acan* mRNA expression (respectively 219-fold and 8-fold compared to D0), but also *Col1a1* mRNA (7.59-fold) [Figure 4A, B, C]. The effect on *Col1a1* mRNA explains the low change of *Col2a1/Col1a1 ratio* (5,47-fold increase) and *Acan/Col1a1 ratio* (not significant) used as functional indexes of the cartilage ECM [Figure 4D and E]. Interestingly, while relative *Htra1* mRNA increases during the 7-day period of culture (p<0,05 for Ctrl compared to D0), the BMP-2 treatment is able to significantly decrease the steady-state amounts of *Htra1*, by 3.3-fold compared to Ctrl [Figure 4F]. Likewise, the relative mRNA levels of *Col10a1* are repressed by BMP-2 treatment. Furthermore, no significant modulation of total protein content was observed upon BMP-2 incubation. Nevertheless, an increasing trend seems to be detectable [Figure S1].

eACs directly isolated from articular cartilage can be considered to be the most efficient control in terms of phenotype quality. Our results show that even if the use of BMP-2 leads to comparable mRNA steady-state levels of *Col2a1* and *Acan* between the *in vitro* cultured chondrocytes and fresh cells, the functional indexes remain incomparable due to the absolute lack of basal *Col1a1* expression in eACs from native cartilage. The poor ECM quality induced by BMP-2 to generate a hyaline cartilaginous substitute is represented by the persistence of type I collagen and HtrA1 expression at the protein level, whereas type II collagen synthesis is recovered and type X collagen seemed to be unexpressed [Figure 4H].

**c. Design of siRNA.**

Due to the fibrotic and catabolic effects of BMP-2 induced MACI process in eACs, a strategy of RNA interference has been developed on the basis of the study performed with human

articular chondrocytes (Galéra *et al.*, 2012)<sup>38</sup>. However, to achieve the proof of concept in horse chondrocytes, there is need for a technological transfer towards the equine model. In fact, new designs of siRNA and dose-effects of each siRNA have been performed. Equine *Htra1* siRNA (si*Htra1*) has been previously designed and functionally tested, and the data demonstrate that it provokes an efficient inhibition of its target [Figure 5A and data not shown]. More attention was devoted to *Col1a1* siRNA (si*Col1a1*) efficiency evaluation due to the complex transcriptional and post-transcriptional regulation of this gene.

First, three si*Col1a1* were designed [Figure 5B] and different siRNA concentrations were evaluated (2, 5, 10, 25 nM) on eAC during redifferentiation mediated by BMP-2. A negative control siRNA (siCtrl) was used at the same concentrations as control to evaluate off-target effects. As shown in Figure 5C, only si*Col1a1*-2 is able to inhibit *Col1a1* mRNA amounts, by more than 50% for all the concentrations compared to siCtrl at the same concentration. No effects of siCtrl or si*Col1a1* at the same concentrations have been observed on the steady-state amounts of *Col2a1* and *Htra1* [Figure S2]. In the following experiments, to take into consideration of the inter-cellular strains variabilities, a concentration of 5 nM for each siRNA was used to obtain an effective mRNA interference.

#### d. RNA interference targeting *Col1a1* improves eAC specific phenotypic profile during the MACI process.

si*Col1a1* transfection inhibits *Col1a1* mRNA expression with or without BMP-2 treatment, respectively 71,5% and 57,3% of inhibition compared to the respective siCtrl conditions [Figure 6A]. The experiments, taken one by one, have demonstrated that if more *Col1a1* mRNA is expressed in eAC, more the si*Col1a1* is effective [Figure S3]. By contrast, the si*Col1a1* induced no significant effect on the relative expression of *Col2a1*, *Acan*, *Mmp13* and *Htra1* (Fig. 6B, C, Fig. S4). The biological gain of *Col1a1* mRNA inhibition is visible on the functional indexes *Col2a1/Col1a1* and *Acan/Col1a1* [Figure 6D and E]. Thus, the *Col2a1/Col1a1* ratio is increased by 27-fold under si*Col1a1* + BMP-2 treatment compared to siCtrl without BMP-2 treatment, against 7,8-fold for the siCtrl eAC + BMP-2 condition. The same trend is also observed for the *Acan/Col1a1* ratio.

#### e. RNA interference targeting *Htra1* can modulate the eAC catabolic process during chondrocyte redifferentiation.

*Htra1* siRNA treatment provokes a decrease on its mRNA in eACs compared to siCtrl treatment. Indeed, a 64% inhibition by the *Htra1* siRNA is observed when the cells are not treated with BMP-2 and 34% for BMP-2 treated cells [Figure 7A]. Even if the siRNA inhibition of *Htra1* is present for the independent experiments (except for one), it seems that this inhibition is lower when the cells are treated with BMP-2. This can be explained by the fact that BMP-2 already decreases *Htra1* mRNA at a comparable basal level of transcription observed in cells cultured as monolayers. Thus, a higher inhibition can be technically difficult to obtain in eACs. Additionally, no significant effect is detected on the relative mRNA expression of *Acan* and *Mmp13* mRNA after si*Htra1* transfection [Figure 7D and S5]. Interestingly, si*Htra1* induces a significant decrease of the relative amounts of *Col1a1* mRNA in the absence of BMP-2 and it provoked an inhibition of *Col2a1* mRNA, with or without BMP-2 [Figure 7B and C]. Nevertheless, the functional indexes *Col2a1/Col1a1* and *Acan/Col1a1* are not significantly affected by the si*Htra1* treatment [Figure 7E and F].

#### f. RNA interference during the MACI process increases the quality of the ECM synthesized by eAC.

At the protein level, the *Col1a1* siRNA caused a decrease of total type I collagen signal and the procollagen expression is strongly repressed [Figure 8]. This is consistent with the chronological maturation of type I collagen and it can be supposed that procollagen is the first isoform affected during inhibition of the *Col1a1* mRNA. *Htra1* synthesis is strongly inhibited by BMP-2 and such an effect seems to be sufficient to decrease its expression during eACs

cartilaginous substitute generation. Nevertheless, *Htra1* interference totally abolishes *Htra1* synthesis when BMP-2 effect was not sufficient alone, and only in the BMP-2 treated cells [Figure S6]. It appears that *siHtra1* transfection affects BMP-2 redifferentiation effect since a slight decrease of type I collagen and type II collagen compared to the *siCtrl* condition is observed. Type X collagen was observed as trace amounts in *siCtrl* samples.

Overall, these data demonstrate that *Col1a1* interference combined to BMP-2 and hypoxia in eACs culture can enhance the quality of the ECM produced by chondrocytes. Even though the *siHtra1* can further abolish its targeted mRNA, the inhibition during BMP-2 redifferentiation seems to be almost totally effective for the enhancement of mature chondrocyte specific phenotype.

#### **g. Chondrocyte redifferentiation mediated by BMP-2 can be modulated by both *Col1a1* and *Htra1* siRNAs.**

To clarify the impact of the different culture parameters, combination of both *Col1a1* and *Htra1* siRNAs, 3D hypoxia eAC culture, and BMP-2 treatment was evaluated during the neocartilage substitute generation process.

The double siRNA interference was efficient on their respective targets by strongly inhibiting atypical *Htra1* and *Col1a1* expressions mediated by BMP-2 [Figure 9A, B]. Both siRNAs treatment shows slight differences in the relative amounts of *Acan* and *Col2a1* compared to BMP-2 treated cells. The global quality of ECM markers is enhanced as demonstrated by the evaluation of *Acan/Col1a1* and *Col2a1/Col1a1* ratios, when we compare the double interference strategy + BMP-2 with BMP-2 treatment only [Figure 9D and F]. At the protein level, the siRNAs effects are also effective on the global type I collagen and *Htra1* syntheses, thereby improving the quality of the chondrocyte ECM neo-synthesized [Figure 9I and J].

Nevertheless, no further gain in the quality of the neocartilage substitute ECM has been detected between both *Htra1* and *Col1a1* siRNA transfection versus *siCol1a1* transfection only [Figure 10A, B, C, D, E, F]. Thus, even if this double RNA interference shows its feasibility to knock down these atypical markers, this strategy does not seem to be better than the *Col1a1* mRNA interference only, which also has the advantage of being more accurate and less stressful for the cells by limiting exogenous genetic material incorporation.

## **4. Discussion.**

Chondrocytes remain the best cell source used in cartilage tissue engineering. Although new advanced therapies based on MACI are actively developed, like the use of MSCs, some basic knowledge must be developed for tissue engineering use (Ringe *et al.*, 2012)<sup>41</sup>. Previous studies achieved in the laboratory show that MSCs can provide a promising source as they present a high chondrogenic potential; however, a high level of type I collagen synthesis is also detected (Gomez-Leduc *et al.*, 2016)<sup>42</sup>. For this reason, in the case of chondrocytes and MSCs, a particular attention must be given to the fibrotic aspect for their use in cartilage tissue engineering.

It is in this perspective that our previous researches were based on the inhibition of the fibrotic process during neocartilage substitute generation *in vitro* with cells of human origin (Ollitrault *et al.*, 2015) (Galera *et al.*, 2012) (Legendre *et al.*, 2013)<sup>28,38,43</sup>. The main objective of the present study was to ensure the proof of concept in chondrocytes from horse origin, which represents an excellent large animal model concerning pathologies of the musculoskeletal system and articular disorders.

The use of an equine model comes with some technical limitations such as the lack of molecular and biological tools compared to human research. Nevertheless, genome homologies between human and horse, and the high sequencing quality of *Equus caballus*, allows for the technological transfer between these two species (Wade *et al.*, 2009)<sup>44</sup>. Our present study highlights some subtle cellular differences during experiments. We have noticed that the eAC

number and their viability after their isolation from the cartilage are substantially increased as well as their proliferation, RNA and protein contents of the cells, when compared to human cells. During experiments, certain cell strains were amplified up to P16 without loss of proliferation. The high proliferation potential of eAC can represent an advantage in the MACI process that requires a great number of cells. Interestingly, cryopreservation of eAC at early passages is possible, unlike with human AC. These characteristics are not only explained by the use of different mammalian models, but more likely by the homogeneity of the cartilage biopsies coming from healthy young or adult horses. This has the advantage of limiting cell variability related to cellular ageing which is hardly possible in human research, since most of the samples are obtained after knee replacement by prosthetic surgery on aged subjects (Tran-Khanh *et al.*, 2005)<sup>45</sup>.

In this study, we have analysed the impact of chondrocyte amplification on the cartilage ECM synthesis capacity of eAC. This cellular phenomenon is one of the most important limitations in the MACI procedure. We show that deep changes in phenotype are observed up to P3, particularly with the loss of chondrocyte marker expression. The monolayer amplification of eAC also induces type I collagen synthesis and catabolic events enhancement, as previously demonstrated in the princeps article (Benya *et al.*, 1978)<sup>12</sup>. Even if the *Col1a1* transcription is increased, type I collagen protein synthesis has not been demonstrated. One possible explanation is that it has been seen that type I collagen expression appears after 21 days in confluent monolayer cultures of hAC (Marlovits *et al.*, 2004)<sup>19</sup>. In our study, the time lapse between two passages is not of a sufficient magnitude to allow for type I collagen secretion due to the rapid cell confluency reached by the eAC. It must be noted that *Col10a1* mRNA is only expressed during early passages. These observations can be explained by the fact that the cartilage biopsies were collected in order to maximize the number of cells harvested. Hypertrophic and superficial zones of articular cartilage were not split. Some traces of hypertrophic chondrocytes probably persist after cell isolation, but these cells enter in apoptosis during early amplification. Chondrocyte is a particular cell type that evolves in low oxygen tension. In addition to favouring the expression of chondrocyte markers, it has been shown that hypoxia inhibits terminal differentiation during chondrogenesis of MSC (Duval *et al.*, 2009) (Lee *et al.*, 2013)<sup>22,23</sup>. These findings can explain the absence of type X collagen expression during all our experiments.

In the chondrocyte redifferentiation process, we have used commercially available type I/III collagen scaffolds. This biomaterial is the most clinically used in MACI, but also in other tissue engineering therapies including tooth, skin, and intestinal tissues (Sumita *et al.*, 2006) (Nakase *et al.*, 2006) (Suzuki *et al.*, 2000)<sup>46-48</sup>. Collagen sponges have the advantage of being easily adjustable to the thickness of the cartilage defect and of preventing cellular loss by migration (Russlies *et al.*, 2002)<sup>49</sup>. Moreover, it does not induce host reaction compared to type II collagen scaffolds (Cho *et al.*, 2007)<sup>50</sup>, and 50% of this biomaterial is degraded after two weeks of implantation. Nevertheless, new advanced biomaterial innovations in MACI will have to take into account new functional supports which can interact with chondrocytes and control the delivery of growth factors or other biological actors (Lee *et al.*, 2011)<sup>51</sup>.

To obtain the chondrocyte redifferentiation after monolayer cultures, 3D, and hypoxia, even though they both favour type II collagen synthesis (Duval *et al.*, 2009)<sup>22</sup>, they do not allow for sufficient expression to lead to the conclusion that redifferentiation is optimal. We previously showed that IGF-1 and TGF- $\beta$ 1 can be used to favour type II collagen expression in dedifferentiated chondrocytes, but they also induce hypertrophic and/or fibrotic markers of cartilage (Legendre *et al.*, 2013) (Pujol *et al.*, 2008)<sup>43,52</sup>. However, BMP-2 seems to remain the best candidate for significantly enhancing mature chondrocyte phenotype during redifferentiation. Type I collagen up-regulation induced by BMP-2 and the dedifferentiation process can be limited by RNA interference strategy since transfection of a *Col1a1* siRNA can greatly enhance the matrix cartilage quality by increasing the *Col2a1/Col1a1* as well as *Acan/Col1a1* ratios. The inhibition concerned preferentially type I procollagen form that may chronologically affect the mature forms at a longer term after implantation.

Difficulties have been encountered in *Col1a1* siRNA design and experiments. Due to the sequence homologies between *Col1a1* and *Col2a1* and the strong up-regulation of *Col1a1* forced us to perform a fine design of the siRNA. Thus, a total of 5 siRNAs have been designed and tested, and only one *Col1a1* siRNA proves to be specifically efficient. To better understand the observed problems, alignments between *Col1a1* siRNA sequences and mRNA secondary structure predictions have been realized [Figure S7]. It seems that the ineffective siRNA targets steric hindrance zones making RNA interference difficult. To maximise siRNA efficiency, the secondary structure of mRNA targets must be considered with great care (Reynolds *et al.*, 2004) (Shao *et al.*, 2007)<sup>54,55</sup>.

Even though the *Col1a1* siRNA proves to be efficient in redifferentiated eACs, another relevant type I collagen mRNA interference could be developed for a significant increase in the mRNA knockdown. This interference should be also based on the *Col1a2* mRNA inhibition together or not with the *Col1a1* knockdown which takes into account the stoichiometric point of view. This hypothesis is based on the fact that pro- $\alpha$ 1 chains of type I collagen cannot associate with pro- $\alpha$ 12 chains if the 2:1 stoichiometry is not respected; and homotrimers of pro- $\alpha$ 1(I) chains will be degraded as a result of intracellular degradation. This process should lead to greater efficiency compared to *Col1a1* mRNA interference alone (Gotkin *et al.*, 2004)<sup>56</sup>. Other approaches may likewise be investigated, such as the use of imperfectly matched siRNA which demonstrates a better mRNA target silencing (Saxena *et al.*, 2003)<sup>57</sup>.

Concerning the serine protease HtrA1, another undesirable marker over-expressed in osteoarthritis and associated with chondrocyte dedifferentiation, interestingly, we unambiguously and originally demonstrated that BMP-2 induces its down-regulation. No previous studies reported in the literature describe such an effect, and HtrA1 inhibition mediated by this chondrogenic factor was not observed in our previous study on hAC (Ollitrault *et al.*, 2015)<sup>28</sup>. The differences between these two studies can perhaps be explained by the fact that the human chondrocytes used came from aged donors. Data from the literature demonstrated that TGF- $\beta$ 1 is able to induce HtrA1 (Xu *et al.*, 2014)<sup>58</sup> and that HtrA1 can interfere with BMP-2 signalling (Wu *et al.*, 2014)<sup>59</sup>. Nevertheless our current studies carried out on equine bone marrow MSCs show that the concomitant BMP-2/TGF- $\beta$ 1 treatment during chondrogenic differentiation induces a strong inhibition of HtrA1 protein synthesis compared with untreated MSCs (Branly *et al.*, submitted)<sup>60</sup>, such as BMP-2 in the eAC of the present investigation.

*Htra1* siRNA interference, which was initially privileged because of the association of this serine protease to chondrocyte dedifferentiation and OA, was found to be highly effective. *siHtra1* inhibition, added to the BMP-2 effect on HtrA1 strongly limited its presence. In addition, due to the fact that HtrA1 can degrade hyaline cartilage ECM components, HtrA1 is indirectly implicated in pericellular matrix degradation of the chondrocyte (Polur *et al.*, 2010)<sup>34</sup> and induction of the MMP-13 collagenase (Xu *et al.*, 2014)<sup>58</sup>. Even though the relationship between MMP-13 and HtrA1 cannot be significantly proved, analysis of each of our independent experiments seems to demonstrate that inhibition of HtrA1 by BMP-2 or *Htra1* siRNA always induces a parallel decrease of the steady-state amounts of *Mmp13* mRNA [Figure S8].

Even if the *Htra1* siRNA is efficient, and *Htra1* and *Col1a1* siRNA combination leads to a functional index increase, the use of this siRNA cocktail does not seem to be the most favorable strategy. Indeed, it appears that the use of both siRNA decreases all the ECM components of the neocartilage substitute and provokes a partial loss of the BMP-2 benefit. An ambiguity in the BMP-2 effect on HtrA1 expression and *Htra1* inhibition on the global behaviour of the chondrocytes may be supposed in the sense that Htra1 could play a bifunctional role in the chondrocyte phenotype. Tiaden *et al.* have shown that HtrA1 play a crucial role in osteogenesis by the positive regulation of matrix mineralisation with its catabolic activity (Tiaden *et al.*, 2012)<sup>32</sup> and show an important concentration of HtrA1 protein in chondrocytes in bone callus during new bone formation suggesting its implication in both chondrogenesis and endochondral ossification. However, it remains to be established if the *Htra1* RNA interference cannot specifically favour chondrocyte

phenotype stabilization, as demonstrated in our present study, by preventing/counteracting its osteogenic positive effects in the context of bone repair.

Furthermore, investigation of experimental Htra1 phenotype models using *in silico* human database analysis by GenomeRNAi (Schmidt *et al.*, 2013)<sup>61</sup> shows that Htra1 (PRSS11) can act as a down-regulator of Wnt signalling pathway following Wnt3A stimulation. This result has been extracted from RNAi screening studies on Wnt/ $\beta$ -Catenin in different cell lines (Tang *et al.*, 2008)<sup>62</sup>. This signalling pathway has been described as an important actor of MSC fate, BMP-2 signalling, and terminal differentiation of chondrocyte (Day *et al.*, 2005) (Tuan *et al.*, 2003)<sup>63,64</sup>.

The data from the literature along with our results on siHtra1 use suggest that this serine protease, other than/with the exception of ECM remodelling and TGF- $\beta$  response modulation, may play a role in chondrocyte phenotype stabilisation or the differentiation status. It would be interesting to study the impact of Htra1 inhibition on the induction of chondrogenesis in MSCs to try to elucidate the functional role of this serine protease in the mature chondrocyte phenotype.

In conclusion, the use of an efficient *Col1a1* interference alone or associated with *Htra1* interference, in the presence of BMP-2, clearly increases the cartilage quality by favouring type II collagen and aggrecan syntheses while inhibiting type I collagen production in eAC, leading to a significant enhancement of the corresponding functional indexes, and reflecting the hyaline nature of the neocartilaginous ECM. Our study suggests that transient RNAi strategy can regulate the catabolic and anabolic components during the MACI procedure mediated by BMP-2 in the equine model. Our results will need to be further validated by establishing the proof of concept in preclinical trials in horse.

## 5. Material and Methods.

### a. eACs isolation and cell culture.

eACs were isolated from cartilage biopsy of healthy equine carpal or femoral condyle joints from 10 young mature or adult horses (4-10 years). Healthy cartilage samples were cut into small slices (approximately 1-2 mm thickness, and 4-6 mm in diameter), and chondrocytes were isolated by sequential digestion for 45 minutes at 37°C with 2 mg/ml of protease from *Streptomyces griseus* type XIV (Sigma-Aldrich), and then overnight at 37°C with 2 mg/ml of type I collagenase from *Clostridium histolyticum* (Thermofisher). Both were prepared with high glucose (4,5 g/L) Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). The cell suspension was filtered through a 70  $\mu$ M mesh nylon membrane, centrifuged, counted with trypan blue for viability evaluation, seeded in plastic vessels at a density of  $2 \cdot 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>, and cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Thermofisher), 100 IU/ml of penicillin, 100  $\mu$ g/ml of streptomycin, and 0.25  $\mu$ g/ml of Fungizone, in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. During expansion, the medium was changed twice a week. For cell passages, at 90% of confluence, chondrocytes were harvested by trypsinization with 0.05% trypsin/1 mM EDTA (Thermofisher), counted with trypan blue for viability evaluation, and seeded again at  $2 \cdot 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> for the next passage.

### b. eACs dedifferentiation.

eACs were amplified during 11 passages (P0-P11). For each passage, at 90% of confluency, one cell culture flask was harvested for protein or RNA extraction and the other for viability evaluation and cell counting. Equations used for doubling time determination was described by Martin Clynes (Clynes, 1996)<sup>65</sup>: time between two passages (h); N<sub>0</sub>: initial cells number; N<sub>t</sub>: cells number at the harvest ; n: number of cells generation during; k: generation by time units; g: doubling time (h).

$$k = \frac{n}{\Delta t} = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2 \times \Delta t}$$
$$g = \frac{1}{k}$$

### **c. Cryopreservation.**

By contrast with human articular chondrocytes, the particularity of eAC lies in the possibility of cryopreservation. All the chondrocytes banking were realized at P0 or P1. After counting, cells were centrifuged and suspended in cryopreserved medium (6 to 10.10<sup>6</sup> cells/ml) composed by 90% FBS and 10% dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich). Freezing was performed using CoolCell Cell Freezing Containers (Biocision) and stored in liquid nitrogen.

### **d. 3D inclusion and hypoxia cell culture.**

After thawing, cells were amplified up to P2. For redifferentiation studies, chondrocytes at P3 were included in scaffolds composed of native type I collagen (90–95%) and type III collagen (5–10%) from calf skin, manufactured by Symatèse Biomatériaux (Chaponost, France). Scaffolds were 2 mm thick and 5 mm in diameter. They were cross-linked using glutaraldehyde to increase their stability and sterilized with  $\beta$ -radiation. Cell seeding into the collagen sponges was performed by dropping 20  $\mu$ l of the cell suspension on the scaffold (6.10<sup>5</sup> cells/scaffold) in 96-well culture plates, dried for 1 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>, and incubated at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> for 16 h with 3D medium composed by DMEM + 2% FBS + 50  $\mu$ g/ml of L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate (Sigma-Aldrich). The next day, scaffolds were transferred to 24-well plates, in 3D medium (600  $\mu$ l/scaffolds) pre-equilibrated to 3% O<sub>2</sub> by bubbling, with or without 50 ng/mL of BMP-2 (rhBMP-2, inductOs, Wyeth Europa Ltd). This point established the day 0 (D0). Cells were incubated in hypoxia (2-4% O<sub>2</sub>) at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> for 7 days. Hypoxic cultures were performed in Plas-Labs basic multi-station glove box (Sigma-Aldrich). The medium was changed twice a week.

### **e. siRNA transfection and *in silico* analysis.**

Design of siRNA [supplemental table 1A] was performed by Eurogentec service, and matching was confirmed using NCBI-Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Sequences and BLAST are represented in Fig. 5A and B and represented with CLC Sequence Viewer 7.7 software (Qiagen). Mamalian siRNA duplexes negative control was used as no-target siRNA (Qiagen). eAC were seeded into type I/III collagen scaffolds as described earlier. At D0, eAC were transfected with a mix (150  $\mu$ l/scaffolds) of INTERFERin (Polyplus-transfection), OptiMEM (Thermofisher), and small interfering RNA (siRNA) for 10 min at room temperature, according to the manufacturer's instructions. Quantities of 2, 5, 10, or 25 nM of siRNA were transfected. Then, the INTERFERin siRNA complex was slowly added to scaffolds disposed in 450  $\mu$ l of 3D medium, pre-equilibrated to 3% O<sub>2</sub> by bubbling, with or without 50 ng/mL of BMP-2. eAC were then cultured in hypoxia (2-4% O<sub>2</sub>) for 7 days. The first medium change for siRNA medium elimination was performed two days after transfection.

### **f. RNA extraction and RTqPCR analysis.**

Total RNA was extracted using Trizol Reagent according to the manufacturer's instructions. One microgram of RNA was reverse transcribed into cDNA using reverse transcriptase (MMLV, Thermofisher) and oligodT (Eurogentec). RTqPCR was performed on StepOnePlus Real-Time system (Thermofisher) using Power SYBR Green PCR (Thermofisher). Sequences of the primers used are listed in supplemental table 1B.  $\beta$ -actin gene (*Actb*) was used as an endogenous reference gene. Relative gene expression was analyzed using the StepOnePlus software and calculated using the 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> method or the standard curve method depending on the efficiency of *Actb* amplification and each target gene, and expressed as the mean of triplicate samples (Schmittgen *et al.*, 2008)<sup>66</sup>.

### **g. Protein extraction and Western-blots.**

After treatment, scaffolds containing cells were rinsed once with ice-cold DPBS (PAN-Biotech), frozen, crushed and total proteins were extracted from cells using the RIPA-lysis buffer

with protease inhibitors. Protein concentration was assessed according to the Bradford colorimetric assay (Bio-Rad). 15 µg of total proteins were separated into 10% polyacrylamide gels containing 0.1% SDS and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) (Millipore). Unspecific binding sites of the membrane were blocked with 10% non-fat milk powder in Tris-buffered saline with 0.1% Tween (TBST) for 2 h. Membranes were incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-human type I collagen (Novotec), rabbit anti-human type II collagen (Novotec), rabbit anti-human type X collagen (Abcam), rabbit anti-human HTRA1 (Millipore), rabbit anti-human β-tubulin (Santa Cruz Biotechnology), or rabbit anti-human GAPDH. The following day, membranes were washed three times, followed by an incubation with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Jackson ImmunoResearch). Signals were visualized with the chemiluminescence method (ECL plus Western-blotting detection reagent+, Santa Cruz Biotechnology) and developed on X-ray film (Santa Cruz Biotechnology).

#### **h. Statistical analysis.**

All experiments were replicated with cells from different specimens. Values are reported as means ± SD or box plots. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney U-test or unpaired T-test to determine significant differences between two groups. Because the siRNA effect depends on the target basal expression of untreated control cases used for normalization, the Wilcoxon signed-rank test or paired T-test were also used. All statistical analyses were done using Prism v6 (Graphpad). The P-value of ≤0.05 was considered to be significant.

#### **Acknowledgements.**

We are grateful to Marie-Christine Enos for her administrative and technical support.

#### **Role of the funding sources.**

This research was funded by the French National Research Agency (ANR) in connection with the Regional Council of Basse-Normandie through the ANR TecSan PROMOCART program to PG (917RB020 and 917RB072 respectively); the French Ministry of Research and Technology to PG; two ERDF (European Regional Development Funds) grants to PG and MD (HIPPOCART 1 no. 2897/33535, 917RB148; HIPPOCART 917CB174); a Regional Council of Basse-Normandie program to PG and MD (HIPPOCART N° 2013-AGRI-236/13P07492, 917CB166); the Fonds Eperon to PG and MD (EQUISTEM, N80-2014, 917CB194); a ERDF and Regional Council of Basse-Normandie grant to PG and MD in the CPER Centaure grant (2015-2020, Centaure Biotechnologies 2015 N° 917CB213 & Centaure PREACH 2016-17). These funding sources had no involvement in the study design, collection, analysis, or in interpretation of the data, in the writing of the manuscript, or in the decision to submit the manuscript for publication.

RR is a recipient from the French ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) and Vetbiobank, a CIFRE fellowship.

TB was supported by a PhD scholarship from the French Ministry of Research and Technology.

MH was supported by a PhD scholarship from the Regional Council of Basse-Normandie.

#### **Authors' contributions.**

RR was implicated in the study design, in data collection/assembly and analysis, in performed experiments, and in the writing of the manuscript. BB, MH, TB, and FL performed experiments, collected data, and analysed the data. FL designed, and provided materials and analysis tools. RR, TB, FA, and NS were involved in collecting cartilage-chondrocytes. PG, MD, NS, and SM were involved in the study conception and design, in supervision of the study, in data

analysis, and data interpretation. PG, NS, and SM participated in the writing of the manuscript and provided financial support. All authors read and approved the final manuscript.

## Disclosure statement.

The authors declare no conflicts of interest.

## 6. Bibliography

1. Mcllwraith, C. W.; Frisbie, D. D.; Kawcak, C. E. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Joint Res* **2012**, *1*, 297–309.
2. Mcllwraith, C. W.; Frisbie, D. D.; Kawcak, C. E.; Fuller, C. J.; Hurtig, M.; Cruz, A. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the horse. *Osteoarthr. Cartil.* **2010**, *18 Suppl 3*, S93–105.
3. Oke, S. L.; Mcllwraith, C. W. Review of the economic impact of osteoarthritis and oral joint-health supplements in horses. *56th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners* **2010**, 4-8 December 2010, 12–16.
4. Aigner, T.; Cook, J. L.; Gerwin, N.; Glasson, S. S.; Laverty, S.; Little, C. B.; Mcllwraith, W.; Kraus, V. B. Histopathology atlas of animal model systems - overview of guiding principles. *Osteoarthr. Cartil.* **2010**, *18 Suppl 3*, S2–6.
5. Marlovits, S.; Zeller, P.; Singer, P.; Resinger, C.; Vécsei, V. Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation. *Eur. J. Radiol.* **2006**, *57*, 24–31.
6. Bartlett, W.; Skinner, J. A.; Gooding, C. R.; Carrington, R. W. J.; Flanagan, A. M.; Briggs, T. W. R.; Bentley, G. Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study. *J. Bone. Joint. Surg. Br.* **2005**, *87*, 640–645.
7. Brittberg, M. Autologous chondrocyte implantation--technique and long-term follow-up. *Injury* **2008**, *39 Suppl 1*, S40–9.
8. Moran, C. J.; Ramesh, A.; Brama, P. A. J.; O'Byrne, J. M.; O'Brien, F. J.; Levingstone, T. J. The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair. *J. Exp. Orthop.* **2016**, *3*, 1.
9. Nixon, A. J.; Rickey, E.; Butler, T. J.; Scimeca, M. S.; Moran, N.; Matthews, G. L. A chondrocyte infiltrated collagen type I/III membrane (MACI® implant) improves cartilage healing in the equine patellofemoral joint model. *Osteoarthr. Cartil.* **2015**, *23*, 648–660.
10. Griffin, D. J.; Bonnevie, E. D.; Lachowsky, D. J.; Hart, J. C. A.; Sparks, H. D.; Moran, N.; Matthews, G.; Nixon, A. J.; Cohen, I.; Bonassar, L. J. Mechanical characterization of matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI®) grafts in an equine model at 53 weeks. *J. Biomech.* **2015**, *48*, 1944–1949.
11. Orved, K. F.; Nixon, A. J. Cell-based cartilage repair strategies in the horse. *Vet. J.* **2016**, *208*, 1–12.
12. Benya, P. D.; Padilla, S. R.; Nimni, M. E. Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell* **1978**, *15*, 1313–1321.
13. Schnabel, M.; Marlovits, S.; Eckhoff, G.; Fichtel, I.; Gotzen, L.; Vécsei, V.; Schlegel, J. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthr. Cartil.* **2002**, *10*, 62–70.
14. Kiani, C.; Chen, L.; Wu, Y. J.; Yee, A. J.; Yang, B. B. Structure and function of aggrecan. *Cell Res.* **2002**, *12*, 19–32.
15. Lin, Z.; Fitzgerald, J. B.; Xu, J.; Willers, C.; Wood, D.; Grodzinsky, A. J.; Zheng, M. H. Gene expression profiles of human chondrocytes during passaged monolayer cultivation. *J. Orthop. Res.* **2008**, *26*, 1230–1237.

16. Blaise, R.; Mahjoub, M.; Salvat, C.; Barbe, U.; Brou, C.; Corvol, M.-T.; Savouret, J.-F.; Rannou, F.; Berenbaum, F.; Bausero, P. Involvement of the Notch pathway in the regulation of matrix metalloproteinase 13 and the dedifferentiation of articular chondrocytes in murine cartilage. *Arthritis Rheum.* **2009**, *60*, 428–439.
17. Peltari, K.; Lorenz, H.; Boeuf, S.; Templin, M. F.; Bischel, O.; Goetzke, K.; Hsu, H.-Y.; Steck, E.; Richter, W. Secretion of matrix metalloproteinase 3 by expanded articular chondrocytes as a predictor of ectopic cartilage formation capacity in vivo. *Arthritis Rheum.* **2008**, *58*, 467–474.
18. Demoor, M.; Ollitrault, D.; Gomez-Leduc, T.; Bouyoucef, M.; Hervieu, M.; Fabre, H.; Lafont, J.; Denoix, J.-M.; Audigié, F.; Mallein-Gerin, F.; Legendre, F.; Galéra, P. Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840*, 2414–2440.
19. Marlovits, S.; Hombauer, M.; Truppe, M.; Vécsei, V.; Schlegel, W. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *J. Bone. Joint. Surg. Br.* **2004**, *86*, 286–295.
20. Huang, B. J.; Huey, D. J.; Hu, J. C.; Athanasiou, K. A. Engineering biomechanically functional neocartilage derived from expanded articular chondrocytes through the manipulation of cell-seeding density and dexamethasone concentration. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2016**.
21. Vinatier, C.; Mrugala, D.; Jorgensen, C.; Guicheux, J.; Noël, D. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 307–314.
22. Duval, E.; Leclercq, S.; Elissalde, J.-M.; Demoor, M.; Galéra, P.; Boumédiène, K. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  inhibits the fibroblast-like markers type I and type III collagen during hypoxia-induced chondrocyte redifferentiation: hypoxia not only induces type II collagen and aggrecan, but it also inhibits type I and type III collagen in the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ -dependent redifferentiation of chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **2009**, *60*, 3038–3048.
23. Lee, H.-H.; Chang, C.-C.; Shieh, M.-J.; Wang, J.-P.; Chen, Y.-T.; Young, T.-H.; Hung, S.-C. Hypoxia enhances chondrogenesis and prevents terminal differentiation through PI3K/Akt/FoxO dependent anti-apoptotic effect. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 2683.
24. Lafont, J. E.; Poujade, F. A.; Padeloup, M.; Neyret, P.; Mallein-Gerin, F. Hypoxia potentiates the BMP-2 driven COL2A1 stimulation in human articular chondrocytes via p38 MAPK. *Osteoarthr. Cartil.* **2016**, *24*, 856–867.
25. Hautier, A.; Salentey, V.; Aubert-Foucher, E.; Bougault, C.; Beauchef, G.; Ronzière, M.-C.; de Sobarnitsky, S.; Paumier, A.; Galéra, P.; Piperno, M.; Damour, O.; Mallein-Gerin, F. Bone morphogenetic protein-2 stimulates chondrogenic expression in human nasal chondrocytes expanded in vitro. *Growth Factors* **2008**, *26*, 201–211.
26. Claus, S.; Aubert-Foucher, E.; Demoor, M.; Camuzeaux, B.; Paumier, A.; Piperno, M.; Damour, O.; Duterque-Coquillaud, M.; Galera, P.; Mallein-Gerin, F. Chronic exposure of bone morphogenetic protein-2 favors chondrogenic expression in human articular chondrocytes amplified in monolayer cultures. *J. Cell. Biochem.* **2010**, *111*, 1642–1651.
27. Jiménez, G.; López-Ruiz, E.; Kwiatkowski, W.; Montañez, E.; Arrebola, F.; Carrillo, E.; Gray, P. C.; Izpisua Belmonte, J. C.; Choe, S.; Perán, M.; Marchal, J. A. Activin A/BMP2 chimera AB235 drives efficient redifferentiation of long term cultured autologous chondrocytes. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16400.
28. Ollitrault, D.; Legendre, F.; Drougard, C.; Briand, M.; Bénateau, H.; Goux, D.; Chajra, H.; Poulain, L.; Hartmann, D.; Vivien, D.; Shridhar, V.; Baldi, A.; Mallein-Gerin, F.; Boumédiène, K.; Demoor, M.; Galéra, P. BMP-2, hypoxia, and COL1A1/HtrA1 siRNAs favor neo-cartilage hyaline matrix formation in chondrocytes. *Tissue Eng. Part C Methods* **2015**, *21*, 133–147.
29. Launay, S.; Maubert, E.; Lebourrier, N.; Tennstaedt, A.; Campioni, M.; Docagne, F.; Gabriel, C.; Dauphinot, L.; Potier, M. C.; Ehrmann, M.; Baldi, A.; Vivien, D. HtrA1-dependent

proteolysis of TGF-beta controls both neuronal maturation and developmental survival. *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 1408–1416.

30. Graham, J. R.; Chamberland, A.; Lin, Q.; Li, X. J.; Dai, D.; Zeng, W.; Ryan, M. S.; Rivera-Bermúdez, M. A.; Flannery, C. R.; Yang, Z. Serine protease HTRA1 antagonizes transforming growth factor- $\beta$  signaling by cleaving its receptors and loss of HTRA1 in vivo enhances bone formation. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e74094.
31. Chien, J.; Staub, J.; Hu, S.-I.; Erickson-Johnson, M. R.; Couch, F. J.; Smith, D. I.; Crowl, R. M.; Kaufmann, S. H.; Shridhar, V. A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer. *Oncogene* **2004**, *23*, 1636–1644.
32. Tladen, A. N.; Breiden, M.; Mirsaidi, A.; Weber, F. A.; Bahrenberg, G.; Glanz, S.; Cinelli, P.; Ehrmann, M.; Richards, P. J. Human serine protease HTRA1 positively regulates osteogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mineralization of differentiating bone-forming cells through the modulation of extracellular matrix protein. *Stem Cells* **2012**, *30*, 2271–2282.
33. Grau, S.; Richards, P. J.; Kerr, B.; Hughes, C.; Caterson, B.; Williams, A. S.; Junker, U.; Jones, S. A.; Clausen, T.; Ehrmann, M. The role of human HtrA1 in arthritic disease. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 6124–6129.
34. Polur, I.; Lee, P. L.; Servais, J. M.; Xu, L.; Li, Y. Role of HTRA1, a serine protease, in the progression of articular cartilage degeneration. *Histol. Histopathol.* **2010**, *25*, 599–608.
35. Vonk, L. A.; Kragten, A. H. M.; Dhert, W. J. A.; Saris, D. B. F.; Creemers, L. B. Overexpression of hsa-miR-148a promotes cartilage production and inhibits cartilage degradation by osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* **2014**, *22*, 145–153.
36. Zhou, H. W.; Lou, S. Q.; Zhang, K. Recovery of function in osteoarthritic chondrocytes induced by p16INK4a-specific siRNA in vitro. *Rheumatology (Oxford)* **2004**, *43*, 555–568.
37. Lianxu, C.; Hongti, J.; Changlong, Y. NF-kappaBp65-specific siRNA inhibits expression of genes of COX-2, NOS-2 and MMP-9 in rat IL-1beta-induced and TNF-alpha-induced chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* **2006**, *14*, 367–376.
38. Galera, P.; Ollitrault, D.; Legendre, F.; Demoor, M.; Mallein-Gerin, F.; Boumediene, K.; Herbage, B.; Duterque-Coquillaud, M.; Damour, O. *Method for obtaining differentiated articular chondrocytes in vitro or ex vivo, and uses of same.* WO2012038668 A1; 2012038668 ed.; 2012.
39. Fermor, B.; Christensen, S. E.; Youn, I.; Cernanec, J. M.; Davies, C. M.; Weinberg, J. B. Oxygen, nitric oxide and articular cartilage. *Eur. Cell. Mater.* **2007**, *13*, 56–65– discussion 65.
40. Clausen, T.; Southan, C.; Ehrmann, M. The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 443–455.
41. Ringe, J.; Burmester, G. R.; Sittinger, M. Regenerative medicine in rheumatic disease-progress in tissue engineering. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2012**, *8*, 493–498.
42. Gomez-Leduc, T.; Hervieu, M.; Legendre, F.; Bouyoucef, M.; Gruchy, N.; Poulain, L.; de Vienne, C.; Herlicoviez, M.; Demoor, M.; Galéra, P. Chondrogenic commitment of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in collagen matrices for cartilage engineering. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 32786.
43. Legendre, F.; Ollitrault, D.; Hervieu, M.; Baugé, C.; Maneix, L.; Goux, D.; Chajra, H.; Mallein-Gerin, F.; Boumediene, K.; Galéra, P.; Demoor, M. Enhanced hyaline cartilage matrix synthesis in collagen sponge scaffolds by using siRNA to stabilize chondrocytes phenotype cultured with bone morphogenetic protein-2 under hypoxia. *Tissue Eng. Part C Methods* **2013**, *19*, 550–567.
44. Wade, C. M.; Giulotto, E.; Sigurdsson, S.; Zoli, M.; Gnerre, S.; Imsland, F.; Lear, T. L.; Adelson, D. L.; Bailey, E.; Bellone, R. R.; Blocker, H.; Distl, O.; Edgar, R. C.; Garber, M.; Leeb, T.; Mauceli, E.; Macleod, J. N.; Penedo, M. C. T.; Raison, J. M.; Sharpe, T.; Vogel, J.; Andersson, L.; Antczak, D. F.; Biagi, T.; Binns, M. M.; Chowdhary, B. P.; Coleman, S. J.;

- Valle, Della, G.; Fryc, S.; Guerin, G.; Hasegawa, T.; Hill, E. W.; Jurka, J.; Kiialainen, A.; Lindgren, G.; Liu, J.; Magnani, E.; Mickelson, J. R.; Murray, J.; Nergadze, S. G.; Onofrio, R.; Pedroni, S.; Piras, M. F.; Raudsepp, T.; Rocchi, M.; Roed, K. H.; Ryder, O. A.; Searle, S.; Skow, L.; Swinburne, J. E.; Syvanen, A. C.; Tozaki, T.; Valberg, S. J.; Vaudin, M.; White, J. R.; Zody, M. C.; Broad Institute Genome Sequencing Platform; Broad Institute Whole Genome Assembly Team; Lander, E. S.; Lindblad-Toh, K. Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science* **2009**, *326*, 865–867.
45. Tran-Khanh, N.; Hoemann, C. D.; McKee, M. D.; Henderson, J. E.; Buschmann, M. D. Aged bovine chondrocytes display a diminished capacity to produce a collagen-rich, mechanically functional cartilage extracellular matrix. *J. Orthop. Res.* **2005**, *23*, 1354–1362.
46. Sumita, Y.; Honda, M. J.; Ohara, T.; Tsuchiya, S.; Sagara, H.; Kagami, H.; Ueda, M. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. *Biomaterials* **2006**, *27*, 3238–3248.
47. Nakase, Y.; Hagiwara, A.; Nakamura, T.; Kin, S.; Nakashima, S.; Yoshikawa, T.; Fukuda, K.-I.; Kuriu, Y.; Miyagawa, K.; Sakakura, C.; Otsuji, E.; Shimizu, Y.; Ikada, Y.; Yamagishi, H. Tissue engineering of small intestinal tissue using collagen sponge scaffolds seeded with smooth muscle cells. *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 403–412.
48. Suzuki, S.; Kawai, K.; Ashoori, F.; Morimoto, N.; Nishimura, Y.; Ikada, Y. Long-term follow-up study of artificial dermis composed of outer silicone layer and inner collagen sponge. *Br. J. Plast. Surg.* **2000**, *53*, 659–666.
49. Russlies, M.; Behrens, P.; Wünsch, L.; Gille, J.; Ehlers, E. M. A cell-seeded biocomposite for cartilage repair. *Ann. Anat.* **2002**, *184*, 317–323.
50. Cho, Y.-G.; Cho, M.-L.; Min, S.-Y.; Kim, H.-Y. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* **2007**, *7*, 65–70.
51. Lee, K.; Silva, E. A.; Mooney, D. J. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J. R. Soc. Interface* **2011**, *8*, 153–170.
52. Pujol, J.-P.; Chadjichristos, C.; Legendre, F.; Baugé, C.; Beauchef, G.; Andriamanalijaona, R.; Galéra, P.; Boumédiène, K. Interleukin-1 and transforming growth factor-beta 1 as crucial factors in osteoarthritic cartilage metabolism. *Connect. Tissue Res.* **2008**, *49*, 293–297.
53. Reynolds, A.; Leake, D.; Boese, Q.; Scaringe, S.; Marshall, W. S.; Khvorova, A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 326–330.
54. Shao, Y.; Chan, C. Y.; Maliyekkel, A.; Lawrence, C. E.; Roninson, I. B.; Ding, Y. Effect of target secondary structure on RNAi efficiency. *RNA* **2007**, *13*, 1631–1640.
55. Lorenz, R.; Bernhart, S. H.; Höner Zu Siederdissen, C.; Tafer, H.; Flamm, C.; Stadler, P. F.; Hofacker, I. L. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol. Biol.* **2011**, *6*, 26.
56. Gotkin, M. G.; Ripley, C. R.; Lamande, S. R.; Bateman, J. F.; Bienkowski, R. S. Intracellular trafficking and degradation of unassociated proalpha2 chains of collagen type I. *Exp. Cell Res.* **2004**, *296*, 307–316.
57. Saxena, S.; Jónsson, Z. O.; Dutta, A. Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 44312–44319.
58. Xu, L.; Golshirazian, I.; Asbury, B. J.; Li, Y. Induction of high temperature requirement A1, a serine protease, by TGF-beta1 in articular chondrocytes of mouse models of OA. *Histol. Histopathol.* **2014**.
59. Wu, X.; Chim, S. M.; Kuek, V.; Lim, B. S.; Chow, S. T.; Zhao, J.; Yang, S.; Rosen, V.; Tickner, J.; Xu, J. HtrA1 is upregulated during RANKL-induced osteoclastogenesis, and negatively regulates osteoblast differentiation and BMP2-induced Smad1/5/8, ERK and p38 phosphorylation. *FEBS Letters* **2014**, *588*, 143–150.
60. Branly, T., Bertoni, L., Contentin, R., Rakic, R., Gomez-Leduc, T., Desancé, M., Hervieu, M., Legendre, F., Jacquet, S., Audigié, F., Denoix, J.M., Demoor, M. and Galéra, P. (2017).

Characterization and use of Equine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Equine Cartilage Engineering. Study of their Hyaline Cartilage Forming Potential when Cultured under Hypoxia within a Biomaterial in the Presence of BMP-2 and TGF- $\beta$ 1. *Stem Cell Rev.* **55**, 1569–20.

61. Schmidt, E. E.; Pelz, O.; Buhlmann, S.; Kerr, G.; Horn, T.; Boutros, M. GenomeRNAi: a database for cell-based and in vivo RNAi phenotypes, 2013 update. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D1021–6.
62. Tang, W.; Dodge, M.; Gundapaneni, D.; Michnoff, C.; Roth, M.; Lum, L. A genome-wide RNAi screen for Wnt/beta-catenin pathway components identifies unexpected roles for TCF transcription factors in cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 9697–9702.
63. Day, T. F.; Guo, X.; Garrett-Beal, L.; Yang, Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev. Cell* **2005**, *8*, 739–750.
64. Tuan, R. S. Cellular signaling in developmental chondrogenesis: N-cadherin, Wnts, and BMP-2. *J. Bone Joint Surg. Am.* **2003**, *85-A Suppl 2*, 137–141.
65. Clynes, M. Basic Cell Culture—A Practical Approach. Edited by JM Davis. Pp. 301. IRL Press at Oxford University Press, 1996. £ 27.50 paperback. ISBN 0 199 63433 5. **1996**.
66. Schmittgen, T. D.; Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* **2008**.

## 7. Figure legends

**Figure 1: Improvement of BMP-2 mediated MACI process based on RNA interference.** MACI is a tissue engineering method involving different parameters: a biomaterial, cells and exogenous stimuli (growth factors and cellular microenvironment). To induce chondrocyte redifferentiation, chondrocytes are cultured in 3D-Hypoxia conditions and treated with BMP-2. To counteract side effects of BMP-2 mediated redifferentiation, RNA interference targeting *Col1a1* and *Htra1* can be used to avoid fibrotic and catabolic evolution of the MACI process.

**Figure 2: Equine articular chondrocytes become more proliferative and lose their specific expression profile during dedifferentiation.** Phase-contrast microscopy of primary chondrocytes (A) and P3 chondrocytes (B) cultured in monolayers (magnification  $\times 10$ ). eAC isolated from equine cartilage were dedifferentiated during 11 passages in monolayer (n= 3). At each passage, doubling times of eAC are determined (C) and relative mRNA expression of *Col2a1*, *Col1a1*, *Htra1*, *Acan*, *Col10a1*, *Mmp13*, *Sox9*, *Runx2* and *Alpl* (respectively D to L) were analyzed by RTqPCR. Statistically significant differences are determined using the Mann Whitney test (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001). (M) Protein extracts were analyzed in Western-blot for type II collagen versus GAPDH. Representative blots are shown. Equine hyaline articular chondrocytes (eHAC) and primary (P0) human articular chondrocytes (hAC) protein extracts show different levels of type II maturation forms such as type II procollagen (pro), with only C- or N- terminal propeptides (Pc/Pn) and the mature doubly cleaved form (mat). The weak signal of eHAC GAPDH is caused by the low proportion of cells in native hyaline cartilage facing the global proteins content of this tissue.

**Figure 3: eAC 3D culture in type I/III collagen sponges under hypoxia induces some changes in the expression of cartilage markers of interest.** After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were placed in hypoxia during 7 days (3D Hypoxia). Cells were subjected to relative mRNA expression analysis by RTqPCR and compared to P3 eAC cultured in monolayers in normoxia (2D). All the data are normalized versus eAC seeded in sponges and arrested after 16h of incubation, and presented as the relative expression of each gene. Box plots represent five independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences are determined using the Mann Whitney test (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001).

**Figure 4: 3D culture, hypoxia and BMP-2 stimulation of eAC allow the expression recovery of cartilage specific markers.** After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were incubated in hypoxia and treated with BMP-2 (BMP-2) (50 ng/ml) or not (Ctrl) during 7 days. Relative mRNA amounts encoding *Col2a1* (A), *Acan* (B), *Col1a1* (C), *Htra1* (F), *Col10a1* (G) were determined by RTqPCR. The quality indexes of the neocartilage *Col2a1/Col1a1* (D) and *Acan/Col1a1* (E) are calculated. mRNA extracts obtained from equine articular chondrocytes (eAC) released from cartilage after overnight enzymatic digestion are used as controls. D0: Cells seeded in sponges and arrested after 16h of incubation. All results are normalized versus eAC cultured in monolayer, and presented as the relative expression of each gene. Box plots represent six independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences are determined using the Mann Whitney test (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001). (H) Protein extracts were analyzed in Western-blot for type II, type I, type X collagens, and HtrA1 versus GAPDH. Representative blots are shown (n = 5). Different levels of type II and type I collagen maturation forms are indicated such as type II procollagen (pro), with only C- or N- terminal propeptides (Pc/Pn) and the mature doubly cleaved form (mat). The 64 kDa type X collagen band represent signal peptide cleaved form.

**Figure 5: siRNA design and efficiency determination of *Col1a1* siRNA.** Sequence alignment between *Htra1* siRNA (A) or the three *Col1a1* siRNA (B) and their respective mRNA target are presented. XM\_005602544: Predicted Equus caballus HtrA serine peptidase 1 (HTRA1), mRNA NCBI reference sequence. XM\_014736922: Predicted Equus caballus collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA NCBI reference sequence. Software: CLC sequence viewer. After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were transfected by different concentrations of three *Col1a1* siRNA in hypoxia and treated with BMP-2 (50 ng/ml) during 7 days (C). The relative expression of *Col1a1* mRNA was determined by RTqPCR. Cells transfected with a negative control siRNA were used as control (siCtrl). All the results are normalized against BMP-2 treated cells without transfection, and are presented as the relative expression of each gene. The data represent three independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences between siCtrl and siCol1a1 transfected cells at the same siRNA concentration are determined using the unpaired (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001) or the paired T-test (§p < 0.05, §§p < 0.01, §§§p < 0.001).

**Figure 6: RNA interference targeting *Col1a1* is able to enhance transcriptome quality of chondrocytes.** After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were transfected by 5 nM of *Col1a1* siRNA (si*Col1a1*) in hypoxia and treated with BMP-2 (50 ng/ml) (BMP-2) or not (Ctrl) during 7 days. Relative mRNA levels of *Col1a1* (A), *Col2a1* (B) and *Acan* (C) were determined by RTqPCR. The quality indexes of the neocartilage *Col2a1/Col1a1* (D) and *Acan/Col1a1* (E) are calculated. siCtrl represents cells transfected with a negative control siRNA. All the data are normalized versus eAC cultured in monolayer, and are presented as the relative expression of each gene. Box plots represent five independent experiments performed in triplicate. Statistically significance differences are determined using the Mann Whitney test (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001) or the Wilcoxon signed-rank test (§p < 0.05, §§p < 0.01, §§§p < 0.001).

**Figure 7: Effects of RNA interference targeting *Htra1* on the expression of this atypical marker during chondrocyte redifferentiation.** After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were transfected by 5 nM of *Htra1* siRNA (si*Htra1*) in hypoxia and treated with BMP-2 (50 ng/ml) (BMP-2) or not (Ctrl) during 7 days. Relative mRNA expression of *Htra1* (A), *Col1a1* (B), *Col2a1* (C) and *Acan* (E) were determined by RTqPCR. The quality indexes of the neocartilage *Col2a1/Col1a1* (D) and *Acan/Col1a1* (F) were also calculated. siCtrl represents cells transfected with a negative control siRNA. All the results are normalized versus eAC cultured in monolayer, and presented as the relative expression of each gene. Box plots represent five independent experiments performed in triplicate.

Statistically significant differences are determined using the Mann Whitney test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) or the Wilcoxon signed-rank test (§ $p < 0.05$ , §§ $p < 0.01$ , §§§ $p < 0.001$ ).

**Figure 8: RNA interference targeting *Col1a1* and *Htra1* is able to decrease the expression of these atypical markers during chondrocyte redifferentiation.** After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were transfected by 5 nM of *Col1a1* siRNA (siCol1) or *Htra1* siRNA (siHt) in hypoxia and treated or not with BMP-2 (50 ng/ml) during 7 days. siCtrl represents cells transfected with a negative control siRNA. 2D : P3 eAC cultured in monolayer in normoxia. Protein extracts were analyzed by Western-blot for type II, type I, type X collagens, and HtrA1 versus GAPDH. Representative blots are shown (n= 5). Different levels of type II and type I collagens maturation forms are indicated such as type II procollagen (pro), with only C- or N- terminal propeptides (Pc/Pn) and the mature doubly cleaved form (mat). The 64 kDa type X collagen band represents signal peptide cleaved form.

**Figure 9: RNA interference targeting *Col1a1* and *Htra1* induces changes in BMP-2 eAC response.** After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were transfected by 5 nM of both *Col1a1* siRNA and *Htra1* siRNA (siRNAs) in hypoxia and treated with BMP-2 (50 ng/ml) during 7 days. Ctrl represents cells which were not transfected and not treated by BMP-2. 2D represents P3 eAC cultured in monolayer in normoxia. Relative mRNA amounts of *Htra1* (A), *Col1a1* (B), *Acan* (C), *Col2a1* (E), *Col10a1* (G) and *Mmp13* (H) were determined by RTqPCR. The quality indexes of the neocartilage *Acan/Col1a1* (D) and *Col2a1/Col1a1* (F) are calculated. Box plots represent five independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences are determined using the Mann Whitney test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) or the Wilcoxon signed-rank test (§ $p < 0.05$ , §§ $p < 0.01$ , §§§ $p < 0.001$ ). Protein extracts were analyzed in Western-blot for type II, type I, type X collagens, and HtrA1 versus GAPDH. Two representative blots are shown (n= 5) (I-J). Different levels of type II and type I collagen maturation forms are indicated such as type II procollagen (pro), with only C- or N- terminal propeptides (Pc/Pn) and the mature doubly cleaved form (mat). The 64 kDa type X collagen band represents signal peptide cleaved form.

**Figure 10: No benefit is detected in the *Col2a1/Col1a1* and *Acan/Col1a1* ratios during co-transfection of both *Col1a1-Htra1* siRNAs compared to the si*Col1a1* alone.** After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were placed in hypoxia and treated with BMP-2 (50 ng/ml) during 7 days. eAC were transfected with si*Col1a1*, combination of si*Col1a1* and si*Htra1* (Both) or not transfected (- siRNA). Relative mRNA amounts of *Col1a1* (A), *Htra1* (B), *Col2a1* (C), and *Acan* (E) were determined by RTqPCR. All the data are normalized versus eAC cultured in monolayer, and presented as the relative expression of each gene. The quality indexes of the neocartilage *Col2a1/Col1a1* (D) and *Acan/Col1a1* (F) are presented. Box plots represent five independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences are determined using the Mann Whitney test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

## 8. Supplementary information

**Figure S1: Total protein content after treatments.** After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were transfected or not by 5 nM of *Col1a1* siRNA (siCol), *Htra1* siRNA (siHt) or both (Both) in hypoxia and treated or not with BMP-2 (50 ng/ml) (+ BMP2) during 7 days. SiC represents the transfection of a negative control siRNA. Total protein extracts were determined by the Bradford protein assay. Box plots represent five independent experiments. Statistically significant differences were determined using the Mann Whitney test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

**Figure S2: Effect of *Col1a1* siRNA on *Col2a1* and *Htra1*.** Relative amounts of *Col2a1* and *Htra1* mRNA were determined by RTqPCR. Cells transfected with a negative control siRNA were used as control (siCtrl). All the results are normalized versus BMP-2 treated cells without transfection, and presented as the relative expression of each gene. Box plots represent three independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences between siCtrl and transfected cells at the same siRNA concentration were determined using the Unpaired (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001) or the paired T-test (§p < 0.05, §§p < 0.01, §§§p < 0.001).

**Figure S3: Linear representation of si*Col1a1* effects on its target.** After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were transfected with 5 nM of *Col1a1* siRNA (si*Col1a1*) in hypoxia and treated with BMP-2 (50 ng/ml) (BMP-2) or not (Ctrl) during 7 days. Relative mRNA levels of *Col1a1* were determined by RTqPCR. siCtrl represents cells transfected with a negative control siRNA. All the data are normalized versus eAC cultured in monolayer in normoxia, and presented as the relative expression of each gene. Box plots represent five independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences were determined using the Mann Whitney test (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001) or the Wilcoxon signed-rank test (§p < 0.05, §§p < 0.01, §§§p < 0.001).

**Figure S4: *Htra1* and *Mmp13* mRNA expression during RNA interference targeting *Col1a1*.** After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were transfected by 5 nM of *Col1a1* siRNA (si*Col1a1*) in hypoxia and treated with BMP-2 (50 ng/ml) (BMP-2) or not (Ctrl) during 7 days. Relative mRNA of *Htra1* and *Mmp13* were determined. siCtrl represents cells transfected with a negative control siRNA. All the results are normalized with eAC cultured in monolayer in normoxia, and presented as the relative expression of each gene. Box plots represent five independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences were determined using the Mann Whitney test (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001) or the Wilcoxon signed-rank test (§p < 0.05, §§p < 0.01, §§§p < 0.001). Only the Mann Whitney test gives some significance.

**Figure S5: *Mmp13* mRNA expression during RNA interference targeting *Htra1*.** After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were transfected by 5 nM of *Col1a1* siRNA (si*Col1a1*) in hypoxia and treated with BMP-2 (50 ng/ml) (BMP-2) or not (Ctrl) during 7 days. Relative mRNA amounts of *Htra1* and *Mmp13* were determined. siCtrl represents cells transfected with a negative control siRNA. All the results were normalized versus eAC cultured in monolayer in normoxia, and presented as the relative expression of each gene. Box plots represent five independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences were determined using the Mann Whitney test (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001) or the Wilcoxon signed-rank test (§p < 0.05, §§p < 0.01, §§§p < 0.001).

**Figure S6: RNA interference targeting *Col1a1* and *Htra1* mRNA: Over-inhibition of *Htra1* by the si*Htra1* treatment.** After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were transfected by 5 nM of *Col1a1* siRNA (si*Col1*) or *Htra1* siRNA (si*Ht*) in hypoxia and treated or not with BMP-2 (50 ng/ml) during 7 days. siCtrl represents cells transfected with a negative control siRNA. 2D : P3 eAC cultured in monolayer in normoxia. Protein extracts were analyzed in Western-blot for type II, type I, type X collagens, and HtrA1 versus GAPDH. Representative blots are shown (n = 5). Different levels of type II and type I collagen maturation forms are indicated such as type II procollagen (pro), with only C- or N-terminal propeptides (Pc/Pn) and the mature doubly cleaved form (mat). The 64 kDa type X collagen band represents signal peptide cleaved form.

**Figure S7: siRNA Effectiveness is correlated with RNA target secondary structure prediction.** mRNA secondary structure predictions were determined *in silico* using ViennaRNA Package 2.0 (Lorenz *et al.*, 2011<sup>53</sup>) with the minimum free energy prediction model. Sequence alignment between *Htra1* siRNA (**A**) or the three *Col1a1* siRNA (**B**) and their respective mRNA target. XM\_005602544: Predicted Equus caballus HtrA serine peptidase 1 (HTRA1), mRNA NCBI reference sequence. XM\_014736922: Predicted Equus caballus collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA NCBI reference sequence. Software : CLC sequence viewer. The coloring of nucleotide is provided automatically by forna only software according to the type of structural element they are in (i.e. stem, interior, hairpin, multi or exterior loop).

**Figure S8: Correlation between *Htra1* and *Mmp13* mRNA amounts under BMP-2 and *siHtra1* treatments.** After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges in hypoxia and treated with BMP-2 (50 ng/ml) (BMP-2) or not (Ctrl) during 7 days (**A**, **C**). During the culture, some cells were transfected or not with 5 nM of *Htra1* siRNA (*siHtra1*) (**B**, **D**). Relative mRNA of *Htra1* (**A**, **B**) and *Mmp13* (**C**, **D**) were determined by RTqPCR. Ctrl in panels **C** and **D** represent cells transfected with a negative control siRNA. All the results are normalized with eAC cultured in monolayer in normoxia, and presented as the relative expression of each gene. Box plots represent five independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences were determined using the Mann Whitney test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

**Table S1: Sequences list.** **A:** siRNA sequences used. **B:** Oligonucleotides used in RTqPCR experiments.



Figure 3

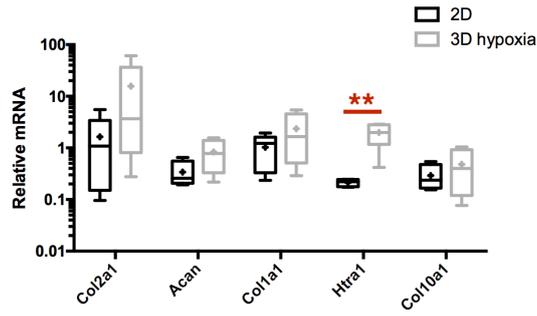


Figure 4

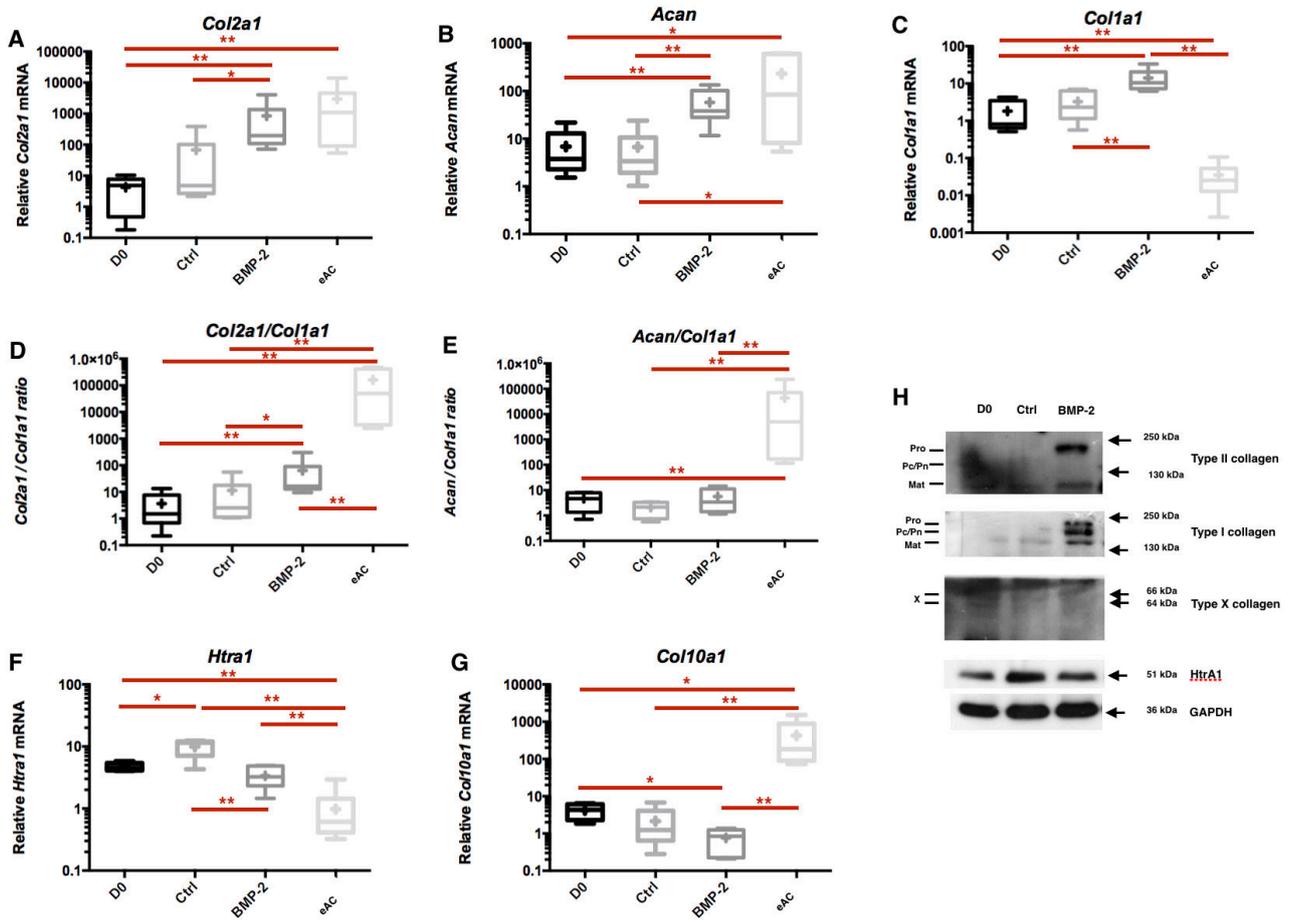




Figure 7

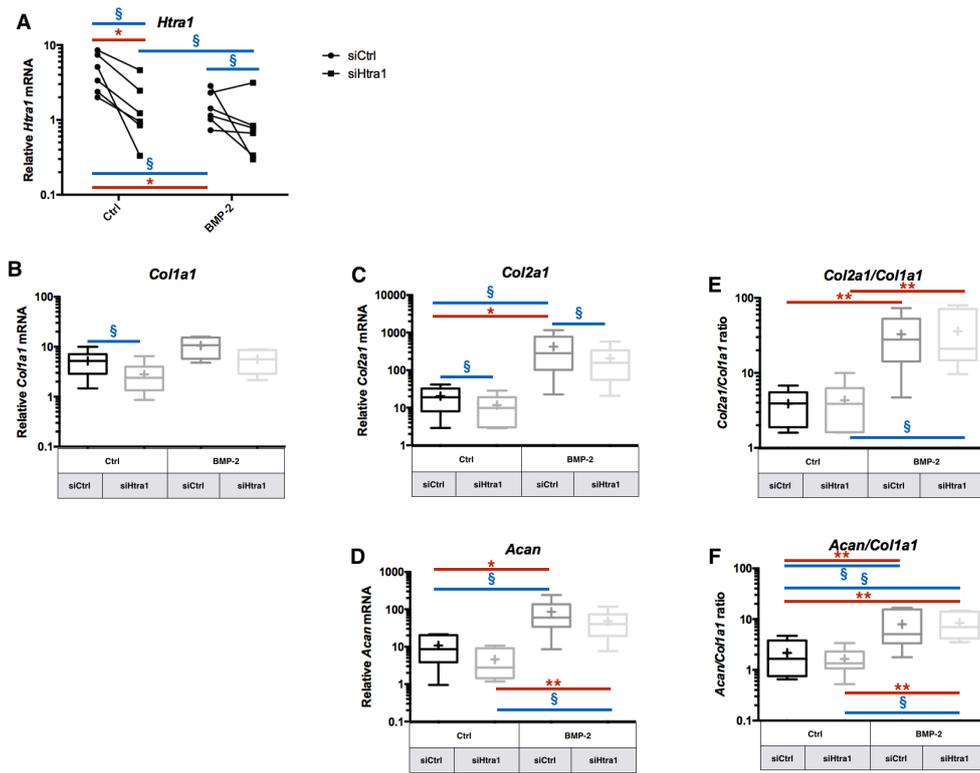
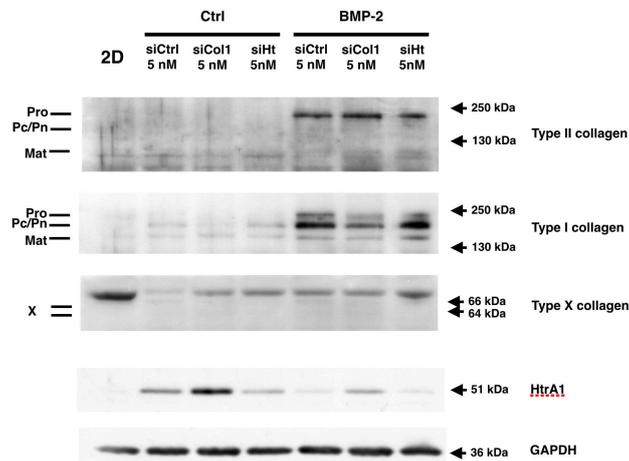
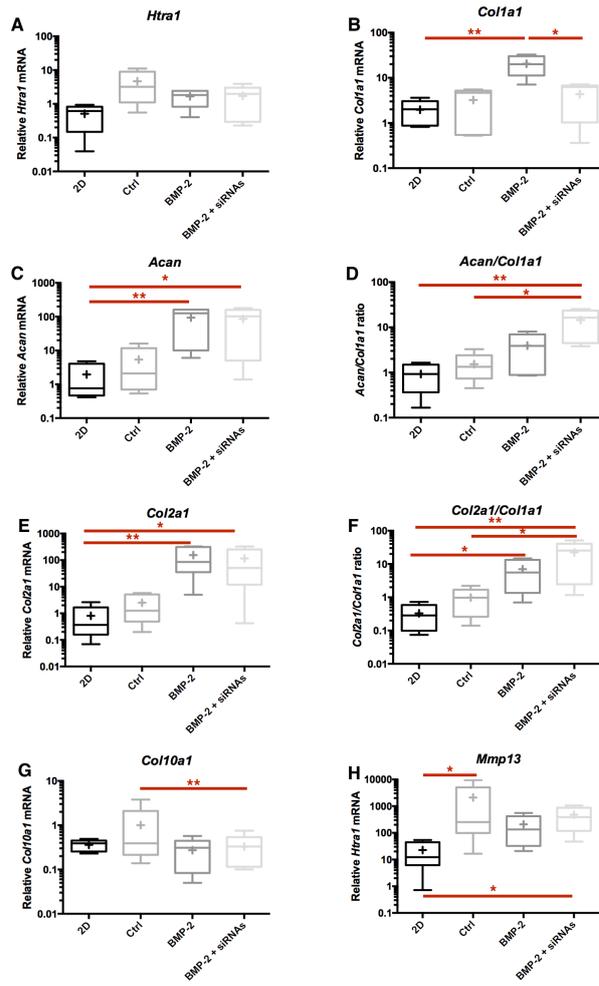


Figure 8



**Figure 9**



**Figure 10**

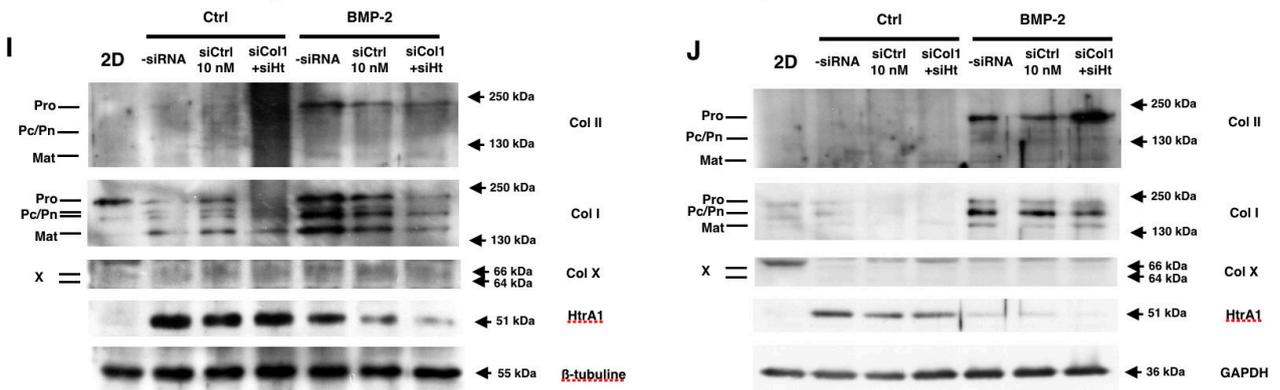


Figure 11

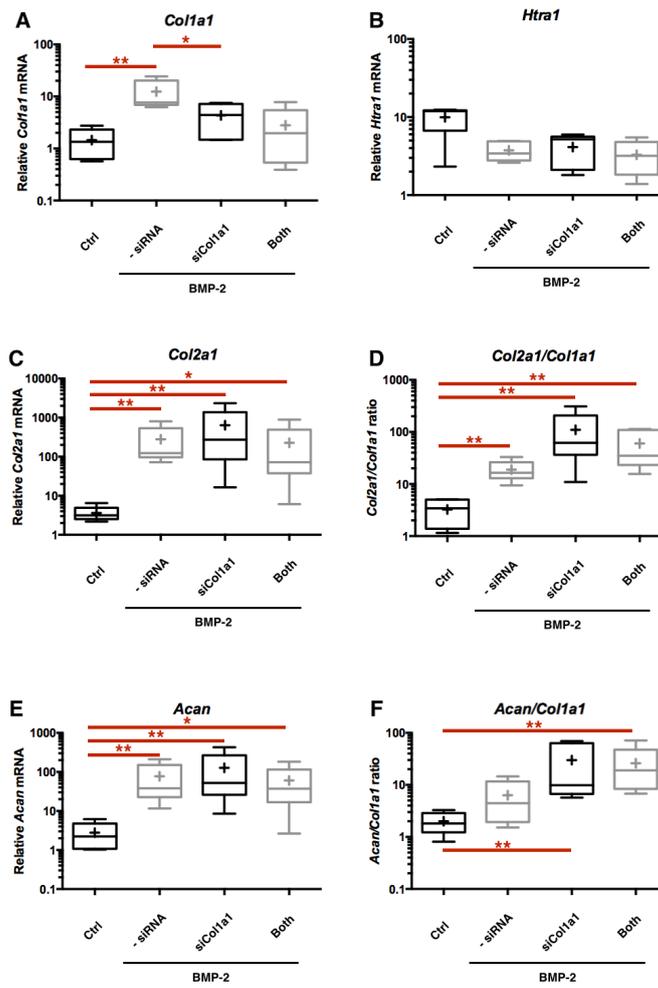
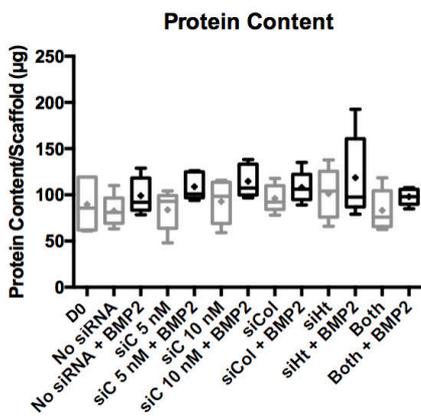


Figure 1S



	Conditions
D0	Cells seeded in sponges and arrested after 16h of incubation
No siRNA	Cells not transfected
siC	Transfection with a negative control siRNA at 5 or 10 nM
siCol	Transfection with a <i>Col1a1</i> siRNA at 5 nM
siHt	Transfection with a <i>Htra1</i> siRNA at 5 nM
Both	Transfection with <i>Col1a1</i> and <i>Htra1</i> siRNA (5 nM + 5 nM)

Figure 2S

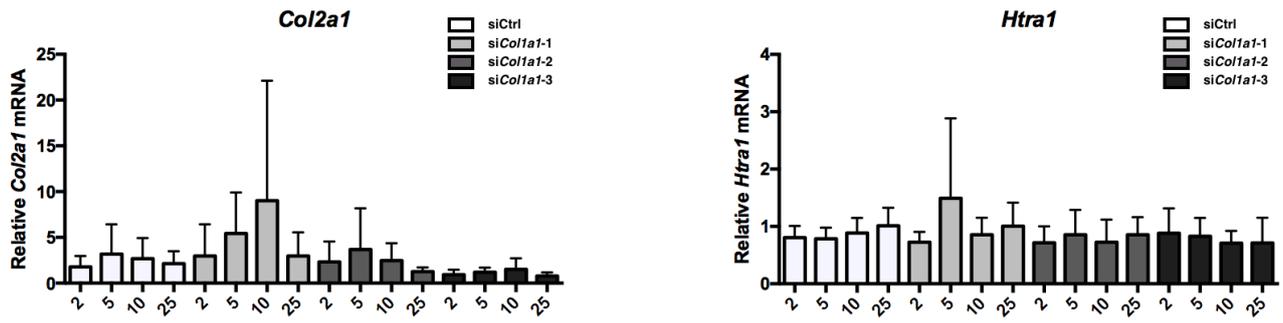


Figure 3S

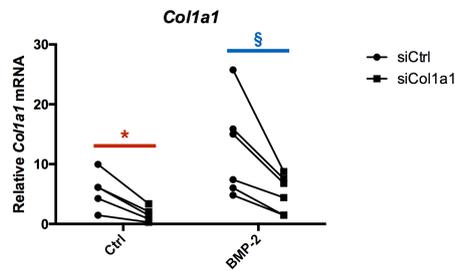


Figure 4S

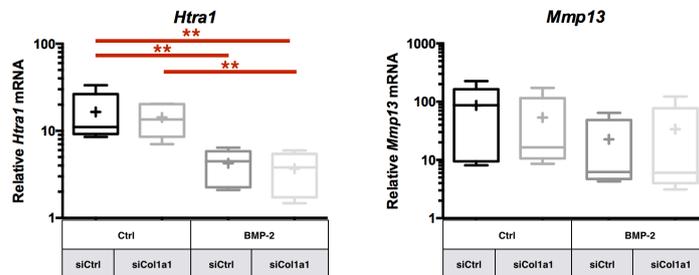


Figure 5S

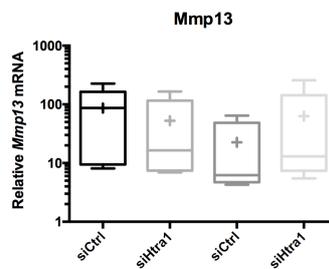


Figure 6S

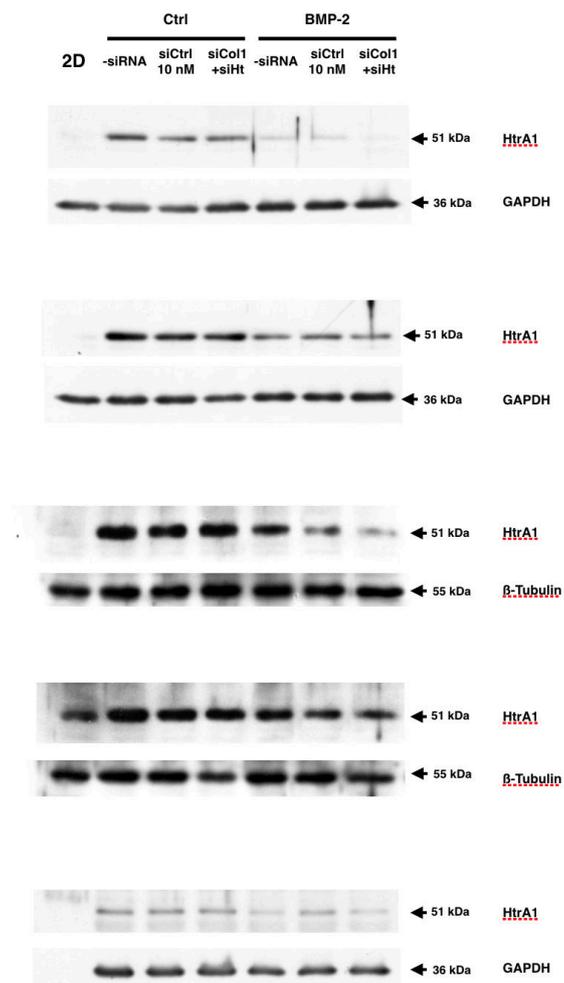
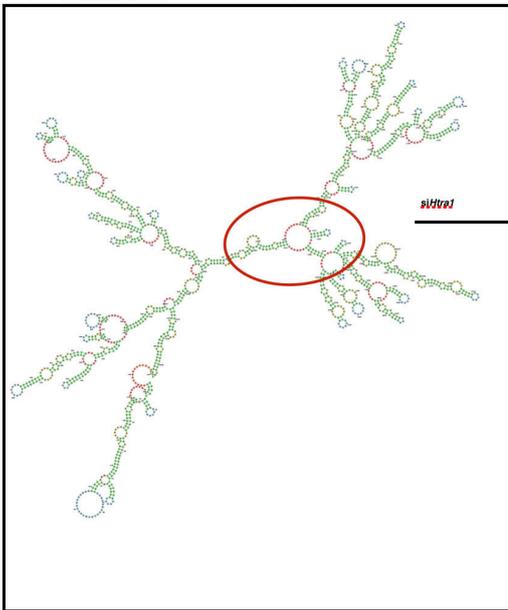


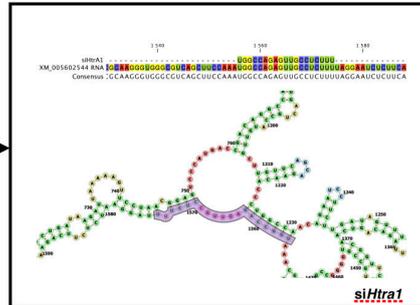
Figure 7S

A

Equus caballus *Htra1* mRNA secondary structure Prediction

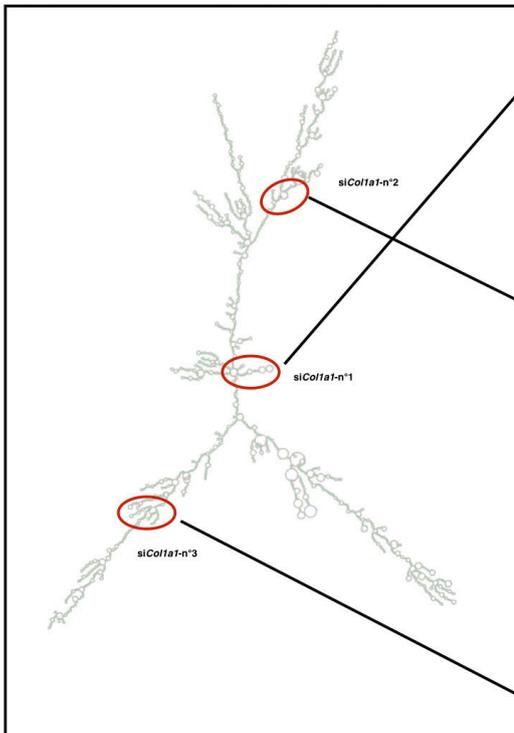


Relation between *Htra1* mRNA secondary structure Prediction and *siHtra1* targeting

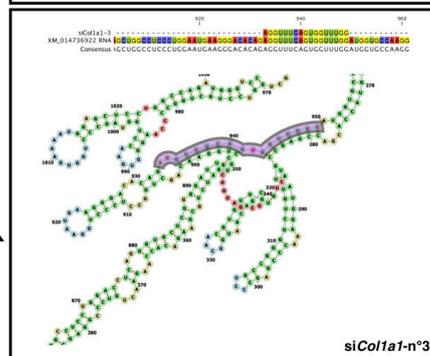
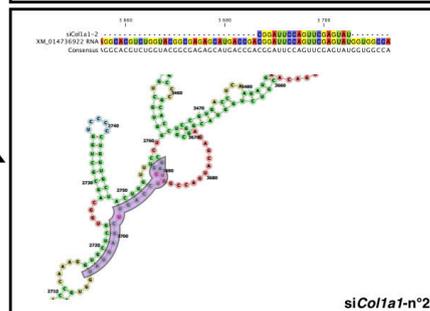
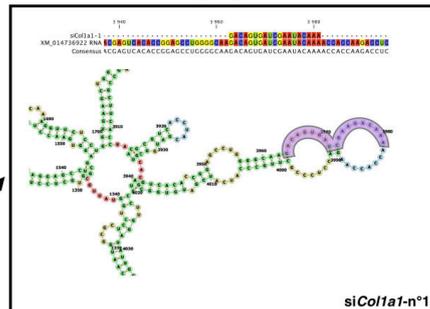


B

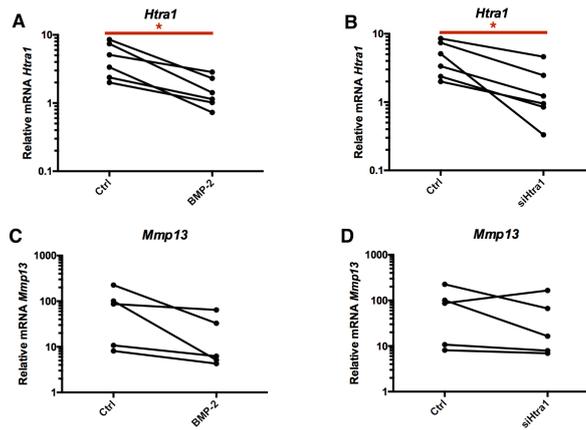
Equus caballus *Col1a1* mRNA secondary structure Prediction



Relation between *Col1a1* mRNA secondary structure Prediction and *siCol1a1* targeting



**Figure 8S**



**Figure 9S**

**A**

siRNA duplex	Forward sequence 5'-3'
<i>Htra1</i> siRNA	UGGCCAGAGUUGCCUCUUU
<i>Col1a1</i> siRNA n°1	GACAGUGAUCGAAUACAAA
<i>Col1a1</i> siRNA n°2	CGGAUUCAGUUCGAGUJU
<i>Col1a1</i> siRNA n°3	GAGGUUCAGUGGUUUGGA

**B**

Gene	Primer	sequence 5'-3'
<i>Actb</i>	forward	AGGCACCAGGGCGTGAT
	reverse	CTCTTGCTCTGGGCCTCGT
<i>Col1a1</i>	forward	TGCCGTGACCTCAAGATGTG
	reverse	CGTCTCCATGTTGCAGAAGA
<i>Col2a1</i>	forward	GGCAATAGCAGGTTACCGTACA
	reverse	CGATAACAGTCTTGCCCCACTT
<i>Col10a1</i>	forward	GCACCCAGTAATGTACACCTATG
	reverse	GAGCCACACCTGGTCATTTTC
<i>Acan</i>	forward	ACACGGATGGTGCCTCTTC
	reverse	CTCAGTCCACGGGTACGAT
<i>Runx-2</i>	forward	GCAGTTCCAAGCATTTCAT
	reverse	CACTCTGGCTTTGGAAGAG
<i>Mmp13</i>	forward	TGAAGACCCGAACCCTAAACAT
	reverse	GAAGACTGGTGTGGCATCAAG
<i>Sox9</i>	forward	CAAGAAGGACCACCCGACTA
	reverse	GGAGATGTGTCTGCTCCGT
<i>Alpl</i>	forward	GACATGACCTCCAGGAAGA
	reverse	GCAGTGAAGGGCTTCTTGTC
<i>Htra1</i>	forward	GGACTTCATGTTCCCTCAA
	reverse	GTTCTGCTGAACAAGCAACA

## C. Conclusion de l'article.

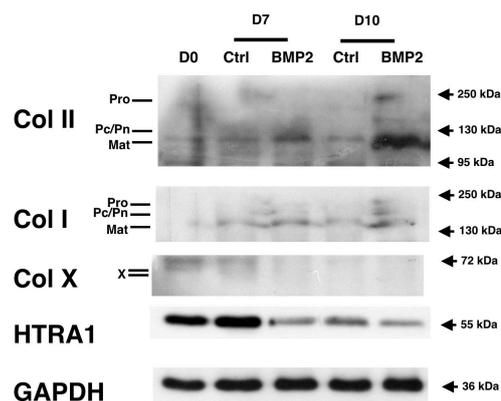
Cette première étude a montré une transposition possible du protocole de redifférenciation élaboré chez l'Homme vers le cheval. Les similarités biologiques entre les deux modèles se sont avérées importantes au niveau cellulaire et ont pu permettre de valider un effet de la BMP-2 humaine sur le recouvrement de la synthèse de MEC chez les chondrocytes équins dédifférenciés.

Par ailleurs, le phénomène de dédifférenciation décrit chez l'Homme et faisant perdre cette synthèse de MEC a été vérifié chez les chondrocytes équins même issus de sujets jeunes. Néanmoins, à la différence des études avec les cellules humaines, aucune sénescence cellulaire n'a pu être observée lors de l'amplification des chondrocytes articulaires équins et ceci jusqu'au passage 16. Une autre particularité des chondrocytes articulaires équins (CAE) a été la possibilité de cryoconservation, impossible chez nos cellules humaines issues de sujets âgés. Cette capacité d'amplification et de cryoconservation augmentent énormément les possibilités d'application de la MACI chez le modèle équin. Néanmoins, cette forte prolifération des CAE semble se faire au détriment de l'activité de synthèse de MEC. Malgré les forts taux d'ARNm des marqueurs du cartilage induits par l'action de la BMP-2, une augmentation de la quantité de CAE ensemencés en éponge a été nécessaire afin d'obtenir une MEC substantielle au niveau protéique.

Malgré les fortes similarités entre les deux modèles, ces premiers constats ont également montré des différences biologiques nous obligeant à ajuster nos protocoles. C'est notamment le cas pour l'application de la stratégie d'interférence par l'ARN. En effet, les forts taux d'expression de collagène de type I par les CAE sous l'effet de la BMP-2, conjugué aux homologies entre *Col1a1* et *Col2a1*, ont nécessité un fort investissement dans le « design » et le test des siRNA dirigés contre cette cible. Ce fort investissement matériel et humain a permis d'augmenter la précision et l'efficacité de la stratégie d'interférence par l'ARN et s'est révélée fructueuse. En effet, cette efficacité a permis une augmentation de la qualité de la MEC exprimée par le chondrocyte en maximisant la proportion de collagène de type II.

D'un autre côté, alors que la stratégie d'interférence par l'ARN ciblant *HTRA1* chez l'Homme s'est montrée efficace, cette dernière ne semble plus pertinente en ce qui concerne les CAE de cette étude. En effet, malgré l'efficacité de l'interférence d'*Htra1*, cette dernière ne permet pas l'augmentation de la qualité ou de la synthèse de la MEC par les CAE. De plus, cette interférence semble induire une hétérogénéité de réponse des CAE face à la BMP-2 rendant cette stratégie de redifférenciation moins robuste. De plus, les résultats ont montré une importante inhibition d'*Htra1* sous l'effet de la BMP-2 (également observée chez les ostéocytes). Cette dernière observation fait perdre la nécessité d'inhibition d'*Htra1* de façon exogène. Néanmoins, l'adversité de réponse face à nos attentes de la stratégie d'interférence d'*Htra1*, soulève la possibilité d'un rôle plus complexe d'*Htra1*, non décrit dans la littérature, chez le chondrocyte. Ce rôle pourrait confirmer l'implication d'*Htra1* dans le phénotypes cellulaires décrit elors du phénomène d'ossification endochondrale.

Des limites semblent persister à l'issue de ces travaux. En effet, même si l'inhibition de collagène de type I est conséquente, elle ne suffit pas à abolir sa présence au sein de la MEC. Cette technologie semble toucher ses limites lorsqu'il s'agit d'une expression aussi importante.

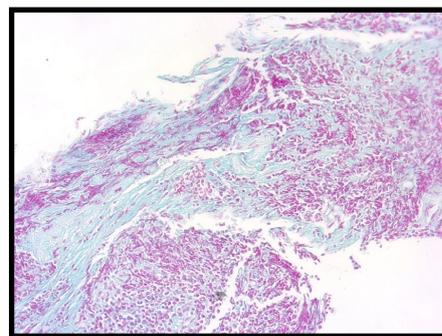


**Figure Complémentaire 1 : Les CAE expriment une MEC composée de collagène de type II lors d'une culture de 10 jours.**

Les CAE sont cultivés durant 10 jours en éponge de collagène de type I/III et en hypoxie (3-5% O<sub>2</sub>). Les cellules sont traitées ou non par la BMP-2 (50 ng/ml) dans du milieu de culture en 3D. L'analyse de l'expression de collagènes de types II, I et X ainsi que d'*Htra1* et de *Gapdh* est réalisée par Western-blot.

D'autre part, même si nous avons observé qu'il était possible de cultiver les chondrocytes durant 10 jours en hypoxie en culture 3D [Figure complémentaire 1], il s'est avéré difficile de les maintenir en culture au delà de 14 jours. Dans le cadre d'une thérapie par MACI, les cellules n'ont pas pour vocation à subir une culture sur le long terme. Néanmoins, ces derniers résultats indiquent que cette méthode de culture ne semble pas adaptée à la génération d'un substitut cartilagineux lors de longues cultures *ex vivo*. Seule l'application d'une culture à haute densité de CAE sous forme de micromasse générée par centrifugation en tubes coniques a permis de cultiver les cellules durant 21J [Figure complémentaire 2]. Ce dernier modèle de culture a montré la présence d'une MEC sulfatée révélée par le bleu alcian après coloration sur coupe histologique. Néanmoins, il a été constaté une proportion de cellules anormalement élevée au sein du cartilage néosynthétisé et sensiblement différente de la proportion de cellules au sein d'un cartilage natif sain.

Il n'en demeure pas moins que cette étude a permis de mettre au point un protocole de génération de tissu cartilagineux à partir de CAE dédifférenciés. Ces derniers, au bout de 7 jours, expriment une « MEC-hyaline like » à la différence des CAE dédifférenciés, utilisés à l'heure actuelle en essais cliniques chez le cheval. Ce protocole pourrait, à l'image de l'Homme, représenter un « gold standard » pour les stratégies de MACI entreprises chez le cheval. Appliquée *in vivo* chez le modèle équin, cette MACI pourrait représenter une preuve de concept ainsi que des premiers essais cliniques chez le modèle gros animal et permettre une passerelle vers des essais pré-cliniques chez l'Homme. Pour autant, cette stratégie reste limitante par l'aspect invasif du prélèvement de chondrocytes ainsi que par la nécessité d'une importante quantité de cellules nécessaire à son application.



**Figure Complémentaire 2 : Les CAE expriment une MEC sulfatée lors d'une culture 3D en micro-masse après 21 jours.**

Les CAE sont cultivés durant 21 jours en micro-masse générée par centrifugation à haute densité cellulaire sous traitement par la BMP-2 (50 ng/ml). Après fixation et coupe au microtome en paraffine les sections sont colorées par le bleu alcian et contre-colorées par le rouge nucléaire. (Grossissement x20).

## **Chapitre 2 : deuxième article**

---

# Chapitre 2 : deuxième article.

---

## I. Major differences in the intrinsic chondrogenic potential of equine umbilical cord matrix and umbilical cord blood mesenchymal stromal stem cells: Comparison of MSC sources for the use in cartilage regeneration.

Soumis Scientific Reports.

Rakic Rodolphe<sup>1,2</sup>, Bourdon Bastien<sup>1</sup>, Demoor Magali<sup>1</sup>, Maddens Stéphane<sup>2</sup>, Saulnier Nathalie<sup>2</sup> and Galéra Philippe<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Caen Normandy University, France; UNICAEN EA7450 BioTARGen (Biologie, Génétique et Thérapies ostéoArticulaires et Respiratoires), 14280 Saint-Contest, France.

<sup>2</sup> VETBIOBANK, 69280 Marcy l'Etoile, France.

\* Corresponding author: philippe.galera@unicaen.fr

### A. Objectifs de l'article : à la recherche de types cellulaires alternatifs pour l'ingénierie tissulaire du cartilage.

Au regard des limites observées par la communauté scientifique et vérifiées lors de la première étude sur les chondrocytes, les technologies d'ingénierie tissulaire du cartilage se sont orientées vers la recherche de sources cellulaires alternatives. A l'heure actuelle, les CSM représentent des sources cellulaires dont le potentiel thérapeutique est prometteur et dont les contraintes éthiques et technologiques sont plus souples. Parmi les différentes sources de CSMs, les cellules issues de cordon ombilical permettent un isolement cellulaire dépourvu de toute intervention chirurgicale, à la différence des CSM-MO et CSM-TA. Ces cellules sont également décrites comme possédant un potentiel de prolifération accru ainsi qu'une capacité à se différencier en cellules spécialisées issues des 3 feuillets embryonnaires, et notamment en chondrocytes.

Dans le cadre de leur utilisation en thérapie cellulaire ou tissulaire, le cordon ombilical peut être récupéré à la naissance du poulain sans aucun risque pour ce dernier et apporte ainsi un avantage éthique à cette intervention. Les CSM issues de cordon ombilical peuvent être isolées à partir du sang de cordon ombilical ou à partir de la matrice du cordon comme la gelée de Wharton. Elles peuvent alors être caractérisées, amplifiées, puis stockées afin d'obtenir une banque cellulaire capable d'être mobilisée dans le but de traiter différentes affections. Dans l'industrie vétérinaire, elles ont le plus souvent pour vocation à être utilisées dans le cadre d'injections au stade indifférencié afin de tirer partie de leurs propriétés immunomodulatrices pour traiter les affections locomotrices et l'inflammation.

Concernant l'ingénierie tissulaire, c'est la plasticité cellulaire des CSM qui est mise en jeu. Au sujet des CSM adultes, les CSM-MO montrent un intérêt certain pour la génération de cartilage *in vitro* par leur forte capacité de synthèse de MEC spécifique du cartilage. En ce qui concerne les CSM néonatales, moins étudiées, la conclusion semble plus subtile étant donné la diversité des résultats obtenus avec les différentes sources dont elles peuvent être issues.

L'utilisation d'un type de CSM à des fins de thérapie tissulaire impose un choix entre la disponibilité de la source et son potentiel thérapeutique.

Cette deuxième étude se consacre à ce dernier aspect dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage. Afin d'évaluer le potentiel thérapeutique des CSM issues de SPL et de GW, les deux types de CSM néonatales ont été caractérisés selon les recommandations de l'ISCT et différenciés en chondrocytes afin d'évaluer leur capacité à générer un tissu cartilagineux. Les données ont alors été comparées entre ces deux types cellulaires. L'implication de l'hypoxie n'ayant pas été démontrée pour la différenciation chondrogénique pour ces deux types de sources, ce paramètre a également été étudié pour la différenciation des CSMs.

Outre la volonté de mettre en évidence l'intérêt thérapeutique de ces CSM néonatales, c'est le concept même de cellule souche qui a été abordé dans cette étude. En considérant qu'une hétérogénéité biologique puisse exister parmi les différentes sources de CSM, cette dernière serait alors un facteur prépondérant à prendre en compte dans l'élaboration d'une stratégie thérapeutique utilisant ces cellules dans les modèles mammifères.

## **B. Deuxième article.**

### **1. Abstract.**

Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) can be isolated from various tissues. Neonatal MSCs, which are harvested from umbilical cord by a non-invasive procedure are a promising source of cells for regenerative medicine. Umbilical cord blood MSCs (UCB-MSCs) and umbilical cord matrix MSCs (UCM-MSCs) have chondrogenic potential and are, therefore, a possible alternative source of cells for cartilage tissue engineering in both horses and humans. However, MSC sources are heterogeneous, and we therefore need to compare the chondrogenic potential of UCB-MSCs and UCM-MSCs to determine which would be the best source of MSCs for cartilage tissue engineering. We isolated and characterized equine UCB-MSCs and UCM-MSCs, and then evaluated their proliferation, immunomodulatory character and multipotency. We then induced the chondrogenic differentiation of UCB-MSCs and UCM-MSCs by incubating them with 3D collagen type I/III scaffolds, in the presence of BMP-2 and TGF- $\beta$ 1 in cultures maintained under normoxia or controlled hypoxia. We carried out an exhaustive characterization of the extracellular matrix generated by both these two types of MSCs after the induction of chondrogenesis, by evaluating hyaline cartilage, hypertrophic and osteogenic markers. Large differences in cell proliferation, immunomodulation characteristics, chondrogenic potential and hypoxia sensitivity were observed between these two neonatal sources of MSCs. UCB-MSCs differentiated into chondrocytes and express an abundant, dense and a hyaline-like cartilage matrix. By contrast, despite their expression of cartilage markers, UCM-MSCs failed to differentiate fully into chondrocytes. The two types of MSCs also displayed intrinsic differences. Our results suggest that UCB-MSCs should be preferred for horse cartilage tissue engineering and highlight the need to take differences between MSC sources into account in regenerative medicine strategies.

**Keywords:** Horse, mesenchymal stem cells, umbilical cord blood, umbilical cord matrix, chondrocytes, cartilage engineering, osteoarthritis, chondral defects, chondrogenesis, extracellular matrix.

**Running head:** Differential chondrogenic potential between UCM-MSCs and UCB-MSCs.

## 2. Introduction

Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) are an attractive source of stem cells for regenerative medicine, due to their plasticity, trophic factors secretion and immunomodulatory properties (Uccelli *et al.*, 2008)<sup>1</sup>. Considerable effort and financial resources have been invested in research into MSCs, their clinical use and industrial production. Bone marrow MSCs (BM-MSCs) and adipose-derived MSCs (AD-MSCs) are the most frequently investigated sources of MSCs. However, the use of adult MSCs is limited by the need for invasive procedures to collect the cells, together with their lower proliferation potential, poor isolation and success rates, intrinsic and extrinsic factors, and the impact of aging on their biological properties (Choudhery *et al.*, 2014)<sup>2</sup> (Stolzing *et al.*, 2008)<sup>3</sup> (Mareschi *et al.*, 2006)<sup>4</sup>.

MSCs can be isolated from various tissues, including bone marrow, adipose tissue, dental pulp, synovial membrane, skeletal muscle, lung and kidney (Mafi *et al.*, 2011)<sup>5</sup> (Chamberlain *et al.*, 2007)<sup>6</sup> (Huang *et al.*, 2009)<sup>7</sup>. Since the turn of the century, MSCs have been harvested from various umbilical cord compartments (McGuckin *et al.*, 2005)<sup>8</sup> (Mitchell *et al.*, 2003)<sup>9</sup>. These neonatal MSCs have several advantages over adult MSCs: the procurement procedure is painless and noninvasive, and these cells have a higher proliferation capacity than adult MSCs (Kern *et al.*, 2006)<sup>10</sup>. Moreover, neonatal MSCs seem to express pluripotent markers and do not display the same effects of aging observed in cells from adult donors (Carlin *et al.*, 2006)<sup>11</sup>. The absence of ethical constraints and the considerable potential of neonatal MSCs for expansion have thus raised new hopes for the development of stem cell therapies, with the possibility of industrialization in good manufacturing practices (GMP) conditions (Nekanti *et al.*, 2010)<sup>12</sup>.

Neonatal MSCs are mostly isolated from umbilical cord blood (UCB-MSCs) and umbilical cord matrix (UCM-MSCs), commonly referred to as “Wharton’s jelly”. Both types of MSCs meet the standards recommended by the International Society of Cellular Therapy (ISCT) for MSCs (Horwitz *et al.*, 2005)<sup>13</sup> (Krampera *et al.*, 2013)<sup>14</sup>. Neonatal MSCs have a high adhesion capacity in monolayer cultures and they express a panel of characteristic cell-surface markers. They are capable of self-renewal, present immunomodulatory properties, provide feeder support by secreting trophic factors, and can be committed to various lineages, through osteoblastic, chondrogenic or adipogenic differentiation, for example (Troyer & Weiss., 2008)<sup>15</sup> (Zhang *et al.*, 2011)<sup>16</sup> (El Omar *et al.*, 2014)<sup>17</sup>.

The ISCT standards result mostly from the characterization of BM-MSCs. They are based on the establishment of benchmarks by scientific consensus, to facilitate investigations on *bona fide* MSCs (Dominici *et al.*, 2006)<sup>18</sup>. However, there is some controversy over the concept of “MSCs” due to ambiguities about their origin during development, heterogeneity within and between the isolated cell populations, and biological variability between different sources (Bianco *et al.*, 2013)<sup>19</sup> (Pevsner-Fischer *et al.*, 2011)<sup>20</sup> (Russell *et al.*, 2010)<sup>21</sup>. The indiscriminate use of different sources of umbilical cord MSCs may, therefore, affect therapeutic efficiency (Samsonraj *et al.*, 2015)<sup>22</sup>, in both human and veterinary medicine, the major markets for MSCs (Millard & Fisk, 2013)<sup>23</sup> (Schnabel *et al.*, 2013)<sup>24</sup>. These differences are illustrated by the differences in chondrogenic potential between UCB-MSCs and UCM-MSCs.

It is widely accepted that UCB-MSCs and UCM-MSCs can differentiate into chondrocytes, but this lineage has mostly been investigated with a view to determining whether it meets ISCT standards. The minimal validation criteria are respected, but only a few studies have focused on the real mechanisms of chondrogenesis and the processes occurring in such cells. Nevertheless, the use of MSCs for chondrogenesis is an area of particular interest, due to its potential for cartilage repair (Ringe *et al.*, 2012)<sup>25</sup>. Indeed, the *ex vivo* generation of a biological neocartilage substitute from MSCs is a potentially attractive alternative to matrix-induced articular chondrocyte implantation (MACI), which is subject to several limitations, for cartilage tissue engineering (Makris *et al.*, 2015)<sup>26</sup>.

Chondrogenesis is a multiparametric differentiation process dependent on the cellular microenvironment (Demoor *et al.*, 2014)<sup>27</sup>. The commitment of cells to this lineage requires particular cell conditions and development of the chondrogenic lineage is closely related to hypertrophic chondrocyte maturation and osteogenesis, as during endochondral ossification in embryonic development (Yang *et al.*, 2014)<sup>28</sup>. Indeed, the differentiation of MSCs into chondrocytes is dependent on the presence of a three-dimensional (3D) environment (Ghone *et al.*, 2012)<sup>29</sup>, the stimulation of MSCs with particular chondrogenic factors and culture conditions (Handorf & Li, 2014)<sup>30</sup>. Furthermore, BM-MSCs chondrogenesis has been shown to be regulated by hypoxia, through the inhibition of chondrocyte hypertrophy and terminal differentiation (Lee *et al.*, 2013)<sup>31</sup>. The production of chondrocytes is a complex process requiring the extensive analysis of specific and non-characteristic markers, due to similarities between the structure of the hyaline cartilage extracellular matrix (ECM) and other analogous structures, such as hypertrophic cartilage ECM, fibrous cartilage and mineralized tissues. Specific molecular analyses are required to evaluate the biological quality and functional properties of cartilage synthesized *ex vivo*.

The evaluation of chondrogenic potential is often neglected or even excluded when characterizing UCB- and UCM-MSCs, due to the need to test other characteristics (Kern *et al.*, 2006)<sup>10</sup> (Karahuseyinoglu *et al.*, 2007)<sup>32</sup> (Reed & Johnson, 2008)<sup>33</sup> (Lee *et al.*, 2015)<sup>34</sup>.

We have shown that human UCB-MSCs in three-dimensional cultures in type I/III collagen sponges in the presence of TGF- $\beta$ 1 and BMP-2 can generate a hyaline-like extracellular matrix of potential value for tissue engineering (Gomez-Leduc *et al.*, 2016)<sup>35</sup>. These findings are consistent with those of a previous report by Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2011)<sup>16</sup>. Like other sources of MSCs, UCM-MSCs, are considered to be an alternative source of cells for cartilage tissue engineering because of their stemness characteristics and chondrogenic potential. Recent studies have provided proof-of-concept for the use of UCM-MSCs in cartilage tissue engineering (Klontzas *et al.*, 2015)<sup>36</sup> (Pereira *et al.*, 2015)<sup>37</sup> (Fong *et al.*, 2011)<sup>38</sup> (Nirmal & Nair, 2013)<sup>39</sup> (Tanthaisong *et al.*, 2017)<sup>40</sup>. However, little is known about the functional quality of these cells and precise nature of the molecular components of the cartilage-like ECM expressed by the UCM-MSCs after chondrogenesis. Moreover, published findings have highlighted discrepancies in the reported chondrogenic potential of UCM-MSCs in both humans and horses (Wang *et al.*, 2009)<sup>41</sup> (Islam *et al.*, 2016)<sup>42</sup> (Burk *et al.*, 2013)<sup>43</sup>.

Most MSC-based therapies in any pathological context involve the unrestricted use of MSCs from any source, but this leads to highly heterogeneous results. It is therefore important to decipher the mechanisms rendering particular sources of MSCs suitable for specific therapeutic applications. In this context, the purpose of this study was to determine whether UCB-MSCs or UCM-MSCs were better sources of cells for substitute cartilage generation and tissue engineering in a mammalian model.

We used the horse UCM-MSCs and UCB-MSCs commercially available for use in veterinary medicine, to evaluate the potential of neonatal MSCs for chondrogenesis in the context of MSC-based treatments. We first checked the ISCT standards and compared the results obtained between the two types of cells. To this end, we used a standardized chondrogenic differentiation process based on 3D cell culture in collagen type I/III scaffolds and TGF- $\beta$ 1-BMP-2 stimulation for chondrogenesis from UCM-MSCs and UCB-MSCs. We analyzed, for the first time, the effect of oxygenation conditions on chondrogenesis from these neonatal MSCs and on lineage commitment.

### 3. Results

#### a. UCM-MSCs are characterized by high proliferation and long-term amplification potentials

We evaluated the proliferation potential of UCM-MSCs and UCB-MSCs, by amplification over 15 passages. The expansion of these populations was compared with that of AD-MSCs. Morphological analysis of the MSCs showed a typical fibroblast-like appearance (Fig. 1A). UCM-MSCs had a proliferation potential similar to that of AD-MSCs obtained from young mature and adult horses (4-10 years) (Fig. 1B and C). UCM-MSCs grew more rapidly than UCB-MSCs when the cells were amplified over more than seven passages (Fig. 1C). Only two samples of UCB-MSCs expanded during at least seven passages. The proliferation of AD-MSCs seemed to decline after nine passages, whereas most UCM-MSC samples displayed amplification over 14 passages. Indeed, UCM-MSCs were found to have the highest growth rates of any of the MSC sources tested.

#### b. IFN- stimulation induces changes in the transcriptomic profiles of UCM-MSCs and UCB-MSCs

The immunomodulation mediated by MSCs is illustrated by the change in the phenotype of these cells in response to the inflammatory microenvironment. We evaluated the response of MSCs to IFN- stimulation, by analyzing the expression of genes encoding immunomodulatory and trophic markers (Fig. 2). Sub-confluent neonatal MSCs were treated for 72 h with 50 ng/ml IFN- and differences in transcript levels were evaluated by RT-qPCR. The IFN- responses of UCM-MSCs and UCB-MSCs were compared with those of BM-MSCs and AD-MSCs.

Steady-state transcript levels differed between MSC sources (Fig. 3). The expression of *Tsg6*, and *Cd80* was weaker in BM-MSCs than in other MSCs, whereas *Hgf* and *Kgf* were more strongly expressed in this MSC source than in other sources of MSCs. *Cd86* expression was downregulated in UCM-MSCs, whereas *Cd80* seemed to be more strongly expressed in these cells than in other types of MSCs. This finding seems to be consistent with the higher levels of MHC-I in the membrane of UCM-MSCs than in that of UCB-MSCs (4-fold difference) (Fig. 4B). Expression levels for *B2m*, *Cd40* and *Kgf* were lowest in UCB-MSCs.

IFN- stimulation affected the expression of at least four transcripts in each type of source MSC, associated with a change of phenotype in all source MSCs, potentially useful as a signature of immunomodulatory properties (Fig. 4A). An overall increase in expression following IFN-treatment was observed for *Ido1*, *B2m* and *Cd40*. By contrast, *Tgfb1* and *Tsg6* transcript levels decreased after IFN- stimulation, in each of the samples. The modulation of gene expression was principally based on the upregulation of *Ido1* and *iNos*. However, UCM-MSCs had low basal levels of expression of the immunosuppressive enzyme gene *iNos*, and they displayed no modulation of the expression of this gene. In both neonatal sources of MSCs, IFN- priming led to the induction of MHC-1 and MHC-2. However, the mean percentage of MHC-2<sup>+</sup> cells after treatment was lower for UCB-MSCs than for UCM-MSCs (61% for UCB-MSCs versus 92% for UCM-MSCs).

There was no clear difference in IFN- response between adult and neonatal MSCs. However, our findings indicate that the phenotypic change was greatest for UCB-MSCs, in which the expression of eight genes was modulated (versus 6 for AD-MSCs, and 4 for BM-MSCs and UCM-MSCs) in addition to MHC-1 and MHC-2. However, UCB-MSCs are more heterogeneous than the other sources of MSCs.

### c. Evaluation of the multipotency potential of neonatal MSCs

The multipotency of UCM-MSCs and UCB-MSCs was assessed by inducing differentiation into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes in monolayer cultures in specific differentiation media (Fig. 5). Both sets of cells displayed commitment to the adipogenic lineage only if exposed to adipogenic medium containing 10% rabbit serum. The rapid production of large numbers of lipid droplets was observed on Oil Red O staining after 17 days. Alizarin red S staining was used to detect calcium phosphate deposits after 21 days of osteogenic differentiation. The culture of UCB-MSCs in osteogenic medium resulted in cell death after 14 days, accounting for the heterogeneous staining of the cell layer. Alcian blue staining was observed for both sources of neonatal MSCs after 21 days of differentiation. UCB-MSCs seemed to aggregate and express sulfated extracellular matrix, whereas staining was more intracellular for UCM-MSCs.

### d. Strong expression of cartilage-specific markers after chondrogenic differentiation for UCB-MSCs, but not for UCM-MSCs

We evaluated the potential of UCM-MSCs and UCB-MSCs for applications in cartilage tissue engineering, by using neonatal MSCs to seed type I/III collagen scaffolds, and culturing them in ICM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) (BT) for the induction of chondrogenesis, which was evaluated after 28 days of incubation. After chondrogenic differentiation, the biological substitute derived from UCM-MSCs had a contracted appearance, whereas the UCB-MSCs produced a hydrated, nacreous tissue resembling cartilage (Fig. 6A).

We then focused on the quality of the *de novo* synthesized ECM in the biological substitute produced by the MSCs from the two sources. We compared cells treated with BMP-2 and TGF- $\beta$ 1 to untreated cells (ICM conditions) and primary cultures of chondrocytes harvested from adult cartilage tissue for mRNA analysis, or equine cartilage for protein analysis.

Transcript analyses for UCM-MSCs and UCB-MSCs treated with BT revealed large differences in gene expression at 28 days (Fig. 6B). UCB-MSCs displayed strongly induced expression of the chondrocyte markers *Col2a1*, *Acan* and *Sox9* relative to ICM conditions (1043-fold, 72-fold and 3-fold induction, respectively). The expression levels of these phenotypic markers were similar in eAC-P0 and UCB-MSCs. By contrast, a moderate induction of *Acan* expression was observed in UCM-MSCs treated with BT relative to ICM conditions (13-fold induction). However, *Acan* levels remained lower than those in adult cartilage. The functional *Col2a1/Col1a1* ratio was increased by BT treatment, in both types of neonatal MSCs. However, this ratio was similar to that for eAC-P0 only for UCB-MSCs exposed to BT.

For chondrocyte hypertrophic markers, we found that *Mmp13* was downregulated in both types of MSCs under BT treatment relative to that observed in ICM conditions, whereas relative *Col10a1* mRNA levels were unaffected by the experimental conditions.

We paid particular attention to the expression of osteogenic markers, to evaluate the various lineages induced by the BT treatment of UCM-MSCs. Exposure to chondrogenic factors induced an increase in relative mRNA levels for *Alpl* in UCM-MSCs and UCB-MSCs relative to ICM conditions (6-fold and 205-fold induction, respectively). Interestingly, some of the genes investigated had opposite responses to growth factor treatment in UCM-MSCs and UCB-MSCs. This was the case, in particular, for *Col1a1*, *Spp1* and *Htra1*, which were downregulated in UCM-MSCs and upregulated in UCB-MSCs.

We ruled out the possibility of our differentiation protocol being the most suitable for the induction of chondrogenesis in UCM-MSCs, by screening other chondrogenic conditions, growth factors and commercial media. The data obtained did not differ markedly from those obtained with

our classical BT protocol for the induction of chondrogenic commitment in UCM-MSCs (**Supp. Fig. 1 and Supp. table I**).

An analysis of the time course of global changes in the expression of genes encoding chondrogenic, osteogenic and hypertrophic markers was performed by RT-qPCR at 7, 14, 21 and 28 days. Major differences in expression profile following stimulation with BT were observed between UCM-MSCs and UCB-MSCs (**Fig. 7**). Chondrogenesis was effectively induced in UCB-MSCs, shown by the early expression of characteristic markers of chondrocytes (*i.e.* *Col2a1*, *Acan* and *Sox9*), whereas it was anecdotal in UCM-MSCs.

Western blots were performed to evaluate the protein levels for some of these markers (**Fig. 8**). Despite the observed lack of increase in relative levels of *Col2a1* mRNA in response to BT treatment in UCM-MSCs, the mature type II collagen protein was detected after seven days of incubation (**Fig. 8A**). However, no further increase in the levels of this protein was observed in subsequent days, right up until the end of BT stimulation, after 28 days of culture. UCM-MSCs synthesized an immature form of type I collagen. BT treatment induced the maturation of this form, but levels were nevertheless still lower than for ICM conditions after 28 days of culture. This effect seems to depend on the culture of cells in ICM conditions rather than BT treatment (**Supp. figure 2**). High levels of Htra1, which is involved in matrix mineralization ([Tladen et al., 2012](#))<sup>44</sup>, were induced by 3D cell culture with or without BT treatment, throughout chondrogenic differentiation (**Fig. 8A**).

High levels of ECM synthesis were induced by treatment of UCB-MSCs with chondrogenic factors (**Fig. 8B**). This induction made it possible for use to load much smaller amounts of protein extract onto SDS-PAGE gels (once sixth the amount) to evaluate more correctly signal differences in the intensity (**Fig. 8C**). The use of less than 2.5  $\mu\text{g}$  UCB-MSCs protein for SDS-PAGE led to a loss of the peroxidase signal for the antibodies analyzed. Type II procollagen (Pro) was found to be overexpressed after chondrocyte differentiation, on gels loaded with 2.5  $\mu\text{g}$  protein. Type II procollagen with C-terminal or N-terminal propeptide deletion (the Pc and Pn forms, respectively) was also produced by UCB-MSCs treated with BT. Nevertheless, low levels of the mature form of type II collagen were detected. In parallel, high levels of type I collagen were observed. BT treatment induced the maturation of this collagen isotype, as the amount of the procollagen form seemed to decrease with treatment time, suggesting a likely blockade of type I collagen synthesis. By contrast, Htra1 expression, which was induced by 3D culture, was inhibited by BT treatment in UCB-MSCs, but not in UCM-MSCs. Chondrogenic medium induced higher levels of ECM production in UCB-MSCs than in UCM-MSCs, as shown by SDS-PAGE for equal amounts of protein. For both MSCs sources, no type X collagen has been detected (**Supp. figure 3**).

#### **e. UCB-MSCs express a hyaline-like cartilage ECM under BT treatment, whereas UCM-MSCs do not**

Neonatal MSCs cultured in chondrogenic medium for 28 days were stained with Alcian blue, 0-safranin and Alizarin red S for histological analysis (**Fig. 9**). Only UCB-MSCs displayed strong dense ECM staining when treated with BT. This ECM seemed to consist of large amounts of homogeneous sulfated proteoglycans. Very low levels of mineralization were observed in the UCB-MSC matrix. Low levels of ECM synthesis were detected for UCM-MSCs after chondrogenic stimulation, and not all samples displayed this ECM production. A tendency towards ECM mineralization was observed in some UCM-MSCs samples, in both ICM and BT conditions, but with considerable variability. The UCM-MSC response to BT treatment was clearly not reproducible, with very weak Alcian blue staining in some cases.

#### **f. UCB-MSCs and UCM-MSCs differ not only in chondrogenic properties, but also in intrinsic characteristics**

We further compared the two neonatal sources of MSCs, by evaluating steady-state mRNA levels and comparing them between strains, before and after BT treatment (**Fig. 10**). There were

large differences between undifferentiated UCM-MSCs and UCB-MSCs (Fig. 10A). First, UCB-MSCs displayed much stronger expression of chondrogenesis-specific markers than UCM-MSCs (*Col2a1*, *Acan* and *Sox9*). Second, *Mcam*, encoding the CD146 surface marker, was also more strongly expressed in UCB-MSCs than in UCM-MSCs (8-fold difference). Third, *Spp1* was more strongly expressed in UCM-MSCs than in UCB-MSCs (55-fold difference, the only gene for which this pattern of differential expression was observed). Finally, an analysis of steady-state mRNA levels after 28 days of chondrogenic differentiation confirmed the stronger expression of chondrogenic markers in UCB-MSCs than in UCM-MSCs. At the protein level and in a longitudinal study (Fig. 10B), basal levels of type I and II collagens differed between UCB-MSC samples. Similar differences were observed for *Sox9*. In addition, UCM-MSCs samples contained less type II collagen than type I collagen. Consistent with the results of transcript analysis, osteocalcin protein levels were much higher in UCM-MSCs than in UCB-MSCs. Another major difference between the MSCs from these two different sources was the overexpression of the osteochondral transcription factors *Sox-9* and *Runx-2* in UCB-MSCs (Fig. 10B).

#### g. Hypoxia induces a time-dependent effect on transcript expression profile in UCM-MSCs and UCB-MSCs during chondrogenesis induction

Hypoxia is known to affect the chondrogenic differentiation of BM-MSCs. We therefore investigated this aspect during chondrogenesis from UCM-MSCs and UCB-MSCs. We induced cell differentiation by treating cells in 3D culture with BT under conditions of normoxia or hypoxia.

After incubation of the cells for 28 days BT conditions, we used RTqPCR to evaluate the transcript profile in both types of neonatal MSCs (Fig 11). Long-term culture in hypoxia during differentiation had only a small impact on expression in UCM-MSCs and UCB-MSCs after 28 days in BT conditions. *Htra1* was the only gene displaying a significant modulation of expression by 28 days of hypoxia in UCM-MSCs, in BT conditions compared to BT in normoxia condition (5-fold increase in hypoxia).

Given this mild influence, we investigated the possible effects of hypoxia on mRNA levels throughout the process of chondrogenesis. We also checked for possible significant differences between hypoxia and normoxia early and late in the differentiation of both UCM-MSCs and UCB-MSCs into chondrocytes. This comparison was designed to detect effects potentially much more subtle than the major changes to the cells induced by BT treatment by the end of the time course (28 days). We analyzed time-dependent effects of hypoxia on gene expression in both BT and ICM conditions. We found that these time-dependent effects differed between UCM-MSCs and UCB-MSCs. In BT conditions for UCM-MSCs (Fig. 12), significant results were obtained for *Sox9* and *Col1a1* at an early stage of differentiation, with the expression of both these genes more strongly induced by hypoxia than normoxia (at 14 days for *Sox9* and during the first 21 days for *Col1a1*). *Htra1* and *Runx2* were upregulated at the end of chondrogenesis in hypoxia relative to normoxia at day 7 or at the end of chondrogenesis. In UCM-MSCs in ICM (Fig. 13), the relative amounts of *Acan* and *Spp1* mRNA seemed to be upregulated by hypoxia throughout differentiation, although the degree of upregulation tended to decrease in the long term. After 28 days, *Col2a1* and *Runx2* seemed to be overexpressed in hypoxic conditions.

In UCB-MSCs (Fig. 12 and Fig. 13) treated with BT (Fig. 12), transcript levels tended to be higher for *Col1a1* and *Sox9* at the end of the culture period than after seven days, in normoxia. By contrast, *Alpl* transcript levels were lower in hypoxia than in normoxia (57-fold difference). In ICM conditions, significant differences were observed at the end of cell culture. *Sox9* expression was upregulated by hypoxia (2.4 times higher than in normoxia), while *Col1a1* expression was repressed by hypoxia, as shown by the difference in transcript levels relative to those after seven days in normoxia. Hypoxia also tended to abolish the gradual decrease in *Htra1* observed towards the end of the cell culture period in normoxia. These findings reveal a time-dependent effect of normoxia in chondrogenic medium.

These data are summarized in **Fig. 14**, in which we classify the significant results for comparisons between hypoxia and normoxia at the same time points (strong effect) and between hypoxia at the end of the study and seven days of normoxia (weaker effect). In our 3D cell culture model, UCM-MSCs and UCB-MSCs responded differently to hypoxia, in ICM or BT conditions. This difference was detected for different genes, and hypoxia had opposite effects on the expression of some genes in the two types of MSCs.

#### **h. Hypoxia decreases the amount of hyaline-cartilage ECM synthesized by UCB-MSCs**

A histological analysis of the newly synthesized ECM produced by neonatal MSCs was performed after chondrogenic differentiation in different oxygen availability conditions (**Fig. 15**). Oxygenation conditions had only minor effects on the new tissues synthesized from UCM-MSCs. UCM-MSCs synthesized a highly diffuse ECM with a low glycosaminoglycan content and low levels of matrix mineralization under BT treatment in normoxia. The synthesis of this ECM was reduced further by incubating the cells in hypoxia.

Hypoxia affected all samples of UCB-MSCs subjected to histological analysis. It seemed to decrease UCB-MSC ECM synthesis and resulted in a more diffuse and heterogeneous ECM than observed in BT-normoxia conditions. As ECM was already poorly mineralized in normoxia, it was difficult to detect an effect of hypoxia on calcium deposits, although such an effect was observed in some cases.

These results were confirmed by western-blot analyses of collagen levels. Total collagen synthesis was decreased by hypoxia during the differentiation of UCB-MSCs (**Fig. 16**). Similar decreases were observed for both type I and type II collagen. Thus, the lower levels of ECM synthesis in hypoxia were not associated with a change in ECM quality. UCB-MSCs and UCM-MSCs synthesized only very small amounts of ECM under ICM conditions; we did not, therefore, analyze the effect of hypoxia in these conditions (**Supp. Fig. 4**).

## **4. Discussion**

There are great hopes for the use of MSCs in regenerative medicine and, particularly, in tissue engineering, due to the cellular plasticity and other properties of these cells. In the engineering of both horse and human cartilage tissues (**Frisbie et al., 2008**)<sup>45</sup>, MSCs may supplant chondrocytes for matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI), thereby overcoming the medical and cellular limitations associated with the need for cartilage biopsy and chondrocyte amplification (**Makris et al., 2015**)<sup>26</sup>. AD-MSCs and BM-MSCs are the most widely used MSCs. However, the isolation of MSCs from both these sources requires the use of invasive procedures. These cells are also sensitive to replicative senescence and have a lower multipotency potential during amplification than neonatal cells (**Mareschi et al., 2006**)<sup>4</sup>. The use of alternative MSCs sources, such as neonatal MSCs, would overcome these obstacles, thereby increasing the possibilities for tissue engineering (**Troyer & Weiss, 2008**)<sup>15</sup>, (**Nekanti et al., 2010**)<sup>46</sup>, (**Guillot et al., 2007**)<sup>47</sup>.

Clarification of the biological properties of neonatal MSCs is required before the therapeutic use of these cells can be considered. In this context, we show here that there is a difference in chondrogenic potential between the two most widely used types of equine neonatal MSCs: UCM-MSCs and UCB-MSCs. We found that UCM-MSCs had higher proliferation rates and longer amplification times than UCB-MSCs. These results are consistent with the results of scale-up cultures for UCM-MSCs (**Nekanti et al., 2010**)<sup>12</sup> and should be taken into account in therapeutic applications. The equally high multiplication rates of AD-MSCs can be explained by the young age of the horses from which cells were obtained by biopsy (4-10 years).

The immunomodulatory properties of MSCs have recently been investigated worldwide (**Wang et al., 2014**)<sup>48</sup>. Since 2013, the ISCT has recommended evaluating the immunomodulatory

capacity of MSCs during their characterization (Krampera *et al.*, 2013)<sup>14</sup>. We carried out such a characterization, by quantifying the expression of 13 target genes known to be involved in immune communication by MSCs. These genes can be assembled into three interaction nodes (Fig. 2B): a co-receptor node (Cd86, Cd80, Cd40 and B2m), a chemokine and cytokine node (Ido1, iNos, Il-10 and Il-6), and a growth factor and other trophic factor (Hgf, Kgf and Tsg-6) node. These nodes seem to be organized around regulatory factors (Rela, Ifng and Tgfb1). We used a simple approach for the partial characterization of the MSC sources study and a comparison of their immunomodulatory properties, involving the treatment of the cells with IFN- to mimic an inflammatory microenvironment. This stimulation triggered a change in phenotype mediated by an upregulation of *Ido1* and *iNos* expression in UCB-MSCs, and of *Ido1* only in UCM-MSCs. These two soluble factors play a major role in the immunomodulation induced by MSCs, but their roles seem to differ between model species. Immunomodulation by human MSCs seems to be governed by IDO activity (Krampera *et al.*, 2006)<sup>49</sup>, whereas that mediated by mouse MSCs also requires the action of iNos action (Ren *et al.*, 2008)<sup>50</sup>. The change in the phenotype of neonatal MSCs also involves an upregulation of MHC-1 and MHC-2, leading to an increase in interactions between neonatal MSCs and immune cells. A response to IFN- was observed in all the MSCs studied, but the nature of the response differed between MSC sources. Indeed, the changes in steady-state mRNA levels seemed to differ between MSCs sources, highlighting cell signatures apparently specific to each of the MSC sources (Supp. Fig. 5). The main differences between UCM-MSCs and UCB-MSCs concerned the iNos response and the greater heterogeneity of UCB-MSCs. Only UCB-MSCs displayed a larger fluctuation of expression for iNos than for *Ido1*.

We characterized the two neonatal sources of MSCs further, to use in tissue engineering, by evaluating their multipotency. UCB-MSCs are known to be refractory to adipogenic differentiation (Karagianni *et al.*, 2013)<sup>51</sup>. This problem has been resolved by inducing adipogenesis in the presence of rabbit serum, which favors commitment to this lineage. UCM-MSCs and UCB-MSCs were positively stained with Alcian blue, oil red O and Alizarin red S, indicating that cells from both the neonatal sources considered here were able to undergo chondrogenesis, adipogenesis and osteogenesis, respectively. Based on these results, it is not possible to assess the difference in therapeutic potential between the two neonatal sources of MSCs.

UCM-MSCs (Tanhaisong *et al.*, 2017)<sup>40</sup> (Bailey *et al.*, 2007)<sup>52</sup> (Beeravolu *et al.*, 2016)<sup>53</sup> (Fong *et al.*, 2011)<sup>38</sup> and UCB-MSCs (Zhang *et al.*, 2011)<sup>16</sup> were considered good candidates for cartilage tissue engineering, due to their ability to generate a biological substitute for cartilage *in vitro*. We assessed the potential of MSCs from these two sources to generate cartilage for therapeutic purposes, by assessing gene expression and investigating the quality of the ECM synthesized after the induction of chondrogenesis in MSCs. We applied a standardized chondrogenic protocol (Galera *et al.*, 2012)<sup>54</sup> used successfully in our previous studies on human BM-MSCs (Legendre *et al.*, 2017)<sup>55</sup> and UCB-MSCs (Gomez-Leduc *et al.*, 2016)<sup>35</sup>. This chondrogenic process is based on the use of a type I/III collagen scaffold cell culture model, and the treatment of the MSCs with BMP-2 and TGF- $\beta$ 1. We observed major differences in the behavior of equine neonatal MSCs from the two sources during chondrogenesis. UCB-MSCs produced an abundant ECM composed of type II collagen and sulfated GAGs, whereas UCM-MSCs failed to produce a hyaline-like ECM in response to growth factor treatment. Our results for UCM-MSCs were not entirely consistent with those of previous studies because, in our culture model, very small amounts of *Acan* and *Col2a1* mRNA, and of mature type II collagen protein, were found to be present in the biological substitute. Chondrogenic commitment seemed to be induced in UCM-MSCs. However, histological investigations and close comparison with UCB-MSCs clearly demonstrated the poor quality of ECM synthesis by UCM-MSCs. These results confirm the findings of a recent study by Islam *et al.* (Islam *et al.*, 2016)<sup>42</sup> demonstrating differences in chondrogenic potential between human UCM-MSCs, adult MSCs (synovial MSCs and Hoffa's fat pad MSCs) and redifferentiated articular chondrocytes. In our experiments comparing the ECM produced by UCB-MSCs and UCM-MSCs induced by incubation with BT and that produced by BMP-2-treated equine articular chondrocytes, we found that type II collagen levels were higher for

BT-treated UCB-MSCs, but that these cells also displayed substantial type I collagen production (Supp. Fig. 6).

We checked that our differentiation model was not unsuitable for the induction of chondrogenesis in MSCs, by assessing the efficacy of different growth factors and commercial chondrogenic media for inducing commitment to chondrogenesis. The suitability of the type I/III collagen scaffold used as a 3D biomaterial in this study could also be called into question, because of the lack of cell-cell contacts, which are absolutely required for chondrogenesis induction, particularly for the initial condensation step (Cao *et al.*, 2015)<sup>56</sup>. We therefore also performed chondrogenic differentiation in high-density 3D cell cultures, with the micropellet and hanging drop models (Suzuki *et al.*, 2012)<sup>57</sup>. None of the different chondrogenic conditions tested promote substantial cartilage-specific marker expression by UCM-MSCs (Supp. Fig. 1, Fig. 7 and 8). Furthermore, analyses of steady-state mRNA levels for specific and non-characteristic chondrocyte markers in undifferentiated neonatal MSCs revealed that, in addition to having different responses to chondrogenic induction, these two types of neonatal MSCs had different basal phenotypes. This difference resulted, in particular, from the high levels of *Spp1* (the gene encoding the osteopontin protein) expression in UCM-MSCs, osteopontin being a key regulator of hematopoietic niches (Nilsson *et al.*, 2008)<sup>58</sup>. High levels of osteocalcin protein were also observed in UCM-MSCs. These two latter results reveal a partial induction of osteogenesis in the UCM-MSCs, probably induced by the isolation and cell culture of the native cell population. Moreover, the main difference between the two types of neonatal MSCs was the overexpression of the osteochondral transcription factors Sox-9 and Runx-2 in UCB-MSCs, potentially associated with their greater tendency to develop into cells of the osteochondrogenic lineage (Eames *et al.*, 2004)<sup>59</sup>.

*Mcam*, encoding the melanoma cell adhesion molecule (Cd-146), has been described as a multipotency marker of particular relevance in chondrogenic differentiation (Russell *et al.*, 2010)<sup>21</sup> (Su *et al.*, 2015)<sup>60</sup>. In our experiments, its overexpression in UCB-MSCs and its lack of expression in UCM-MSCs also seemed to be correlated with chondrogenic potential.

There may be differences in intrasource population heterogeneity between UCM-MSCs and UCB-MSCs and chondroprogenitors may also differ between the two MSCs sources. UCM-MSCs probably include a smaller population of chondroprogenitors, leading to the expression of mature type II collagen from day 7. Further *in situ* labeling or single-cell analysis studies are required to confirm this hypothesis.

Hypoxia plays a major role in cartilage and chondrocyte physiology. We previously showed that hypoxia enhances chondrogenesis and hyaline-like ECM synthesis by human BM-MSCs (Legendre *et al.*, 2017)<sup>55</sup>. Hypoxia seems to be involved in inhibiting the terminal differentiation of chondrocytes (Lee *et al.*, 2013)<sup>31</sup>, and it is also involved in MSC physiology, as it is a key microenvironment parameter (Grayson *et al.*, 2006)<sup>61</sup> (Bigot *et al.*, 2015)<sup>62</sup>. Our results seem to be in agreement with these previous researches because of the strong inhibition of *Alpl* gene expression in UCB-MSCs under hypoxia. *Alpl* is a marker of both the terminal differentiation of chondrocytes and the pre-osteoblast differentiation.

Hypoxia predominates in hematopoietic stem cell niches (Cipolleschi *et al.*, 1993)<sup>63</sup> and may regulate the therapeutic properties of MSCs (Rosová *et al.*, 2008)<sup>64</sup>. Nevertheless, hypoxia has not clearly been implicated in chondrogenesis from neonatal MSCs. We therefore investigated the impact of long-term hypoxia during chondrogenic induction in both types of neonatal MSCs. Hypoxia seemed to reduce ECM synthesis by differentiated UCB-MSCs, but it was not possible to determine from the results whether hypoxia had advantageous or deleterious effects for the chondrogenic differentiation of UCB-MSCs. However, hypoxia seems to upregulate Sox9 gene expression. These results can be explained by the affinity of HIF-1 $\alpha$  to consensus sequences in the promoter of the Sox9 gene. This relation between Sox9 and hypoxia is essential to pre-chondrogenic induction under low oxygen conditions (Amarilio *et al.*, 2007)<sup>65</sup>. Unlike BM-MSCs, UCB-MSCs develop under normoxic conditions, in the umbilical cord vascular system. Hypoxia

probably imposes metabolic changes on UCB-MSCs, limiting ECM synthesis. Thus, hypoxia may be involved in changes to oxidative metabolism through a glucose-dependent metabolism more active in mature chondrocytes (Rajpurohit *et al.*, 1996)<sup>66</sup>. The long-term culture of undifferentiated cells in hypoxia before their differentiation may result in cellular adaptation, with differential effects on UCB-MSC chondrogenesis.

We found that the effects of hypoxia on transcript levels depended on cell treatment and MSC source. Furthermore, a temporal effect of hypoxia on gene expression was observed by comparing the results obtained at the beginning and end of cell cultures in ICM and BT conditions. Hypoxia had a multifactorial effect on neonatal cell behavior. A complex effect of hypoxia on MSC behavior was demonstrated in our previous studies (data not shown) showing a time-dependent effect of hypoxia during human UCB-MSCs chondrogenesis, resulting in an increase in ECM quality. Nevertheless, the real effects of hypoxia on chondrogenic differentiation may be concealed by the major change in phenotype occurring during the differentiation of MSCs into chondrocytes.

This work provides the first extensive evaluation of the chondrogenic potential of equine UCM-MSCs and UCB-MSCs, with a comparison of these two types of MSCs. It is also the first study, to our knowledge, of the role of hypoxia in chondrogenesis from both UCM-MSCs and UCB-MSCs. The potential value of hypoxia for cartilage generation from UCB-MSCs requires clarification through further studies. Our results suggest that UCB-MSCs should be preferred over UCM-MSCs for cartilage generation and highlight the need to take intersource variability into account for tissue engineering for therapeutic purposes in both humans and horses. Our findings provide important new information that must be taken into account to improve the personalization of cell and tissue therapies based on MSCs.

## **5. Materials and methods.**

### **a. Equine mesenchymal stem cell samples.**

Equine UCM-MSCs, UCB-MSCs, AD-MSCs and BM-MSCs were isolated between passages 1 and 3 (P1-P3), cryopreserved and provided by VETBIOBANK. Parasitology analysis and surface-marker immunophenotyping (CD-105, CD-90, CD-44, MHC-1, MHC-2, CD-45 and CD-29) by flow cytometry were also performed by VETBIOBANK.

### **b. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood.**

Reagents used for cell expansion were purchased from Pan-Biotech unless stated otherwise. Equine UCB samples were collected in tubes containing citrate phosphate dextrose anticoagulant, immediately after foaling (Alcyon). Within 72 hours of their collection, UCB samples were diluted 1:1 in phosphate-buffered saline (DPBS) (PAN Biotech) and carefully overlaid onto Pancoll solution (1.077 g/ml). They were subjected to gradient density centrifugation at 400 x *g* for 30 min at room temperature. The mononuclear cell phase was collected and washed with DPBS. Cells were counted and seeded at the density of 2.5x10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> in low glucose-Dulbecco's modified Eagle Medium (LG-DMEM) containing 10% of fetal bovine serum (FBS) (Hyclone), 2.5 ng/ml of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) (R&D Biosystem), 1% glutamine and 1% penicillin-streptomycin, and incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The culture flasks were then incubated at 37°C, under an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Non-adherent cells were removed 48 h after initial plating and the medium was changed twice weekly until adherent cells appeared. Adherent cells were detached by trypsin/EDTA (PAN Biotech) treatment and were used to reseed (3,000 cells/cm<sup>2</sup>) culture dishes. We used nine different cell isolates for the experiments.

### c. Isolation of equine umbilical cord mesenchymal stem cell from Wharton jelly.

Umbilical cords were recovered from selected mares belonging to French National Studs (IFCE, Saumur, France) following parturition, in accordance with standard veterinary practice. UC samples were transported under appropriate refrigerated condition in a dedicated container with D-PBS solution supplemented with penicillin/streptomycin/fungizone. Tissues were dissected into the laboratory within 5 days after foaling. UC samples were extensively washed with D-PBS. MSC were isolated from Wharton's jelly tissue and cultured following the laboratory standard procedures. Briefly, tissue was mechanically and enzymatically treated with collagenase type I (Sigma-Aldrich). Cells were filtered through a 100 µM mesh nylon membrane and plated in proliferation medium as previously described. We used eight different cell isolates for the experiments.

### d. Culture of equine UCM-MSCs and UCB-MSCs.

MSCs were cultured in amplification medium consisting of LG-DMEM, 10% FBS, 1% glutamine and 2% PSF, at 37°C, under an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Cells were treated with trypsin, at subconfluence for UCB-MSCs and at 70% confluence for UCM-MSCs, to prevent the formation of spheroids. They were counted and their viability was evaluated by trypan blue (Sigma-Aldrich) staining. Viable cells were used to seed culture dishes at a density of 3,000-5,000 cells/cm<sup>2</sup>. UCB-MSCs did not adhere well. They were therefore treated with FGF-2 (10 ng/ml) during the first 48-72 h of each passage in culture dishes.

### e. Cryopreservation of MSCs.

MSCs were banked between P1 and P3. After counting with trypan blue, cells were centrifuged and suspended in cryopreservation medium (6 to 24 x 10<sup>6</sup> cells/ml) consisting of LG-DMEM, 10% FBS, 1% glutamine, 2% PSF and 10% dimethyl-sulfoxide (Sigma-Aldrich). We then placed 2 ml of the cell suspension in a cryotube for freezing in CoolCell Cell Freezing Containers (Biocision) and storage in liquid nitrogen.

### f. Evaluation of the growth rate of MSCs.

MSCs were used to seed cultures at a density of 3,000 cells/cm<sup>2</sup>, with amplification over 15 passages when possible. For each passage, at 70% confluence, the cells were treated with trypsin and their viability was assessed by trypan blue staining and counting. The equations described by Martin Clynes were used for doubling time determination (Clynes *et al.*, 1996)<sup>67</sup> : time between two passages (h) ; N<sub>0</sub>: initial number of cells; N<sub>t</sub>: cell number at harvesting; n: number of cells generated during ; k: generation in time units; g: doubling time (h).

$$k = \frac{n}{\Delta t} = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2 \times \Delta t}$$

$$g = \frac{1}{k}$$

### g. IFN-γ treatment.

MSCs were cultured to subconfluence between P3 and P5, in amplification culture medium. For cytokine treatment, we used IFN- at a concentration of 50 ng/ml for 72 h. The cells were then washed with DPBS, treated with trypsin and counted. Treated and untreated cells were used for RNA analysis and flow cytometry experiments.

## **h. Flow cytometry.**

MSCs at P2 to P4 were harvested, washed and resuspended in DPBS-sodium azide buffer (0.1%) at a density of  $1 \times 10^6$  cells/ml. Cells were incubated with monoclonal antibodies, for 25 min at 4°C in a dark room. Monoclonal antibodies against the following proteins were used: CD-105, CD-90, CD-44, MHC-1, MHC-2, CD-45 and CD-29 (with mouse anti-human CD90-PE, mouse anti-human CD44-APC, mouse anti-human CD29-PE (all three purchased from BioLegend), mouse anti-horse MHC1-FITC, mouse anti-horse MHC2-FITC, mouse anti-human CD105-PE and mouse anti-human CD45-FITC (all four purchased from ABD Serotec)). Negative control staining was performed with the corresponding conjugated isotype antibodies. The cells were washed and resuspended in 300  $\mu$ l DPBS-azide. Flow cytometry was performed with a BD ACCURI C6 cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJO software (TreeStar).

## **i. Evaluation of MSC multipotency.**

We evaluated the chondrogenic, osteogenic and adipogenic differentiation of MSCs from P4 to P6, by specific staining in six-well plates.

Chondrogenesis was induced at 70% confluence. MSCs were cultured in differentiation medium consisting of incomplete chondrogenic medium (ICM: HG-DMEM Glutamax (Thermo Fisher), dexamethasone ( $1 \times 10^{-7}$  M, Sigma-Aldrich), ascorbic acid-2-phosphate (50  $\mu$ g/ml, Sigma-Aldrich), proline (40  $\mu$ g/ml, Sigma-Aldrich), sodium pyruvate (1 nM, Thermo Fisher), insulin transferin selenium (1 %, Thermo Fisher)) supplemented with BMP-2 (50 ng/ml, rhBMP-2, inductOs, Wyeth Europa Ltd) and TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml, Miltenyi Biotec). The chondrogenic differentiation medium was changed twice weekly during the 21-day incubation period.

Osteogenesis was induced at 70% confluence. MSCs were cultured in osteogenic medium consisting of MSC amplification medium supplemented with dexamethasone ( $1 \times 10^{-7}$  M), ascorbic acid-2-phosphate (100 ng/ml),  $\beta$ -glycerophosphate (10 mM). The osteogenic medium was changed once weekly during the 21-day incubation period.

Adipogenesis was induced at 50% confluence. MSCs were cultured in adipogenic medium consisting of LG-DMEM, 1% glutamine, 2% PSF supplemented with 10% rabbit serum (Sigma-Aldrich), dexamethasone ( $1 \times 10^{-6}$  M, Sigma-Aldrich), 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (0.5 mM), indomethacin (0.2 mM) and recombinant human insulin (10  $\mu$ g/ml). The medium was replaced three times during the first two weeks and the incubation was prolonged for seven more days. After 17-21 days of incubation, lipid droplet accumulation became visible.

For each differentiation, MSCs cultured in amplification medium were used as negative controls.

At the end of the incubation period, cells were washed twice with DPBS, fixed with 10% formalin neutral buffer (Sigma-Aldrich) for 10 min at room temperature and then washed again with DPBS. Chondrogenesis was evaluated by staining with 1% Alcian blue 1% in 1 M chlorhydric acid 1M (pH= 1) (Sigma-Aldrich). Osteogenesis was assessed by Alizarin red S (pH= 4.1) staining (Sigma-Aldrich) and adipogenesis was evaluated by staining with 0.3% oil red O in isopropanol (Sigma-Aldrich). Images were acquired with a confocal phase-contrast microscope.

## **j. Chondrogenic differentiation on a 3D scaffold.**

Collagen scaffolds were manufactured by Symatèse Biomatériaux (Chaponost, France) and used for chondrogenic differentiation. These collagen sponges (100% collagen, 2 mm thick, 5 mm in diameter, corresponding to a volume of 0.04 cm<sup>3</sup>, with a pore size of about 100  $\mu$ m) consisted of native type I (90–95%) and type III (5–10%) collagens from calf skin. Collagen fibers were crosslinked with glutaraldehyde to increase their stability, sterilized by  $\beta$ -irradiation and they displayed no swelling on rehydration.

After MSC amplification, P3-P6 cells were treated with trypsin, stained with trypan blue, counted and included in collagen scaffolds. The collagen sponges were seeded with cells by dropping 20  $\mu$ l of the cell suspension onto the scaffold ( $5 \times 10^5$  cells/scaffold) in 96-well culture plates, drying for 1 h at 37°C under an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> and then transferring the cells to ICM or ICM supplemented with 50 ng/ml BMP-2 and 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 in 24-well plates,. For cultures in hypoxic conditions, ICM was pre-equilibrated at 3% O<sub>2</sub> by bubbling before the transfer of culture dishes into hypoxic Plas-Labs basic multistation glove box (Sigma-Aldrich) containing 2-4% O<sub>2</sub> at 37°C, under an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. MSCs were allowed to differentiate into chondrocytes for 7, 14, 21 or 28 days and were then harvested for RNA, protein and histochemical analyses. MSCs incubated for 1 h in collagen type I/III scaffolds at 37°C were used as day 0 controls for these experiments.

#### **k. RNA analysis.**

Total RNA was extracted in Trizol Reagent (ThermoFisher) according to the manufacturer's instructions. We reverse-transcribed RNA to generate cDNA, using reverse transcriptase (MMLV, Thermo Fisher) and oligodT (Eurogentec). RT-qPCR was performed on a StepOnePlus Real-Time system (Thermo Fisher) by Power SYBR Green PCR (Thermo Fisher). The sequences of the primers used are listed in **Supplemental table II**. They were purchased from Eurogentec. The  $\beta$ -actin gene (*Actb*) was used as an endogenous reference gene. Relative mRNA levels were determined with StepOnePlus software (Thermo Fisher), by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method or the standard curve method, depending on the efficiency of amplification for *Actb* amplification and each target gene. The results are expressed as the mean for triplicate samples (Schmittgen *et al.*, 2008)<sup>68</sup>.

#### **l. Protein extraction and western-blots.**

After treatment, the scaffolds containing the cells were rinsed once with ice-cold DPBS (PAN- Biotech), frozen, crushed and total protein was extracted in RIPA lysis buffer supplemented with protease inhibitors. Protein concentration was assessed with the Bradford colorimetric assay (Bio-Rad). We separated 2.5-15  $\mu$ g of total protein by electrophoresis in 10% polyacrylamide gels (Bio-Rad) in denaturing conditions and transferred the bands obtained onto a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) (Biorad) with the Trans-Blot Turbo Transfer System (Biorad). Non-specific binding sites on the membrane were blocked by incubation with 10% non-fat milk powder in Tris-buffered saline supplemented with 0.1% Tween for 2 h. Membranes were incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-human type I collagen (Novotec), rabbit anti-human type II collagen (Novotec), rabbit anti-human type IIB collagen (Covalab), rabbit anti-human type X collagen (Abcam), rabbit anti-human HTRA1 (Millipore), rabbit anti-human  $\beta$ -tubulin (Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-human SOX9 (Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-human RUNX2 (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-human OSTC (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-human GAPDH (Santa Cruz Biotechnology) or rabbit anti-human  $\beta$ -tubulin (Santa Cruz Biotechnology) antibodies. The next day, the membranes were washed three times, and incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG antibody (Jackson ImmunoResearch). Signals were visualized by the chemiluminescence method (Clarity ECL, Biorad) and analyzed on the ChemiDoc Touch Imaging system with Image Lab Touch software (Biorad).

#### **m. Histochemical analysis.**

After 28 days of chondrogenic differentiation in 3D scaffold model, MSCs were harvested, washed twice in PBS, fixed by incubation in 10% formalin neutral buffer for 8 h at room temperature and embedded in paraffin. The paraffin blocks were cut into 4  $\mu$ m-thick sections. The paraffin was removed by incubation in toluene and the sections were rehydrated by passage through a series of alcohol solutions of decreasing concentration. For Alcian blue staining, deparaffined sections were rinsed in 3% acetic acid, stained with an Alcian blue/3% acetic acid solution (pH = 2.5) (Sigma-Aldrich) and counterstained with Nuclear Fast Red solution (Sigma-Aldrich). For the analysis of ECM calcification, deparaffinized sections were stained with Alizarin

Red S solution (pH= 4.1) (Sigma-Aldrich). Sulfated proteoglycans were detected by counterstaining deparaffinized sections with 0.01% Fast Green solution (Sigma-Aldrich) and then incubating in 0.1 Safranin-O solution (Sigma-Aldrich) before washing in absolute ethanol. Stained deparaffinized sections were dehydrated by passage through a series of alcohol solutions of graded concentrations, cleared in toluene and mounted.

#### **n. Statistical analysis.**

All experiments were replicated with cells samples from different specimens. Values are reported as means  $\pm$  SD or box plots. Statistical analyses were performed with the Mann-Whitney U-test to assess the significance of differences between the two groups. All statistical analyses were performed with Prism v6 (Graphpad). *P*-values  $\leq 0.05$  was considered to be significant.

#### **o. Statistical analysis.**

All experiments were replicated with cells samples from different specimens. Values are reported as means  $\pm$  SD or box plots. Statistical analyses were performed with the Mann-Whitney U-test to assess the significance of differences between the two groups. All statistical analyses were performed with Prism v6 (Graphpad). *P*-values  $\leq 0.05$  was considered to be significant.

### **Acknowledgements**

We are grateful to Marie-Christine Enos for her administrative and technical support.

### **Role of the funding sources**

This research was funded by the French ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) and VETBIOBANK, to PG and SM (917CB170); the Fonds Eperon to PG and MD (EQUISTEM, N80-2014, 917CB194); an ERDF (European Regional Development Funds) and Regional Council of Basse-Normandie grant to PG and MD in the CPER Centaure grant (2015-2020, Centaure Biotechnologies 2015 N° 917CB213 & Centaure PREACH 2016-17). These funding sources had no involvement in the study design, collection, analysis, or in interpretation of the data, in the writing of the manuscript, or in the decision to submit the manuscript for publication.

RR is a recipient from the French ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) and VETBIOBANK, a CIFRE fellowship.

### **Authors' contributions**

RR was implicated in the study design, in data collection/assembly and analysis, performed experiments, and in the writing of the manuscript. BB, and NS performed experiments, collected data, and analyzed the data. RR, and NS were involved in collecting MSCs. PG, NS, and SM were involved in the study conception and design, in supervision of the study, in data analysis, and data interpretation. MD was involved in data analysis. PG, NS, and SM participated in the writing of the manuscript. SM and PG provided financial support. All authors read and approved the final version of the manuscript.

### **Disclosure statement**

The authors declare no conflicts of interest.

## 6. Bibliography

1. Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 726–736.
2. Choudhery, M.S., Badowski, M., Muise, A., Pierce, J., and Harris, D.T. (2014). Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med* 12, 8.
3. Stolzing, A., Jones, E., McGonagle, D., and Scutt, A. (2008). Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech. Ageing Dev.* 129, 163–173.
4. Mareschi, K., Ferrero, I., Rustichelli, D., Aschero, S., Gammaitoni, L., Aglietta, M., Madon, E., and Fagioli, F. (2006). Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J. Cell. Biochem.* 97, 744–754.
5. Mafi, R., Hindocha, S., Mafi, P., Griffin, M., and Khan, W.S. (2011). Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculoskeletal applications - a systematic review of the literature. *Open Orthop J* 5 Suppl 2, 242–248.
6. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., and Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25, 2739–2749.
7. Huang, G.T.J., Gronthos, S., and Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J. Dent. Res.* 88, 792–806.
8. McGuckin, C.P., Forraz, N., Baradez, M.-O., Navran, S., Zhao, J., Urban, R., Tilton, R., and Denner, L. (2005). Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif.* 38, 245–255.
9. Mitchell, K.E., Weiss, M.L., Mitchell, B.M., Martin, P., Davis, D., Morales, L., Helwig, B., Beerensrauch, M., Abou Easa, K., Hildreth, T., et al. (2003). Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 21, 50–60.
10. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., and Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24, 1294–1301.
11. Carlin, R., Davis, D., Weiss, M., Schultz, B., and Troyer, D. (2006). Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4, 8.
12. Nekanti, U., Mohanty, L., Venugopal, P., Balasubramanian, S., Totey, S., and Ta, M. (2010). Optimization and scale-up of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications. *Stem Cell Res* 5, 244–254.
13. Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., Keating, A., International Society for Cellular Therapy (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393–395.
14. Krampera, M., Galipeau, J., Shi, Y., Tarte, K., Sensebé, L., MSC Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT) (2013). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy* 15, 1054–1061.

15. Troyer, D.L., and Weiss, M.L. (2008). Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 26, 591–599.
16. Zhang, X., Hirai, M., Cantero, S., Ciubotariu, R., Dobrila, L., Hirsh, A., Igura, K., Satoh, H., Yokomi, I., Nishimura, T., et al. (2011). Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *J. Cell. Biochem.* 112, 1206–1218.
17. El Omar, R., Beroud, J., Stoltz, J.-F., Menu, P., Velot, E., and Decot, V. (2014). Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Eng Part B Rev* 20, 523–544.
18. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.
19. Bianco, P., Cao, X., Frenette, P.S., Mao, J.J., Robey, P.G., Simmons, P.J., and Wang, C.-Y. (2013). The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat. Med.* 19, 35–42.
20. Pevsner-Fischer, M., Levin, S., and Zipori, D. (2011). The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. *Stem Cell Rev and Rep* 7, 560–568.
21. Russell, K.C., Phinney, D.G., Lacey, M.R., Barrilleaux, B.L., Meyertholen, K.E., and O'Connor, K.C. (2010). In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells* 28, 788–798.
22. Samsonraj, R.M., Rai, B., Sathiyathan, P., Puan, K.J., Röttschke, O., Hui, J.H., Raghunath, M., Stanton, L.W., Nurcombe, V., and Cool, S.M. (2015). Establishing criteria for human mesenchymal stem cell potency. *Stem Cells* 33, 1878–1891.
23. Millard, S.M., and Fisk, N.M. (2013). Mesenchymal stem cells for systemic therapy: shotgun approach or magic bullets? *Bioessays* 35, 173–182.
24. Schnabel, L.V., Fortier, L.A., McIlwraith, C.W., and Nobert, K.M. (2013). Therapeutic use of stem cells in horses: which type, how, and when? *Vet. J.* 197, 570–577.
25. Ringe, J., Burmester, G.R., and Sitterling, M. (2012). Regenerative medicine in rheumatic disease—progress in tissue engineering. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 493–498.
26. Makris, E.A., Gomoll, A.H., Malizos, K.N., Hu, J.C., and Athanasiou, K.A. (2015). Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat. Rev. Rheumatol.* 11, 21–34.
27. Demoor, M., Ollitrault, D., Gomez-Leduc, T., Bouyoucef, M., Hervieu, M., Fabre, H., Lafont, J., Denoix, J.-M., Audigié, F., Mallein-Gerin, F., et al. (2014). Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 2414–2440.
28. Yang, L., Tsang, K.Y., Tang, H.C., Chan, D., and Cheah, K.S.E. (2014). Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 12097–12102.
29. Ghone, N.V., and Grayson, W.L. (2012). Recapitulation of mesenchymal condensation enhances in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* 227, 3701–3708.

30. Handorf, A.M., and Li, W.-J. (2014). Induction of mesenchymal stem cell chondrogenesis through sequential administration of growth factors within specific temporal windows. *J. Cell. Physiol.* *229*, 162–171.
31. Lee, H.-H., Chang, C.-C., Shieh, M.-J., Wang, J.-P., Chen, Y.-T., Young, T.-H., and Hung, S.-C. (2013). Hypoxia enhances chondrogenesis and prevents terminal differentiation through PI3K/Akt/FoxO dependent anti-apoptotic effect. *Sci. Rep.* *3*, 2683.
32. Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G.G., Demiralp, D.Ö., Tukun, A., Uckan, D., and Can, A. (2007). Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells* *25*, 319–331.
33. Reed, S.A., and Johnson, S.E. (2008). Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. *J. Cell. Physiol.* *215*, 329–336.
34. Lee, S., Park, B.-J., Kim, J.Y., Jekarl, D., Choi, H.Y., Lee, S.Y., Kim, M., Kim, Y., and Park, M.-S. (2015). The effect of fibroblast growth factor on distinct differentiation potential of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Cytotherapy* *17*, 1723–1731.
35. Gomez-Leduc, T., Hervieu, M., Legendre, F., Bouyoucef, M., Gruchy, N., Poulain, L., de Vienne, C., Herlicoviez, M., Demoor, M., and Galéra, P. (2016). Chondrogenic commitment of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in collagen matrices for cartilage engineering. *Sci. Rep.* *6*, 32786.
36. Klontzas, M.E., Kenanidis, E.I., Heliotis, M., Tsiroidis, E., and Mantalaris, A. (2015). Bone and cartilage regeneration with the use of umbilical cord mesenchymal stem cells. *Expert Opin Biol Ther* 1–12.
37. Pereira, R.C., Costa-Pinto, A.R., Frias, A.M., Neves, N.M., Azevedo, H.S., and Reis, R.L. (2015). In vitro chondrogenic commitment of human Wharton's jelly stem cells by co-culture with human articular chondrocytes. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*
38. Fong, C.-Y., Subramanian, A., Gauthaman, K., Venugopal, J., Biswas, A., Ramakrishna, S., and Bongso, A. (2011). Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells undergo enhanced chondrogenic differentiation when grown on nanofibrous scaffolds and in a sequential two-stage culture medium environment. *Stem Cell Rev and Rep* *8*, 195–209.
39. Nirmal, R.S., and Nair, P.D. (2013). Significance of soluble growth factors in the chondrogenic response of human umbilical cord matrix stem cells in a porous three dimensional scaffold. *Eur. Cell. Mater.* *26*, 234–251.
40. Tanthaisong, P., Imsoonthornruksa, S., Ngernsoungnern, A., Ngernsoungnern, P., Ketudat-Cairns, M., and Parnpai, R. (2017). Enhanced chondrogenic differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells by GSK-3 inhibitors. *PLoS ONE* *12*, e0168059.
41. Wang, L., Tran, I., Seshareddy, K., Weiss, M.L., and Detamore, M.S. (2009). A comparison of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A* *15*, 2259–2266.
42. Islam, A., Hansen, A.K., Mennan, C., and Martinez-Zubiaurre, I. (2016). Mesenchymal stromal cells from human umbilical cords display poor chondrogenic potential in scaffold-free three dimensional cultures. *Eur. Cell. Mater.* *31*, 407–424.

43. Burk, J., Ribitsch, I., Gittel, C., Juelke, H., Kasper, C., Staszky, C., and Brehm, W. (2013). Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *Vet. J.* *195*, 98–106.
44. Tiaden, A.N., Breiden, M., Mirsaidi, A., Weber, F.A., Bahrenberg, G., Glanz, S., Cinelli, P., Ehrmann, M., and Richards, P.J. (2012). Human serine protease HTRA1 positively regulates osteogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mineralization of differentiating bone-forming cells through the modulation of extracellular matrix protein. *Stem Cells* *30*, 2271–2282.
45. Frisbie, D.D., Bowman, S.M., Colhoun, H.A., DiCarlo, E.F., Kawcak, C.E., and McIlwraith, C.W. (2008). Evaluation of autologous chondrocyte transplantation via a collagen membrane in equine articular defects: results at 12 and 18 months. *Osteoarthr. Cartil.* *16*, 667–679.
46. Nekanti, U., Rao, V.B., Bahirvani, A.G., Jan, M., Totey, S., and Ta, M. (2010). Long-term expansion and pluripotent marker array analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* *19*, 117–130.
47. Guillot, P.V., Gotherstrom, C., Chan, J., Kurata, H., and Fisk, N.M. (2007). Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem Cells* *25*, 646–654.
48. Wang, Y., Chen, X., Cao, W., and Shi, Y. (2014). Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat. Immunol.* *15*, 1009–1016.
49. Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., et al. (2006). Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* *24*, 386–398.
50. Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C., and Shi, Y. (2008). Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* *2*, 141–150.
51. Karagianni, M., Brinkmann, I., Kinzebach, S. & Grassl, M. A comparative analysis of the adipogenic potential in human mesenchymal stromal cells from cord blood and other sources. *Cytotherapy* (2013). doi:10.1016/j.jcyt.2012.11.001
52. Bailey, M.M., Wang, L., Bode, C.J., Mitchell, K.E., and Detamore, M.S. (2007). A comparison of human umbilical cord matrix stem cells and temporomandibular joint condylar chondrocytes for tissue engineering temporomandibular joint condylar cartilage. *Tissue Eng.* *13*, 2003–2010.
53. Beeravolu, N., Khan, I., McKee, C., Dinda, S., Thibodeau, B., Wilson, G., Perez-Cruet, M., Bahado-Singh, R., and Chaudhry, G.R. (2016). Isolation and comparative analysis of potential stem/progenitor cells from different regions of human umbilical cord. *Stem Cell Res* *16*, 696–711.
54. Galera, P. et al. (2012), Method for obtaining differentiated articular chondrocytes in vitro or ex vivo, and uses of same. WO Patent 2012038668 A1, <https://www.google.com/patents/WO2012038668A1?cl=en>.
55. Legendre, F., Ollitrault, D., Gomez-Leduc, T., Bouyoucef, Hervieu, M., Gruchy, N., Mallein-Gerin, F., Leclercq, S., Demoor, M., Galéra, P., (2017). Enhanced chondrogenesis of bone marrow-derived stem cells by using a combinatory cell therapy strategy with BMP-2/TGF- $\beta$ 1, hypoxia, and COL1A1/Htra1 siRNAs. *Sci. Rep.* (in press).

56. Cao, B., Li, Z., Peng, R., and Ding, J. (2015). Effects of cell-cell contact and oxygen tension on chondrogenic differentiation of stem cells. *Biomaterials* *64*, 21–32.
57. Suzuki, S., Muneta, T., Tsuji, K., Ichinose, S., Makino, H., Umezawa, A., and Sekiya, I. (2012). Properties and usefulness of aggregates of synovial mesenchymal stem cells as a source for cartilage regeneration. *Arthritis Res. Ther.* *14*, R136.
58. Nilsson, S.K., Johnston, H.M., Whitty, G.A., Williams, B., Webb, R.J., Denhardt, D.T., Bertocello, I., Bendall, L.J., Simmons, P.J., and Haylock, D.N. (2005). Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* *106*, 1232–1239.
59. Eames, B.F., Sharpe, P.T., and Helms, J.A. (2004). Hierarchy revealed in the specification of three skeletal fates by Sox9 and Runx2. *Dev. Biol.* *274*, 188–200.
60. Su, X., Zuo, W., Wu, Z., Chen, J., Wu, N., Ma, P., Xia, Z., Jiang, C., Ye, Z., Liu, S., et al. (2015). CD146 as a new marker for an increased chondroprogenitor cell subpopulation in the later stages of osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* *33*, 84–91.
61. Grayson, W.L., Zhao, F., Izadpanah, R., Bunnell, B., and Ma, T. (2006). Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J. Cell. Physiol.* *207*, 331–339.
62. Bigot, N., Mouche, A., Preti, M., Loisel, S., Renoud, M.-L., Le Guével, R., Sensebé, L., Tarte, K., and Pedeux, R. (2015). Hypoxia Differentially Modulates the Genomic Stability of Clinical-Grade ADSCs and BM-MSCs in Long-Term Culture. *Stem Cells* *33*, 3608–3620.
63. Cipolleschi, M.G., Sbarba, Dello, P., and Olivotto, M. (1993). The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* *82*, 2031–2037.
64. Rosová, I., Dao, M., Capoccia, B., Link, D., and Nolte, J.A. (2008). Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* *26*, 2173–2182.
65. Amarilio, R., Viukov, S.V., Sharir, A., Eshkar-Oren, I., Johnson, R.S., and Zelzer, E. (2007). HIF1 $\alpha$  regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis. *Development* *134*, 3917–3928.
66. Rajpurohit, R., Koch, C.J., Tao, Z., Teixeira, C.M., and Shapiro, I.M. (1996). Adaptation of chondrocytes to low oxygen tension: relationship between hypoxia and cellular metabolism. *J. Cell. Physiol.* *168*, 424–432.
67. Clynes, M. (1996) *Basic Cell Culture—A Practical Approach*. Edited by JM Davis. Pp. 301. IRL Press at Oxford University Press.
68. Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* *3*, 1101–1108.

## 7. Figure legends

### Figure legends

#### **Figure 1: UCM-MSCs have a higher proliferation rate than UCB-MSCs .**

(A) Morphological aspect of UCM-MSCs and UCB-MSCs during monolayer cell culture at P3 observed by phase-contrast microscopy (magnification  $\times 10$ ). (B) Recapitulative table of sample numbers used for proliferation potential evaluation. (C) Growth rate of UCB-MSCs, UCM-MSCs and AD-MSCs cultured in amplification medium is represented as cell generation cumulation by time unit (h).

**Figure 2: Gene list of bioactive and regulatory factors involved in immunomodulation and trophic function of MSCs.**

(A) List of genes used for transcriptomic screening of immunomodulatory compartment of MSCs. (B) Protein-protein interaction networks of targets. Representation using STRING v10.0. Blue circle represents chemokines and cytokines node. Pink circle represents co-receptors node and yellow circle trophic factors.

**Figure 3: Trophic factor expression variation during IFN- $\gamma$  sensibilisation of MSCs.**

AD-MSCs (AD), BM-MSCs (BM), UCM-MSCs (UCM) and UCB-MSCs (UCB) cultured in monolayer were treated during 72h by INF- $\gamma$  (IFN). Relative mRNA amounts of bioactive and regulatory factors involved in immunomodulation and trophic function of MSCs were determined by RTqPCR and compared to untreated cells (Ctrl). All results were normalized versus control case of one AD-MSC sample, and presented as the relative expression of each gene. Five independent experiments for each MSCs sources were performed. Statistically significant differences were determined using the Mann Whitney test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Black line represent comparison between MSCs sources in basal condition and gray line represent comparison between treated and untreated cases.

**Figure 4: Relative impact of IFN- $\gamma$  treatment on MSCs gene expression and on MHC-1 and MHC-2 membrane expression.**

(A) Manual classification of expression variation induced by IFN- $\gamma$  treatment were realized according to significant results obtained between treated and untreated cells (positive and negative regulation  $p < 0.05$ ) and repeatability of variation for each independent experiment with respect to MSCs sources (positive and negative regulation trend). (B) UCM-MSCs and UCB-MSCs cultured in monolayers were treated for 72 h by INF- $\gamma$  (IFN) and MHC-1 and MHC-2 expressions were quantified by flow cytometry. Respectively five and six independent experiments for UCM-MSCs and UCB-MSCs were performed. Statistically significant differences were determined using the Mann Whitney test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Black lines represent comparison between MSCs sources in basal conditions and gray lines comparison between treated and untreated samples.

**Figure 5: UCB-MSCs and UCM-MSCs multilineage evaluation.**

UCM-MSCs and UCB-MSCs were induced in adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineage by using specific induction media. ECM mineralization was demonstrated by alizarin red S staining. Lipid droplets in the cytoplasm are highlighted by oil red O staining and sulfated matrix observed during chondrogenesis was evidenced by alcian blue staining. A representative example from seven samples for UCM-MSCs and five samples for UCB-MSCs are shown (magnification:  $\times 10$  and  $\times 20$ ).

**Figure 6: Differential expression of chondrogenic and osteogenic markers for UCM-MSCs and UCB-MSCs after chondrogenic differentiation in type I/III collagen scaffolds.**

UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds and normoxia for 28 days in incomplete chondrogenic medium (ICM) or ICM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) (BT). (A) Macroscopical observation was realized at the end of the incubation period. Relative mRNA amounts encoding chondrogenic markers (B) (*Col2a1*, *Acan* and *Sox9*), hypertrophic markers (D) (*Col10a1* and *Mmp13*) and osteogenic markers (E) (*Col1a1*, *Alpl*, *Spp1*, *Htra1*, *Runx2* and *Bglap*) were determined by RTqPCR. The functional *Col2a1/Col1a1* ratio was presented in C. mRNA extracts obtained from equine articular chondrocytes (eAC) released from cartilage after overnight enzymatic digestion and equine P0 osteoblasts (eO) were used as controls. Monolayer cultured MSCs (2D) were used as undifferentiated cells control. All results for each MSC source were normalized versus untreated MSCs incubated during 1h in type I/III collagen scaffolds at 37°C and presented as the relative expression of each gene. Box-plots represent five independent experiments for each MSCs source. Statistically significant differences

were determined using the Mann-Whitney test. \*: 2D versus other conditions (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001). §: ICM versus other conditions (§p < 0.05, §§p < 0.01, §§§p < 0.001).

**Figure 7: Strong differences between UCM-MSCs and UCB-MSCs in gene expression during chondrogenesis.**

UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds at 21% O<sub>2</sub> during 7, 14, 21 and 28 days in ICM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF-β1 (10 ng/ml). Relative mRNA amounts encoding *Col2a1*, *Acan*, *Sox9*, *Col10a1*, *Mmp13*, *Col1a1*, *Alpl*, *Htra1*, *Spp1*, *Runx2* and *Bglap* were analyzed by RTqPCR. All results for each MSCs source were normalized versus untreated MSCs incubated during 1h in type I/III collagen scaffolds at 37°C and presented as the relative expression of each gene. Dots represent each measurement in five independent experiments for each MSCs source.

**Figure 8: Protein analysis of UCM-MSCs and UCB-MSCs after chondrogenic differentiation.**

UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds in normoxia during 7, 14, 21 and 28 days in ICM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF-β1 (10 ng/ml). Protein extracts were analyzed in western-blot for type II collagen, type I collagen and Htra1. Representative blots of UCM-MSCs (n= 5) (**A**) and UCB-MSCs (n= 3) (**B and C**) are shown. (**C**) 2.5 μg of protein extracts were used for the western-blot of UCB-MSCs samples in order to enhance signal accuracy. Different levels of type II and type I collagen maturation forms are indicated such as type II procollagen (pro), without C- or N- terminal propeptides (Pc/Pn) and the mature doubly cleaved form (mat).

**Figure 9: Histological analysis of the neo-tissue substitute generated by UCM-MSCs and UCB-MSCs after chondrogenic stimulation.**

UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds at 21% O<sub>2</sub> during 28 days in ICM supplemented with or without BMP-2 (50 ng/ml) and TGF-β1 (10 ng/ml). Chondrogenic and/or osteogenic ECM was analyzed by alcian blue, O-safranin and alizarine red S stainings. A representative example from four samples for UCM-MSCs and three samples for UCB-MSCs is shown (magnification: ×10, scale bar: 500 μm).

**Figure 10: Comparison of the osteo-chondrogenic markers expression between UCM-MSCs and UCB-MSCs.**

UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in monolayer to sub-confluence or induced in chondrogenic lineage during 28 days of culture in scaffolds in ICM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF-β1 (10 ng/ml). (**A**) Steady-state levels of mRNA expression in UCB-MSCs and UCM-MSCs were compared in both conditions by RTqPCR. All results were normalized versus undifferentiated sample of one UCM-MSCs sample, and presented as the relative expression of each gene. Box-plots represent five independent experiments and statistically significant differences were determined using the Mann Whitney test by comparison of UCM-MSCs versus UCB-MSCs \*:(\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001). (**B**) Four samples of monolayer cultured MSCs for each MSCs sources (numbers 1 to 4) were compared at protein level by western-blot analysis of types I and II collagens, osteocacin, Sox-9 and Runx-2.

**Figure 11: Effect of hypoxia on chondrogenic differentiation after 28 days of culture in the presence of growth factors.**

UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds at 21% or 3-5% O<sub>2</sub> during 28 days in ICM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF-β1 (10 ng/ml) (BT). The relative mRNA expression was determined by RTqPCR. All results for each MSCs source were normalized versus untreated MSCs incubated during 1 h in type I/III collagen scaffolds and presented as the relative expression of each gene. Box-plots represent five independent experiments for each

MSCs source. Statistically significant differences between normoxia and hypoxia conditions were determined using the Mann Whitney test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

**Figure 12: Differential gene expression modulation under hypoxia during a kinetic culture under BMP-2 and TGF- $\beta$ 1 treatment of UCM-MSCs and UCB-MSCs.**

UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds at 21% or 3-5% O<sub>2</sub> during 7, 14, 21 and 28 days in ICM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml). Relative mRNA expression was determined by RTqPCR. All results for each MSCs source were normalized versus untreated MSCs incubated during 1 h in type I/III collagen scaffolds at 37°C and presented as the relative expression of each gene. Box-plots represent five independent experiments for each MSCs source. Statistically significant differences between normoxia and hypoxia conditions were determined using the Mann Whitney test. \*: Hypoxia versus normoxia at the same time (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). §: Hypoxia versus normoxia at 7 days (§ $p < 0.05$ , §§ $p < 0.01$ , §§§ $p < 0.001$ ).

**Figure 13: Differential gene expression modulation by hypoxia in a kinetic culture of UCB-MSCs cultured without growth factors.**

UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds at 21% or 3-5% O<sub>2</sub> during 7, 14, 21 and 28 days in ICM in absence of growth factors. Relative mRNA expression was determined by RTqPCR. All results for each MSCs source were normalized versus untreated MSCs incubated during 1 h in collagen type I/III scaffolds at 37°C and presented as the relative expression of each gene. Box-plots represent five independent experiments for each MSCs source. Statistically significant differences between normoxia and hypoxia conditions were determined using the Mann Whitney test. \*: Hypoxia versus normoxia at the same time (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). §: Hypoxia versus normoxia at 7 days (§ $p < 0.05$ , §§ $p < 0.01$ , §§§ $p < 0.001$ ).

**Figure 14: Summary of the relative effects of hypoxia on different genes expression : differential time-dependent profile between MSCs sources and upon growth factors treatment.**

UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds at 21% or 3-5% O<sub>2</sub> during 7, 14, 21 and 28 days in ICM with or without BT treatment. Relative mRNA expression was determined by RTqPCR. All results for each MSCs sources were normalized versus untreated MSCs incubated during 1 h in type I/III collagen scaffolds at 37°C and presented as the relative expression of each gene. (A) Manual classification of mRNA expression variation by hypoxia was realized by taking into account only the significant results between hypoxia versus normoxia at the same time of measurement and between hypoxia versus normoxia at 7 days. (B) *Col2a1/Col1a1* ratio (Q-Ratio) was presented for UCB-MSCs cultured in ICM.

**Figure 15: Histological analysis of the tissue substitute obtained from UCM-MSCs and UCB-MSCs after chondrogenesis induction.**

UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds at 21% or 3-5% O<sub>2</sub> during 28 days in ICM complemented with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml). The qualitative nature of the ECM was evaluated by alcian blue, O-safranin and alizarine red S stainings. A representative example from four samples for UCM-MSCs and three samples for UCB-MSCs are shown (magnification:  $\times 10$ , scale bar: 500  $\mu$ m).

**Figure 16: Hypoxia influence on the nature of the matrix newly synthesized by UCB-MSCs under BT treatment.**

UCB-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds at 21% or 3-5% O<sub>2</sub> during 7, 14, 21 and 28 days in ICM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml). Protein extracts were analyzed in western-blot for type II and type I collagens. Representative blots of UCB-MSMs (n=

3) are shown. 2.5  $\mu\text{g}$  of protein extracts were used for SDS-PAGE of UCB-MSCs samples to improve signal accuracy. Different levels of type II and type I collagen maturation forms are indicated such as type II procollagen (pro), with only C- or N- terminal propeptides (Pc/Pn) and the mature doubly cleaved form (mat).

## **8. Supplementary information**

### **Supplemental figure 1: Effect of different growth factors and chondrogenic culture conditions screening on chondrogenesis induction in UCM-MSCs.**

UCM-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds at 21% or 3-5%  $\text{O}_2$  during 14 days in various chondrogenic media and growth factors presented in Supp. table I. Relative mRNA amounts encoding *Col2a1* and *Sox9* were analyzed by RTqPCR and shown. mRNA extracts obtained from equine articular chondrocytes (eAC) released from cartilage after overnight enzymatic digestion and equine P0 osteoblasts (O) are used as controls. Monolayer cultured MSCs were used as a control for the undifferentiated status. All results for each MSC source were normalized versus untreated MSCs incubated during 1h in type I/III collagen scaffolds at 37°C and presented as the relative expression of each gene. A representative experiment of two independent experiments is presented.

### **Supplemental figure 2: Comparison of ICM and BT treatments on UCM-MSCs and UCB-MSCs.**

UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in type I/III scaffolds collagen at 21%  $\text{O}_2$  during 7, 14, 21 and 28 days in ICM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml). Protein extracts were analyzed in western-blot for type II and type I collagen. Representative blots of UCM-MSCs (n= 5) and UCB-MSMs (n= 3) are shown. Different levels of type II and type I collagen maturation forms are indicated such as type II procollagen (pro), without C- or N- terminal propeptides (Pc/Pn) and the mature doubly cleaved form (mat).

### **Supplemental figure 3: Analysis of type X collagen expression in UCM-MSCs and UCB-MSCs protein extracts.**

UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds at 21%  $\text{O}_2$  during 7, 14, 21 and 28 days in ICM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml). Protein extracts were analyzed in western-blot for type X collagen. Representative blots of UCM-MSCs (n= 5) and UCB-MSMs (n=3) are shown. Two forms of type X collagen should be observed corresponding to the long form (66 kDa) and signal peptide clived form (64 kDa).

### **Supplemental figure 4: Effect of hypoxia on matrix synthesis by UCM-MSCs under growth factors treatment.**

UCM-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds at 21% or 3-5%  $\text{O}_2$  during 7, 14, 21 and 28 days in ICM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml). Protein extracts were analyzed in western-blot for types II, I and X collagens and Htra1. Representative blots of UCM-MSMs (n= 5) are shown. Different levels of type II and type I collagen maturation forms are indicated such as type II procollagen (pro), with only C- or N- terminal propeptides (Pc/Pn) and the mature doubly cleaved form (mat).

### **Supplemental figure 5: Trophic factors expression profiles of MSCs before and after IFN- $\gamma$ sensitization.**

AD-MSCs, BM-MSCs, UCM-MSCs and UCB-MSCs cultured in monolayer were treated during 72 h by IFN- $\gamma$  (IFN). Relative mRNA amounts of bioactive and regulatory factors involved in immunomodulation and trophic fonction of MSCs were analyzed by RTqPCR and compared to untreated cells (Ctrl). All results were normalized versus control sample of one AD-MSc sample, and presented as the relative expression of each gene. Five independent experiments for each MSCs sources were performed. A representative profile obtained for each MSCs sources is shown.

**Supplemental figure 6: Neonatal MSCs and redifferentiated equine articular chondrocyte comparison for neo-cartilage substitute generation.**

UCM-MSCs and UCB-MSCs induced in chondrogenic lineage during 7 days were compared with equine articular chondrocytes redifferentiated by 3D-hypoxia cell culture under BMP-2 (50 ng/ml) treatment during 7 days. Protein extracts were analyzed in western-blot for type II collagen, type I collagen, and Sox-9. Two representative blots of three independent experiments are shown. Different levels of type II and type I collagen maturation forms are indicated such as type II procollagen (pro), without C- or N- terminal propeptides (Pc/Pn) and the mature doubly cleaved form (mat).

**Supplemental figure 7: UCM-MSCs and UCB-MSCs chondrogenic differentiation in a hanging-drop cell culture model.**

UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in a hanging-drop model during 14 days in amplification medium (Ctrl) or in ICM with or without BT treatment. Relative mRNA amounts encoding *Col2a1*, *Acan* and *Sox9* were determined by RTqPCR and shown. All results for each MSCs source were normalized versus a 24 h hanging drop culture before treatment (D0) and presented as the relative expression of each gene. A representative experiment of two independent experiments is presented.

**Supplemental figure 8: Histochemistry of UCM-MSCs and UCB-MSCs chondrogenic differentiation in a micro-pellet cell culture model.**

UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured as micro-pellets during 28 days in amplification medium (Ctrl) or in ICM with or without BT treatment. The quality of the ECM synthesized was evaluated by alcian blue and O-safranin. A representative example of two independent experiments is shown (magnification:  $\times 20$ , scale bar: 100  $\mu\text{m}$ ).

**Supplemental table I: lists of the growth factors concentrations and chondrogenic conditions used for the screening.**

**Supplemental table II: Primers used in RT-qPCR analysis.**

(A) Chondrogenesis and osteogenesis analyses. (B) Immunomodulation analysis.

## 9. Figures

Figure 1

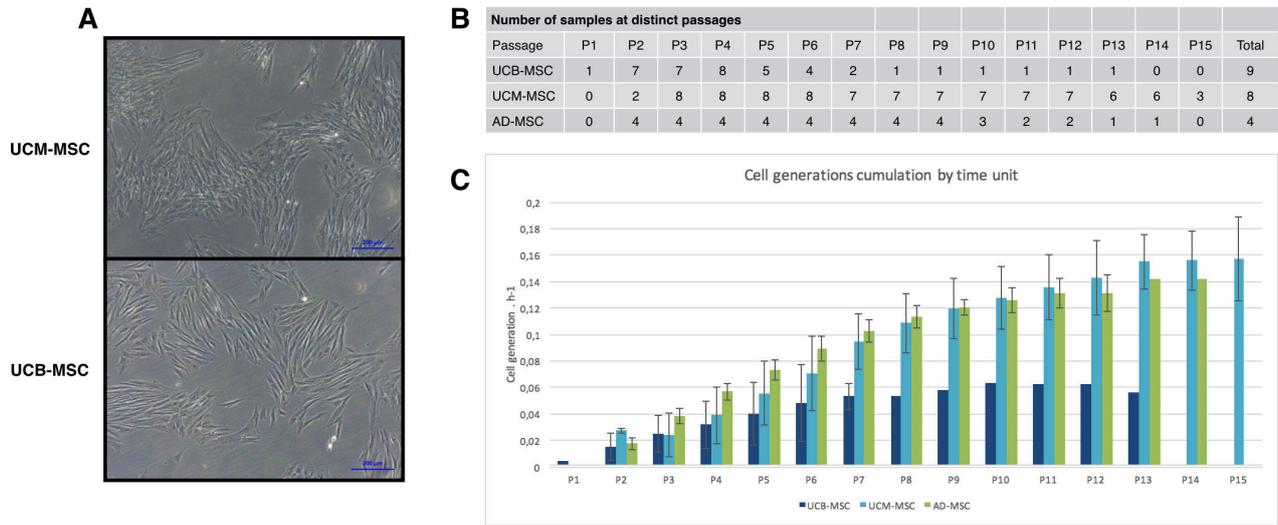


Figure 2

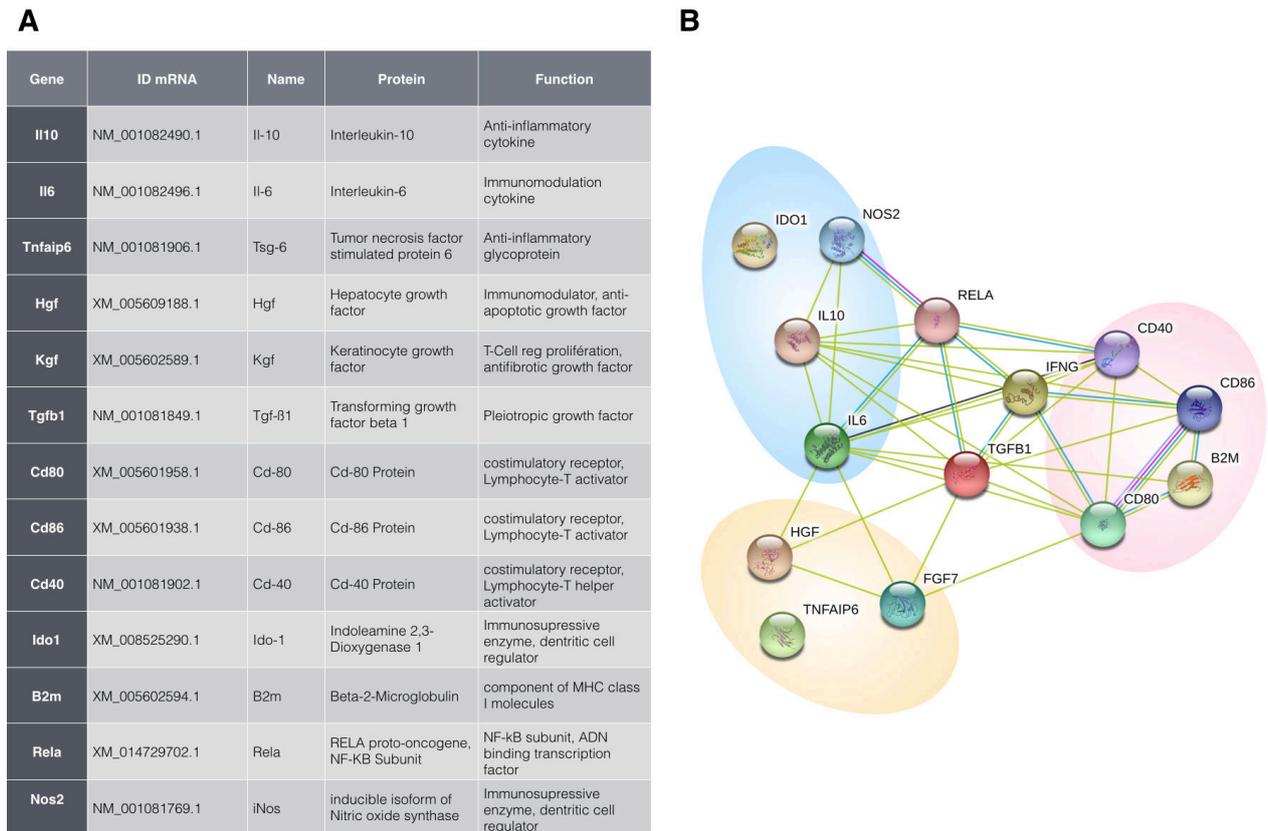
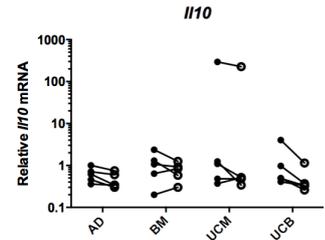
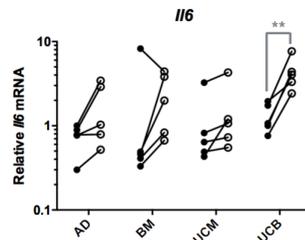
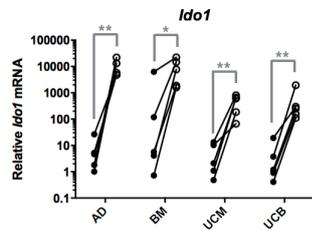
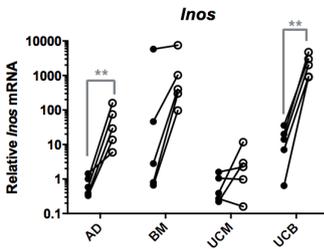
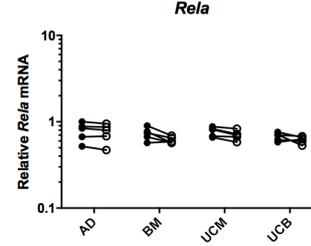
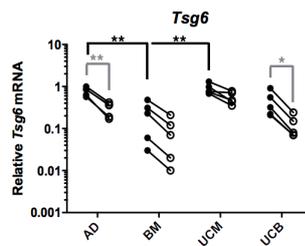
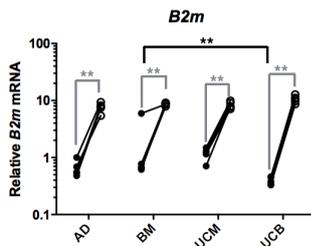


Figure 3

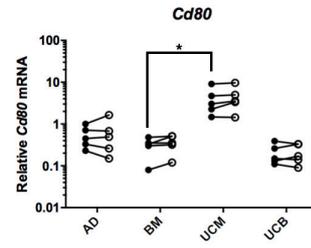
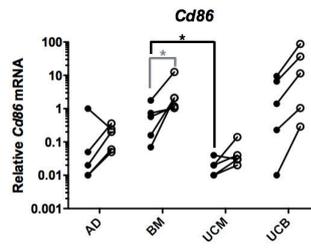
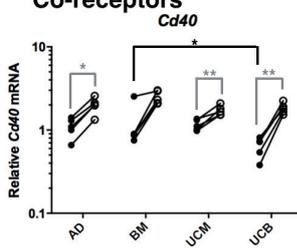
Immunomodulatory effectors



● Ctrl  
○ IFN



Co-receptors



Growth factors

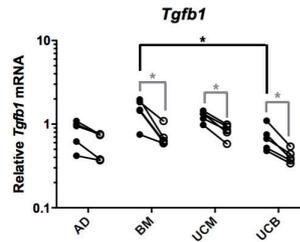
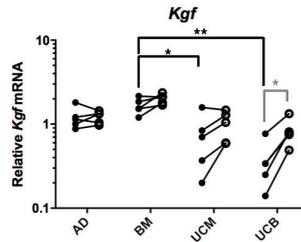
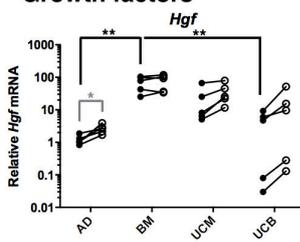


Figure 4

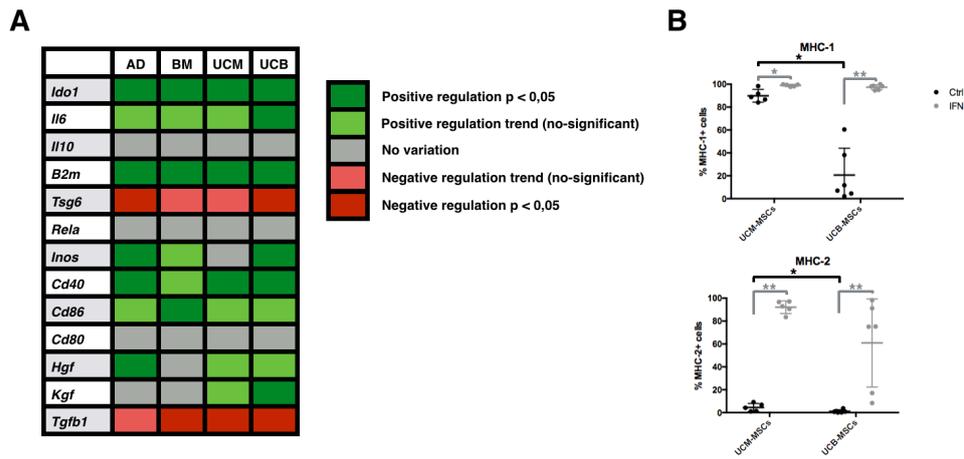


Figure 5

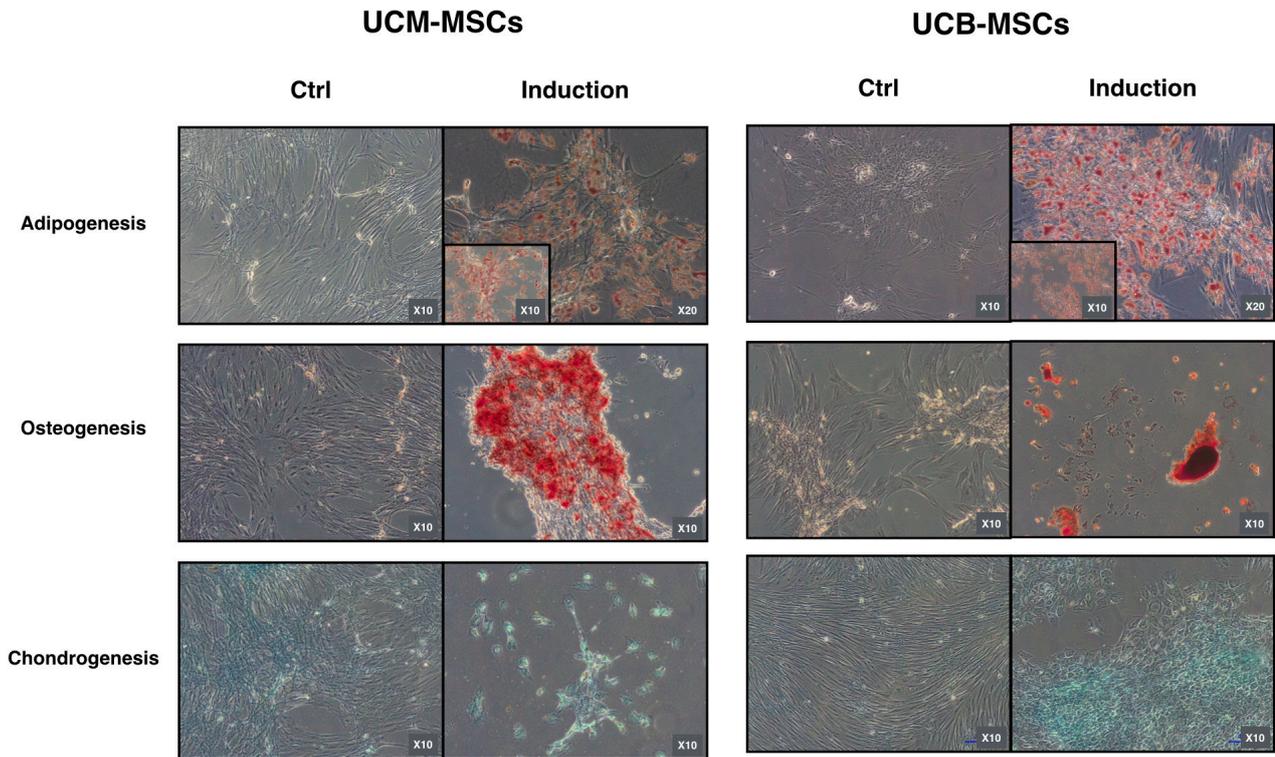


Figure 6

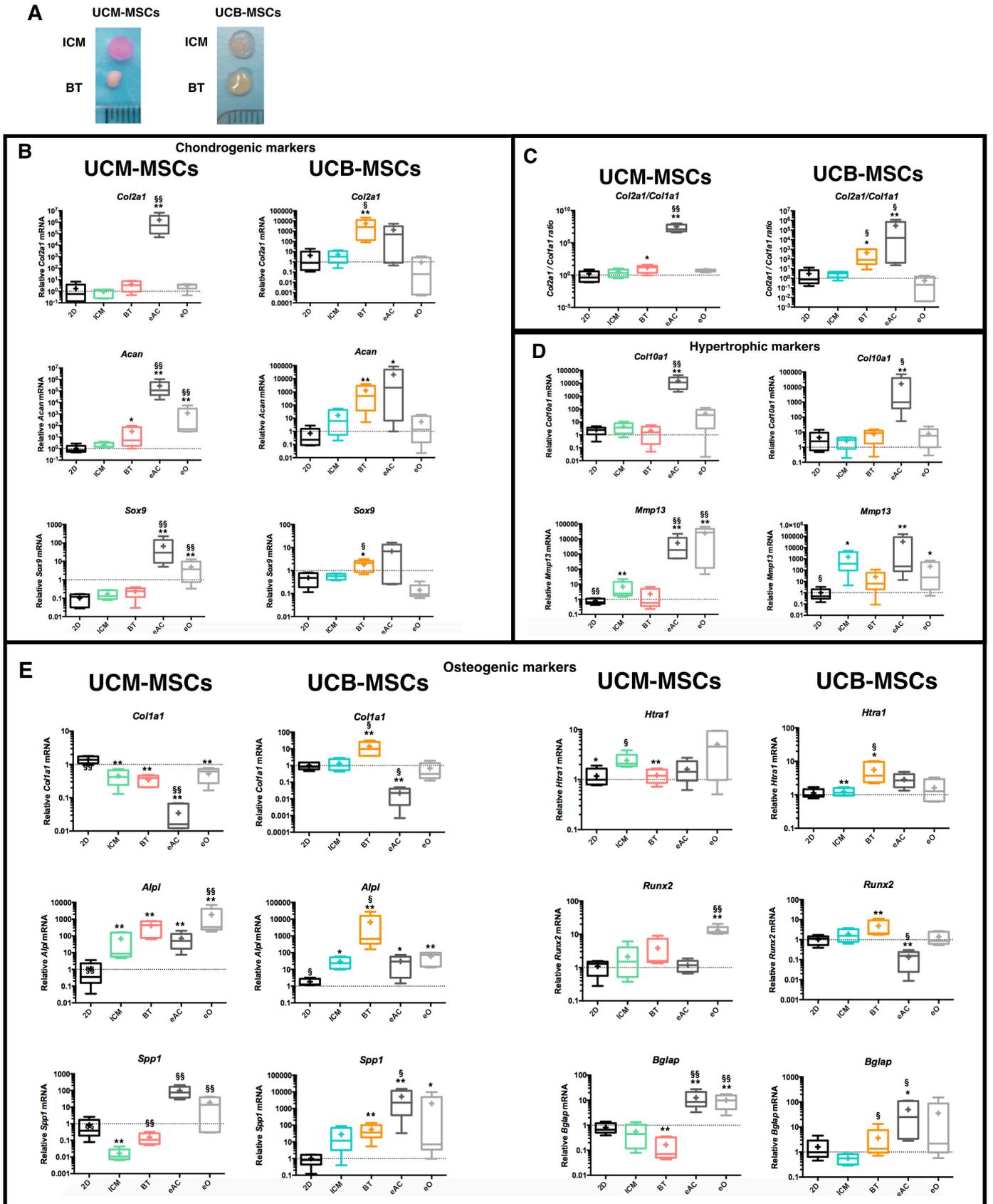
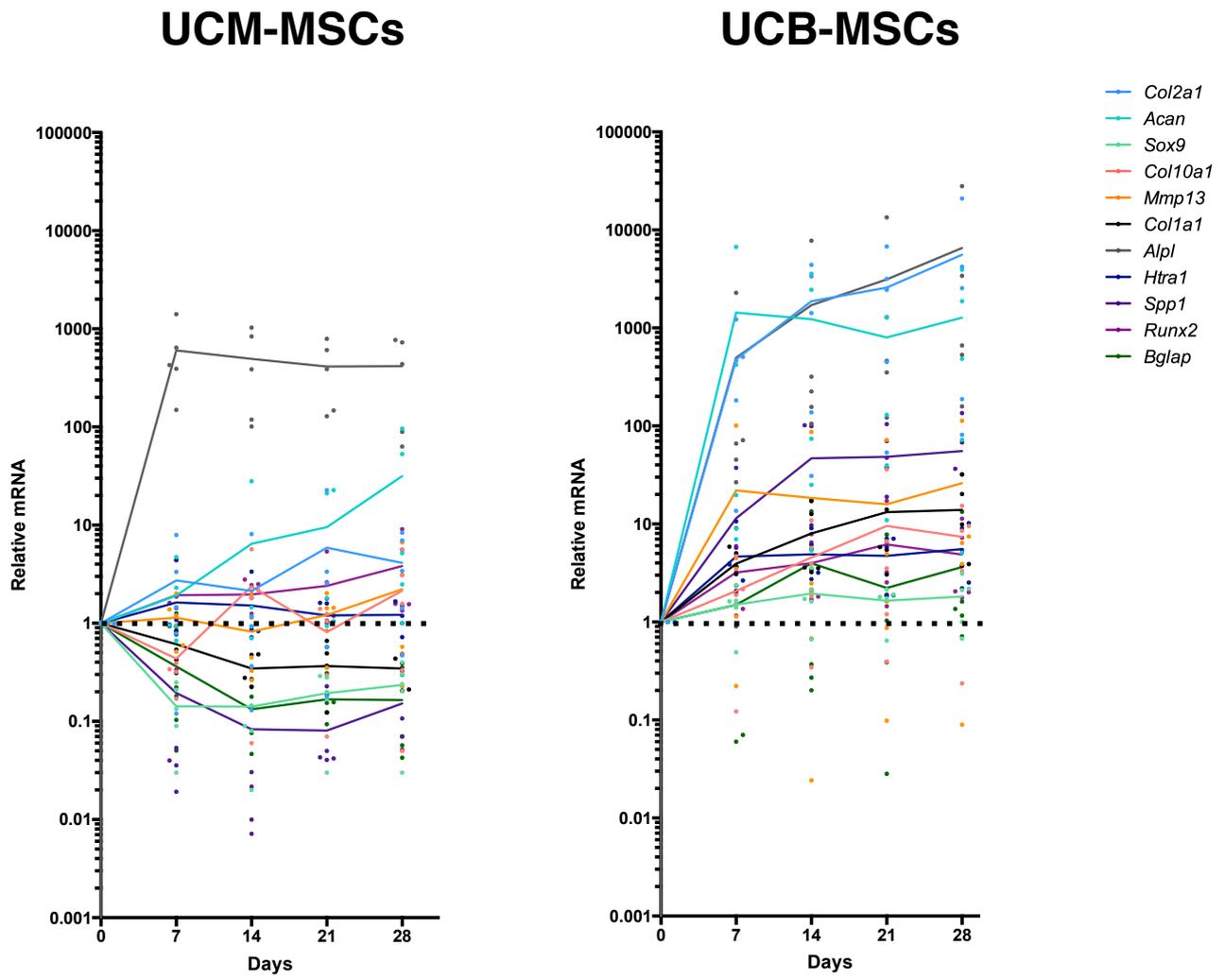


Figure 7



**Figure 8**

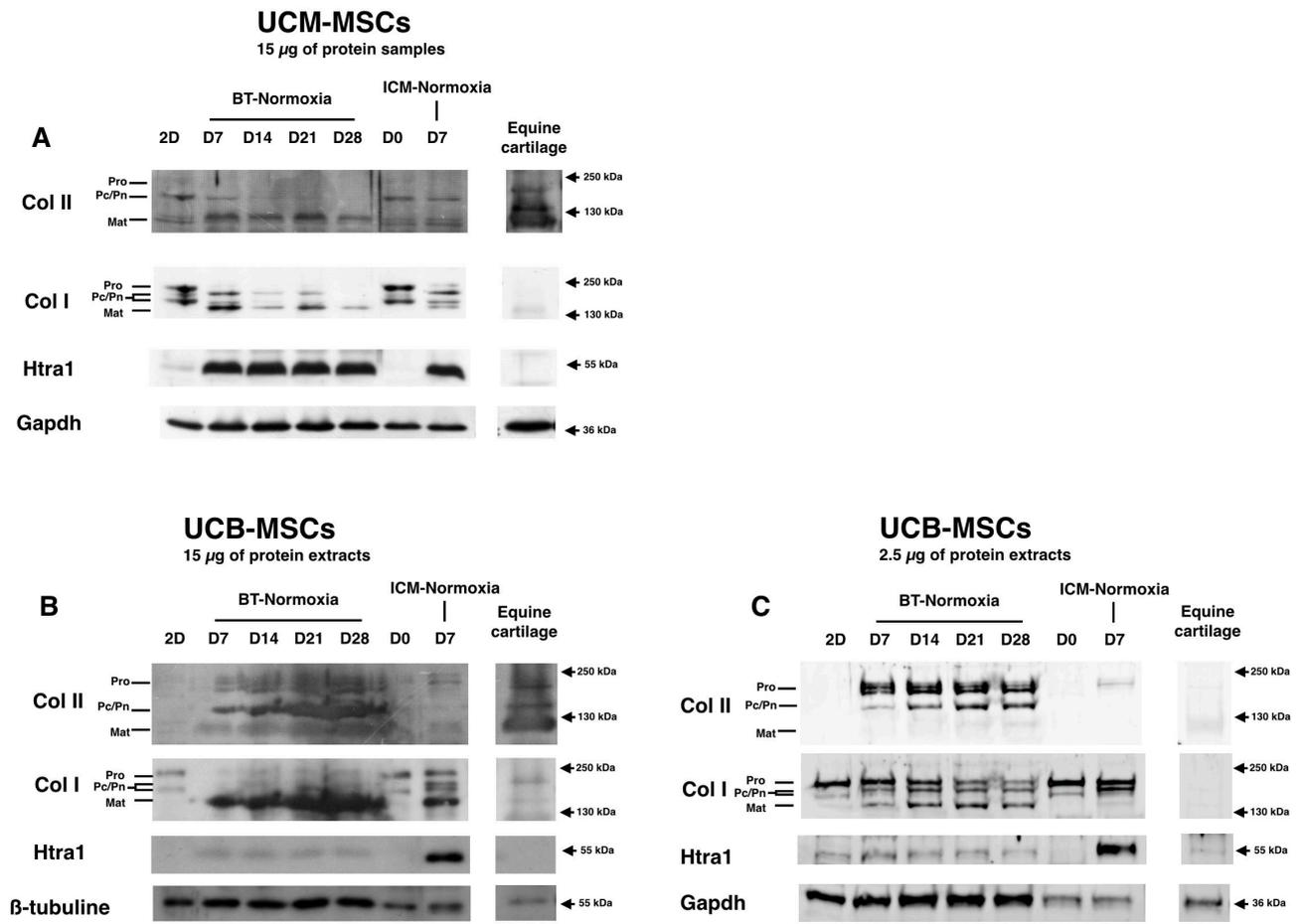


Figure 9

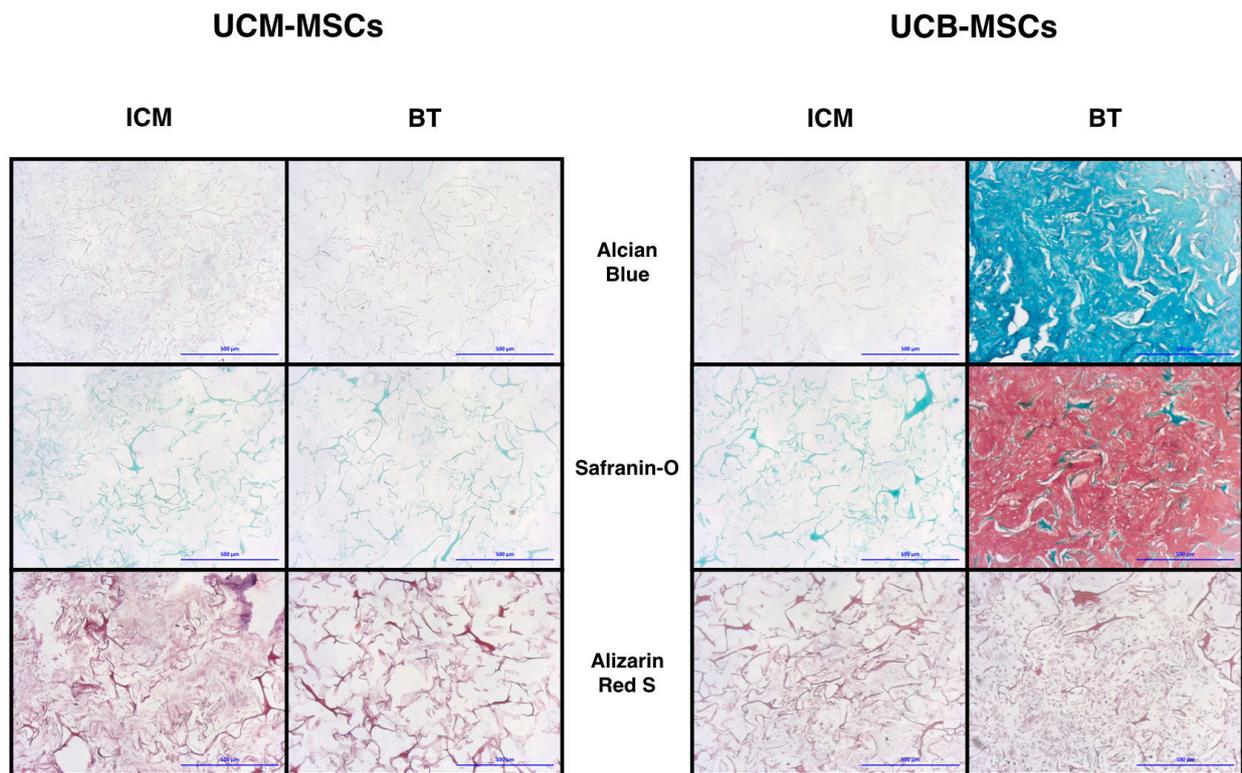


Figure 10

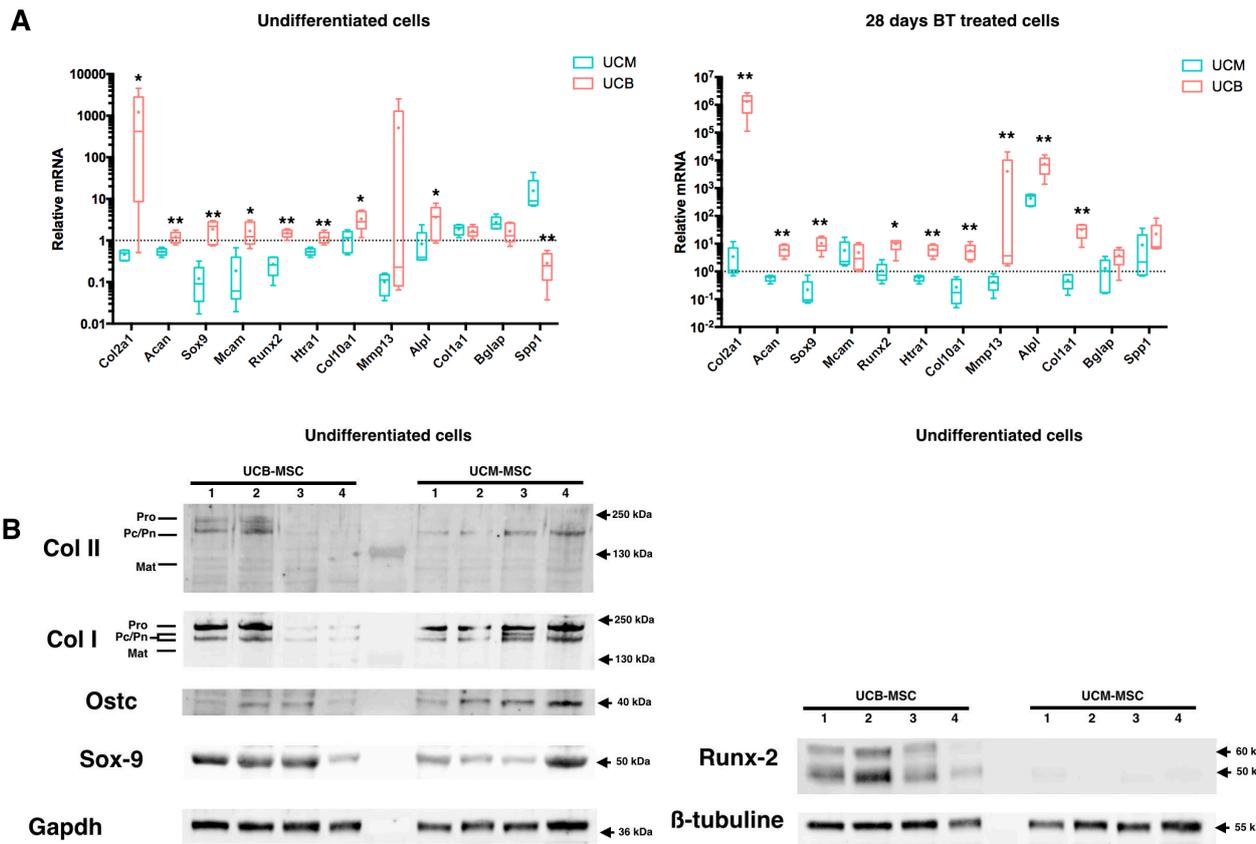


Figure 11

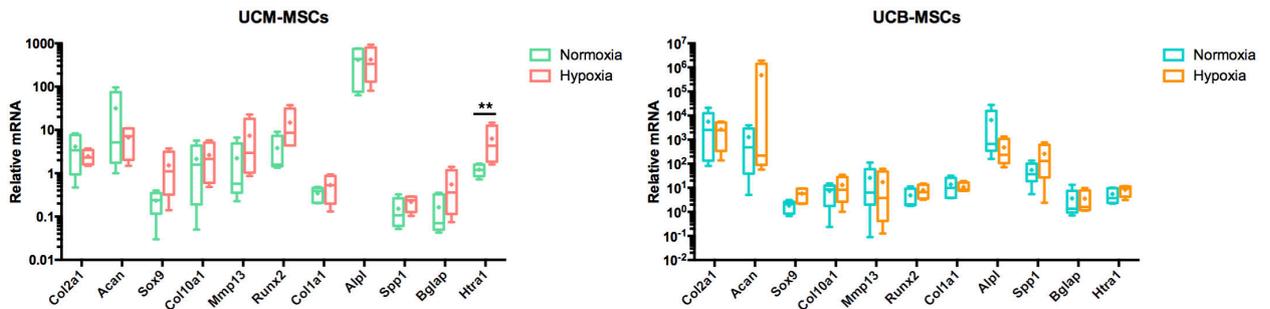


Figure 12

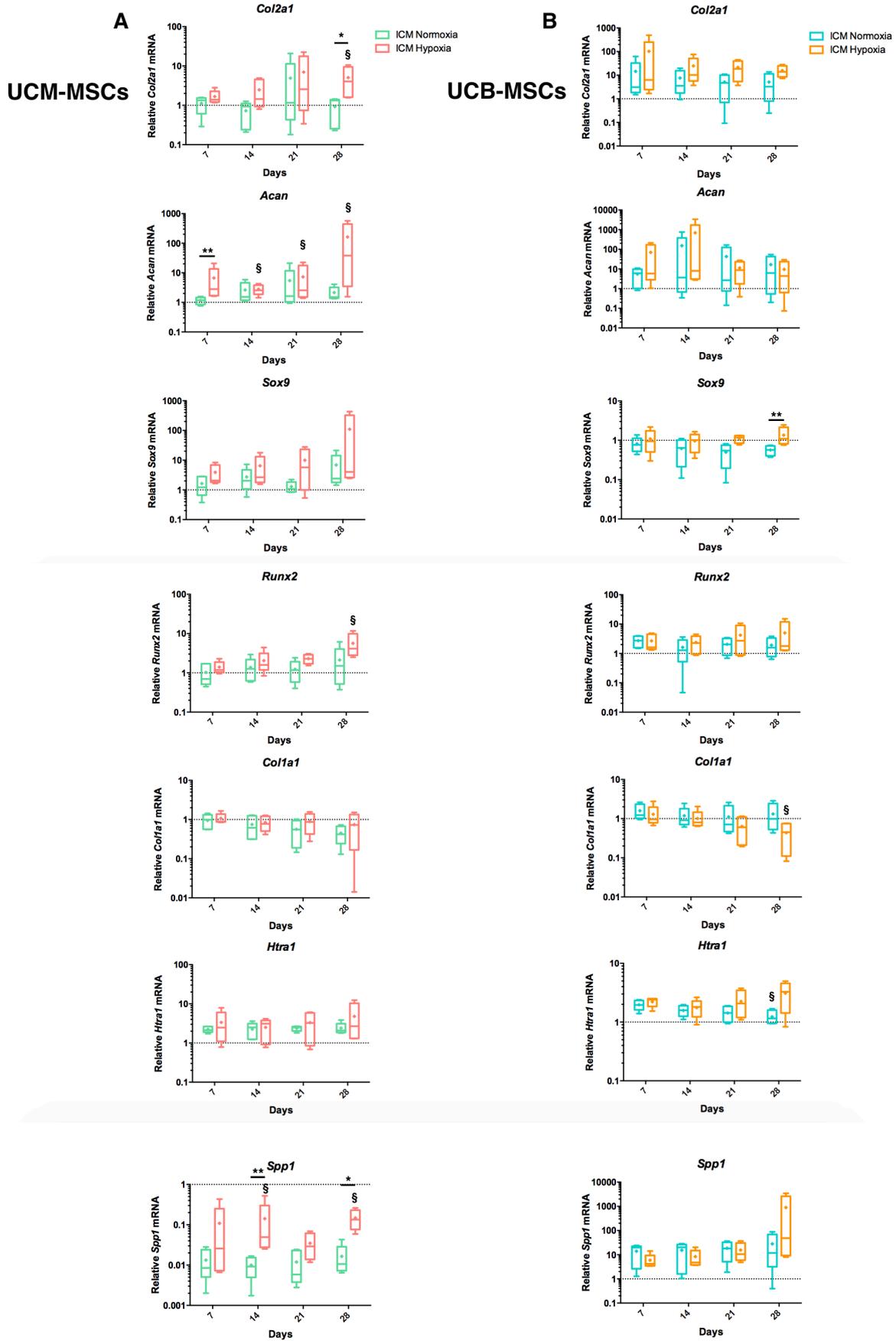
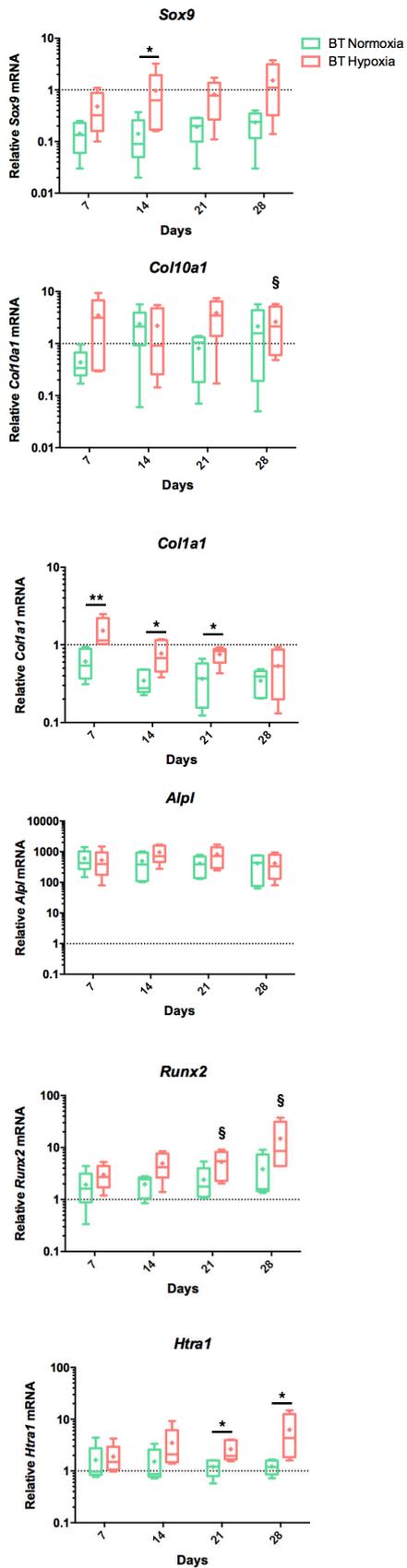


Figure 13

**A UCM-MSCs**



**B UCB-MSCs**

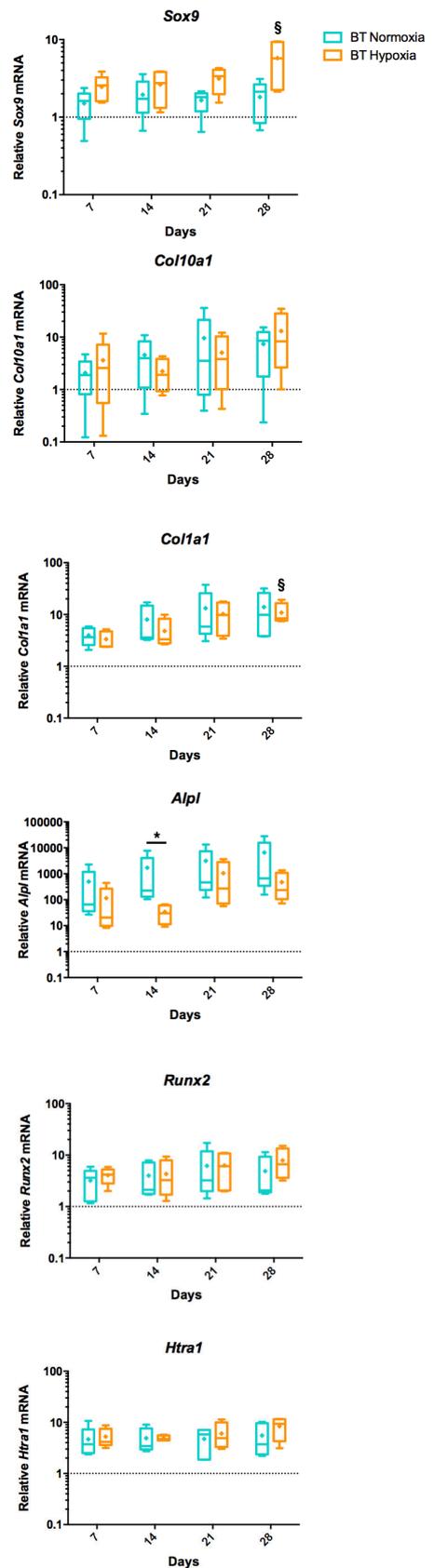


Figure 14

A

	UCM		UCB	
	ICM	BT	ICM	BT
<i>Col2a1</i>	Green	Grey	Grey	Grey
<i>Acan</i>	Green	Grey	Grey	Grey
<i>Sox9</i>	Grey	Green	Green	Light Green
<i>Col10a1</i>	Grey	Light Green	Grey	Grey
<i>Mmp13</i>	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>Runx2</i>	Light Green	Light Green	Grey	Grey
<i>Col1a1</i>	Grey	Green	Red	Light Green
<i>Alpl</i>	Grey	Grey	Grey	Red
<i>Spp1</i>	Green	Grey	Grey	Grey
<i>Htra1</i>	Grey	Green	Light Green	Grey
<i>Bglap</i>	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>Q-Ratio</i>	Grey	Grey	Green	Grey

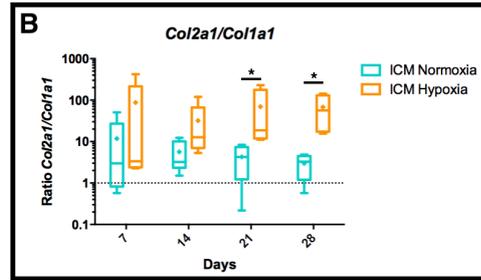
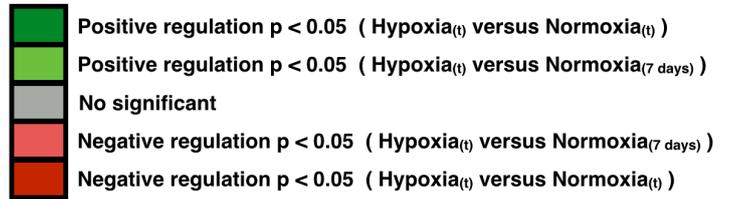


Figure 15

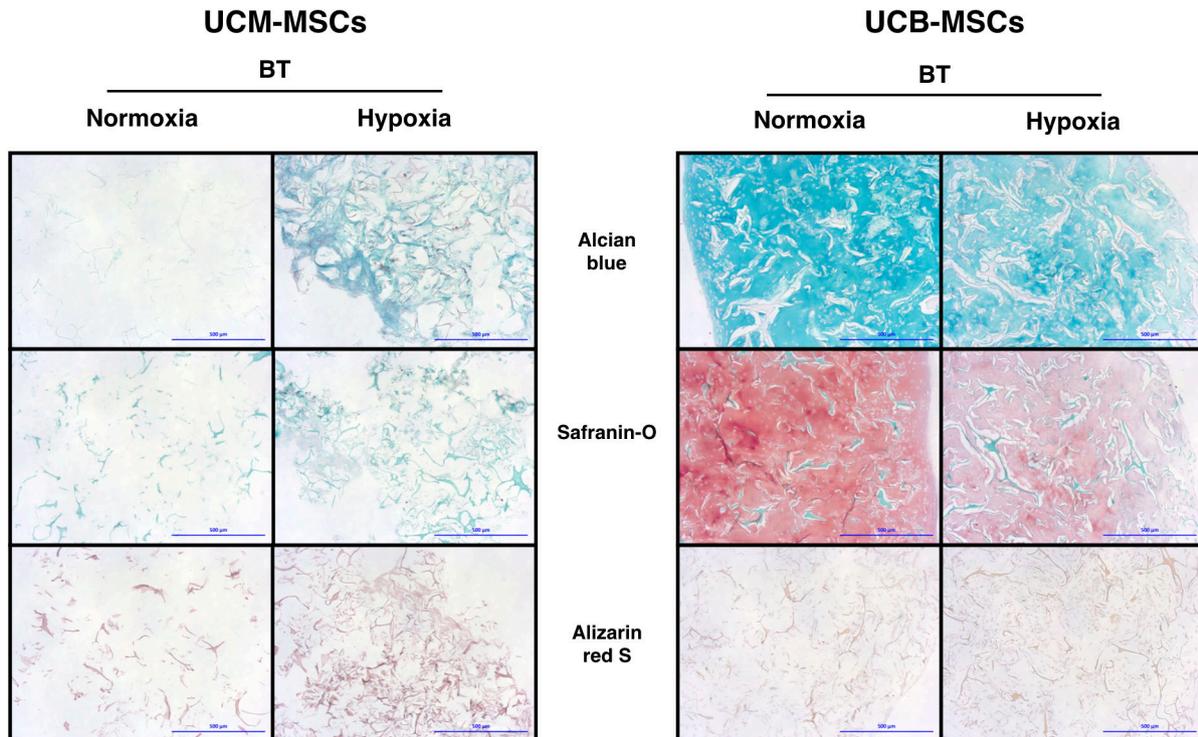
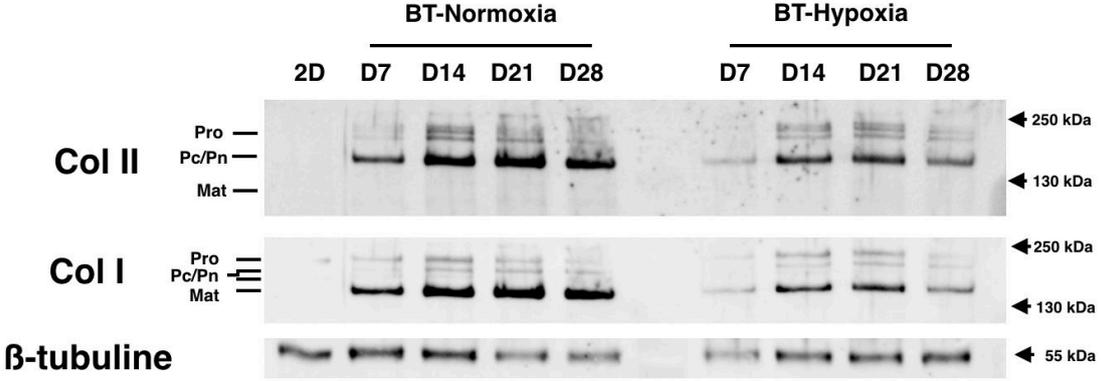
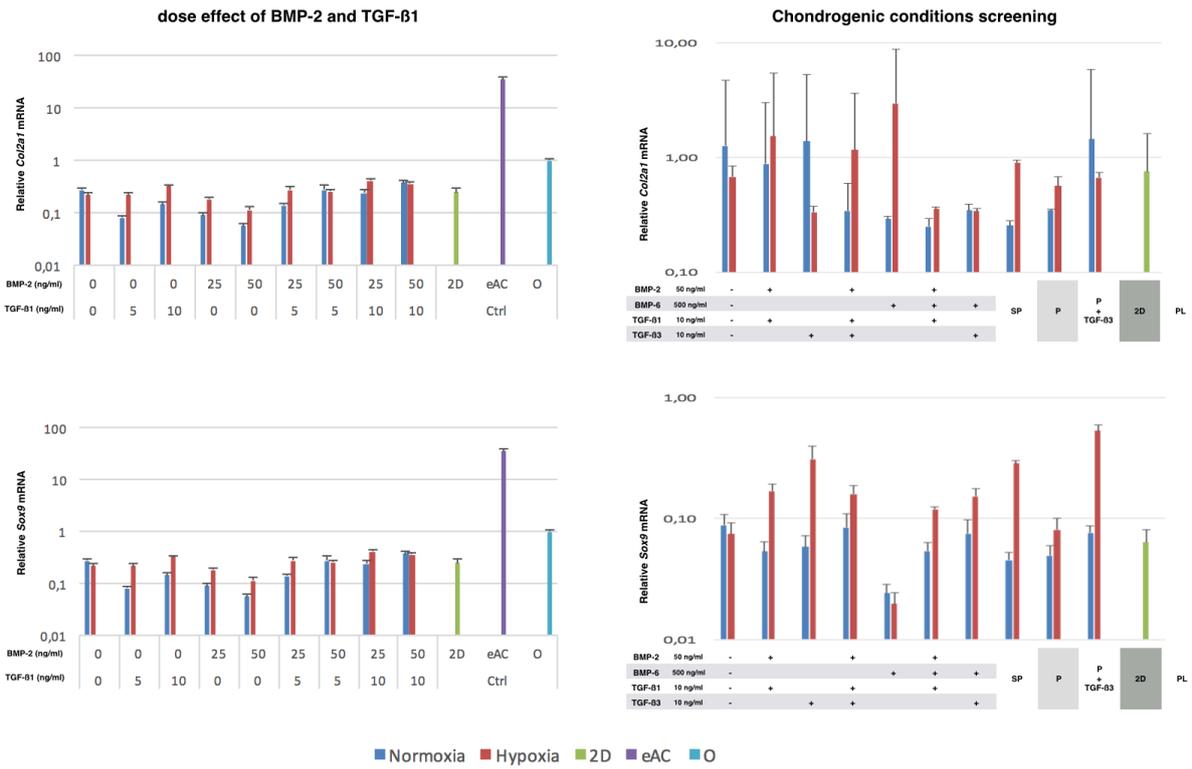


Figure 16

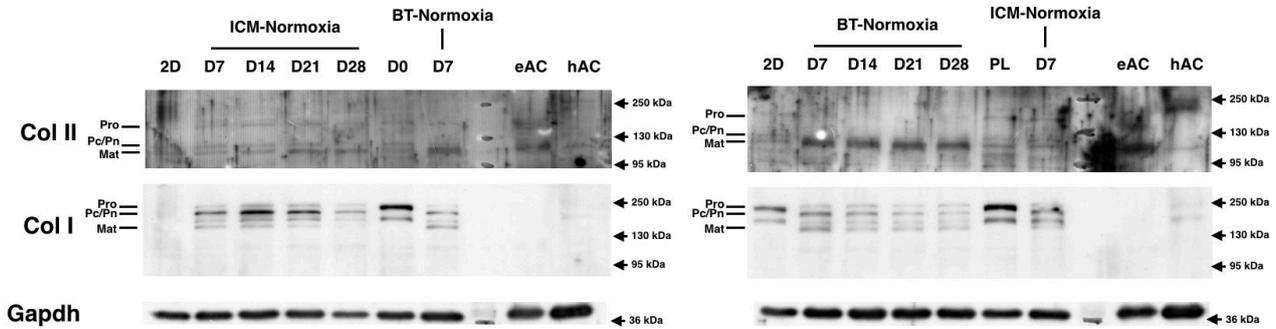


## Supplemental figure 1

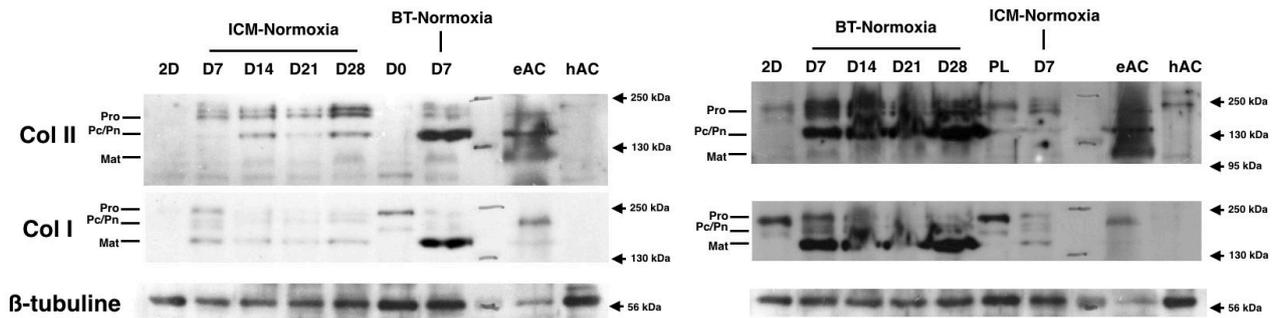


## Supplemental figure 2

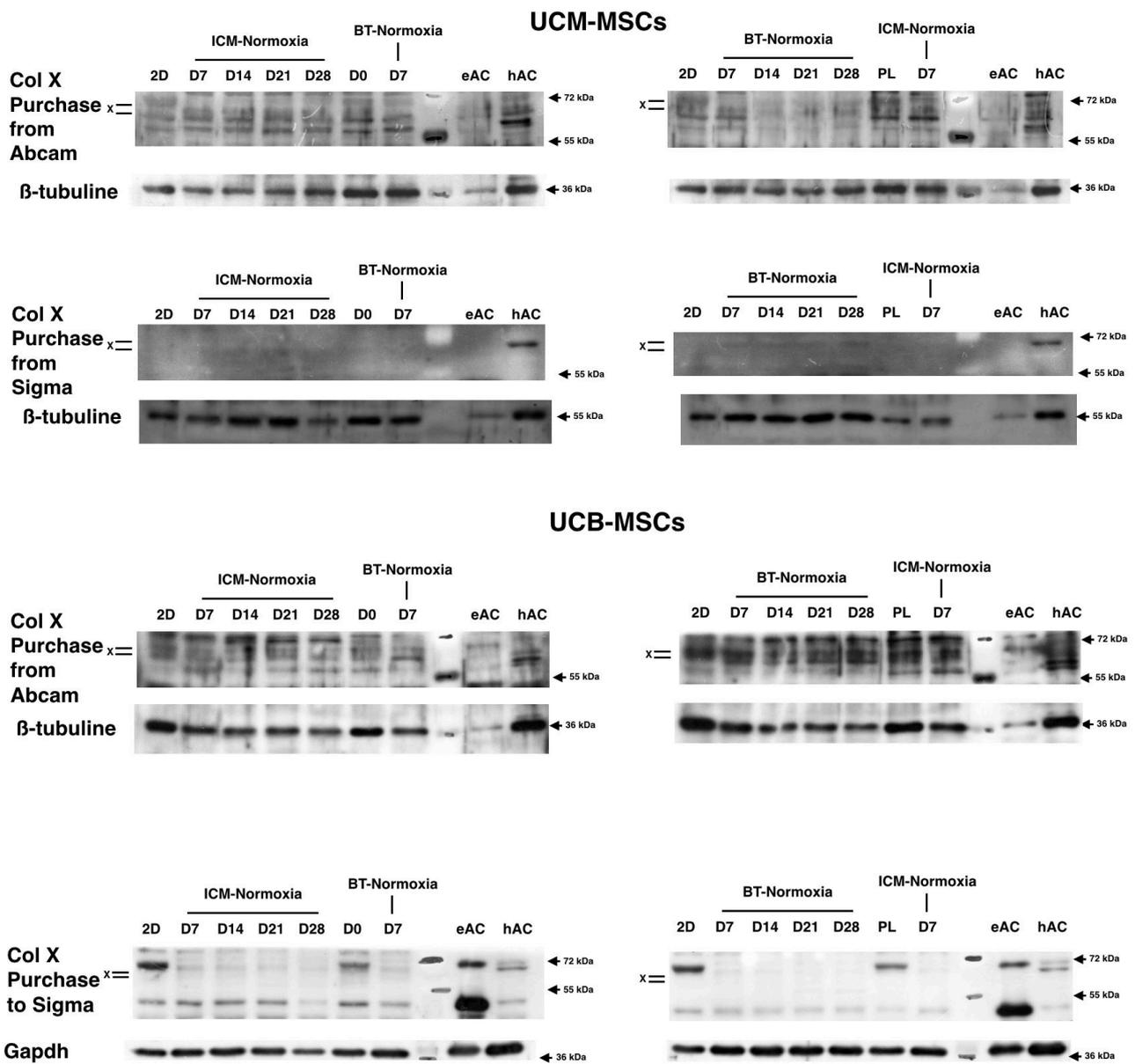
### UCM-MSCs



### UCB-MSCs

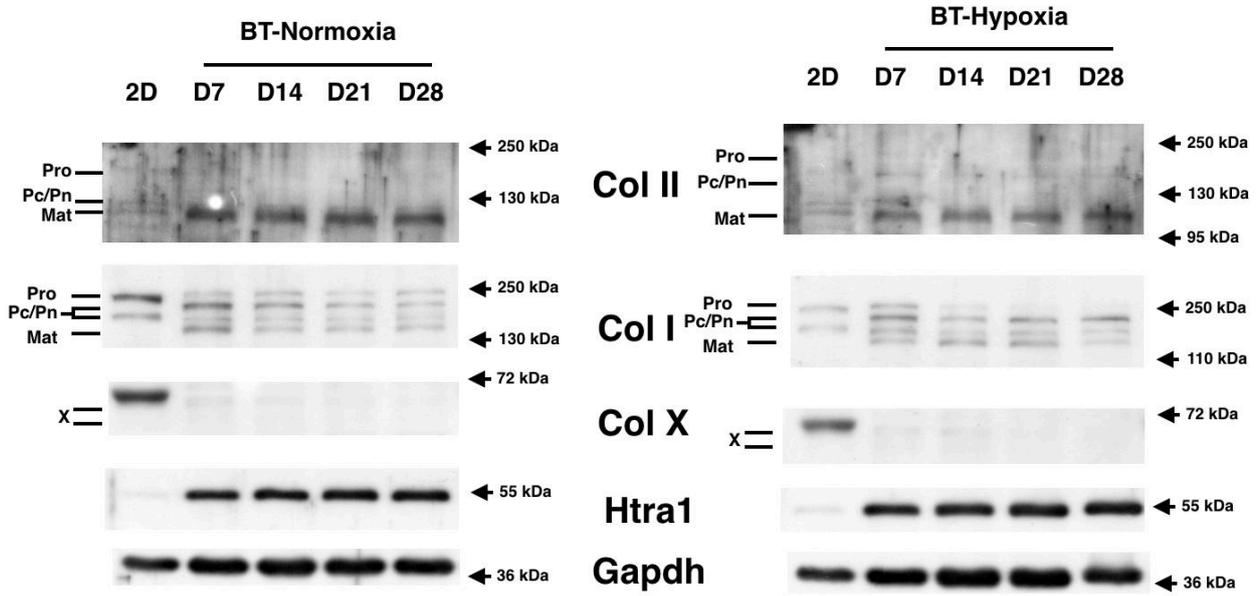


### Supplemental figure 3

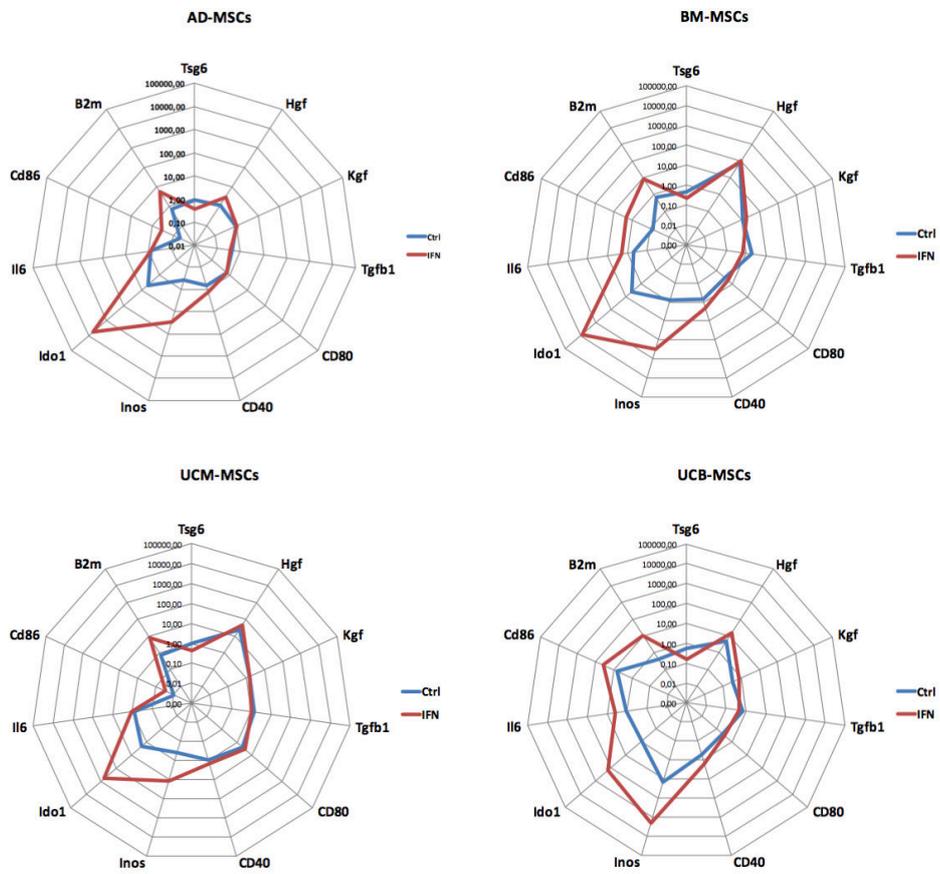


Supplemental figure 4

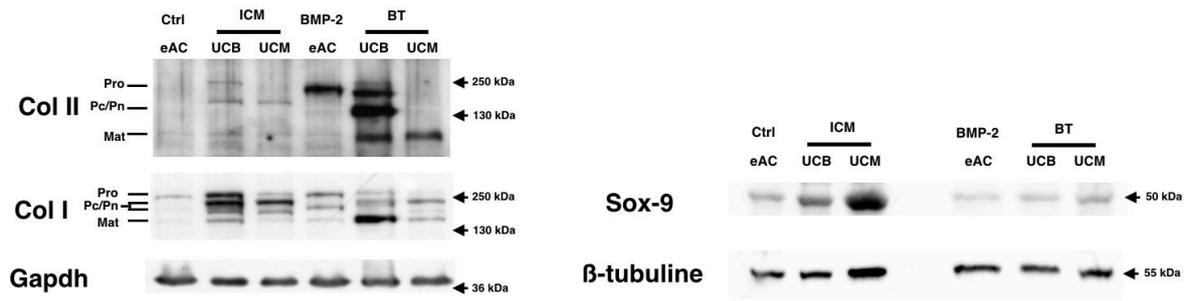
UCM-MSCs



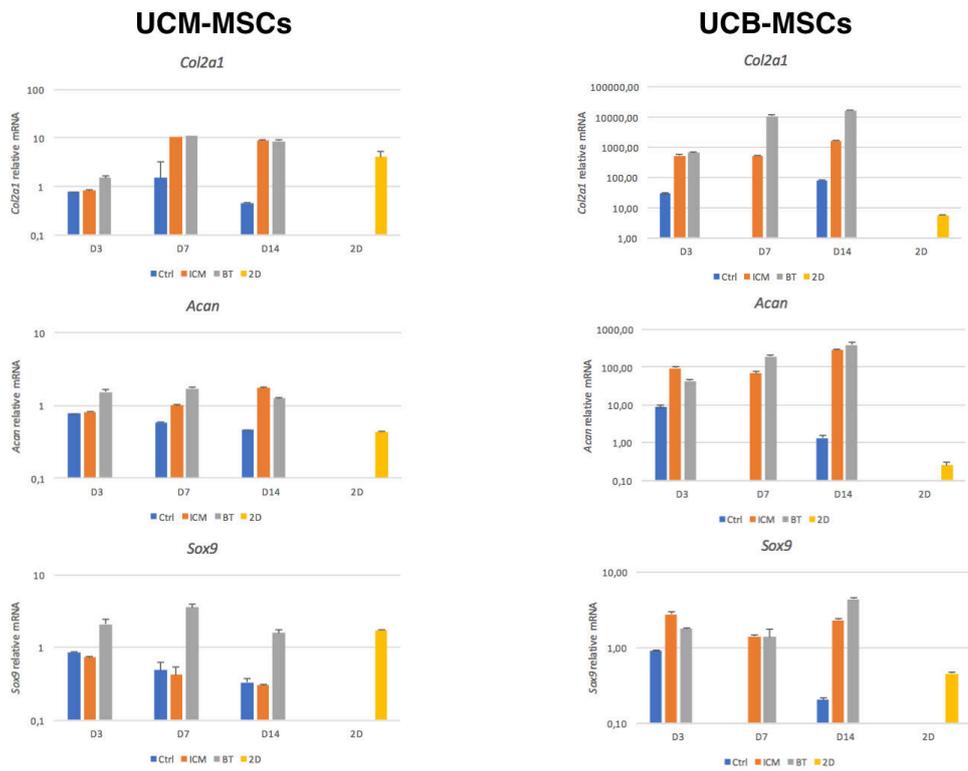
Supplemental figure 5



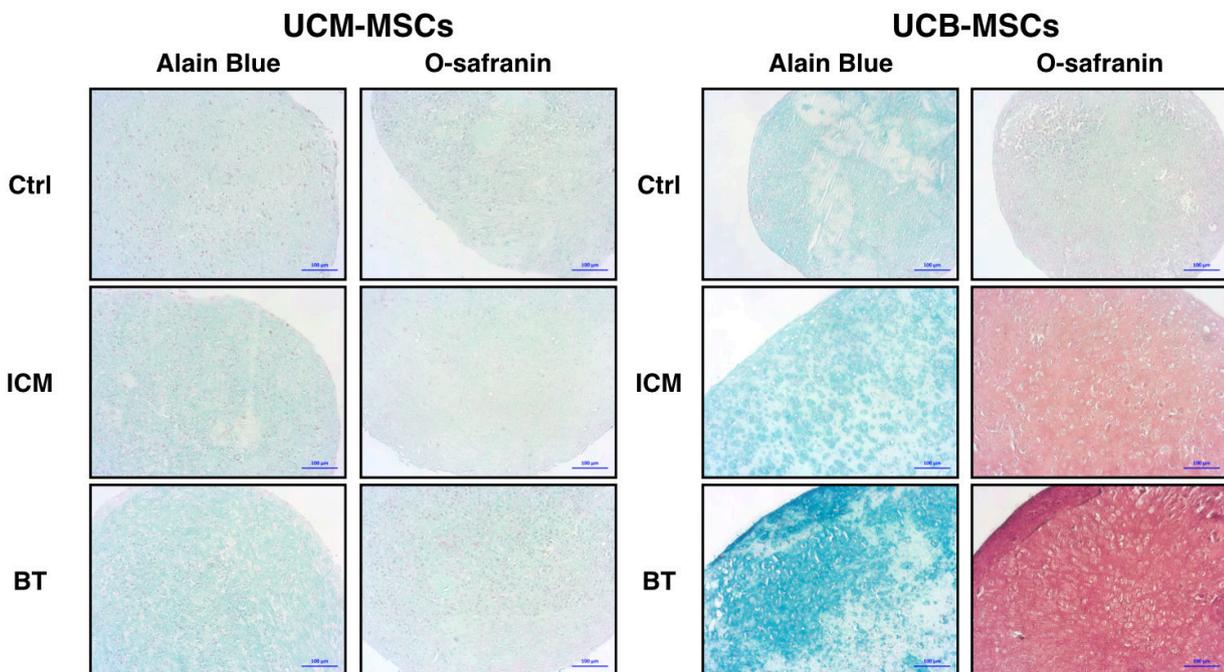
## Supplemental figure 6



## Supplemental figure 7



## Supplemental figure 8



## Supplemental table 1

Dose effect of BMP-2 and TGF-β1

	BMP-2 (ng/ml)	TGF-β1 (ng/ml)	
1	-	-	Normoxia
2	5	5	
3	10	10	
4	-	-	
5	-	-	
6	5	5	
7	5	5	
8	10	10	
9	10	10	
10	-	-	
11	5	5	Hypoxia
12	10	10	
13	-	-	
14	-	-	
15	5	5	
16	5	5	
17	10	10	
18	10	10	

Chondrogenic conditions for the screening

	Treatment	
1	ICM	Normoxia
2	TGF-β1 (10 ng/ml) + BMP-2 (50 ng/ml)	
3	TGF-β3 (10 ng/ml)	
4	TGF-β3 (10 ng/ml) + BMP-2 (50 ng/ml)	
5	BMP-6 (500 ng/ml)	
6	BMP-6 (500 ng/ml) + TGF-β1 (10 ng/ml) + BMP-2 (50 ng/ml)	
7	BMP-6 (500 ng/ml) + TGF-β3 (10 ng/ml)	
8	Stempro +supplement (TermoFisher)	
9	Poietics complete (Lonza)	
10	Poietics complete + TGF-β3 (10 ng/ml)	
11	ICM	Hypoxia
12	TGF-β1 (10 ng/ml) + BMP-2 (50 ng/ml)	
13	TGF-β3 (10 ng/ml)	
14	TGF-β3 (10 ng/ml) + BMP-2 (50 ng/ml)	
15	BMP-6 (500 ng/ml)	
16	BMP-6 (500 ng/ml) + TGF-β1 (10 ng/ml) + BMP-2 (50 ng/ml)	
17	BMP-6 (500 ng/ml) + TGF-β3 (10 ng/ml)	
18	Stempro +supplement (TermoFisher)	
19	Poietics complete (Lonza)	
20	Poietics complete + TGF-β3 (10 ng/ml)	

## Supplemental table 2

Gene	Primer	sequence 5'-3'
<i>Actb</i>	forward	GATGATGATATCGCCGCGCTC
	reverse	TGCCCCACGTATGAGTCCTT
<i>Col1a1</i>	forward	TGCCGTGACCTCAAGATGTG
	reverse	CGTCTCCATGTTGCAGAAGA
<i>Col2a1</i>	forward	GGCAATAGCAGGTTCAAGTACA
	reverse	CGATAACAGTCTTGCCCACTT
<i>Col10a1</i>	forward	GCACCCAGTAATGTACACCTATG
	reverse	GAGCCACACCTGGTCATTTTC
<i>Acan</i>	forward	ACACGGATGGTGCCTCTTC
	reverse	CTCAGTCCACGGGTTACGAT
<i>Runx-2</i>	forward	GCAGTCCCAAGCATTTTCAT
	reverse	CACCTGGCCTTGGGAAGAG
<i>Mmp13</i>	forward	TGAAGACCCGAACCCTAAACAT
	reverse	GAAGACTGGTGATGGCATCAAG
<i>Sox9</i>	forward	CAAGAAGGACCACCCGGACTA
	reverse	GGAGATGTGTCTGCTCCGT
<i>Alpl</i>	forward	GACATGACCTCCAGGAAGA
	reverse	GCAGTGAAGGGCTTCTTGTC
<i>Htra1</i>	forward	GGACTTCATGTTCCCTCAA
	reverse	GTTCTGCTGAACAAGCAACA
<i>Mcam</i>	forward	GCTCCGTGTGTACAAGCTCC
	reverse	GGGACGACTGAATGTGGACT
<i>Ppia</i>	forward	CCCTACCGTGTCTTCGACA
	reverse	GTGAAGTCAACCCTGACA
<i>Bglap</i>	forward	TCCTTTGGGTTTGGCCTAC
	reverse	GCCTGTGAGACAAGGAGGG
<i>Spp1</i>	forward	GAGACACGTATGATGGCCGA
	reverse	GCTGTCCCAATCAGAAGCCA

Gene	Primer	sequence 5'-3'
<i>Il10</i>	forward	GACTTTAAGGGTTACCTGGGTT
	reverse	TGCTCTATTTTTCACAGGGCAG
<i>Il6</i>	forward	CACCACTGCAGACAAAACCA
	reverse	CAGGTCTCCTGATTGAACCCA
<i>Tnfaip6</i>	forward	GCTTTGTGGGAAGATACTGTGG
	reverse	ACTGGGTTTGGATGGGGAT
<i>Hgf</i>	forward	CCACATGAGCACAGCTATCG
	reverse	ACTTCCCATTGCAGGTCA
<i>Kgf</i>	forward	AGGCAAAGTCAAAGGGACTCA
	reverse	TCGTTGCATTCTTCTTGAT
<i>Tgfb1</i>	forward	CTGGCGTACCTCAGTAACC
	reverse	AACTGAACCCGTTGATGCC
<i>Cd80</i>	forward	CAGGAAAGTTGGCTCTGACCA
	reverse	TCTCCATTGTATCCTGGCTC
<i>Cd86</i>	forward	GCCCCTCTCATGAGTGTGAAA
	reverse	AATGTGACGACTTTAGTCGCC
<i>Cd40</i>	forward	AAGGCCTGGTGGAACTACAG
	reverse	TCCTTGGCCACCTTTCTGATAC
<i>Ido1</i>	forward	TCATGACTACGTGGACCAAAA
	reverse	CGCCTTCAATAGAGCAGACCTTC
<i>B2m</i>	forward	CTACTCTCCCTGACTGGCCT
	reverse	TCTGACCGGTGCACTTTCATC
<i>Rela</i>	forward	TCCGGACACCTCCCTACGCG
	reverse	TCGCTGAGCTCCCGATCCGA
<i>Inos</i>	forward	GCTGGTCCCGGATTTTCTG
	reverse	AGCACGGTTTAAACCAAGAC
<i>Sdha</i>	forward	CTTCCCACAGGTACACACA
	reverse	TGCCGTAATTCCTCAGCTCA

## C. Conclusion du deuxième article

A l'issue de ces travaux, une nette différence a pu être mise en évidence entre les CSM-GW et CSM-SPL au niveau de leur potentiel chondrogénique. En effet, nous avons montré que les CSM-SPL sont capables d'exprimer une importante MEC « hyaline-like » après induction de la chondrogenèse. A l'inverse, les CSM-GW montrent une très faible expression matricielle et ainsi un échec de génération d'un substitut cartilagineux de qualité.

Cet important constat montre une utilisation préférentielle des CSM-SPL face aux CSM-GW pour la génération de cartilage *in vivo* alors que la communauté scientifique peine encore à établir une distinction entre ces deux types cellulaires.

Malgré un fort potentiel prolifératif des CSM-GW (donc une forte attractivité en terme d'application thérapeutique), ce type de CSM ne semble pas répondre pleinement aux critères de l'ISCT par l'absence d'une réelle différenciation des CSM-GW en chondrocytes. Ces résultats ne réfutent pas le caractère souche des CSM-GW mais pointent les ambiguïtés dans leur caractérisation, leurs propriétés biologiques décrites dans la littérature et ainsi leur potentiel thérapeutique.

L'efficacité du protocole employé pour la différenciation chondrogénique a précédemment été montrée sur les CSM humaines (CSM-MO humaines et CSM-SPL humaines) et a été vérifiée pour la différenciation des CSM-MO équines et, avec cette étude, chez les CSM-SPL équines. Pour autant, afin de lever tous doutes concernant les CSM-GW, un criblage complet de protocoles de chondrogenèse a été réalisé sur ces dernières. Ni l'action de la BMP-6, du TGF- $\beta$ 3 ou d'autres milieux chondrogéniques n'ont permis une différenciation chondrocytaire efficace. Nous avons également émis des doutes concernant le modèle de culture 3D employé lors de cette différenciation. Ainsi, d'autres modèles communément utilisés dans la littérature ont été employés sans pour autant réussir à faire exprimer une MEC chondrogénique chez ces CSM-GW différenciées.

L'importante différence de comportement entre les CSM-GW et les CSM-SPL n'est pas restreinte au simple potentiel chondrogénique. En effet, l'aspect immunomodulateur des deux types de CSM néonatales semble différent, notamment par les écarts d'expression du CMH-I ainsi que par l'absence d'induction d'iNos au niveau transcriptionnel chez les CSM-GW par l'action de l'IFN- $\gamma$ . D'autre part, ces différences pourraient être inhérentes aux caractéristiques intrinsèques des deux sources de CSM. En effet, au niveau indifférencié, ces CSM ne possèdent déjà pas le même profil d'expression transcriptionnel et protéique. Nous avons notamment noté une forte proportion des marqueurs chondrocytaires chez les CSM-SPL indifférenciées ainsi que de marqueurs prédictifs comme le CD146 exprimé chez ces dernières.

L'absence de données sur l'implication de l'hypoxie dans la différenciation chondrogénique des CSM-SPL et CSM-GW nous a poussé à inclure ce paramètre lors de notre protocole de différenciation. Là encore, des réponses adverses et distinctes entre les deux sources ont pu être observées. L'effet le plus notoire constaté de l'hypoxie sur la chondrogenèse est la diminution de la synthèse matricielle par les CSM-SPL sans pour autant conclure sur un effet délétère.

En plus de montrer une différence de potentiel thérapeutique entre CSM-SPL et CSM-GW, bien que des études *in vivo* chez le cheval n'aient pas été abordées dans ce travail doctoral, mais le sont dans d'autres programmes de BioTARGen (thèses des Dr T. Branly et M. Desancé), ces travaux ont permis de montrer l'intérêt d'utiliser des CSM-SPL pour la génération de cartilage *in vitro* en comparaison avec les CAE. En effet, nos derniers résultats indiquent que la synthèse de MEC cartilagineuse par les CSM-SPL différenciées en chondrocytes est de loin supérieure à celle issue de CAE redifférenciés. La supériorité des CSM-SPL face aux CAE est à la fois visible au niveau protéique, avec l'expression d'importantes quantités de collagène de type II ainsi qu'au

niveau histologique par l'abondance d'une MEC sulfatée. De surcroît, la moindre quantité de CSM-SPL nécessaire à l'obtention d'un substitut cartilagineux par rapport aux CAE (respectivement 500 000 cellules par éponges contre 600 000) et le caractère non invasif du prélèvement de sang de cordon apporte des atouts thérapeutiques majeurs aux CSM-SPL.

Néanmoins, la forte proportion de collagène de type I au sein de la MEC synthétisée par les CSM-SPL laisse supposer un aspect fibrotique de ce substitut. Des études *in vivo* et/ou l'évaluation des propriétés mécaniques de ce substitut devront être réalisées pour conclure sur le fait que ce dernier puisse supplanter les chondrocytes autologues dans les stratégies de MACI.

De nouvelles interrogations subsistent suite à cette deuxième étude. Il s'agit des facteurs responsables de la différence entre CSM-SPL et CSM-GW. Nous supposons que la différence de réponse entre ces deux types de CSM pourrait être dû à la présence de populations cellulaires hétérogènes et différentes d'une source à une autre. Des explications pourraient ainsi être apportées par l'utilisation de marquages *in situ* afin de localiser et évaluer la proportion de chondroprogéniteurs au sein de la population de CSM.



# **Discussion et Perspectives**

---

# Discussion et Perspectives

---

## I. Rappel des enjeux et des résultats de l'étude.

Les atteintes cartilagineuses représentent la première cause d'apparition de l'arthrose chez le cheval. Elles émergent suite à une sollicitation trop importante du cartilage lors des contraintes articulaires imposées au cheval. Le faible potentiel de réparation intrinsèque du cartilage ne permet pas une régénération spontanée très significative du tissu. Additionnée au manque de traitement curatif des atteintes cartilagineuses, l'évolution de ces affections vers le stade arthrosique est inéluctable et implique un arrêt prématuré de la carrière sportive du cheval. Les affections du cartilage représentent 60% des causes de boiteries chez l'équidé, ainsi, un traitement durable des affections du cartilage représenterait un intérêt vétérinaire majeur.

Cette étude s'est penchée sur l'amélioration des thérapies de médecine régénérative du cartilage, permettant un traitement durable des affections cartilagineuses. Basée sur l'ingénierie tissulaire, l'étude a pour objectif de comparer plusieurs types cellulaires dans la génération d'un substitut cartilagineux, ayant pour vocation à être réimplanté au niveau des sites articulaires lésés. Le principal facteur influant la réussite de l'application de ces MTI est le type cellulaire utilisé pour générer ce substitut cartilagineux.

Nous avons ainsi étudié le potentiel thérapeutique d'un type cellulaire adulte et différencié ainsi que celui de deux types de CSM néonatales.

- Le chondrocyte représente encore, chez l'Homme et le cheval, le principal type cellulaire employé en ingénierie tissulaire du cartilage au niveau clinique. Son utilisation dans le cadre de la MACI montre des résultats encourageants sur le long terme. Pour autant, la maîtrise de la culture *ex vivo* nécessite d'être améliorée. Notre première étude a, d'une part, montré l'intérêt d'améliorer le phénotype chondrocytaire après l'amplification des CAE en culture cellulaire. Ces derniers, en se différenciant, perdent leur capacité d'expression d'une MEC stable, aboutissant ainsi à la génération d'un substitut cartilagineux de faible qualité. D'autre part, en employant un procédé de culture mimant le microenvironnement cellulaire natif du chondrocyte, nous avons pu permettre à ce dernier de ré-exprimer une MEC composée des biomarqueurs spécifiques du cartilage. Une stratégie d'interférence par l'ARN a finalement permis la répression de marqueurs atypiques du cartilage ainsi que l'inhibition du collagène de type I délétère pour la qualité hyaline du cartilage.
- Suite aux résultats de cette première étude, il semble que les limites des cellules adultes spécialisées soient atteintes en ce qui concerne notre procédé d'élaboration du substitut cartilagineux. Ainsi, notre volonté a été la recherche de types cellulaires alternatifs d'intérêt thérapeutique, matérialisés par les CSM de cordon ombilical. Afin de déterminer le meilleur candidat à utiliser en ingénierie tissulaire du cartilage, nous avons comparé deux types de CSM néonatales (CSM-SPL et CSM-GW) pour leur capacité à générer du cartilage après induction de la chondrogenèse. Cette étude a permis de montrer que le substitut cartilagineux issu des CSM-SPL différenciées en chondrocyte surpassait celui issu des CSM-GW de par sa qualité biologique. Ainsi, ces résultats font des CSM-SPL des cellules préférentielles à utiliser pour les thérapies d'ingénierie tissulaire du cartilage.

Ces résultats s'inscrivent ainsi dans l'amélioration des techniques d'ingénierie tissulaire du cartilage chez le cheval mais également chez l'Homme de par les similitudes biologiques entre les deux espèces. De surcroît, cette étude a permis une meilleure compréhension des mécanismes

impliqués dans la stabilité du phénotype chondrocytaire, ainsi que ceux impliqués dans la génération du chondrocyte de la cellule indifférenciée à la cellule mature fonctionnelle.

## II. De l'Homme au cheval : le modèle équin, un sujet d'étude à part entière.

Nous avons précédemment indiqué que le choix du modèle équin comme modèle d'étude a été réalisé à partir des similitudes biologiques et comportementales de ce dernier avec le modèle humain. Cette démarche s'applique aux affections locomotrices ainsi qu'aux particularités biologiques du cartilage articulaire hyalin.

Pour autant, malgré le fait que le cheval représente un excellent modèle gros animal, aux contraintes articulaires et à la physiologie du cartilage comparables à celles de l'Homme, d'importantes différences sont à prendre en compte. Ces différences sont visibles à la fois au niveau cellulaire et tissulaire, au niveau des outils moléculaires et biotechnologiques mis à disposition, ainsi que dans l'utilisation qui est faite du cheval dans la société.

### A. Avantages et contraintes liées à la biologie des cellules équines.

Dans leur globalité, les deux modèles sont assez proches pour permettre un isolement des cellules, une culture ainsi que l'obtention de réponses aux traitements comparables entre les cellules équines et humaines. Mais, nous le verrons par la suite, ces similitudes se sont également accompagnées de divergences dans le comportement des cellules et notamment dans celui des chondrocytes issus du modèle équin. Nous pensons que les principales variables cellulaires des CAE avec le modèle humain sont en partie liées à l'âge moyen des sujets prélevés.

Les réponses cellulaires comparables s'expliquent par la haute homologie de l'ensemble des protéines entre le l'Homme et le cheval. A titre d'exemple, les effets importants de la BMP-2 humaine (InductOS) et du TGF- $\beta$ 1 humain sur les cellules équines peuvent s'expliquer par les fortes homologies entre les séquences protéiques équine et humaine de ces deux facteurs de croissance (Tableau 7). Les réponses biologiques communes sont également facilitées par des températures corporelles semblables entre le cheval (37,8 °C) et l'Homme (comprises entre 36,1 °C et 37,8 °C). Pour autant, ces constats ne sont pas à généraliser à l'ensemble des voies de signalisation mises en jeu.

	Couverture	Homologies
BMP-2	60 %	96 %
TGF- $\beta$ 1	94 %	90 %

**Tableau 7 : Couverture et homologie de séquences protéiques de la BMP-2 et du TGF- $\beta$ 1 entre le cheval et l'Homme.**

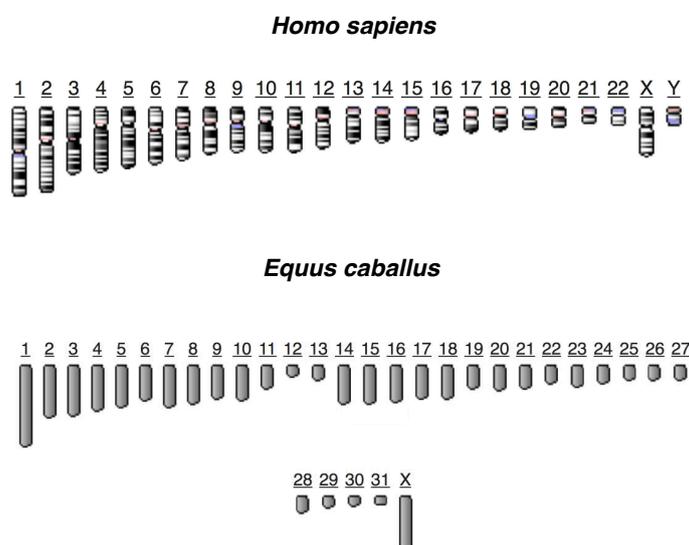
Les séquences protéiques équines de la BMP-2 et du TGF- $\beta$ 1 ont été alignées avec leurs séquences homologues respectives humaines. Le pourcentage de couverture et d'homologie de la première séquence sur la deuxième est présenté (NCBI-Blast).

### B. Entre homologies et divergences moléculaires.

Néanmoins, malgré ces homologies, une grande difficulté a été perçue dans l'application des outils biotechnologiques mis à disposition chez le modèle équin. Cela a notamment été le cas pour l'utilisation d'anticorps. En effet, la haute spécificité d'interaction nécessaire à la reconnaissance d'un épitope cible par un anticorps est trop importante pour permettre la quantification ou la reconnaissance de certaines protéines équines d'intérêt. En effet, malgré les fortes homologies entre les protéines orthologues, les variations des modifications post-traductionnelles entre les deux espèces, pour une même protéine, pourraient modifier leur conformation moléculaire. C'est d'autant plus le cas pour les protéines fortement glycosylées.

Ainsi, le panel de récepteurs utilisé pour caractériser les CSM équines est assez restreint du fait de l'absence de reconnaissance croisée des anticorps dirigés contre les protéines humaines utilisés chez le cheval (De Schauwer *et al.*, 2011).

De ce fait, beaucoup d'efforts ont été consacrés à l'obtention de technologies alternatives et notamment pour l'analyse moléculaire. En effet, comme nous l'avons vu, le génome humain est proche du génome équin. De plus, le génome équin est relativement bien séquencé en comparaison avec d'autres espèces plus « exotiques », facilitant les possibilités d'études des ARNm chez le cheval et permettant de s'affranchir des contraintes (précédemment citées) liées à l'analyse protéique. Ainsi, la grande majorité des criblages des taux de transcrits de nos cellules a pu être réalisée à partir de développements d'outils basés sur les banques de données en libre accès *in silico*. Néanmoins, certaines cibles ont pu poser problème du fait d'insertions nucléotidiques au sein de séquences d'ADN ainsi que de la juxtaposition de contigs (Figure 90). Ces structures dans les bases de données ont induit une perte de précision dans les séquences d'ADNc, voir la disparition complète de gènes putatifs au sein du génome équin. Cela a été notamment le cas du gène de « Small novel rich in cartilage » (*Snorc*) et de *Prg4* codant la lubriline dont une partie des séquences a été soit déléetée, soit a été déplacée.



**Figure 90 : Représentation schématique du caryotype d'*Homo sapiens* et d'*Equus caballus*.**

Le caryotype de l'Homme est composé de 24 chromosomes contre 32 chez le cheval. Les chromosomes surnuméraires ont une répercussion sur l'intégration de séquences non-codantes répétées au sein du génome équin (NCBI-Genome).

## C. Le cheval : contexte hippique et contexte scientifique.

L'utilisation sportive du cheval le rapproche de l'athlète humain. La recherche de performances impose au cheval un rythme, une rigueur alimentaire ainsi qu'un fort contrôle comportemental, au même titre qu'un sportif humain de haut niveau.

L'expérimentation scientifique tire parti de ce cadre particulier dans la pathologie des affections locomotrices pour les comprendre et apporter des solutions à la fois sanitaires et médicales chez les deux modèles. Néanmoins, les conclusions apportées par cette méthode ne doivent pas être systématiquement extrapolées au contexte de l'arthrose humaine et doivent être replacées dans le contexte équin.

En effet, les contraintes articulaires générées dans le cadre sportif de l'animal sont de plus fortes intensités et de plus hautes fréquences que dans un contexte physiologique normal. L'arthrose équine est ainsi généralement plus précoce que l'arthrose humaine (hors domaine

athlétique pour ce dernier). Ainsi, le modèle pourrait devenir limitant pour les études de l'arthrose liée au vieillissement, prépondérante chez l'Homme.

De ce fait, la durée d'efficacité d'une thérapie à long terme chez l'Homme n'est pas de la même échelle que chez le cheval. En effet, l'espérance de vie moyenne d'un cheval étant de 26 ans (Gardey, 2001), et sa carrière sportive comprise entre 3 et 10 ans, si l'âge minimum de mise en compétition du cheval s'avère être de 4 ans (données de la fédération française d'équitation), la période moyenne post-compétition serait comprise entre 12 et 19 ans.

Une thérapie à long terme d'une arthrose débutante ou établie chez le cheval serait nécessairement sous-estimée face aux objectifs sanitaires de thérapies arthrosiques chez l'Homme (dont l'espérance de vie moyenne dans les pays développés se situe autour de 80 ans).

Un autre exemple de paramètre à prendre en compte dans le traitement conjugué des maladies chez l'Homme et le cheval est l'élevage sélectif des animaux. Cette pratique zootechnique est courante chez l'équidé et vise à l'amélioration des performances sportives dans le cas du cheval. Sachant qu'une des causes de l'arthrose pourrait avoir une composante génétique (Valdes & Spector, 2011) (et de ce fait héréditaire), une thérapie à long terme de l'arthrose chez le modèle équin nécessite une vigilance accrue vis-à-vis de la qualité du patrimoine génétique des races. Un soin systématique des chevaux prédisposés à l'arthrose, conjugué à une sélection par croisement, pourrait faire passer sous silence le caractère héréditaire de cette prédisposition et ainsi augmenter sa fréquence au sein de la population.

De façon plus globale, les similitudes biologiques entre Homme et cheval, ont permis un important transfert technologique entre les deux modèles en seulement 5 ans au sein des divers projets de recherche du laboratoire. Ce dernier a pu être multidisciplinaire et a concerné à la fois la biologie des cellules somatiques adultes (chondrocytes, ténocytes ou ostéoblastes) et la biologie des cellules souches (issues de tissus néonataux, de moelle osseuse ou encore de tissu adipeux). De surcroît, les méthodologies de transfert technologique peuvent désormais s'appliquer à d'autres modèles mammifères. Par ailleurs, ce projet de recherche, mais également d'autres au sein du laboratoire, ont nécessité et permis la création de nouveaux partenariats académiques et industriels dans la filière équine, matérialisés par cette thèse et ses travaux.

### **III. Le chondrocyte articulaire équin : un outil thérapeutique et de compréhension des mécanismes cellulaires du cartilage.**

La première étude était principalement basée sur le transfert d'une technologie de biologie cellulaire de l'Homme vers le modèle équin. Ainsi, la réponse cellulaire des CAE pouvait être un facteur critique réhibitoire à l'application de cette technologie. Dans l'ensemble, les deux modèles sont assez proches pour permettre un isolement des cellules, une culture ainsi que l'obtention de réponses aux traitements comparables entre les chondrocytes articulaires humains (CAH) et les CAE.

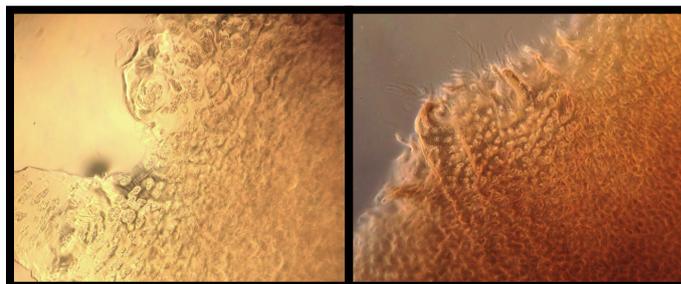
#### **A. Les spécificités des chondrocytes articulaires équins.**

##### **1. Du prélèvement à la production de matériel cellulaire.**

Durant les expériences de la première étude, des particularités ont été observées chez les CAE. Tout d'abord, lors de l'isolement des cellules, l'observation microscopique des biopsies de cartilage équin a montré des divergences par rapport au cartilage humain. Il semblerait que le cartilage issu de têtes fémorales humaines d'individus âgés (entre 60 et 90 ans) présente une forte proportion de « clusters » de chondrocytes (synonyme d'arthrose). Les biopsies de cartilage équin

ont montré quant à elles une plus forte cellularité sans formation de « clusters » (Figure 91).

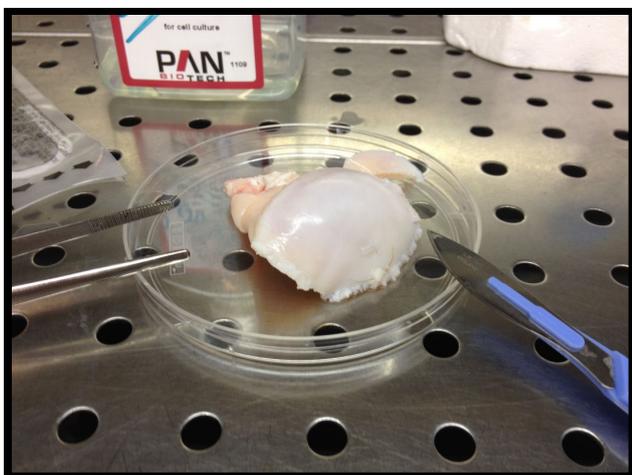
L'isolement de chondrocytes à partir de cartilage équin a permis l'obtention d'un nombre bien plus conséquent de cellules par rapport aux isollements antérieurs chez l'Homme. En effet, la quantité de cartilage équin récupérée, ainsi que la rapide prise en charge des prélèvements, augmentent énormément le rendement d'isolement des CAE. A partir d'une tête fémorale humaine, le nombre moyen de chondrocytes n'excédait que rarement les 10 millions de cellules. Chez le cheval, l'articulation étant de taille conséquente et le rendement meilleur, entre 60 et 100 millions de cellules pouvaient être régulièrement récupérés à partir d'une même articulation saine (Figure 92).



**Figure 91 : Observation microscopique de biopsies de cartilages humain et équin.**

A gauche, le cartilage humain vieillissant présente une forte proportion de « clusters » de chondrocytes. A droite, le cartilage équin issu de sujets plus jeunes montre une répartition homogène de nombreux chondrocytes (grossissement x10).

La phase de « banking » des CAE s'est également avérée plus productive que pour les CAH. La viabilité des cellules post-digestion n'est jamais descendue en dessous de 95% (sur 17 chevaux) et cette dernière a été comprise entre 90 % et 100 % lors des trypsinisations et des décongelations. A ce titre, un avantage de l'utilisation des CAE a été la possibilité de cryoconservation, impossible à réaliser avec nos prélèvements humains. Ce stockage permet ainsi un « biobanking » conséquent et augmente considérablement les possibilités d'approvisionnement en matériel cellulaire en s'affranchissant des contraintes dues à la dépendance de prélèvements pour la primoculture.



**Figure 92 : Prélèvement de bloc ostéochondral de condyle fémoral équin.**

Le prélèvement de cartilage a été réalisé sur un sujet *post-mortem* à l'aide d'un carottage en utilisant un ostéotome.

## **2. La prolifération du chondrocyte articulaire équin.**

A notre surprise, lors des travaux sur la dédifférenciation, le nombre de générations obtenus à partir des CAE a dépassé de loin le potentiel prolifératif des chondrocytes décrits dans la littérature. En effet, alors que les chondrocytes humains entrent rapidement en sénescence cellulaire après une série de passages (entre P5 et P10), nous avons pu observer que la prolifération cellulaire des CAE ne variait pas entre P3 et P11 (Figure 93). De même, une amplification à long terme sur 16 passages a pu être réalisée sans perte des capacités prolifératives. Ces résultats montrent une capacité de production de cellules considérable. Pour

autant, l'étude de leur sensibilité aux traitements de redifférenciation n'a pas été réalisée pour des passages plus élevés que P3. Il est fort probable que les cellules cultivées à passages élevés perdent leur capacité de synthèse de MEC de manière irrémédiable (Schulze-Tanzil *et al.*, 2002).

La sénescence répliquative des chondrocytes en culture peut avoir plusieurs origines. Tout d'abord, il a été montré que la taille des télomères des chondrocytes influençait leur prolifération, la qualité de leur ADN génomique ainsi que leur capacité à résister aux stress oxydatifs. Or, au cours de l'amplification des chondrocytes, la taille de leurs télomères est fortement réduite, impliquant nécessairement une sénescence répliquative (Parsch *et al.*, 2002).

Nous supposons que la différence de prolifération observée chez les CAE pourrait être en relation avec une plus importante taille de télomères. De plus, il a été montré que ces télomères voyaient leur taille diminuer chez les chondrocytes en fonction de l'âge des sujets dont ils sont issus. Les CAE étant prélevés chez des sujets jeunes, ceci pourrait appuyer notre hypothèse.

## B. Vers un modèle d'étude du développement du cartilage et du chondrocyte sain.

Les plus grandes différences observées chez les CAE par rapport aux CAH ont été leurs capacités biologiques pouvant être en relation avec l'âge de prélèvement des individus. L'aspect histologique, prolifératif, de viabilité ainsi que la réponse aux traitements semblent sensiblement meilleurs chez les CAE.

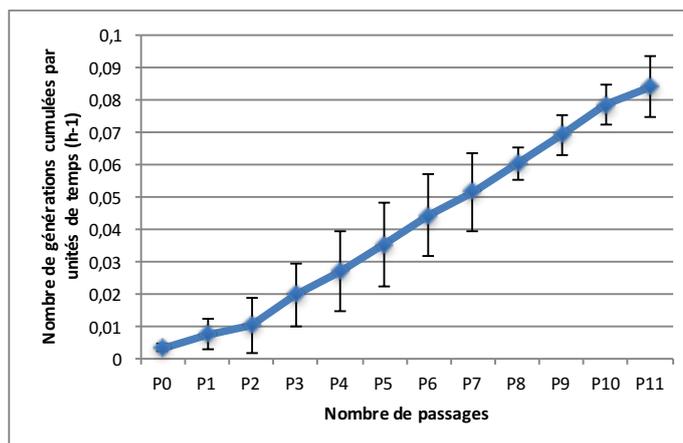
En pratique, les CAH sont en effet récupérés généralement de façon post-opératoire après pose d'une prothèse totale de genou ou de hanche. Les prélèvements à partir de têtes fémorales humaines sont ainsi de très mauvaise qualité biologique et présentent un phénotype chondrocytaire âgé ou arthrosique.

Le modèle équin pourrait ainsi représenter un modèle d'étude du cartilage sain par la possibilité d'obtention de chondrocytes de phénotype sain.

L'ensemble des prélèvements *post-mortem* a été réalisé sur des chevaux jeunes et sains. Ces prélèvements sont ainsi de bien meilleure qualité biologique. Malgré le fait que le cheval demeure notre sujet d'étude, en tant que sujet expérimental, il est plus simple d'avoir accès à des animaux n'ayant pas subi de forts dommages tissulaires au niveau du cartilage, à la différence de l'Homme où l'arthrose représente une prévalence de 17% de la population en France et l'une des premières causes de morbidité (Le Pen *et al.*, 2005).

L'étude du cartilage sain ou des chondrocytes non pathologiques nécessite de tirer partie du contexte de mortalité chez le cheval par la création de circuits de prélèvements et de réseaux dans les filières équines (viande chevaline, équarrissages, écoles vétérinaires nationales, centres de recherche). L'absence de réglementation sur les prélèvements *post-mortem* chez le cheval décédé rend accessible l'obtention de biopsies.

La mort d'un cheval est prise en charge par des systèmes d'équarrissages et autorise la prise de contact avec ce genre de structure. La mort fortuite du cheval n'est pas majoritairement



**Figure 93 : Evaluation de la prolifération des CAE sur 11 passages.**

Les CAE ont été amplifiés sur 11 passages et leur taux de prolifération a été calculé à chaque passage cellulaire. Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes des résultats +/- écart-types de 3 à 5 souches.

liée à l'âge contrairement à l'Homme. Il s'agit d'un animal fragile et notamment en ce qui concerne sa sensibilité aux troubles du système digestif qui représentent la première cause de mortalité équine. L'utilisation sportive du cheval représente également un important risque de mort prématurée du cheval sachant que la fracture équine est un motif principal d'euthanasie de l'animal (hors troubles du système digestif) (Mee *et al.*, 1998).

En plus de ce constat, il est à noter que la mort du poulain est relativement élevée chez le cheval durant les 7 premiers jours *post-partum*. Elle représenterait 3-4% des poulains nés chez le pur sang. Ce dernier modèle pourrait représenter un modèle d'étude du cartilage juvénile et notamment de la plaque de croissance, du chondrocyte hypertrophique et de son développement. Néanmoins, la mort du poulain est majoritairement liée à des causes infectieuses et nécessite une vigilance accrue sur la parasitologie des cellules isolées (Laugier, 2016).

## C. La MACI et ses limites chez le modèle équin.

Depuis 2008, des études sur la MACI chez le modèle équin ont débutées et montrent des résultats bénéfiques sur le traitement de lésions cartilagineuses (Frisbie *et al.*, 2008). Ces études sont réalisées à partir de chondrocytes amplifiés en culture puis ensemencés en biomatériau afin d'être implantés au niveau de la surface lésée du cartilage. Nos résultats ont montré que la période d'amplification avait une forte incidence sur le phénotype des CAE, faisant perdre leur faculté d'expression d'une MEC cartilagineuse. De ce fait, nous avons utilisé une stratégie de redifférenciation de ces CAE pour permettre l'expression *de novo* de cette MEC spécifique du cartilage.

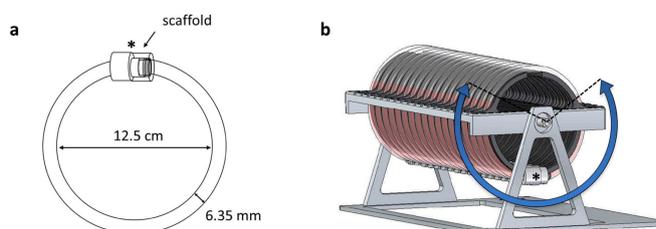
### 1. La stratégie de redifférenciation des CAE.

L'application de la stratégie de redifférenciation par l'utilisation de la BMP-2 et d'une stratégie d'interférence par l'ARN en culture 3D hypoxique s'est avérée efficace mais a soulevé quelques questionnements concernant sa faisabilité et le comportement des chondrocytes.

Premièrement, l'utilisation de BMP-2 humaine sous sa formule pharmaceutique (dibotermine alpha, InductOS) s'est montrée plus efficace que chez les CAH. Cette formule pharmaceutique permet de réduire les variabilités liées à la production de tels facteurs de croissance avec des conditions GMP, déjà établies dans le domaine pharmaceutique humain.

Dans un second temps, l'application de la stratégie d'interférence par l'ARN a permis d'inhiber l'expression du collagène de type I, permettant un gain dans la qualité hyaline de la MEC exprimée par les CAE. Néanmoins, des difficultés expérimentales à appliquer cette technique ont été perçues du fait de la forte induction du collagène de type I par la BMP-2. Cette réponse primaire des chondrocytes serait due au caractère ostéo-inducteur de la BMP-2.

D'autres travaux d'équipes scientifiques ont montré que l'utilisation combinée de deux milieux de culture d'amplification et de redifférenciation comportant respectivement des cocktails FGF-2/Insuline (FI), et BMP-2/Insuline/Triiodothyronine (BIT) permettraient un fort recouvrement de l'expression matricielle des chondrocytes après redifférenciation en structure 3D avec un fort *ratio Col2a1/Col1a1* (Claus *et al.*, 2012). Cette stratégie, combinée à notre stratégie d'interférence par l'ARN, pourrait améliorer la génération de substituts cartilagineux à partir de chondrocytes. Par ailleurs, l'utilisation d'une culture 3D dynamique à l'aide de bioréacteurs semble capable d'augmenter la qualité hyaline de la MEC exprimée par les chondrocytes redifférenciés, tout en réduisant l'intervention humaine (Figure 94) (Mayer *et al.*, 2016). La combinaison de telles techniques pourrait ainsi représenter une



**Figure 94 : Exemple de système de bioréacteur oscillateur.**

Ce type de bioréacteur est capable de mimer un microenvironnement par perfusion et par un système d'oscillation. Le biomatériau (« scaffold ») (a) est placé au milieu des unités d'oscillation (b) (Mayer *et al.*, 2016).

nouvelle alternative.

Les dernières avancées en biologie moléculaire et cellulaire ont permis de mettre en évidence l'efficacité de petits ARN non-codants : les « micro RNA » (miRNA). Ces ARN interférants sont capables, à l'instar des siRNA, d'inhiber l'expression de gènes spécifiques (Lee *et al.*, 1993). Néanmoins, ils possèdent des spectres d'action larges capables de réguler l'expression de centaines de gènes à la fois et ainsi influencer l'intégralité du phénotype cellulaire (Bartel, 2009). Au sein du cartilage, les miRNA-199a\* (Lin *et al.*, 2009), miRNA-145 (Yang *et al.*, 2011), miRNA-181b (Song *et al.*, 2013) et miRNA-23b (Ham *et al.*, 2014) ont respectivement une fonction importante dans la chondrogenèse induite par la BMP-2, l'activité de Sox-9, l'intégrité du cartilage et dans le maintien du phénotype chondrocytaire. Outre ces quatre miRNA cités, une multitude d'autres peuvent intervenir dans la physiologie ou les maladies liées au cartilage.

miRNA	Conservation
miRNA-199a	98 %
miRNA-145	100 %
miRNA-181b	81 %
miRNA-23b	100 %

Le rôle des miRNA a été généralisé à l'ensemble des organismes, y compris chez le cheval (Kim *et al.*, 2014). A l'heure actuelle, les banques de données *in silico* montrent une importante homologie entre les miRNA décrits chez l'Homme et les miRNA équins (exemple des quatre miRNA cités précédemment en [tableau 8](#)) (Kiezun *et al.*, 2012). Ainsi, les miRNA orthologues du cheval pourraient tout aussi bien avoir des implications dans la redifférenciation des chondrocytes et ainsi être utilisés à des fins de thérapie du cartilage.

**Tableau 8 : Conservation des séquences de miRNA entre l'Homme et le cheval.**

Le taux de conservation entre les séquences de miRNA a été déterminé *in silico* en utilisant la base de donnée « microRNAviewer ». Les résultats montrent une forte homologie entre les séquences des deux espèces (Kiezun *et al.*, 2012).

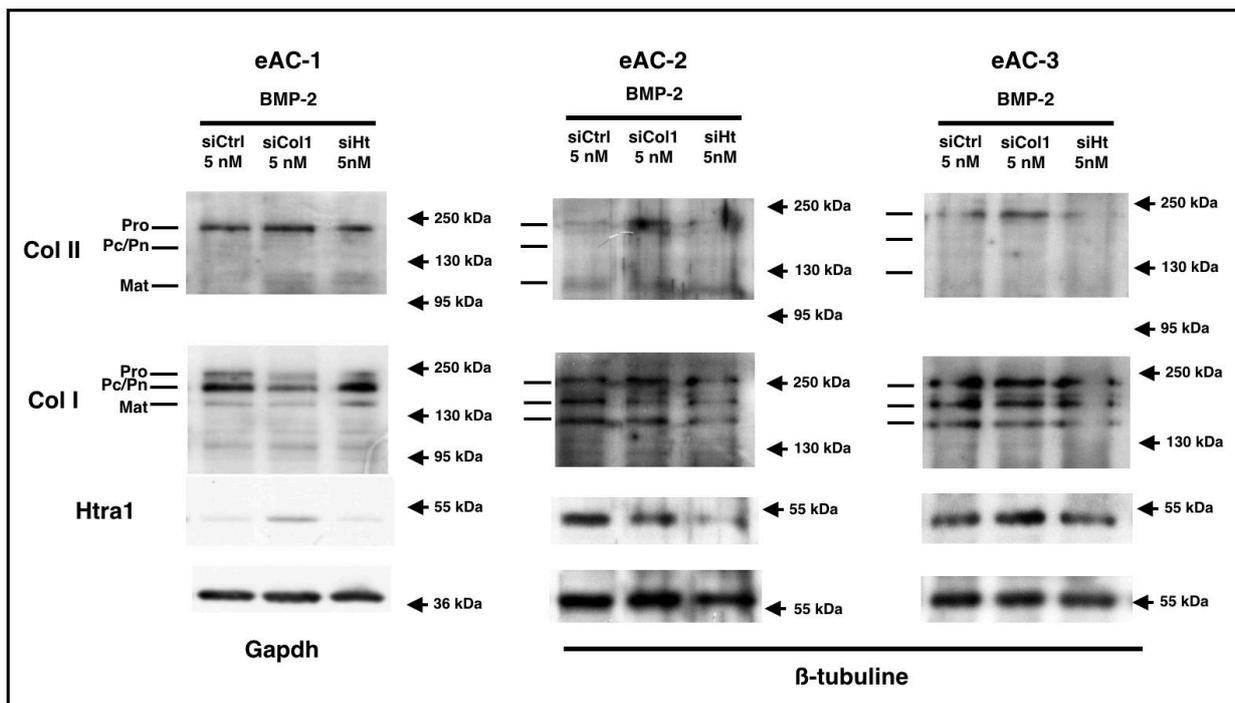
## 2. Le phénotype chondrocytaire : Le cas particulier d'Htra1.

D'après nos résultats, l'utilisation du siRNA *Htra1*, bien qu'il ait une bonne efficacité sur l'inhibition de l'expression de sa cible, n'a pas permis d'améliorer le phénotype chondrocytaire et la synthèse de MEC hyaline par le chondrocyte. Cette stratégie est d'autant plus critiquable que le traitement par la BMP-2 des chondrocytes suffit à lui seul à inhiber la synthèse protéique d'Htra1.

Les résultats des autres études sur la différenciation des CSM-GW, CSM-SPL ainsi que sur les CSM-MO dans l'unité BioTARGen, ont montré que chez le cheval, l'inhibition d'Htra1 par la BMP-2 se vérifiait pour ces types cellulaires (Branly *et al.*, 2017).

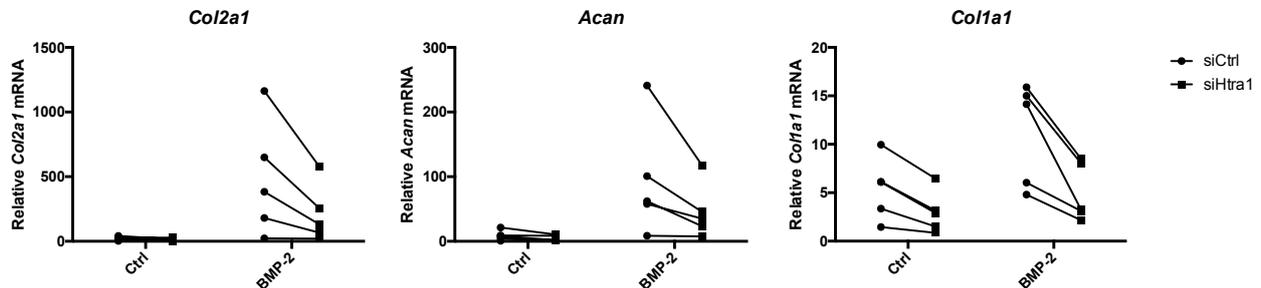
Ainsi, malgré une forte induction d'Htra1 lors de la culture en 3D, une stratégie de redifférenciation utilisant la BMP-2 permettrait de s'affranchir de son effet délétère sur le cartilage et le chondrocyte. Ces résultats n'ont pas été montrés par nos travaux précédents chez l'Homme, où l'expression d'Htra1 était induite par le traitement par la BMP-2. De plus, l'action d'un siRNA *HTRA1* a montré, chez les CAH, une amélioration du phénotype chondrocytaire ainsi qu'une augmentation de la quantité de collagène de type II exprimé (Ollitrault *et al.*, 2015).

Nos expériences ont montré d'autres ambiguïtés dans l'inhibition d'Htra1 et dans la réelle implication de cette protéase à sérine dans le phénotype chondrocytaire. Même si l'effet reste faible, nous avons constaté que pour la majorité de nos souches de CAE traitées, l'utilisation du siRNA *Htra1* faisait perdre une partie de l'effet de la BMP-2 sur la synthèse de MEC au niveau protéique (Figure 95). Au niveau des ARN, l'effet de l'inhibition d'Htra1 sur la réponse des chondrocytes vis-à-vis de la BMP-2 a pu être vérifié indépendamment sur 5 expériences (Figure 96). Cette perte de l'effet BMP-2 se matérialise par une diminution de l'induction des taux d'ARNm de *Col2a1*, *Acan* et *Col1a1*. Néanmoins, les moyennes de ces résultats n'ont pas montré d'effets significatifs. L'absence de significativité semble due à une trop grande hétérogénéité d'expression des marqueurs entre les souches pour un effet du siRNA *Htra1* beaucoup trop modéré.



**Figure 95 : Inhibition de l'effet de la BMP-2 par le siRNA *Htra1* sur les CAE cultivés en 3D - hypoxie durant 7 jours.**

Sous l'effet de la transfection du siRNA *Htra1*, il peut être constaté une inhibition de l'induction des collagènes de type II et de type I provoquée par le traitement par la BMP-2. SiCtrl : siRNA contrôle; Si Col1: siRNA *Col1a1*; siHt : siRNA *Htra1*.



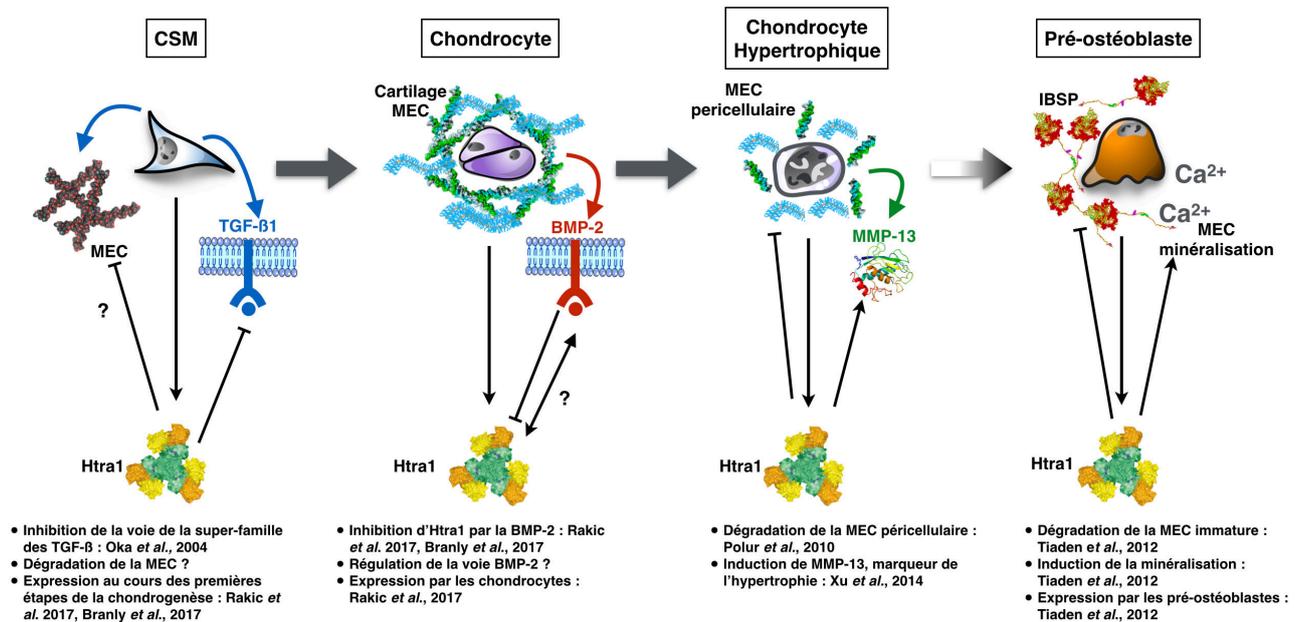
**Figure 96 : Inhibition de l'effet de la BMP-2 au niveau des taux de transcrits par le siRNA *Htra1* sur les chondrocytes articulaires équins cultivés en 3D - hypoxie durant 7 jours.**

Sous l'effet de la transfection du siRNA *Htra1*, l'augmentation des taux de *Col2a1*, *Acan* et *Col1a1* provoquée par le traitement BMP-2 est prévenue.

Se pose alors la question du rôle d'*Htra1* dans les CAE. Pourquoi cette dernière est-elle sur-exprimée par le chondrocyte cultivé en 3D? Pourquoi est-elle inhibée par la BMP-2? Pourquoi une inhibition exogène d'*Htra1* pourrait induire une perte de l'effet BMP-2?

Depuis peu, *Htra1* n'est pas décrite comme un simple acteur catabolique mais comme un intervenant majeur dans la définition des lignages cellulaires. C'est notamment le cas pour la différenciation ostéoblastique (Li & Zhang, 2015; Tiaden *et al.*, 2012) et ostéoclastique (Wu *et al.*, 2014). Plus récemment, il a été montré qu'*Htra1* avait un rôle dans l'inhibition de la différenciation adipogénique à partir de CSM (Tiaden *et al.*, 2016). Dans nos expériences, la rapide induction d'*Htra1* en 3D n'a pas été observée uniquement chez les chondrocytes et a été vérifiée chez les CSM-SPL et CSM-MO au cours de la différenciation chondrocytaire. L'inhibition d'*Htra1* par la BMP-2 a également été observée dans ces types cellulaires.

Nous supposons que sa forte induction au cours des premières étapes de différenciation cellulaire en chondrocytes implique un rôle dans ces dernières. Nous pensons également qu'elle pourrait être impliquée dans le remodelage matriciel de la MEC issue des CSM indifférenciées avant la mise en place de la MEC cartilagineuse. Sa relation avec l'activité de la BMP-2 laisse entendre une implication dans la chondrogenèse au cours des premiers stades du développement du chondrocyte, sa maturation ainsi que dans sa différenciation terminale. Nous pensons ainsi qu'Htra1 pourrait être un médiateur de la différenciation cellulaire des CSM dans les lignages ostéo-chondraux (Figure 97).



**Figure 97 : Représentation schématique de l'implication d'Htra1 dans les lignages cellulaires ostéo-chondraux.** D'après nos résultats et la littérature, il semblerait qu'Htra1 intervienne à plusieurs niveaux dans le lignage ostéo-chondrogénique. Cette protéase à sérine semble être impliquée dans l'initiation de la chondrogenèse, dans le mise en place et le maintien du phénotype chondrocytaire, l'hypertrophie du chondrocyte et la maturation de l'ostéoblaste. Son rôle semble visible au niveau matriciel mais également cellulaire.

### 3. Une persistance des limites d'application de la MACI à partir des chondrocytes.

Malgré l'amélioration du procédé de synthèse *in vitro* d'un substitut cartilagineux à partir des chondrocytes dans nos études, des limites inhérentes au type cellulaire et à la méthode persistent.

La dépendance vis-à-vis de l'obtention de chondrocytes matures et spécialisés implique une forte contrainte concernant le prélèvement de tissu. Malgré les avantages à travailler sur le modèle équin, dans le cadre de la recherche, ces prélèvements nécessitent systématiquement la mort de l'animal. Dans le cadre de l'application, ce prélèvement nécessitera une lourde intervention chirurgicale et donc la mobilisation d'une main d'oeuvre dédiée ainsi que de possibles dommages à l'articulation liés à l'intervention. A partir d'une simple biopsie, la quantité de cartilage récupérée peut être limitante et ainsi nécessiter une période d'amplification plus longue et limiter les possibilités de « banking » cellulaire. Cette période d'amplification aboutira inexorablement à la perte du phénotype chondrocytaire et une limitation dans l'application d'un processus de redifférenciation.

Pour contourner ce problème, un effort peut être réalisé sur l'isolement du chondrocyte en réduisant le temps des digestions enzymatiques pour conserver l'intégrité de la structure cellulaire (Lau *et al.*, 2015). Des stratégies visant à limiter leur dédifférenciation au cours de l'amplification

devront être employées, comme par exemple l'incubation en présence de FGF-2 et d'insuline lors de la phase de multiplication (Claus *et al.*, 2010).

Chez l'Homme, les essais cliniques de TCA et de MACI montrent des résultats encourageants sur le moyen terme. Néanmoins, ces techniques étant récentes, et si l'on considère les enjeux thérapeutiques de l'arthrose, le recul n'est pas encore assez suffisant pour montrer la supériorité de la MACI face à la TCA (Goyal *et al.*, 2013). L'investissement financier et humain nécessaires à la mise en place de stratégies de redifférenciation pré-implantatoires semblent à l'heure actuelle trop importants par rapport au gain thérapeutique potentiel.

TABLE 2  
Typical Cost Associated With Autologous Chondrocyte Implantation (ACI)

Item	Cost, US\$
Initial consult	231
Follow-up visits	345
Surgical costs (including surgeon, anesthesia, and hospital fees for both the initial knee arthroscopy and biopsy as well as the ACI graft procedure)	30,809
ACI (cell shipping and processing)	32,492
Physical therapy	1875
Durable medical equipment	1000
Total	66,752

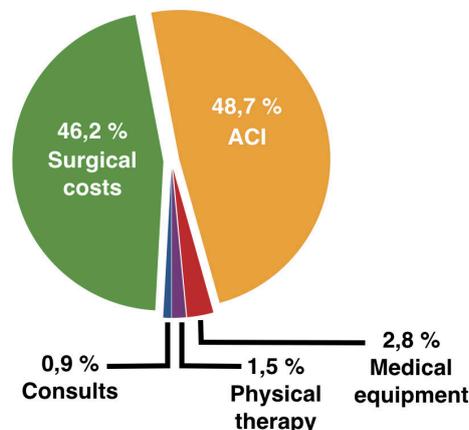


Figure 98 : Estimation du coût thérapeutique de la TCA.

Le coût thérapeutique de la TCA est de 66 752 \$ contre 66 939,50 \$ pour la MACI (Samuelson & Brown, 2012).

Chez l'Homme, la troisième génération de MACI telle qu'elle est pratiquée à l'heure actuelle (biopsie, isolement des chondrocytes, amplification et implantation avec biomatériaux) a un coût d'environ 70 000 \$ par intervention (66 939,50 \$ en 2012), dont presque 50 % correspondent au coût du procédé *ex vivo* et les 50 % autres au coût des interventions (Samuelson & Brown, 2012) (Figure 98). Elles sont qualifiées comme étant des thérapies à faible coût au regard de son coût par année de vie pondérée sur la qualité (« quality-adjusted life year » QALY) qui est de 9 243 \$/QALY (Figure 99). Ce coût modéré par rapport aux autres thérapies de chirurgie orthopédique est dû à une amélioration de la qualité de vie des patients sur plusieurs années.

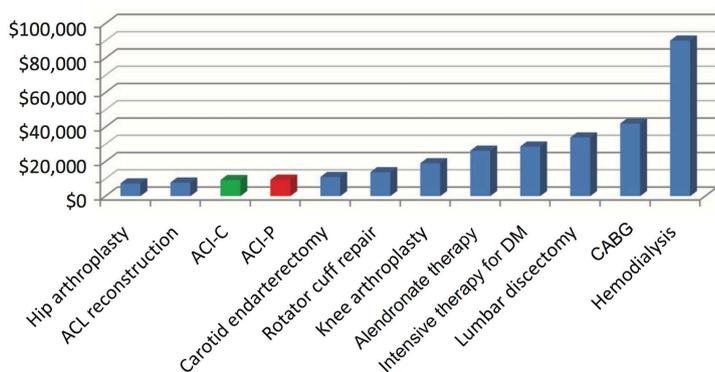


Figure 99 : Estimation du coût thérapeutique de la TCA et de la MACI en coût par QALY.

Le coût par QALY de la TCA et de la MACI les place favorablement par rapport aux autres thérapies utilisées en routine en chirurgie orthopédique (Samuelson & Brown, 2012).

Si l'amélioration de la MACI actuelle passe par une optimisation du procédé de fabrication d'un substitut cartilagineux en culture cellulaire, le coût de fabrication devrait sensiblement augmenter. Ainsi, une augmentation significative du coût total de cette thérapie pourrait être observée. Cette dernière devrait ainsi être accompagnée d'un important bénéfice thérapeutique afin de garantir la compétitivité de cette thérapie face aux générations actuelles de MACI et face aux autres thérapies.

## 4. Les limites d'application de la MACI chez le cheval.

C'est en effet la notion du coût thérapeutique de la MACI qui représente la plus grande limite à son application dans le modèle équin.

Chez le cheval, l'estimation du coût de cette thérapie peut être réalisée. Pour autant, il est possible que ce coût diminue pour le modèle animal du fait de démarches qualité et de conditions GMP plus flexibles que chez l'Homme.

Néanmoins, chez le modèle équin, la notion financière et l'intérêt thérapeutique de techniques comme la MACI ne sont pas les mêmes que chez l'Homme :

- Du fait des difficultés à apprécier la qualité de vie de l'animal, l'efficacité thérapeutique est difficile à estimer. Par exemple, la notion de qualité de vie de l'animal sportif ou de compagnie n'est pas la même du point de vue du propriétaire, de l'entraîneur ou encore du vétérinaire ;

- La valeur de l'animal entre en ligne de compte, qu'elle soit sentimentale ou financière. Ce deuxième paramètre peut faire varier sensiblement la notion d'efficacité thérapeutique perçue chez le modèle équin et les moyens mis en jeu dans ces thérapies ;

- Comme nous l'avons vu précédemment, la notion de durabilité thérapeutique peut également faire varier l'intérêt d'utiliser des thérapies de type MACI ;

- L'écart sensible entre les coûts des thérapies palliatives et de la MACI rend difficile l'application de cette dernière chez le modèle équin si l'efficacité thérapeutique n'est pas sensiblement meilleure.

Ainsi, l'influence de tous ces paramètres (non-exhaustifs) rend difficile l'appréciation du bénéfice de la MACI chez le cheval.

## IV. Les cellules souches en MACI.

### A. Les avantages dans l'industrialisation des CSM en tant que cellules médicaments.

Parmi les limites de l'utilisation des chondrocytes précédemment citées pour l'application de la MACI, certaines peuvent être levées par l'utilisation des CSM. L'utilisation d'un type cellulaire alternatif tels que les CSM pourrait permettre de s'affranchir du prélèvement lourd et invasif du cartilage sur les zones non portantes. L'utilisation de CSM issues de cordon ombilical, à la différence des CSM adultes, permettrait de faciliter d'autant plus le prélèvement, ce dernier étant non invasif et n'interférant pas avec la prise en charge de la naissance ou poulinage.

La capacité de prolifération des CSM pourrait également permettre de



Figure 100 : Photographie illustrant la mise en place d'une banque d'échantillons biologiques ou « biobanking ».

diminuer les temps de production et améliorer le rendement pour la fabrication du dispositif de MACI. La possibilité de culture en « scale-up » ainsi que la cryoconservation des cellules permettraient une possibilité de « banking » étendue ainsi qu'une mise en place de conditions GMP facilitées (Figure 100).

Ainsi, si l'on considère les passages cellulaires pour lesquels le taux de prolifération des cellules est relativement constant (P2-P7 pour les CSM-SPL, P3-P7 pour les CSM-GW, CSM-TA et eAC), les moyennes des constantes  $k$  de générations cellulaires par unités de temps (h) sont respectivement de 0,011, 0,016 et 0,017 génération.h<sup>-1</sup> pour les CSM-SPL, CSM-GW et CSM-TA alors qu'elle n'est seulement que de 0,009 génération.h<sup>-1</sup> pour les eAC. Ainsi, à titre d'exemple, si l'on fixe ces chiffres pour avoir une idée du temps nécessaire afin d'obtenir 1,28 millions de cellules (nombre de cellules approximatif minimal pour générer un patch cartilagineux de 10x2 mm) à partir de 10 000 cellules initiales (soit 7 générations nécessaires), il faut respectivement 27 jours, 18 jours et 17 jours de culture pour les CSM-SPL, CSM-GW et CSM-TA contre 32 jours pour les eAC.

De plus, les CSM sont plus naïves que les cellules somatiques adultes d'un point de vue immunitaire. Cette particularité pourrait étendre grandement les possibilités thérapeutiques de ces dernières en envisageant la possibilité de greffes allogéniques. Ainsi, les CSM issues d'un même cordon pourraient servir à traiter plusieurs sujets. De surcroît, il a été montré que la barrière fœto-maternelle limitait la propagation de certains pathogènes entre la mère et le nouveau-né. Il a notamment été montré que les cellules hématopoïétiques issues de sang de cordon présentaient une infectiosité moindre pour le cytomégalovirus et le virus Epstein-Barr face aux cellules de MO (Behzad-Behbahani *et al.*, 2005). Même si la réfringence face au transfert de pathogènes est relative au niveau de la barrière fœto-maternelle, les cellules de cordon pourraient représenter un avantage si l'on considère la parasitologie, face aux cellules adultes.

Ces avantages en terme de production cellulaire, flexibilité de prélèvement et de gestion des stocks représentent une grande opportunité pour l'industrialisation des CSM. Néanmoins, dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage, il est nécessaire d'appréhender la multipotence des CSM, aspect critique dans l'obtention d'un substitut cartilagineux à vocation d'implantation.

## **B. Le potentiel chondrogénique des sources de CSM.**

La deuxième étude de ce projet de recherche s'est concentrée sur ce potentiel de différenciation en chondrocytes chez les deux types de CSM néonatales. Dans l'éventualité d'une utilisation de CSM pour la génération de cartilage *in vitro* pour la MACI, il est en effet indispensable de vérifier et d'évaluer le potentiel de différenciation chondrogénique de ces CSM. Ces données pourraient aider dans l'appréciation du potentiel thérapeutique des CSM en médecine régénérative du cartilage.

Des études comparatives chez les CSM-MO et les CSM-TA ont montré des prédispositions plus importantes des CSM-MO à générer des chondrocytes. Malgré une expression similaire entre les marqueurs de surface ainsi qu'un potentiel ostéogénique et adipogénique comparables (Jaiswal *et al.*, 2000), une absence de potentiel chondrogénique a été constatée chez les CSM-TA (Sakaguchi *et al.*, 2005). Plusieurs années plus tard, un étude a permis de mettre en évidence une altération de l'expression des récepteurs de la famille des TGF- $\beta$  et de la BMP chez les CSM-TA. Un traitement par la BMP-6 a ainsi permis d'augmenter la capacité de réponse des cellules aux facteurs chondrogéniques et ainsi permettre une différenciation en chondrocytes efficace chez les CSM-TA. Néanmoins, les CSM-MO sont encore considérées comme étant le « gold standard » des CSM et notamment en médecine régénérative du cartilage.

Néanmoins, un potentiel chondrogénique supérieur à celui des CSM-MO semble être retrouvé chez les CSM issues de la membrane synoviale. Ces dernières, isolées par biopsie de la synovie, sont capables d'exprimer, sous l'effet de facteurs chondrogéniques (comme le TGF- $\beta$ 3 et

la BMP-2), une plus abondante MEC de type cartilagineuse que les CSM-MO (Shirasawa *et al.*, 2006).

Comme nous l'avons vu en introduction, un travail conséquent en bibliographie a été réalisé afin d'avoir une idée du potentiel chondrogénique des CSM-SPL et CSM-GW. Pour autant, le peu de publications au sujet des CSM-GW et les résultats contradictoires de différentes études menées chez ces dernières ont montré des ambiguïtés dans la pertinence de leur utilisation en ingénierie tissulaire du cartilage (Tableau 9).

Publication	Potentiel chondrogénique des CSM-GW	Conclusion sur le potentiel chondrogénique des CSM-GW
Liu <i>et al.</i> , 2014	+	Utilisation appropriée à l'ingénierie tissulaire du cartilage.
Arufe <i>et al.</i> , 2011	+	Fort potentiel chondrogénique.
Reppel <i>et al.</i> , 2015	+	Différenciation en chondrocyte sans ajout de facteurs chondrogéniques.
Chen <i>et al.</i> , 2013	+	Fort potentiel chondrogénique.
Fong <i>et al.</i> , 2011	+	Source attractive pour la chondrogenèse.
Aleksander-Konert <i>et al.</i> , 2016	+	Potentiel chondrogénique prometteur pour l'ingénierie tissulaire du cartilage.
Tanthisong <i>et al.</i> , 2017	+	Bon modèle d'étude de la chondrogenèse.
Nirmal & Nair, 2013	+	Fort potentiel chondrogénique.
Burk <i>et al.</i> , 2013	+/-	Meilleur potentiel chondrogénique chez les CSM-SPL.
Hildner <i>et al.</i> , 2010	+/-	Meilleur potentiel chondrogénique chez les CSM-TA.
Beeravolu <i>et al.</i> , 2016	+/-	Potentiel chondrogénique mais plus faible que dans d'autres régions du cordon.
Wang <i>et al.</i> , 2009	+/-	Utilisable pour la génération d'un fibrocartilage.
Bailey <i>et al.</i> , 2007	+/-	Utilisable pour la génération d'un fibrocartilage.
Lovati <i>et al.</i> , 2011	-	Potentiel chondrogénique limité.
Islam <i>et al.</i> , 2016	-	Faible potentiel chondrogénique.

**Tableau 9 : Analyse bibliographique du potentiel chondrogénique des CSM-GW.**

La littérature sur le potentiel chondrogénique des CSM-GW est controversée du fait des ambiguïtés et des contradictions des résultats entre les études. Sur 15 études, seulement deux insistent sur les limites de la chondrogenèse chez les CSM-GW.

Par l'utilisation d'un protocole de différenciation des CSM en chondrocyte standardisé, développé au laboratoire, une comparaison rigoureuse du potentiel chondrogénique entre les CSM-SPL et les CSM-GW a été réalisée.

Les résultats ont clairement montré une réelle supériorité des CSM-SPL concernant leur potentiel de différenciation en chondrocytes par rapport aux CSM-GW. Ces dernières semblent capables d'exprimer des marqueurs chondrocytaires, mais sont incapables d'exprimer une MEC cartilagineuse hyaline de qualité. Le tissu semble ainsi fibrotique et présente une très faible proportion de MEC. A l'inverse, les CSM-SPL ont montré un fort potentiel chondrogénique se matérialisant par une forte expression des marqueurs spécifiques du cartilage au niveau transcriptionnel et protéique ainsi qu'une importante production de MEC.

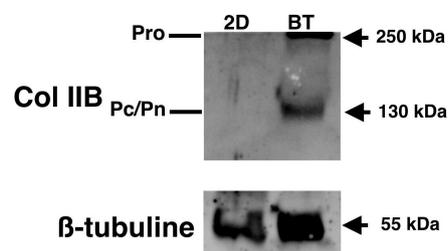
## C. Le potentiel chondrogénique des CSM-SPL.

Nos résultats ont permis de réaliser la preuve de concept de la différenciation des CSM-SPL chez le modèle équin en utilisant un modèle de culture 3D en éponge de collagène de types I/III ainsi qu'un traitement par le TGF- $\beta$ 1 et la BMP-2.

De ce fait, ces résultats confirment ceux obtenus précédemment chez le modèle humain (Gomez-Leduc *et al.*, 2016). De surcroît, d'après Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2011), les CSM-SPL présenteraient un potentiel chondrogénique supérieur aux CSM-MO et CSM-TA. Durant nos expériences, la forte synthèse de MEC par les CSM-SPL a permis d'obtenir un substitut cartilagineux à l'aspect nacré et opaque d'un point de vue macroscopique. Après la chondrogenèse, les CSM-SPL ont exprimé de façon abondante les marqueurs spécifiques du cartilage et notamment le collagène de type II. De façon surprenante, l'expression des collagènes par les CSM-SPL différenciées en chondrocytes s'est avérée tellement forte que l'utilisation de très faibles quantités d'extraits protéiques en « western-blot » permet de les mettre en évidence.

La différenciation chondrogénique semble aboutir à la formation de chondrocytes matures. En effet, il a pu être constaté que la MEC produite par les CSM-SPL différenciées était composée de collagène de type IIB, témoignant de la commutation de l'isoforme IIA du collagène de type II total en cette forme spécifique d'une MEC hyaline mature (Figure 101). Néanmoins, cette matrice présente des formes matures de collagène de type II total (y compris de type IIB) en faible proportion, témoignant d'un processus de maturation en cours. Des cultures plus longues (42 jours) pourraient permettre d'obtenir une MEC avec des proportions de biomarqueurs matures plus importantes.

Conformément aux résultats d'expression génique, les CSM-SPL semblent ne pas s'orienter vers l'hypertrophie. Aucune expression du collagène de type X n'a pu être mise en évidence. L'expression de *Mmp13*, observable pour les échantillons ICM, semble inhibée lors de la différenciation et n'a été observée en taux relativement importants que pour un prélèvement. Malgré une forte expression d'*Alpl* au niveau des taux d'ARNm, les observations histologiques ne montrent que très peu de minéralisation du substitut biologique. Néanmoins, une surexpression des taux d'ARNm de *Spp1* et de *Bglap* a pu être observée. Cette expression semble corrélée avec l'induction de *Runx2* au niveau transcriptionnel, témoignant d'une stabilisation perfectible des CSM dans le phénotype chondrogénique mature.



**Figure 101 : Expression du collagène de type IIB par les CSM-SPL différenciées en chondrocytes.**

Les cellules ont été cultivées en éponge de collagène de types I/III en présence de TGF- $\beta$ 1/BMP-2 durant 28 jours. Les cellules expriment alors les formes pro-collagène et Pc/Pn du collagène de type IIB (5  $\mu$ g d'extraits protéiques ont été utilisés pour la migration en « western-blot »).

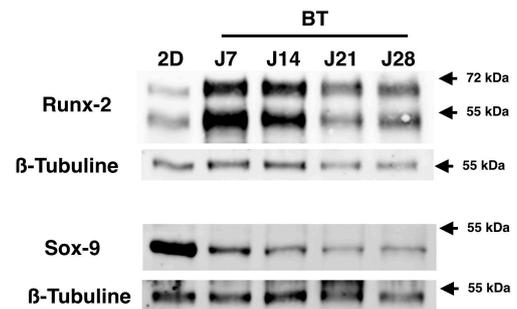
Cette expression transcriptionnelle de *Runx2* est répercutée au niveau protéique par une expression *de novo* de ce facteur de transcription impliqué dans la différenciation ostéoblastique et dans l'hypertrophie (Lengner *et al.*, 2002). Malgré l'absence d'hypertrophie de nos cellules, nous pensons que l'expression de Runx-2 peut être responsable de la forte composante fibrotique au sein du « patch », illustrée par la synthèse du collagène de type I. En effet, Runx-2 (ou Cbfa1) est un facteur de transcription se liant spécifiquement à des séquences consensus au niveau des promoteurs des gènes *Col1a1* et *Col1a2*. Il joue ainsi un rôle dans l'induction de l'expression du collagène de type I (Kern *et al.*, 2001). Cet analogue structural du collagène de type II est fortement exprimé lors de la différenciation chondrogénique des CSM-SPL. Le collagène de type I est exprimé dès les premiers stades de la différenciation chondrogénique et une maturation de celui-ci semble être observée tout le long de la culture. Néanmoins, son expression n'est pas augmentée entre J14 et J28.

Nous avons constaté une forte augmentation des taux d'ARNm de *Sox9* au cours de la différenciation chondrogénique des CSM-SPL. Néanmoins, à la différence de l'étude de Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2011), nous n'avons pas observé d'induction des taux protéiques de Sox-9 au

cours de la différenciation. En effet, il semble que cette dernière soit réprimée par le traitement BT durant les premiers jours de culture (Figure 102). Au vu de la forte induction d'une MEC cartilagineuse par les CSM-SPL, nous pensons que la capacité de liaison de Sox-9 à ses amplificateurs spécifiques sur les promoteurs/introns de ses gènes cibles est conservée. Pour autant, il semble exister un rétro-contrôle post-transcriptionnel de l'expression de Sox-9 au cours de la différenciation. Une étude de Tew et Clegg en 2011 a montré qu'il existait une corrélation négative entre le taux d'induction de l'ARNm Sox9 et son « turn-over » au cours de la différenciation chondrogénique de CSM-MO et chez les chondrocytes de souris (Tew & Clegg, 2011). De ce fait, la demi-vie des ARNm de Sox9 diminue au cours de la différenciation chondrogénique et pourrait impliquer une perte de la quantité absolue de protéine Sox-9 au sein de nos cellules.

Néanmoins, très peu d'études sur le suivi de cette protéine *in vitro* ont été réalisées. Ainsi, pour vérifier nos hypothèses, des expériences de retardement sur gel ou de marquages *in situ* sont nécessaires afin de vérifier si l'activité de Sox-9, ou sa translocation dans le noyau au cours de la chondrogenèse des CSM-SPL, sont indépendantes de son induction. Il est néanmoins nécessaire de rappeler que Sox-9 ne peut induire l'expression des biomarqueurs du cartilage indépendamment de l'activité de L-Sox-5 et de Sox-6 (Lefebvre *et al.*, 2001).

Les deux facteurs de transcription Sox-9 et Runx-2 ont un rôle ambivalent dans la différenciation chondrogénique et ostéogénique. Lors de l'ossification endochondrale, les deux acteurs majeurs de différenciation fonctionnent de façon indépendante, orientant les progéniteurs vers la chondrogenèse ou l'ostéogenèse au cours du développement. Le seul moment où une co-

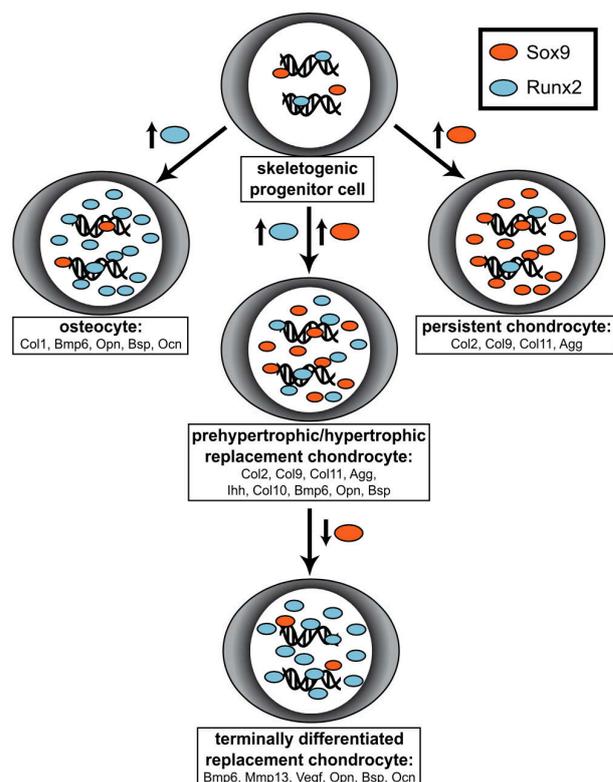


**Figure 102 : Expression des facteurs de transcription Runx-2 et Sox-9 au cours de la différenciation chondrogénique des CSM-SPL.**

Les cellules ont été cultivées en éponge de collagène de types I/III en présence de TGF-β1/BMP-2 durant 28 jours. L'expression de Runx-2 est importante au cours de la différenciation chondrogénique tandis que celle de Sox-9 est inhibée (2,5 μg d'extraits protéiques ont été utilisés pour la migration en « western-blot »).

**Figure 103 : Représentation schématique d'un modèle de différenciation ostéochondrale à 3 lignages.**

La balance entre Sox-9 et Runx-2 au cours de la différenciation des progéniteurs squelettiques orienterait les cellules vers 3 types de lignages cellulaires durant le phénomène de chondrogenèse et d'ossification endochondrale (Eames *et al.*, 2004).



expression peut être observée, c'est lors de l'hypertrophie du chondrocyte (Komori, 2011). Nous n'avons néanmoins pas observé d'hypertrophie, ou de signe d'ostéogenèse, au cours de nos expérimentations. En 2004, Eames et ses collaborateurs proposent un modèle de différenciation ostéochondral à 3 lignages dépendants de l'expression de Runx-2 et Sox-9 (Eames *et al.*, 2004) (Figure 103). Selon cette équipe, lors de l'induction de la chondrogenèse, des progéniteurs co-exprimant Runx-2 et Sox-9 désignés « terminally differentiated replacement chondrocytes », représenteraient un type cellulaire de transition vers la mise en place de l'os sous-chondral au cours du développement. D'autre part, au cours de la réparation osseuse, il peut être observé une formation d'un cal osseux à partir de progéniteurs squelettiques. Ce cal osseux exprime une forte quantité de la collagène de type I et d'Htra1 et joue un rôle de support de l'ossification endochondrale (Tiaden *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014). Il est possible que les chondrocytes obtenus par différenciation des CSM-SPL puissent être assimilés aux chondrocytes présents dans le cal osseux. De ce fait, ils seraient voués à être remplacés. Ainsi, il est indéniable que notre protocole de différenciation doit encore pouvoir être amélioré.

## **D. L'hypoxie : un facteur qui influence la différenciation chondrogénique des CSM-SPL.**

L'hypoxie joue un rôle prépondérant dans le développement et le maintien du phénotype chondrocytaire (Kanichai *et al.*, 2008). Nous avons précédemment montré qu'elle était impliquée dans la qualité de la MEC exprimée par les CSM-MO et qu'elle jouerait un rôle dans l'inhibition de la différenciation terminale des chondrocytes. Aucune étude n'a à ce jour été réalisée sur l'implication de l'hypoxie sur la différenciation chondrogénique des CSM-SPL. Nos travaux concernant le rôle de l'hypoxie sur les CSM-SPL n'ont pas pu permettre de confirmer les données de la littérature observées chez les autres sources de CSM.

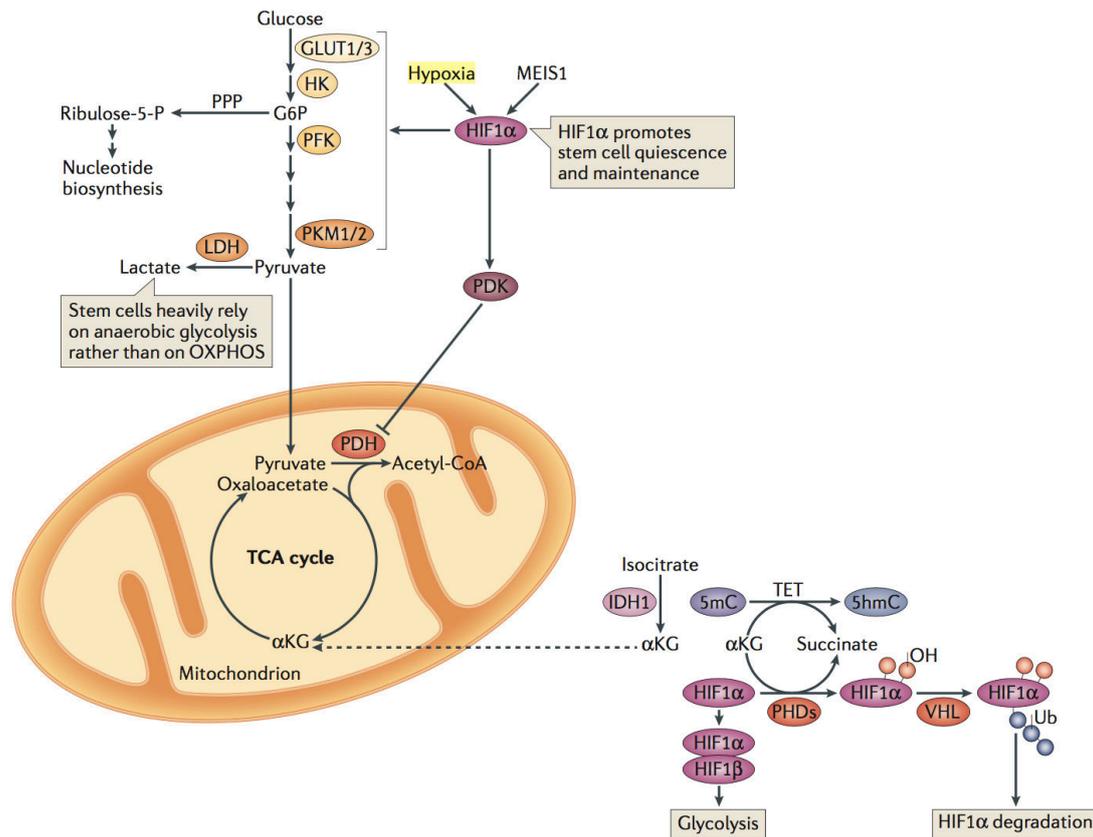
L'hypoxie semble influencer le phénotype des CSM à toutes les étapes de la culture, et ceci en présence ou non de facteurs chondrogéniques. Dans ce dernier cas, il semblerait que l'hypoxie favoriserait le phénotype chondrocytaire par une augmentation de l'expression des taux d'ARNm de *Sox9* ainsi que du *ratio Col2a1/Col1a1* (par le biais d'une diminution de l'expression de *Col1a1*). Néanmoins, du fait de la très faible production de MEC par les CSM-SPL cultivées en ICM, les résultats n'ont pas pu être vérifiés au niveau protéique.

Concernant la différenciation chondrogénique, l'hypoxie semble réduire la production de MEC par la diminution à la fois de la quantité de collagène de type II, mais également de type I et de la proportion de MEC sulfatée.

Nous supposons que la majorité des effets observables de l'hypoxie sur nos cellules au cours de la différenciation sont dus à un important changement métabolique de ces dernières. Nous pensons que ce dernier s'opère en vue d'une adaptation des CSM à leurs nouvelles conditions oxiques au détriment de l'activité anabolique matricielle.

En effet, il a été montré qu'au stade indifférencié, les CSM sont capables de survivre en hypoxie et subissent une commutation de leur activité métabolique vers une activité glycolytique. Cet événement se traduit par une augmentation de leur consommation de glucose et de leur production du lactate (Lavrentieva *et al.*, 2010, Ito & Suda, 2014) (Figure 104). Il a notamment été montré que l'hypoxie favorisait la survie cellulaire des CSM et réduisait globalement leur métabolisme et leur prolifération. De surcroît, les différenciations ostéogénique et adipogénique sont inhibées lorsqu'elles sont réalisées en conditions hypoxiques (Beegle *et al.*, 2015). Ces dernières études pourraient ainsi être rapprochées de nos résultats concernant la différenciation chondrogénique.

Malgré un rôle potentiel de l'hypoxie dans la différenciation chondrogénique durant la période de culture de 28 jours de nos cellules, il est possible que l'adaptation métabolique des CSM-SPL en cours de différenciation ralentisse cette dernière ou la production de MEC par ces



**Figure 104 : Représentation schématique de l'implication de l'hypoxie dans le métabolisme des cellules souches.**

Au sein des niches hématopoïétiques, les cellules souches évoluent dans un environnement hypoxique. Ce dernier favorise le métabolisme glucidique et la production de lactate. Cette activité métabolique régule à la fois la prolifération des cellules, la maintenance du pool de cellules souches et leur engagement dans les lignages cellulaires spécialisés (Ito & Suda *et al.*, 2014).

CSM-SPL. Néanmoins, l'implication de l'hypoxie dans la différenciation cellulaire est difficile à cerner du fait de la multitude de voies de signalisation ou métaboliques impactées par une privation d'oxygène. Parmi les nombreux exemples, la voie « sonic hedgehog » (SHH) impliquée dans la prolifération chondrocytaire (Long *et al.*, 2001) est étroitement liée au métabolisme du cholestérol. Une modulation de la concentration de cholestérol par l'hypoxie, telle qu'elle est observable au niveau musculaire (Tsukitani *et al.*, 1984) pourrait ainsi influencer la voie SHH et moduler ainsi le devenir du chondrocyte en cours de formation.

D'autre part, pourquoi les CSM-SPL présenteraient une réponse différente de celle décrite chez les CSM-MO dans la littérature? Cela pourrait peut être provenir du microenvironnement natif différent entre les deux types de CSM. La pression partielle normale exercée par l'oxygène dissout dans le sang artériel est comprise entre 73 et 100 mm de mercure et la saturation en oxygène de l'hémoglobine est comprise entre 95 % et 100 %. Malgré le fait que ces données ne représentent pas l'oxygène moléculaire disponible pour les cellules présentes dans le plasma, les CSM-SPL évoluent dans un microenvironnement où le taux d'oxygène est supérieur aux niches hématopoïétiques (Simon & Keith, 2008) (Figure 105). Afin de comprendre les enjeux de ces différences de microenvironnements natifs entre ces deux sources de CSM, il est nécessaire de rapprocher les conditions oxiques avec le métabolisme cellulaire et la composante épigénétique des cellules.

L'acétyl-coenzyme-A est une molécule à la frontière entre la glycolyse cellulaire et le cycle de Krebs. Elle représente un régulateur clef de l'acétylation des histones impliquées dans la régulation épigénétique des gènes des cellules. Une modification du catabolisme de l'acétyl-coenzyme-A dans les conditions hypoxiques pourrait ainsi impacter le profil épigénétique des

cellules (Ito & Suda, 2014). L'hypoxie influence grandement le programme génétique et épigénétique des cellules. De ce fait, le microenvironnement natif des CSM pourrait influencer différemment leur comportement *in vitro/ex vivo* vis-à-vis d'un nouveau microenvironnement synthétique.

Néanmoins, afin d'obtenir des éléments de réponse, il serait intéressant d'évaluer l'impact de l'hypoxie à différents stades de culture de nos CSM. Afin d'appréhender le conditionnement des CSM par un microenvironnement hypoxique en vue d'une différenciation, il serait possible de cultiver les CSM indifférenciées en milieu hypoxique afin de permettre une adaptation métabolique préalable des cellules, avant d'initier la chondrogenèse en faisant varier ou non la disponibilité de l'oxygène.

Par ailleurs, au regard du processus d'ossification endochondrale intervenant lors du développement embryonnaire, les conditions oxiques observables pourraient varier de la normoxie avant la condensation des CSM, à une hypoxie légère durant cette condensation, puis une hypoxie plus forte vers la phase de prolifération et de différenciation des cellules lors de l'élongation du patron cartilagineux. La vascularisation subsidiaire du centre d'ossification primaire va alors aboutir à la formation d'un gradient d'oxygène lors du développement du cartilage (Dunwoodie, 2009). Cette alternance de déplétion en oxygène pourrait avoir un rôle dans la définition du lignage chondrocytaire.

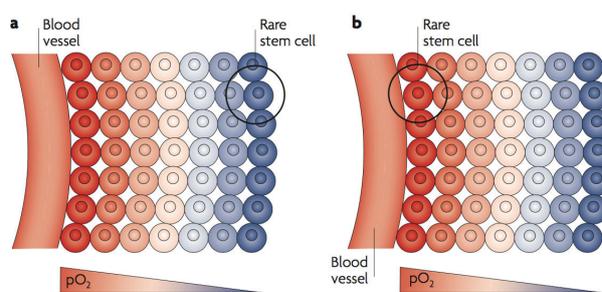
Ainsi, plusieurs travaux du laboratoire sur l'alternance entre normoxie et hypoxie ont été réalisés et tendent à montrer qu'une phase de pré-différenciation normoxique, puis une différenciation en hypoxie, favoriserait l'augmentation de la qualité de MEC exprimée par les CSM-SPL humaines. Par ailleurs, il a été observé une expression comparable de collagène de type II entre normoxie et l'alternance normoxie/hypoxie et une inhibition des marqueurs d'hypertrophie pour cette dernière condition.

## E. Les eAC, « gold standard » de la MACI, en comparaison avec les CSM-SPL.

Afin d'évaluer l'utilisation de types cellulaires alternatifs pour la MACI, nous avons comparé l'expression matricielle des CAE cultivés en 3D en hypoxie en présence de BMP-2 avec les CSM néonatales différenciées en chondrocytes durant 7 jours sous l'action de la BMP-2 et du TGF- $\beta$ 1.

Il a été constaté, qu'à des temps comparables de culture, les CSM-SPL exprimaient une MEC cartilagineuse plus mature et plus abondante au regard de l'expression du collagène de type II par rapport aux eAC et aux CSM-GW différenciées. Alors que les CAE n'expriment généralement que les formes procollagéniques, les CSM-GW expriment la forme mature du collagène de type II (mais en faible proportion). Concernant les CSM-SPL, elles expriment toutes les formes collagéniques, et notamment en forte proportion pour les formes pro-collagéniques.

Si l'on compare les coupes histologiques des CAE après 21 jours de culture (cf discussion de l'article 1) avec les coupes histologiques de CSM-SPL et CSM-GW à 28 jours de différenciation chondrogénique, la qualité du substitut cartilagineux est clairement supérieure pour les CSM-SPL qui présentent à la fois une proportion de cellules plus faible pour une MEC bien plus abondante que pour les CAE et pour les CSM-GW différenciées.



**Figure 105 : Représentation schématique de la variation de population de cellules souches en fonction du microenvironnement oxique.**

Une partie des cellules souches retrouvées au sein de l'organisme évolue dans des conditions hypoxiques du fait de leur éloignement physique par rapport aux vaisseaux sanguins, c'est notamment le cas des CSM-MO (a). Du fait de la proximité des CSM-SPL avec le système vasculaire du cordon, ces dernières pourraient quant à elles évoluer dans un environnement où le taux d'oxygène serait supérieur (b) (Simon & Keith, 2008).

Néanmoins, la forte expression du collagène de type I par les CSM-SPL en cours de différenciation pourrait compromettre la qualité de la MEC néoformée, au même titre que celle issue de CAE différenciés. Il est ainsi nécessaire d'évaluer le gain biologique et fonctionnel du substitut cartilagineux généré par les CSM-SPL. Cette évaluation pourrait être réalisée par des essais de résistance mécanique par analyse dynamique de stress mécanique de compression, d'extension et de cisaillement des « patches » générés à partir des CSM-SPL et CAE.

Si l'on rapproche ces derniers résultats avec les potentiels des CSM en termes de production cellulaire et de « biobanking », malgré une capacité de production inférieure des CSM-SPL face aux CSM-GW, les CSM-SPL surpassent les CAE qui présentent une faible capacité à générer du matériel cellulaire en quantité.

Au vu de ces résultats encourageants concernant la différenciation chondrogénique des CSM-SPL, il est nécessaire de s'orienter vers la preuve de concept de « patches » générés à partir de CSM-SPL dans des études *in vivo*. Au sein du laboratoire, deux modèles expérimentaux d'arthropathies équinnes ont été élaborés en partenariat avec le Centre d'Imagerie et de Recherche sur les Affections Locomotrices Equines (CIRALE). Le premier modèle d'arthropathie induite est réalisé par induction de lésions cartilagineuses à la curette et le deuxième par une fragmentation ostéochondrale de l'os radial du carpe. Ces modèles expérimentaux devraient permettre de réaliser les premiers essais cliniques en médecine vétérinaire d'implantation de « patches » élaborés à partir de CSM-SPL différenciées en chondrocytes. Des premiers essais ont été réalisés par greffe d'un « patch » élaboré à partir de CSM-MO à l'aide de colle biologique de cyanoacrylate. Ces résultats ont montré une fusion partielle du substitut cartilagineux avec le cartilage articulaire équin avec conservation de la MEC de nature hyaline produite par les CSM-MO (Thèse du Dr. Thomas Branly, unité BioTARGen).

Des études cliniques en médecine vétérinaire chez le modèle gros animal permettraient ainsi d'envisager un transfert vers des essais de phase clinique chez l'Homme.

## **V. De nouvelles stratégies thérapeutiques apportées par les CSMs en médecine régénérative.**

Nous avons étudié le potentiel de différenciation chondrogénique des CSM-SPL et CSM-GW en vue d'une application en ingénierie tissulaire et avons montré que celui-ci diffère entre les deux sources. Au regard de la littérature scientifique, nous pouvons extrapoler cette conclusion à l'ensemble des effets biologiques thérapeutiques apportés par les CSM issues de différentes sources tissulaires. Ainsi, différentes sources de CSM peuvent apporter différents effets thérapeutiques.

Par l'évaluation du potentiel thérapeutique des différentes sources de CSM, une plus grande personnalisation des thérapies cellulaires et tissulaires peut ainsi être obtenue. Pour une même thérapie, la sélection d'une source de CSM aux prédispositions thérapeutiques pour l'effet désiré pourrait augmenter grandement l'efficacité de traitement. Cette conclusion est valable pour l'ingénierie tissulaire du cartilage mais également pour d'autres aspects biologiques.

### **A. Le traitement de la composante inflammatoire de l'arthrose et les thérapies combinées.**

Dans le cadre de la caractérisation des CSM, nous avons abordé l'aspect immunomodulateur des CSM. D'un point de vue thérapeutique, cette propriété revêt un important

intérêt médical et vétérinaire. En effet, l'injection de CSM pourrait présenter des effets bénéfiques à plus long terme comparée aux injections d'anti-inflammatoires conventionnels. Cette injection de CSM pourrait, à la place d'inhiber la réaction immunitaire des cellules face à l'inflammation, réguler cette dernière en agissant à la fois sur la prolifération des cellules immunitaires mais également en limitant l'inflammation provoquée par les tissus environnants. La stratégie ne reviendrait donc pas à leurrer l'organisme afin de limiter sa réponse innée mais plutôt de se servir des acteurs de l'inflammation afin de réguler l'homéostasie du tissu.

Les capacités immunomodulatrices des CSM passent par la sécrétion de facteurs trophiques par ces dernières. Ceux-ci vont se lier spécifiquement aux récepteurs membranaires des cellules qui en disposent, et ainsi induire une réponse de ces dernières. Au niveau immunitaire, les CSM vont réguler, par le biais des facteurs immunomodulateurs, la prolifération, la capacité de migration et la différenciation des cellules immunitaires (Lee *et al.*, 2011). C'est notamment le cas pour les molécules telles que l'IL-1ra, le TGF- $\beta$ 1, l'IDO, le Tsg-6, la PGE2, l'iNos, l'IL-6, l'IL-10 et les chimiokines.

Néanmoins, l'effet trophique des cellules souches ne passe pas que par son action sur les cellules immunitaires mais également sur les cellules somatiques environnantes. Cet effet peut affecter la capacité d'angiogenèse, la prolifération, la synthèse de la MEC et le phénotype des cellules. Evidemment, la plupart des études s'intéressent au devenir du chondrocyte arthrosique face à ce genre de thérapie, mais cet effet devrait normalement s'appliquer aux autres types cellulaires de l'articulation tels que les synoviocytes, les CSM du cartilage ou de la membrane synoviale (Meirelles *et al.*, 2009). Les facteurs trophiques les plus étudiés dans le cadre de l'inflammation de l'articulation sont l'Hgf, le Kgf, le Vegf, l'Igf-1 et le Fgf.

Les CSM peuvent également influencer les types cellulaires de l'articulation par une interaction cellule-cellule *via* certains récepteurs. Vis-à-vis des cellules immunitaires, l'interaction principale se fait par les CMH-1 et CMH-2, ayant pour but d'assurer les mécanismes de présentation de l'antigène et induisant les réactions de l'immunité innée. Néanmoins, les CSM semblent immunoprivilégiées et échappent à cette interaction par une sous-expression du CMH-1 et l'absence d'expression du CMH-2 ainsi que de leurs co-récepteurs (CD80, CD86 et CD40) (Gebler *et al.*, 2012) (cf Figure 2 article 2).

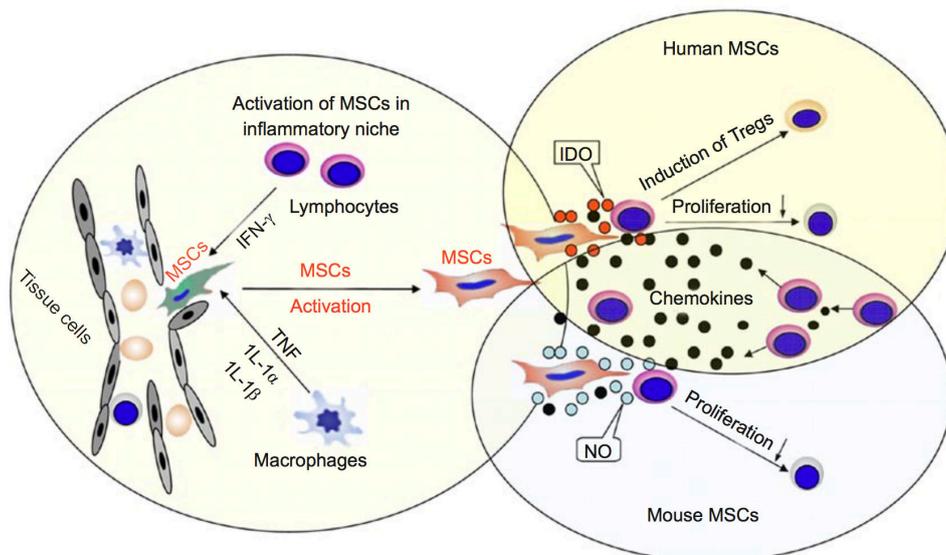
Plusieurs études ont montré que les CSM, en présence d'un environnement pro-inflammatoire, étaient capables de modifier leur profil d'expression et leur phénotype afin de migrer et d'activement agir sur le système immunitaire et les cellules environnantes. De ce fait, afin d'évaluer si nos cellules pouvaient posséder des capacités immunomodulatrices, les taux d'ARNm des facteurs trophiques et impliqués dans l'immunomodulation ont été quantifiés et l'influence de l'IFN- $\gamma$  sur ces marqueurs a été évaluée. Nos résultats ont montré que ce « priming » cellulaire modulait les marqueurs immunomodulateurs des CSM-SPL et CSM-GW. Néanmoins, des différences ont été observées parmi les deux types de sources étudiées.

Les principales observations de la réponse à l'IFN- $\gamma$  ont été faites sur l'induction d'IDO, d'iNos et des CMH-1 et CMH-2.

Concernant l'IDO, cette enzyme est présentée comme étant le principal médiateur de l'immunomodulation chez l'Homme en catalysant la réaction d'oxydation du tryptophane en kynurénine. La déplétion du tryptophane, de façon localisée, va alors inhiber la prolifération des cellules T. L'induction d'IDO par l'IFN- $\gamma$  chez les CSM-SPL et CSM-GW (de la même manière que chez les CSM adultes) lors de nos expériences confirme les résultats obtenus par Croitoru-Lamoury *et al.* (Croitoru-Lamoury *et al.*, 2011). Nous n'avons pas pu pour autant quantifier cette expression d'IDO au niveau protéique. A l'heure actuelle, nous ne savons pas si l'absence de signal par quantification *via* les kits de détection conventionnels est due à l'absence de croisement des anticorps utilisés en médecine humaine chez le modèle équin ou à une absence totale d'expression d'IDO au niveau protéique. Chez l'Homme, l'équipe de Prasanna *et al.* a montré une activité effective d'IDO après stimulation des CSM-GW par de l'IFN- $\gamma$  (Prasanna *et al.*, 2010).

Chez la souris, il a été démontré que les activités immunomodulatrices des CSM n'est pas dépendante de la simple expression d'IDO sous l'influence de l'INF- $\gamma$  mais que cette dernière devait être conjuguée à une forte activité d'iNos. Cette dernière enzyme est capable d'induire une production d'oxyde nitrique, inhibant la réponse des cellules T vis-à-vis d'un *stimulus* pro-inflammatoire (Shi *et al.*, 2010) (Figure 106). Nous avons pu montrer que le traitement par l'INF- $\gamma$  impliquait une forte réponse des cellules en induisant également l'expression d'*Inos* au niveau transcriptionnel. Néanmoins, cette induction n'a pas pu être vérifiée chez les CSM-GW. Nous ne concluons pas sur des propriétés immunomodulatrices moindres de la part des CSM-GW par rapport aux CSM-SPL. D'autres publications ont, en effet, vérifié cette capacité chez ces deux types de CSM néonatales (Weiss *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2009). Néanmoins, les différences observées entre les deux types cellulaires alimentent notre hypothèse concernant l'hétérogénéité des populations cellulaires entre les différentes sources cellulaires.

Cette activité immunomodulatrice des CSM pourrait être utilisée à des fins d'ingénierie tissulaire du cartilage. En effet, même s'il est possible de générer un cartilage *in vitro* voué à être implanté au sein d'une articulation lésée, cette stratégie ne ciblerait que les lésions cartilagineuses générées suite à un accident ou un choc traumatique. Dans le cadre de l'arthrose, le versant inflammatoire de l'arthropathie ne permet pas un traitement durable de la maladie par transplantation d'un néo-cartilage qui pourrait alors dégénérer face au microenvironnement inflammatoire globalisé. Néanmoins, cette transplantation, conjuguée à une injection de CSM indifférenciées, pourrait permettre la prise en charge du caractère lésionnel du cartilage par une reconstruction du tissu ainsi que le caractère inflammatoire de l'articulation par l'effet immunomodulateur des CSM.



**Figure 106 : Représentation schématique des mécanismes d'immunomodulation dépendants de l'activité d'iNos et d'IDO.**

Après activation des CSM par un contexte inflammatoire, ces dernières peuvent agir sur le système immunitaire par le biais de l'activation d'IDO pour le cas de l'Homme et l'activité conjuguée d'IDO et iNos (NO) chez la souris (Shi *et al.*, 2010).

## **B. De l'ingénierie tissulaire à l'organogenèse.**

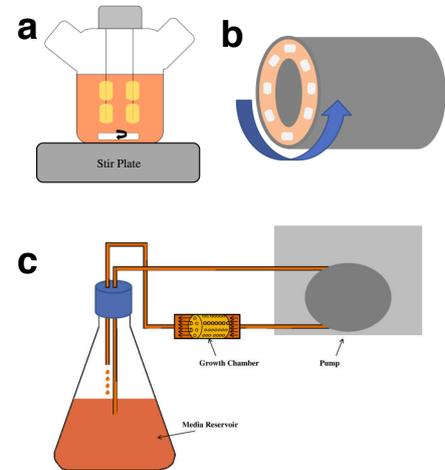
L'ingénierie tissulaire se base sur la reproduction d'un microenvironnement cellulaire ainsi que d'une stimulation cellulaire afin d'obtenir un substitut biologique. Néanmoins, les processus cellulaires ne peuvent se résumer à une simple culture en 3D ainsi que l'incrémentation de trois ou quatre facteurs biologiques, physiologiques ou physiques. Les lois biologiques régissant la différenciation ou le comportement des cellules sont bien plus complexes et font intervenir des centaines de paramètres où une multitude de contrôles, rétro-contrôles et influences mutuelles de ces derniers peuvent opérer.

Aujourd'hui, les stratégies d'ingénierie tissulaire s'orientent vers des systèmes technologiques complexes.

## 1. La maîtrise des paramètres microenvironnementaux.

Les systèmes de culture complexes peuvent avoir pour but un contrôle plus fin d'un ou de plusieurs paramètres de culture. C'est notamment le cas des bioréacteurs. Ces derniers permettent un flux constant de milieu au travers du substitut cartilagineux. Ce flux permet de limiter les déperditions de nutriments au cours de la culture et rend disponible ces derniers de façon plus homogène au sein du tissu néoformé (Figure 107) (Yeatts & Fisher, 2011). Les bioréacteurs permettent également un meilleur contrôle de l'oxygénation et du pH du milieu de culture. Le flux constant de nutriments et de milieu de culture engendre une pression physique au tissu, incitant les cellules du substitut à répondre par une modification de leur phénotype. Ainsi, il a été montré que ce type de culture favorise la différenciation des cellules face aux *stimuli*, par une augmentation des voies de signalisation cellulaires impliquées dans ces réponses (Yeatts *et al.*, 2013).

Les bioréacteurs permettent également de se rapprocher des conditions GMP en diminuant, d'une part, l'intervention humaine et d'autre part, en limitant les contaminations exogènes par la limitation des interactions entre la culture et l'atmosphère de travail. Ce type de culture autorise des cultures cellulaires de plus grande ampleur en vue d'une production conséquente. Au niveau industriel, l'utilisation de systèmes de bioréacteurs permettrait une augmentation du rendement de production de substituts cartilagineux ainsi qu'une diminution des coûts dus à la culture cellulaire.



**Figure 107 : Représentation schématique de trois types de bioréacteurs.**

Les bioréacteurs les plus couramment utilisés en culture cellulaire sont de trois types et assurent un renouvellement continu du milieu en nutriment et oxygène au sein des biomatériaux/substituts cellulaires. (a) les bioréacteurs à agitation mécanique. (b) les bioréacteurs à perfusion rotative. (c) les bioréacteurs à perfusion pneumatique (Yeatts *et al.*, 2011).

## 2. La chondrogenèse : un processus temporel.

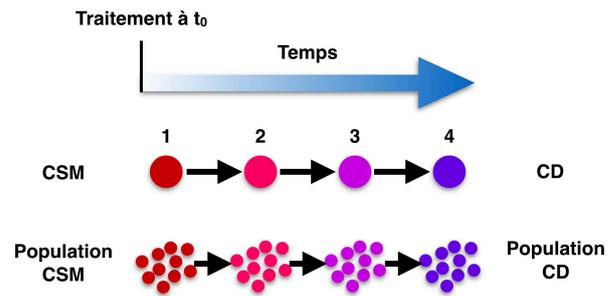
Outre la maîtrise des paramètres, les nouveaux processus de culture cellulaire visent à augmenter le nombre de paramètres microenvironnementaux afin d'optimiser les processus de différenciation cellulaire. Nous avons cité précédemment la possibilité d'utiliser un grand nombre de facteurs de croissance/hormones simultanément afin de constituer un cocktail optimisé pour la différenciation chondrogénique. Notre criblage sur les facteurs chondrogéniques n'a pas montré de résultats probants sur l'amélioration du protocole déjà utilisé pour la différenciation des CSM-SPL. Néanmoins, la faible quantité de souches cellulaires utilisées pour les expériences ne permet pas de conclure sur l'élaboration d'une nouvelle combinatoire de facteurs.

Si l'on imagine que les lois qui régissent le processus de différenciation des CSM sont les mêmes que celles responsables du développement de l'embryon à partir de cellules progénitrices, la simple combinaison de facteurs ne peut mimer les conditions régulant le développement du système vasculaire, du système nerveux central ou encore du squelette. En effet, parmi les études précédemment citées, un paramètre prépondérant dans le devenir cellulaire est exclu, il s'agit du temps.

La variable temporelle fait partie intégrante du développement de l'organisme. De la naissance à la mise en place d'un organisme mature, les cellules de ce dernier ne présentent pas les mêmes caractéristiques, les mêmes rôles et de ce fait les mêmes réponses biologiques au

cours du temps. Une cellule embryonnaire se comporte différemment par rapport à un fibroblaste mature.

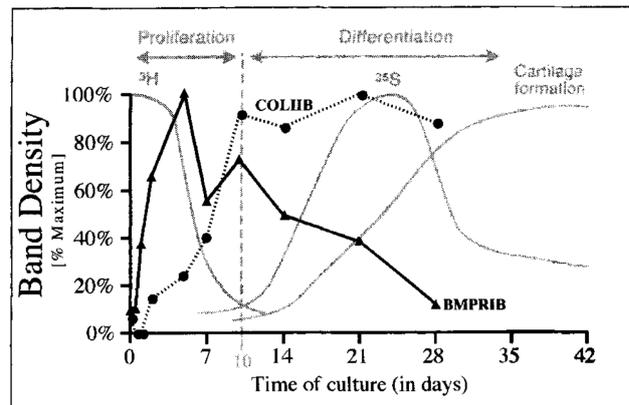
Ainsi, il peut être concevable qu'au cours du processus de différenciation, la cellule indifférenciée et la cellule spécialisée ne représentent pas les seuls protagonistes du lignage cellulaire. Une cellule en cours de différenciation ne présentera ainsi pas le même phénotype à un instant «  $t_1$  » que la même cellule à un autre instant «  $t_2$  ». Si l'on ajoute à ce paramètre la possibilité d'une réponse différée de la population cellulaire de CSM face à la différenciation (soit de façon stochastique, soit en fonction de la disponibilité en nutriments/facteurs inducteurs), alors la population cellulaire, malgré son statut homogène initial, évoluera de façon hétérogène et ce constamment et profondément au cours du temps (Figure 108). Nous reviendrons par la suite sur cette notion d'hétérogénéité de populations des CSM.



**Figure 108 : Représentation schématique de la notion de temps au cours de la différenciation d'une population de CSM.**

La notion de temps au cours de la différenciation implique la prise en compte de l'existence de plusieurs stades phénotypiques ordonnés de façon hiérarchisée entre le stade de CSM indifférenciées (CSM) et le stade de cellules matures (CD).

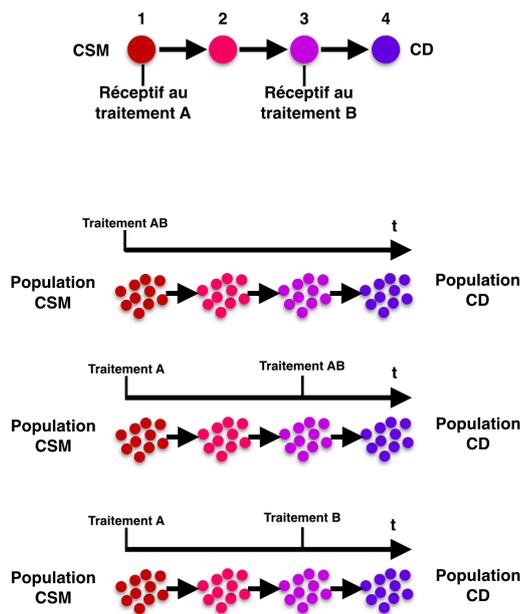
Nos résultats ont notamment montré que les effets de l'hypoxie sur le phénotype de nos cellules étaient dépendants du temps de culture et de la population de cellules étudiée. D'autres études, prenant en compte la composante temporelle, montrent que le principe peut être extrapolé à bon nombre de phénomènes cellulaires. Notamment, en 2002, l'équipe de Sanyal (Sanyal *et al.*, 2002) a montré que le profil d'expression des récepteurs aux BMP fluctuait au cours du temps durant la chondrogenèse (Figure 109). Ainsi, une meilleure compréhension des profils d'expression de ces récepteurs pourrait permettre une optimisation du processus de différenciation par une action dynamique des facteurs de transcription. En 2014, Handorf *et al.* (Handorf & Li, 2014) ont montré un exemple de confirmation de cette hypothèse en prouvant que l'utilisation séquentielle de facteurs de croissance au cours de la chondrogenèse pourrait permettre d'améliorer le phénotype chondrocytaire. En terme d'application, l'utilisation séquentielle de facteurs de croissance pourrait représenter un gain économique face à l'utilisation d'un cocktail de ces mêmes facteurs de croissance aboutissant aux mêmes résultats durant un même temps de culture (Figure 110).



**Figure 109 : Graphique de la relation entre l'expression de BMPRI3 et celle de l'ARNm du collagène de type IIB au cours de la chondrogenèse.**

L'expression transitoire de BMPRI3 durant les premiers jours de culture semble correspondre avec un changement phénotypique des CSM au cours de la différenciation (Sanyal *et al.*, 2002).

Les effets de traitements dépendants du temps ne s'appliquent pas qu'aux facteurs de croissance. Ils peuvent être transposés au stress mécanique sur les CSM. En effet, il a été montré qu'une application de contraintes mécaniques durant les phases précoces de la chondrogenèse ne provoque pas de gain de synthèse matricielle, voire semble délétère à cette dernière. Pourtant, lors d'une stimulation mécanique tardive (à partir de 21 jours de culture), la qualité et la quantité de la MEC synthétisée par les cellules est significativement augmentée (Haugh *et al.*, 2011). Ces résultats s'expliquent par la nécessité d'une expression d'une matrice péricellulaire mature par les cellules avant de pouvoir répondre positivement aux stimulations mécaniques. Entre autres, cette



**Figure 110 : Représentation schématique des traitements séquentiels au cours de la différenciation.**

Deux exemples de traitements séquentiels sont présentés. Ils permettent d'obtenir un gain économique pour le même résultat biologique, qu'un traitement combiné seul. Ces exemples sont valables seulement sous certaines conditions biologiques qu'il est nécessaire de vérifier.

étude montre que la non prise en compte du statut de différenciation au cours de temps pourrait être délétère à la bonne réception d'un traitement par les cellules.

L'ensemble de ces données tend à prouver qu'une meilleure compréhension des comportements cellulaires dépendants du temps durant la différenciation chondrogénique pourrait améliorer de façon considérable nos connaissances fondamentales sur le développement squelettique et cartilagineux ainsi que nos connaissances appliquées en médecine régénérative.

### **3. Le futur de l'ingénierie tissulaire.**

D'autres études prennent en compte l'intervention d'autres paramètres microenvironnementaux, et notamment l'association de plusieurs types cellulaires pour générer un tissu *in vitro*. Ainsi, les techniques de co-cultures sont plébiscitées par la communauté scientifique depuis quelques années (Goers *et al.*, 2014).

En prenant l'exemple d'une co-culture entre CSM indifférenciées et chondrocytes, les deux types cellulaires pourraient bénéficier des communications paracrines de l'autre type cellulaire, soit grâce au caractère nourricier et immunomodulateur des CSM, soit par l'interaction des facteurs chondrogéniques exprimés par les chondrocytes sains sur les CSM (Figure 111).

Il est difficile de montrer une différenciation spontanée des CSM ou une amélioration de cette dernière par co-culture en présence de chondrocytes. Néanmoins, des études ont montré un fort intérêt dans les co-cultures de CSM indifférenciées et de chondrocytes en démontrant une augmentation de la prolifération cellulaire et de la qualité de la MEC exprimée par les chondrocytes (Hubka *et al.*, 2014). De plus, la co-culture de CSM et de chondrocytes permettrait une culture cellulaire sur le plus long terme en 3D sans perte de qualité de la MEC produite (Ouyang *et al.*, 2015). Un tel mode de culture permettrait d'améliorer les procédés de MACI par

une diminution du nombre de chondrocytes nécessaires à la génération du néocartilage et à l'amélioration biologique de ce dernier.

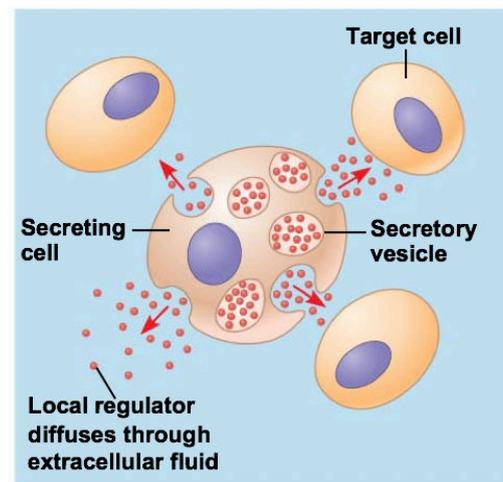
La génération de substituts biologiques chimériques apporte de nouvelles perspectives à l'ingénierie tissulaire. Ces nouvelles perspectives sont désormais envisageables grâce aux nouvelles technologies disponibles. Ces nouvelles technologies passent par l'utilisation de biomatériaux de nouvelle génération, combinée à l'ensemencement cellulaire grâce à la bio-impression 3D permettant un gain substantiel de temps, de précision ainsi qu'une limitation de l'intervention humaine (Ren *et al.*, 2016). Une autre exemple peut être représenté par les biomatériaux fonctionnalisés capables de délivrer de façon différée des nutriments et des facteurs de croissance (Lee *et al.*, 2011).

Cette nouvelle génération de technologies, combinée aux connaissances fondamentales en biologie cellulaire poussent la culture cellulaire vers de nouveaux horizons comme l'organogenèse ou la formation d'organoïdes *in vitro* (Figure 112).

Parmi tous les paramètres micro-environnementaux cités précédemment, l'organogenèse permet en plus d'aborder les relations existant entre les différentes cellules, voire différents tissus. Concernant la formation d'organoïdes, il ne s'agit pas seulement d'une co-culture mais plus d'un modèle systémique pouvant aborder la compréhension de lois physiologiques régissant le développement d'un organe. Certains processus sont difficiles à appréhender en dehors des études *in vivo* lors du développement embryonnaire, tels que l'organisation spatiale d'un tissu, l'angiogenèse, la mise en place de gradients biochimiques, ou encore la polarisation tissulaire (Lancaster & Knoblich, 2014). L'organogenèse *in vitro* a notamment été utilisée à partir de cellules pluripotentes afin de tenter de former un cortex cérébral, un estomac, une rétine et un foie (Figure 113).

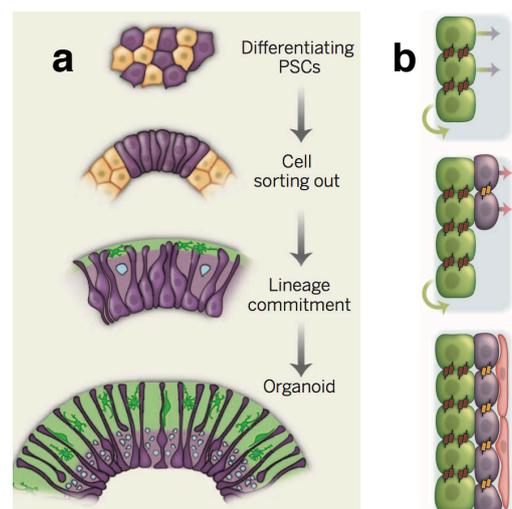
Dans notre cas, l'étroite relation entre le lignage chondrocytaire et le lignage ostéoblastique au cours de l'ossification endochondrale représente une contrainte de taille dans l'étude d'un tissu spécifique comme le cartilage ou l'os. Une compréhension plus poussée de la biologie de chaque tissu passe par l'interaction entre ces derniers. Pourquoi le cartilage, représentant 90% du tissu squelettique au cours de l'embryogenèse, ne représente plus qu'une infime proportion dans l'organisme adulte? Quels sont les mécanismes mis en jeu dans le contrôle du remodelage tissulaire du cartilage au cours de l'ostéogenèse? Quels sont les processus biologiques permettant au cartilage adulte de perdurer uniquement sur des localisations très spécifiques de l'organisme?

Si l'on regroupe les compétences en embryologie, en biologie du cartilage et en biologie osseuse, des modèles de culture cellulaire chimériques,



**Figure 111 : Représentation schématique de l'effet paracrine.**

Les communications cellulaires peuvent s'exercer entre deux types de cellules par le biais de la sécrétion de molécules ou de vésicules d'un type cellulaire émetteur vers un type cellulaire récepteur (<http://slideplayer.com/>).

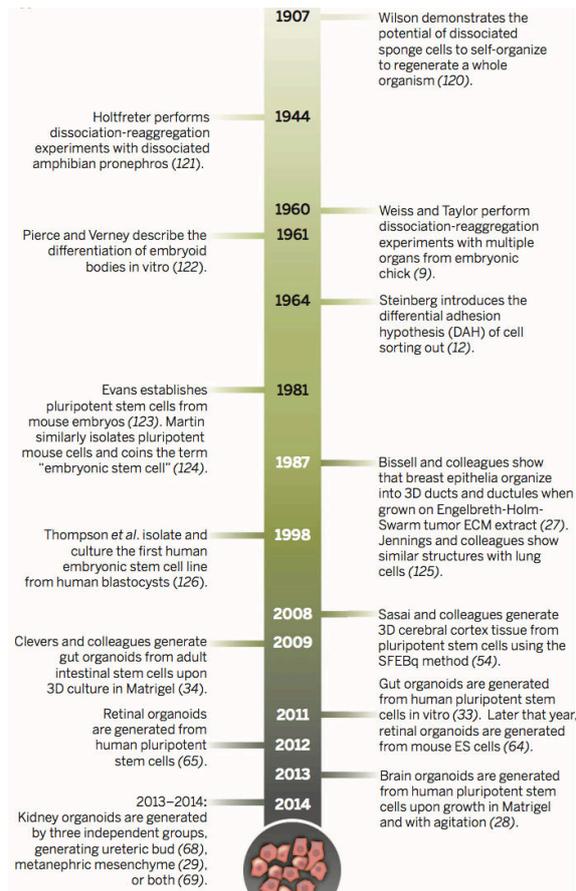


**Figure 112 : Illustration schématique de la génération d'un organoïde *in vitro*.**

L'organoïde généré *in vivo* (a) est une organisation spatiale restreinte (b) de plusieurs lignages cellulaires spécialisés issus de la différenciation cellulaire de progéniteurs (Lancaster & Knoblich, 2014).

outre leur aspect spectaculaire, pourraient permettre la compréhension de certains de ces mécanismes. Il serait notamment possible, à partir d'un substitut cartilagineux généré à partir de CSM, d'étudier les capacités de migration et de développement de progéniteurs cellulaires pré-engagés dans le lignage endothélial vasculaire et ostéoblastique. Ces résultats pourraient permettre une compréhension des prémices de l'ossification endochondrale.

Un autre exemple serait la possibilité d'implantation au sein du substitut cartilagineux, formé à partir de CSM, de progéniteurs ostéogéniques et de cellules pré-engagées dans le lignage ostéoblastique. La culture de deux types de progéniteurs ou de progéniteurs engagés dans des lignages différents permettrait une meilleure compréhension du phénomène d'ossification endochondrale et à la fois du phénomène de chondrogenèse et d'ostéogenèse. Ces types d'études pourraient permettre une meilleure compréhension du devenir d'un substitut cartilagineux implanté sur une surface osseuse. Ces études permettraient d'appréhender l'impact de la communication os-cartilage au cours du phénomène d'ossification endochondrale (Keeney & Pandit, 2009 ; Sheehy *et al.*, 2013).



**Figure 113 : Frise chronologique des différentes études concernant l'organogenèse in vitro.** (Lancaster & Knoblich, 2014)

En terme d'application, il a notamment été montré qu'un pré-engagement des CSM dans le lignage chondrogénique, suivi d'une induction ostéogénique avant implantation *in vivo*, permettrait une meilleure formation d'os en médecine régénérative osseuse (Farrell *et al.*, 2011). De surcroît, une meilleure compréhension des phénomènes biologiques régissant la croissance du patron cartilagineux pourrait aboutir à une maîtrise de la croissance d'un substitut cartilagineux en contrôlant la prolifération des progéniteurs indifférenciés et leur différenciation en chondrocytes exprimant une MEC hyaline.

Ces modèles d'organogenèse peuvent être mis en place par l'addition manuelle de types cellulaires dans le tissu déjà mis en place. Une autre possibilité pourrait être la construction automatisée d'un substitut biologique chimérique par « bioprinting » à partir de différents types cellulaires engagés ou pré-engagés dans les différents lignages cellulaires en question.

## VI. L'hétérogénéité des populations de cellules souches.

Nos études ont montré une importante différence en terme de différenciation chondrogénique entre les CSM-SPL et CSM-GW. Cela met en évidence la possibilité que plusieurs populations de cellules répondant aux caractéristiques de cellules souches se comportent différemment et possèdent des propriétés biologiques différentes. On parle alors d'hétérogénéité de populations. Cette hétérogénéité entre les populations de cellules souches est un facteur important à prendre en compte pour la recherche en biologie mais surtout pour les applications. La prise en compte du facteur d'hétérogénéité des populations pour la mise en place de traitements

permettrait, d'une part, d'améliorer une stratégie thérapeutique et d'autre part, de ne pas passer à côté d'un effet biologique majeur.

## A. La mise en évidence de l'hétérogénéité entre les populations de CSM-SPL et CSM-GW.

### 1. Des différences entre les sources de CSM.

La notion de différences entre les sources de cellules souches est apparue assez tôt dans la littérature du fait de l'évidence des difficultés à définir de façon claire les cellules souches (Cai *et al.*, 2004). D'une part, ces différences sont importantes d'une classe de cellules souches à l'autre (pluripotente à multipotente), mais également au sein d'une même classe et notamment parmi les cellules souches/stromales mésenchymateuses, ou l'ensemble des cellules souches somatiques. En effet, malgré le fait que d'importantes similarités entre les CSM aient conduit à la mise en place de critères de caractérisations des CSM par consensus scientifique, il est constaté que d'importantes différences biologiques permettent de différencier les sources les unes par rapport aux autres. L'ambivalence entre caractéristiques communes et caractéristiques distinctes parmi les différentes CSM est la principale limite à la recherche de biomarqueurs spécifiques du caractère cellules souches ou « stemness ».

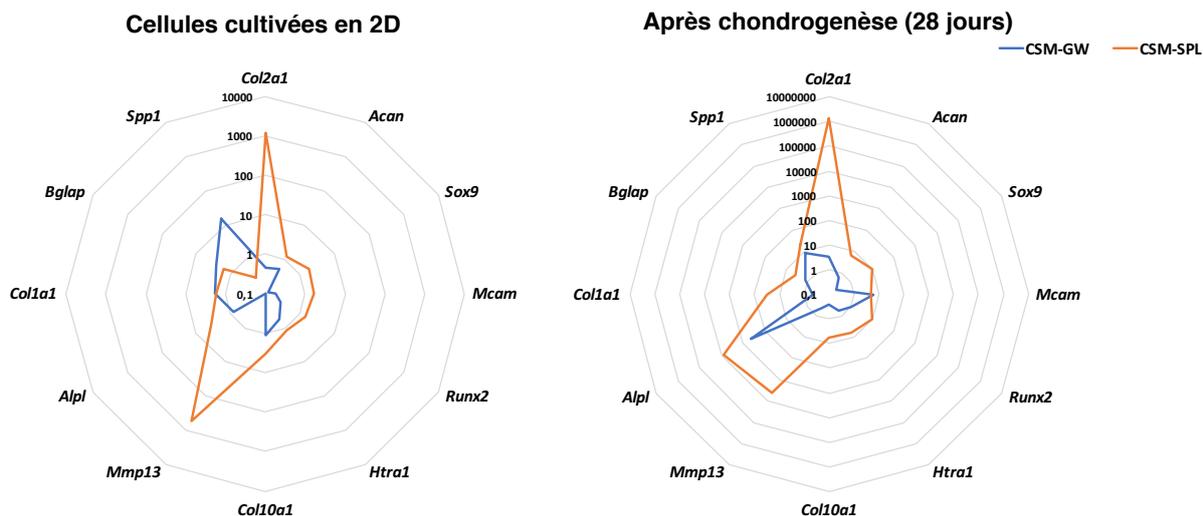
Aspect	Critère	CSM SPL	CSM-GW
Prolifération	Taux de croissance	+	+++
Morphologie	Microscopie	Longilignes et organisation en tapis	Hexagonales et organisation en réseau
Immunomodulation	Traitement IFN- $\gamma$	Ido + Inos +	Ido +
	CMH-1	+	++
Différenciation	Chondrogenèse	+++	-/+
Microenvironnement	Effet hypoxique	+	+
Expression intrinsèque	Facteurs de croissance ostéo-chondraux	+++	+
	Marqueurs ostéogéniques	-	+
	Marqueurs chondrogéniques	+++	+
	CD146	++	-

**Tableau 10 : Différences majeures observées entre les CSM-SPL et les CSM-GW.**  
Les deux sources de CSM diffèrent selon plusieurs aspects.

Durant nos travaux, nous avons démontré l'hétérogénéité entre les populations de CSM-SPL et des CSM-GW à partir de plusieurs aspects (Tableau 10). Ces critères concernent l'aspect prolifératif, morphologique, le potentiel de différenciation, la réponse aux traitements ainsi que le taux d'expression basal de plusieurs marqueurs. L'ensemble des résultats montre qu'une importante différence existe entre ces deux sources de CSM néonatales.

Les différences majeures ont été observées dans leur potentiel biologique après stimulation (par l'IFN- $\gamma$ , ou par différenciation chondrogénique sous conditions oxygènes contrôlées), différences d'autant plus importantes au regard de leur utilisation dans de potentielles stratégies thérapeutiques.

Outre ces différences de réponse aux traitements, des différences intrinsèques ont été clairement démontrées sans pour autant pouvoir les considérer, sans ambiguïté, comme des marqueurs prédictifs du potentiel thérapeutique des CSM (Figure 114).



**Figure 114 : Représentation sous forme de radar de la comparaison des taux moyens d'ARNm avant et après différenciation chondrogénique des CSM-GW et CSM-SPL.**

Le graphique de gauche représente les taux moyens d'ARNm des cellules cultivées en monocouche. Le graphique de droite représente les taux moyens des ARNm après différenciation chondrogénique en normoxie et en éponge de collagène de types I/III (28 jours) (les valeurs moyennes sont représentées, n= 5).

## **2. Cellule indifférenciée, progéniteur cellulaire et cellule différenciée : de la caractérisation à la recherche de marqueurs prédictifs.**

La recherche de marqueurs prédictifs du potentiel thérapeutique des CSM représente l'enjeu majeur concernant la recherche sur les cellules souches. La fin de notre étude a permis d'aborder cet aspect.

Nous pouvons classer les caractéristiques intrinsèques observées en absence de traitement. Ainsi, durant ces expériences, les marqueurs spécifiques de lignages cellulaires matures (marqueurs chondrocytaires, hypertrophiques, ostéoblastiques) peuvent être considérés comme des marqueurs de pré-différenciation. Dans nos expériences, les CSM-SPL semblent capables d'exprimer de façon basale le collagène de type II au niveau protéique ainsi qu'*Acan* au niveau des taux moyens des ARNm. D'autres marqueurs, tels que Runx-2 et Sox-9 n'ont pas une expression restreinte aux types cellulaires matures mais pourraient être exprimés par des progéniteurs cellulaires. Là encore, les CSM-SPL expriment de forts taux de ces facteurs de transcription, à la différence des CSM-GW. Cette co-expression de Runx-2 et Sox-9 avant et après induction de la chondrogenèse pourrait expliquer la forte production de MEC « hyaline-like » mais également la forte expression de collagène de type I.

L'ensemble de ces résultats tend à montrer une pré-différenciation des CSM-SPL dans le lignage chondrocytaire. A l'inverse, les CSM-GW semblent davantage orientées vers la différenciation ostéogénique du fait de l'expression basale de l'ARNm *Spp1* et de l'ostéocalcine au niveau protéique.

Ainsi, nos cellules sont-elles déjà engagées dans des lignages cellulaires spécifiques? Du fait du taux d'induction de ces marqueurs après différenciation chondrogénique, le stade de chondrocyte mature n'est, semble-t-il, pas atteint par les CSM-SPL indifférenciées (non traitées). Il est plus difficile de conclure vis-à-vis des CSM-GW dont la MEC a plus tendance à minéraliser, synonyme d'ostéogenèse, par rapport aux CSM-SPL, sans pour autant montrer une forte différence. La conclusion la plus claire que nous ayons concerne les CSM-SPL qui expriment, en absence de traitement, les acteurs moléculaires responsables de la différenciation dans les lignages ostéochondraux : Sox-9 et Runx-2. L'expression de marqueurs de cellules différenciées

par les CSM a précédemment été montrée, pour l'agrécane et le collagène de type X (Mwale *et al.*, 2006). Ces expressions constitutives ne sont pas forcément synonymes d'une différenciation effective en phénotype cellulaire mature. Il est possible qu'au cours de phases d'isolement, d'amplification, de passages cellulaires et de l'ensemble des stress induits par la culture cellulaire *ex vivo*, une évolution du phénotype des CSM puisse se produire, impliquant une différenciation partielle des cellules. Détaillés à l'origine chez les CSH et les cellules souches cancéreuses, ces concepts représentent de nouveaux axes de réflexion sur les CSM (Pevsner-Fischer *et al.*, 2011).

D'autres marqueurs, représentant putativement un caractère de cellules souches et impliquant un potentiel biologique, pourraient être considérés comme des marqueurs prédictifs du potentiel chondrogénique. C'est le cas du CD146. Ce dernier est un récepteur membranaire Mcam impliqué dans l'adhésion cellule-cellule. Le CD146 a été décrit comme marqueur prédictif du caractère multipotent des cellules souches. Nous avons constaté que son expression était corrélée avec la capacité de différenciation en chondrocytes des CSM-SPL.

Il serait intéressant d'évaluer la présence d'autres marqueurs prédictifs des progéniteurs chondrogéniques retrouvés au sein du cartilage. Plusieurs études montrent que l'utilisation de couples ou de triplets de récepteurs pourraient servir à suivre l'évolution des progéniteurs somatiques cartilagineux. Il est très difficile d'estimer la quantité de progéniteurs dans le cartilage car les résultats sont hétérogènes dans la littérature. Ils sont généralement caractérisés par le couple de récepteurs co-exprimés CD105 (endogline)/CD166 (« activated leukocyte cell adhesion molecule ») ou le triplet (V-Cam)/CD166/Notch-1 (« neurogenic locus notch homologue protein 1 »)/STRO-1 et le « smooth muscle actine » (Jiang & Tuan, 2015). Néanmoins, chaque publication ne se focalise que sur deux ou trois marqueurs, faisant varier les proportions de 22,1% pour les cellules CD105+/CD166+ (Pretzel *et al.*, 2011) à 45% pour les cellules Notch-1+/Stro-1+/V-cam+ (Grogan *et al.*, 2009). Par contre, cette proportion de chondroprogéniteurs est restreinte à la surface du cartilage et semble augmenter dans les stades précoces d'arthrose. Ainsi, l'utilisation de tels marqueurs pourrait permettre d'affiner l'évaluation du potentiel chondrogénique des CSM-SPL.

### **3. De l'hétérogénéité inter-sources à l'hétérogénéité intra-population.**

Le constat de différences cellulaires entre deux sources de CSM introduit le concept d'hétérogénéité des sources. Cette notion d'hétérogénéité est un obstacle supplémentaire au paradigme établi sur la définition des CSM.

Le consensus de base concernant une population de CSM consistait à définir une population isolée et homogène comme possédant les caractéristiques des CSM et ainsi possédant les propriétés biologiques inhérentes à cette appellation. Elles étaient ainsi placées dans un modèle hiérarchique classique avec leurs capacités d'auto-renouvellement et de multipotence.

Depuis une dizaine d'année, la notion d'hétérogénéité entre les sources de cellules souches est en constante évolution. Elle peut être rapprochée d'observations similaires apportées par la recherche sur les cellules souches cancéreuses et les CSH.

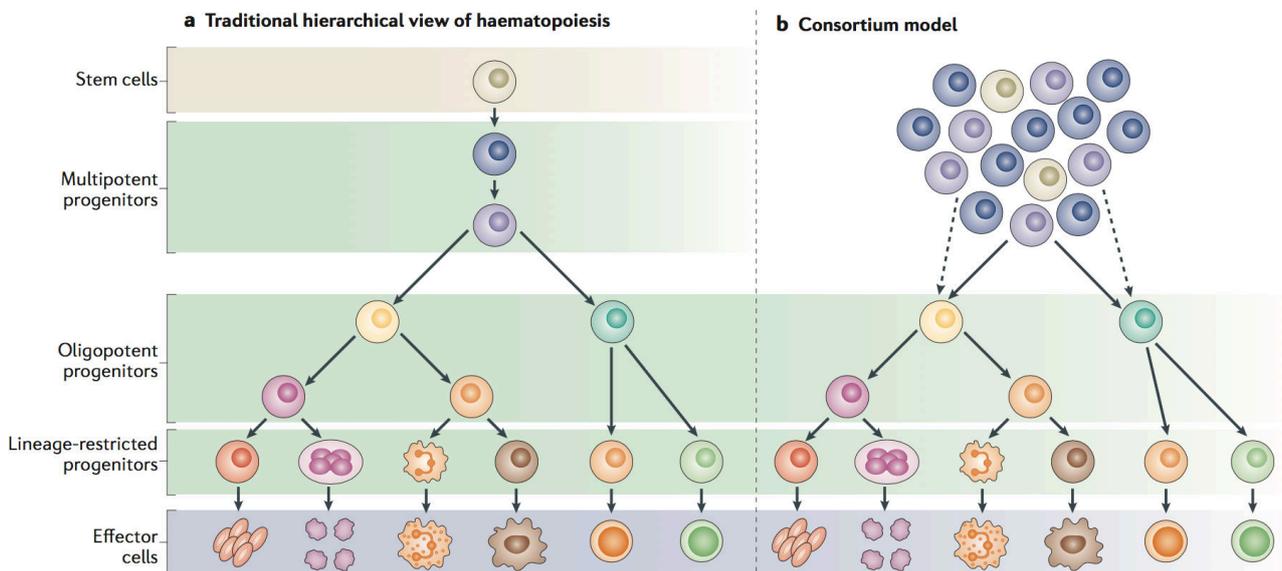
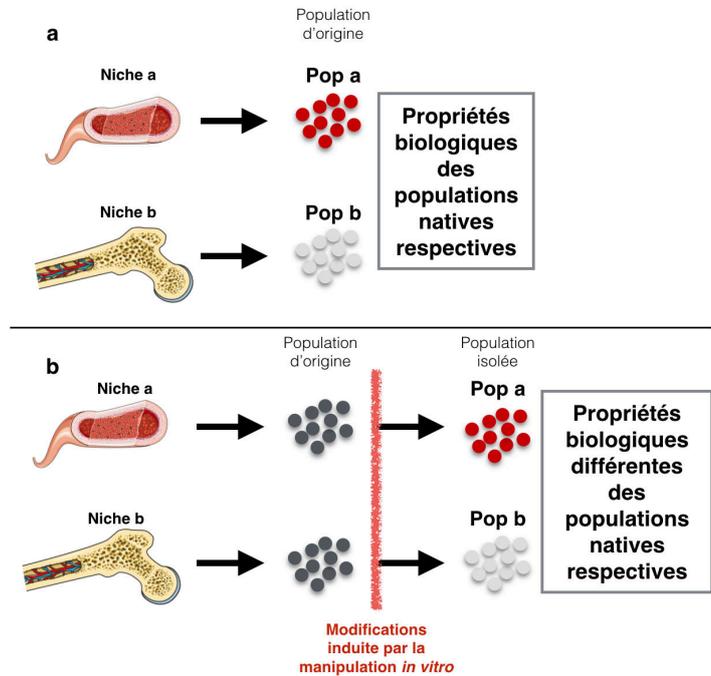
#### **a. L'origine de l'hétérogénéité inter-sources.**

L'origine de l'hétérogénéité des populations de CSM pourrait être de plusieurs natures. Premièrement, elle pourrait être issue de populations natives différentes entre les niches cellulaires (issue de sang de cordon, de tissu adipeux ou encore de MO). Les différences observées entre les CSM-SPL et CSM-GW pourraient s'expliquer par les fortes différences physiologiques entre les deux tissus, l'un « sanguin » et l'autre « fibreux ». La co-localisation avec d'autres types de cellules au sein de la niche tissulaire pourrait jouer un rôle dans le phénotype des CSM. Comme nous l'avons vu, les conditions microenvironnementales, comme la disponibilité en nutriments et en oxygène pourrait imposer des phénotypes cellulaires spécifiques aux CSM de chaque source. Un exemple de différences inhérentes à la niche cellulaire d'origine des CSM est

l'inhibition de la différenciation adipogénique des CSM-SPL (sous certains protocoles de différenciation) du fait de leur localisation dans le plasma du sang de cordon contenant un inhibiteur de l'adipogenèse, « Preadipocyte factor 1 » Pref-1 (Karagianni *et al.*, 2013). Ainsi, les différences observées sur l'ensemble de la population de CSM entre les différentes sources, correspondent à une hétérogénéité inter-sources ou inter-populations (Figure 115).

**Figure 115 : Représentation schématique de deux exemples d'hétérogénéité inter-sources des CSM.**

Le premier type d'hétérogénéité est inhérent à la source tissulaire à partir de laquelle sont isolées les CSM (a). Le second type d'hétérogénéité part d'une modification induite du phénotype natif, des CSM d'origines différentes, par la succession de manipulations *in vitro* (isolement, amplification, traitement) (b).



**Figure 116 : Représentation schématique de deux exemples de modèles hiérarchiques appliqués aux populations de CSH.**

Le premier modèle hiérarchique montre une chronologie distincte des événements induisant la perte d'un phénotype multipotent évoluant vers un phénotype spécialisé (a). Le second modèle part d'un principe d'hétérogénéité de la population native d'origine et apporte une dimension plus complexe aux précédents paradigmes (b). Comme mentionné par l'équipe de Phinney et plus récemment par celle de Goodell, ces principes définis chez les CSH sont en passe d'être transposés chez les cellules souches somatiques/stromales (Goodell *et al.*, 2015)

Le deuxième paramètre pouvant jouer un rôle dans cette hétérogénéité inter-sources représente l'ensemble des stress imposés aux cellules durant la période d'isolement, d'amplification et de manipulations *ex vivo*. Cette hétérogénéité induite correspondrait à une modification du phénotype cellulaire par les facteurs microenvironnementaux *in vitro* ou à une sélection clonale des cellules par la succession de traitements qui leurs sont imposés.

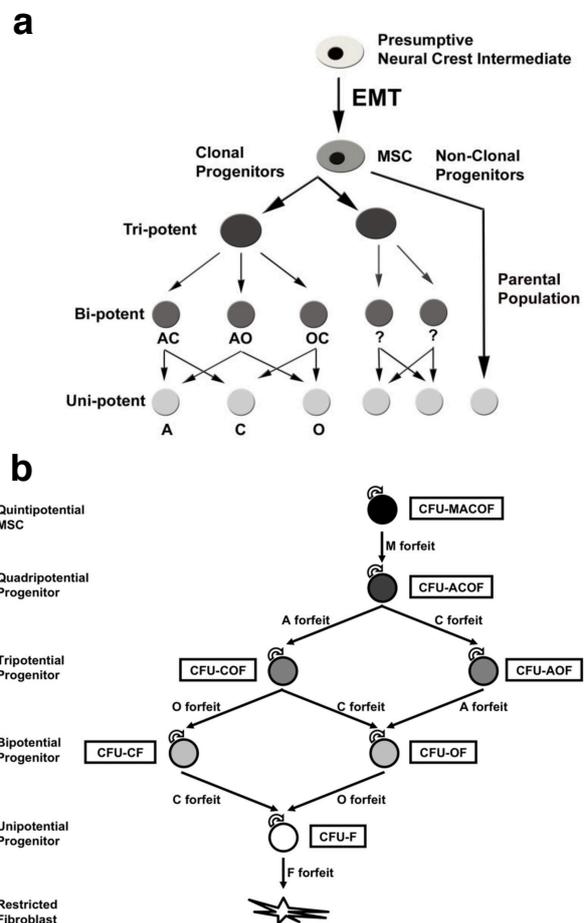
### b. De la variabilité inter-clonale à l'hétérogénéité intra-population des CSM.

Des expériences visant à déterminer précisément le modèle hiérarchique des CSM ont démontrées une réalité plus complexe que les modèles existants (Figure 116). Ces hypothèses sont nées à partir d'une remise en cause du modèle hiérarchique d'origine des CSM. En 2000, une étude s'est attachée à déterminer les caractéristiques de multipotence de 185 populations clonales issues de l'isolement de CSM-MO (Muraglia *et al.*, 2000). Il a été montré que parmi toutes les CFU-F, la tripotence caractéristique des CSM n'était pas vérifiable sur la totalité des colonies. Une partie des clones étaient en effet bipotents (potentiel chondrogénique-ostéogénique ou adipogénique-chondrogénique), voire capables de se différencier en un seul des types cellulaires induits par différenciation (potentiel ostéogénique). Il a notamment été montré qu'en fonction de la durée d'amplification et de l'âge des donneurs, cette tripotence était progressivement perdue de façon hiérarchisée (perte de l'adipogenèse, puis de la chondrogenèse). C'est ainsi qu'une nouvelle vision de la capacité de différenciation des CSM a émergée.

Par la suite, sans pour autant remettre en cause les résultats de Muraglia *et al.*, Russel *et al.* ont montré que des colonies cellulaires distinctes de CSM (CFU-F), elles-mêmes isolées à partir d'une même population de CSM d'origine présentaient des propriétés de différenciation différentes (Russell *et al.*, 2010). Concernant les CSM-SPL, le même type d'étude a montré également la présence d'une clonogénéité hétérogène au sein des populations étudiées ainsi qu'un autre modèle hiérarchique de multipotence (Sarugaser *et al.*, 2009).

**Figure 117 : Représentation schématique des modèles hiérarchiques établis par Phinney en 2012 et Sarugaser et coll. en 2009.**

Ces modèles hiérarchiques exploitent l'existence d'une population native (ou « parental population ») hétérogène composée de progéniteurs aux potentiels de différenciation distincts pouvant être isolés de façon clonale (« Clonal progenitors »). Il est alors difficile de rapprocher les résultats obtenus sur la tripotence des progéniteurs de la multipotence de la population native. Un spectre de différenciation plus large des CSM complexifierait d'autant plus les conclusions sur le potentiel de différenciation de la population de CSM (a : Phinney, 2012 ; b : Sarugaser *et al.*, 2009).



De ces résultats a découlée la possibilité que la population native de CSM pouvait être intrinsèquement hétérogène. Ainsi, d'une hétérogénéité inter-colonies *in vitro* est née le concept d'hétérogénéité intra-population *in vivo* (Phinney, 2012) (Figure 117).

Ce nouveau paramètre implique alors une complexité supplémentaire à l'élaboration d'un modèle hiérarchique clair de la multipotence des CSM et une difficulté bien supérieure à l'interprétation de résultats scientifiques *in vitro* et *in vivo*.

Dès lors, les conclusions à établir sur le potentiel de différenciation d'une population donnée seraient multiples et issues d'une conjoncture de plusieurs facteurs.

## VII. La cellule souche mesenchymateuse : une classification pour plusieurs types de cellules.

La partie traitant des CSM de notre projet de recherche se confronte alors à une réalité plus vaste et rend difficilement interprétable nos résultats. Néanmoins, l'ensemble des résultats tendent à montrer qu'une des possibilités d'explication résiderait dans l'étude des deux sources de CSM-SPL et de CSM-GW à l'échelle de la population cellulaire qui les compose.

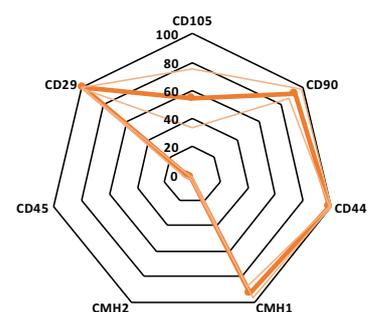
Cette dernière partie de la discussion ne prétend pas trouver des explications scientifiques à nos résultats mais vise à sensibiliser sur l'importance du paramètre d'hétérogénéité des populations des CSM tout en tentant d'apporter des voies de compréhension des phénomènes biologiques observés.

### A. Les populations de CSM-SPL et de CSM-GW sont-elles hétérogènes?

Une importante variable entre les deux sources est la divergence entre les protocoles d'isolement des CSM étudiées. Les CSM-SPL sont issues d'une sélection par adhérence sur plastique à partir d'une sous-population des cellules totales du sang alors que les CSM-GW sont issues d'explants de tissus pré-digérés enzymatiquement. Cette différence méthodologique nous incite à penser que la population de CSM-SPL, composée des différentes colonies adhérentes, serait plus homogène que celle issue d'explants de l'ensemble des cellules « fibroblast-like » de la matrice du cordon.

Les résultats en faveur d'une conclusion sur l'hétérogénéité de nos populations de CSM néonatales peuvent être visibles au niveau des analyses cytométriques.

Au cours de l'immunophénotypage, il a été montré que les CSM-GW représentaient une population hétérogène au regard de l'expression du CD105 (endogline) et du CMH-I (Figure 118). D'après la littérature, le marqueur CD105 pourrait être en relation avec la capacité d'immunomodulation et de multipotence. Il a notamment été montré que les CSM-MO CD105- présenteraient des capacités de différenciation supérieures en adipocyte et ostéoblaste ainsi qu'une meilleure capacité d'immunomodulation que les CSM-MO CD105+ issues de la même source native (Anderson *et al.*, 2013). Néanmoins, il semblerait que l'utilisation de ce marqueur comme outil de



**Figure 118 : Expression des marqueurs membranaires servant à caractériser les CSM-GW.**

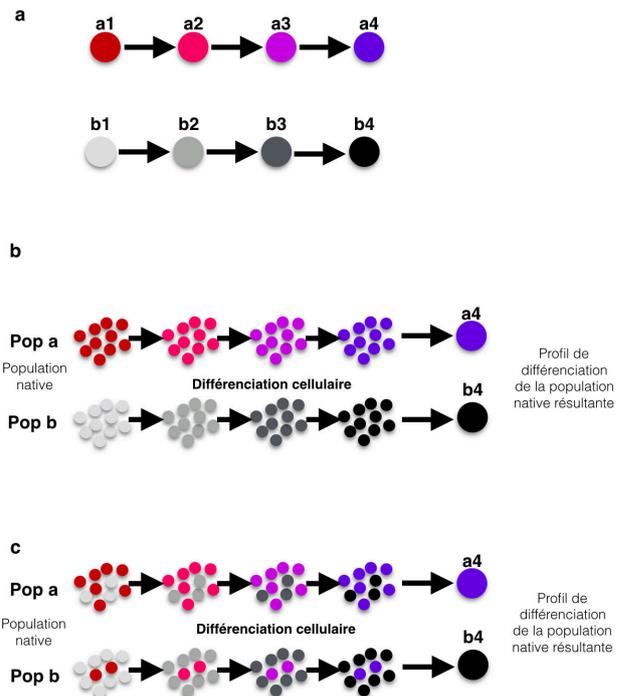
Les CSM-GW répondent aux caractéristiques des CSM par l'expression d'un panel de marqueurs spécifiques de de surface. Néanmoins, la population ne semble pas homogène au regard de l'expression du CD105 (Moyennes de 5 expériences).

caractérisation chez le cheval soit discutable.

Concernant les CSM-SPL, au niveau de l'expression du CMH-1 et du CMH-2, une importante hétérogénéité a d'abord été visible entre les prélèvements au niveau de l'expression intrinsèque du CMH-1. D'autre part, au sein d'une même population, cette hétérogénéité d'expression est également visible. Après stimulation par l'IFN- $\gamma$ , là encore, de grandes différences de réponse au traitement entre les échantillons et au sein d'un même échantillon ont été montrées par une induction non totale et variable de l'expression du CMH-2 (à la différence des CSM-GW).

## B. L'influence des paramètres d'hétérogénéité intra-population des CSM néonatales sur le potentiel chondrogénique.

Ainsi, partant du principe que nos populations de CSM néonatales seraient hétérogènes, il pourrait être possible d'entrevoir la différence de potentiel chondrogénique entre nos deux types de CSM comme étant les répercussions d'une différence de proportion de progéniteurs chondrogéniques. Nous ne pouvons pas vérifier cette hypothèse, néanmoins, sa prise en compte pourrait modifier drastiquement l'interprétation de nos résultats. L'impossibilité d'évaluer la présence de différents progéniteurs cellulaires au sein de notre population ne peut pas nous permettre de conclure si l'absence de réelle différenciation des CSM-GW en chondrocytes est due à une faible réponse des CSM-GW ou à une population limitante de progéniteurs chondrogéniques (Figure 119).



**Figure 119 : Représentation schématique de deux profils de différenciation à partir de deux populations distinctes de cellules souches.**

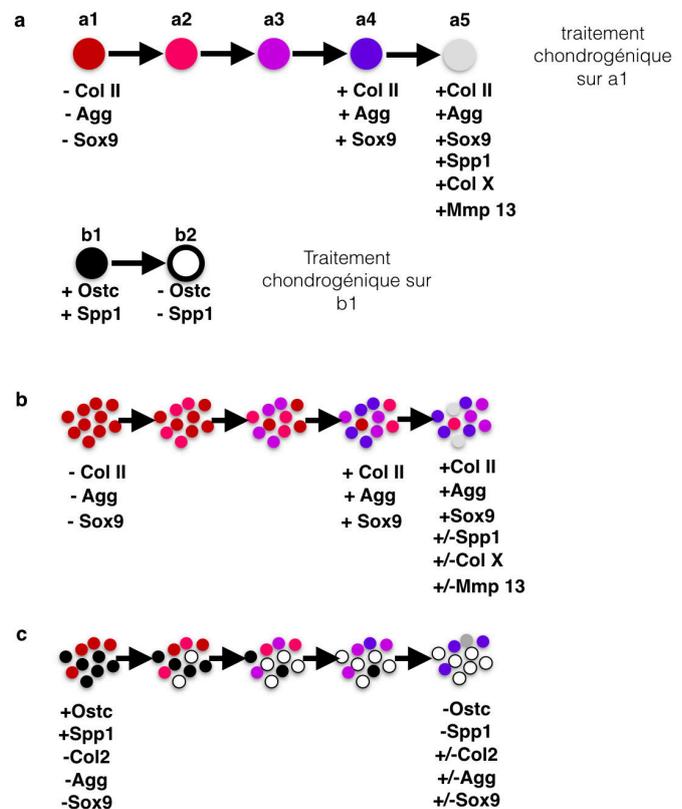
Soient deux types de progéniteurs cellulaires aux potentiels de différenciation différents (a). Deux populations de CSM hétérogènes l'une par rapport à l'autre aboutiraient à des profils de différenciation différents (b). Si une hétérogénéité intra-population se juxtapose à l'hétérogénéité inter-population, l'analyse des profils de différenciation de la population totale ne permettrait pas de discerner la part d'implication de l'hétérogénéité intra-population dans le résultat final (c).

De surcroît et de la même manière que pour l'hétérogénéité inter-populations, l'hétérogénéité intra-population peut être liée aux conditions physiologiques *in vivo* mais aussi à l'influence de procédés appliqués *in vitro* (Cai *et al.*, 2004). L'influence de l'isolement, de l'amplification et des expérimentations limite nos possibilités de conclusion sur la mécanistique impliquée dans la différence entre CSM-SPL et CSM-GW. Au cours de la différenciation chondrogénique, la variable de temps, la disponibilité en facteurs de croissance et en nutriments pourraient alors représenter une influence considérable dans l'interprétation de nos résultats.

L'ensemble de ces facteurs nous ont donc poussé à revoir certaines de nos hypothèses concernant les CSM-GW.

Ainsi, les faibles taux de *Col2a1* observés durant toute la durée de la chondrogenèse étaient en contradiction avec la rapide observation d'une bande mature de collagène de type II au niveau protéique. Nous avons tenté d'expliquer cette contradiction par la présence d'un pic transitoire de *Col2a1* durant les phases précoces de différenciation. Nous avons ainsi voulu vérifier cette hypothèse par des expériences de différenciation à haute densité cellulaire afin de mimer le phénomène de condensation des CSM-GW tout en diminuant la fenêtre d'analyse (à 24 h et J3). Nous n'avons pas pu mettre en évidence ce pic transitoire. Ainsi, nous pensons que la présence d'une réserve, même faible, d'ARNm *Col2a1* servant à l'expression du collagène de type II pouvait être masquée par nos outils de normalisation. En effet, si une faible proportion de progéniteurs chondrogéniques est présente au sein de la population de CSM-GW, alors cette dernière deviendrait limitante pour l'analyse de résultats d'ARNm normalisés au cours de l'expérimentation (1 µg d'ARNm total servant à la rétro-transcription) et lors de l'analyse par la méthode des ΔΔct ou des courbes standards. Cette remarque s'applique moins à l'analyse protéique, étant donné que le temps de demi-vie du collagène de type II est considérable (Verzijl *et al.*, 2000). Ainsi, la bande de collagène de type II observée représenterait l'accumulation de celui-ci durant les premières étapes de différenciation. Ainsi, cette hypothèse pourrait aller en faveur du modèle hiérarchique décrit en figure 119c, où les CSM-SPL seraient représentées par la population a et les CSM-GW par la population b.

Pour tous nos échantillons de CSM-GW, ces dernières ont montré une légère expression des marqueurs chondrocytaires au terme de la différenciation cellulaire (entre J21 et J28). Ces données pourraient provenir d'un signal cellulaire des progéniteurs chondrogéniques de la CSM-GW devenu détectable, soit par une augmentation de l'expression des marqueurs à partir de ces derniers, soit par leur sélection par le traitement chondrogénique au détriment des autres populations durant la différenciation.



**Figure 120 : Représentation schématique de deux profils chondroprogéniteurs hypothétiques.**

(a) Soient un type cellulaire dit chondroprogéniteur et un autre ostéogénique. Une population majoritairement composée de chondroprogéniteurs répondrait de façon classique à une analyse de cette différenciation avec l'expression *de novo* des marqueurs chondrocytaires voire hypertrophiques (b). Pour une population hétérogène composée minoritairement de chondroprogéniteurs, l'expression *de novo* des marqueurs chondrocytaires pourrait être masquée par les marqueurs spécifiques des types cellulaires colocalisant. Une perte progressive de ces derniers marqueurs pourrait permettre une quantification des marqueurs chondrocytaires au terme de la différenciation (c).

L'hypothèse de la sélection cellulaire au cours de la différenciation chondrogénique pourrait expliquer certains de nos résultats sur les marqueurs ostéoblastiques. En effet, il a été constaté que les CSM-GW présentaient de plus forts taux d'expression de *Spp1* et montraient une expression de l'otéocalcine avant la différenciation. Cette sur-expression semble perdue durant la différenciation pour laisser place à une faible expression des marqueurs chondrogéniques. Nous supposons ainsi que les CSM-GW pourraient contenir une proportion non négligeable de progéniteurs osseux ou de cellules pré-différenciées en ostéoblastes. Ces cellules étant placées dans un microenvironnement inadapté à leur développement, elles verraient leur activité de synthèse de leurs propres biomarqueurs spécifiques diminuer, voire même leur proportion cellulaire diminuer au sein de la population globale (Figure 120).

### **C. L'étude de la variété des progéniteurs cellulaires au sein d'une population.**

Cette variabilité entre les sources de CSM observable entre les espèces, parmi la même espèce, au sein d'une même population de CSM ou induite au cours de la culture rend difficile la recherche de caractères « souches » ou « stemness ». Il est possible que cette recherche de caractères communs ne permette pas d'aboutir à un outil de caractérisation des CSM satisfaisant durant ces prochaines années du fait des controverses existantes sur les propriétés, les facultés d'auto-renouvellement, de multipotence, l'origine et la nature biologique des CSM (Nombela-Arrieta *et al.*, 2011). Plutôt que de remettre en cause les critères de caractérisation des CSM actuels, nous voulons sensibiliser à une approche personnalisée sur les CSM comme outil thérapeutique. Cette approche personnalisée passe par une meilleure connaissance d'une source donnée de CSM pour une application donnée. L'objectif étant d'orienter la caractérisation générale des CSM vers la caractérisation d'une source de cellules souches au potentiel de différenciation et aux potentiels thérapeutiques définis pour une localisation somatique précise chez une espèce. Il est indispensable que cette caractérisation prenne en compte les variabilités pouvant être induites par l'isolement et les manipulations *in vitro*. A l'heure actuelle, les équipes de recherche tendent à maîtriser les spécificités d'un type (ou d'un nombre restreint) de CSM spécifique par soucis de rigueur scientifique ou d'obligation logistique ou technologique. Cette méthodologie contraignante d'étude personnalisée d'une ou d'un nombre restreint de sources à court terme pourrait aboutir à une plus grande maîtrise de l'utilisation des CSM à long terme.

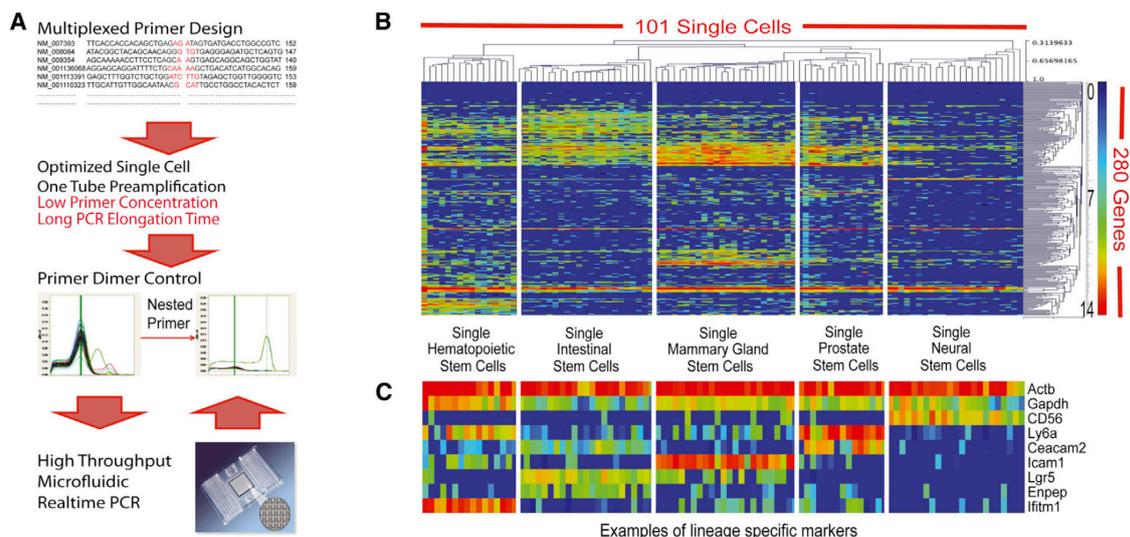
Dans ces objectifs et dans le but d'avoir une meilleure compréhension de la composition de la population cellulaire des sources de CSM, il est possible, à l'instar des groupes ayant travaillé sur l'hétérogénéité intra-population (ou inter-clonales), d'isoler les différents clones cellulaires issus d'un isolement de CSM et de les caractériser respectivement. A partir d'une telle étude, il serait alors possible de déterminer la proportion de progéniteurs de chaque lignage cellulaire et d'élaborer un profil d'identité d'une source de CSM donnée.

Néanmoins, des limites peuvent être observées si l'ensemble des cellules adhérentes récupérées sont difficiles à discerner et rendrait contraignante une sélection clonale à partir d'explants tissulaires. Il pourrait être nécessaire de passer par d'autres types de techniques pour évaluer la proportion de chaque progéniteur cellulaire de la population native ou parentale.

Il sera alors nécessaire de passer par des techniques d'analyse de l'unité cellulaire ou « Single-Cell Analysis » (SCA). La cytométrie en flux en est un exemple et représente notre unique preuve d'hétérogénéité des populations de CSM dans notre étude. L'analyse d'une population totale hétérogène implique des résultats sous forme de moyennes des signaux issus de dizaines de milliers de cellules. L'hétérogénéité inhérente à la population ou générée par un ensemble d'événements génétiques et biologiques stochastiques représente alors des données perdues dans un « bruit » biologique par la normalisation des résultats (Wang & Bodovitz, 2010). Les nouveaux outils biotechnologiques, plus précis et plus sensibles, comme la fluorescence, la microscopie à haute résolution, la microfluidique ou l'analyse haut débit permettent de s'attarder sur l'étude à l'échelle « une cellule ».

A partir de la SCA, il est possible d'isoler les résultats d'une cellule et d'obtenir un détail à haute résolution d'une signalisation cellulaire, d'une activation génique, d'un profil cellulaire protéique, transcriptomique ou épigénétique (Tang *et al.*, 2011; Islam *et al.*, 2011).

Par ailleurs, l'utilisation d'un phénomène ou d'une caractéristique biologique ou moléculaire connu (présence d'un récepteur sur une cellule spécifique, activation d'un gène par un traitement à un instant « t » ou la translocation d'une protéine intracellulaire) étudié à l'échelle « une cellule » sur un nombre largement significatif de cellules d'une même population pourrait aboutir à sa caractérisation. Par une autre méthodologie, il serait alors possible d'obtenir des résultats similaires ou plus approfondis que ceux issus des techniques d'études clonales sur les CSM (Guo *et al.*, 2013) (Figure 121).



**Figure 121 : Représentation schématique de la méthodologie employée pour l'élaboration de techniques de SCA.**

La « single cell analysis » représente une technologie haut débit permettant de mettre en évidence les fluctuations géniques/protéiques/biologiques existantes au sein d'une population cellulaire hétérogène. Elle représente un pas en avant dans la biologie cellulaire et moléculaire et notamment dans l'analyse « omique » des cellules souches (Guo *et al.*, 2013).

Ainsi, l'utilisation d'outils de SCA pourraient, d'une part mettre en évidence de façon précise l'hétérogénéité de nos populations de CSM, mais également aboutir à une caractérisation plus fine, plus exhaustive et mesurée des différentes sources de CSM. Cette caractérisation est indispensable à la bonne pratique de recherche sur les CSM.

## D. Les limites de la caractérisation des CSM : l'exemple des CSM de gelée de Wharton.

Notre étude a ainsi montré qu'alors que les CSM-SPL répondaient aux caractéristiques de CSM préconisées par l'ISCT, les CSM-GW ne répondaient pas pleinement à ces dernières au regard de leur potentiel de différenciation chondrogénique.

Comme nous l'avons vu dans la littérature, dépourvues de tout outil de comparaison, certaines publications récentes concluent positivement sur le potentiel chondrogénique des CSM-GW et encouragent leur utilisation en médecine régénérative du cartilage, au même titre que d'autres sources de CSM plus communément utilisées. Au regard de notre comparaison avec le potentiel de différenciation des CSM-SPL ainsi que d'autres résultats obtenus parmi d'autres sources de CSM, il semble nécessaire de déconseiller, en l'état actuel des connaissances sur la

différenciation chondrogénique des CSM-GW, d'utiliser ces dernières pour de telles thérapies. Il est, de plus, nécessaire de prendre en compte cet aspect différenciatif des CSM-GW dans l'élaboration de thérapies utilisant ces dernières.

Les limites apportées par l'absence d'un vrai marqueur spécifique des CSM, de seuils objectifs sur les caractérisation des CSM ainsi que les variabilités des résultats entre les sources de CSM nous incitent à considérer les critères de l'ISCT comme pouvant être optimisés. Ces derniers ne permettent pas, d'une part, d'assurer la prise en compte du caractère souche d'un type cellulaire avec certitude, et d'autre part, pourraient également favoriser l'exclusion de certaines sources cellulaires aux potentiels biologiques comparables aux cellules souches.

Nos résultats nous poussent à se poser la question du caractère souche des CSM-GW. Du fait de leur éloignement par rapport aux critères de l'ISCT, ces dernières pourraient potentiellement être exclues de la classification des CSM. Or, ce type de CSM est attractif par bien d'autres aspects que ceux ciblés en ingénierie tissulaire du cartilage.

Nous n'avons pu vérifier avec certitude la différenciation chondrogénique des CSM-GW. Néanmoins, dans la littérature, les CSM-GW présentent de potentielles applications dans le traitement de maladies dégénératives telle que la maladie de Parkinson. Il a notamment été montré qu'il était possible d'induire une neurogenèse chez ces CSM et que leur transplantation au stade différencié dans le cerveau murin montrait une pérennité des cellules sur 4 mois au niveau des zones lésionnelles neuronales (Fu *et al.*, 2006). Par ailleurs, il est possible de différencier les CSM-GW en cellules endothéliales, favorisant ainsi l'angiogenèse et la reconstruction de vaisseaux sanguins. De plus, il a été montré que cette capacité à supporter l'angiogenèse par les CSM-GW était supérieure à celle des CSM-SPL (Chen *et al.*, 2009). La capacité de différenciation des CSM-GW en cellules pancréatiques pourrait permettre également de traiter les maladies issues d'un dérèglement hormonal comme le diabète de type I (Chao *et al.*, 2008).

Leur capacité d'isolement, leur forte prolifération cellulaire et leurs propriétés biologiques font des CSM-GW des cellules « industrialisables » et notamment en médecine régénérative. En effet, elles sont douées de capacité d'immunosuppression, font preuve d'innocuité, ne sont pas rejetées par l'organisme après transplantation (Weiss *et al.*, 2008) et ont notamment fait ou font l'objet d'au moins huit essais cliniques chez l'Homme (d'après clinicaltrials.gov). Il a également été montré en 2015 que l'injection intra-articulaire de CSM-GW équines dans un modèle murin d'arthropathie induite diminuait l'activité catalytique induite par l'inflammation de l'articulation et diminuait les signes cliniques de la maladie (Saulnier *et al.*, 2015).

Ainsi, plutôt que de réfuter l'appartenance des CSM-GW au statut de CSM, nous insistons sur le fait que les critères de l'ISCT servant à caractériser les CSM ne sont pas particulièrement adaptés à la caractérisation des CSM-GW et à la prédiction de leurs propriétés biologiques ainsi que de leur utilisation thérapeutique.



# Bibliographie

---

## A

---

- Adams, O. R. (1966). *Lameness in horses*. 2nd edition. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Aigner, T., and Stöve, J. (2003). Collagens—major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 1569–1593.
- Aigner, T., Bertling, W., Stöss, H., Weseloh, G., and Mark, von der, K. (1993). Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *J. Clin. Invest.* 91, 829–837.
- Aigner, T., Cook, J.L., Gerwin, N., Glasson, S.S., Lavery, S., Little, C.B., McIlwraith, W., and Kraus, V.B. (2010). *Histopathology atlas of animal model systems - overview of guiding principles*. *Osteoarthr. Cartil.* 18 Suppl 3, S2–S6.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science.
- Alliston, T., Choy, L., Ducey, P., Karsenty, G., and Derynck, R. (2001). TGF- $\beta$ -induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases *cbfa1* and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *Embo J.* 20, 2254–2272.
- Altman, R.D., Abramson, S., Bruyere, O., Clegg, D., Herrero-Beaumont, G., Maheu, E., Moskowitz, R., Pavelka, K., and Reginster, J.Y. (2006). Commentary: osteoarthritis of the knee and glucosamine. *Osteoarthr. Cartil.* 14, 963–966.
- Anderson, P., Carrillo-Gálvez, A.B., García-Pérez, A., Cobo, M., and Martín, F. (2013). CD105 (endoglin)-negative murine mesenchymal stromal cells define a new multipotent subpopulation with distinct differentiation and immunomodulatory capacities. *PLoS ONE* 8, e76979.
- Archer, C.W., and Francis-West, P. (2003). The chondrocyte. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 401–404.
- Arufe, M.C., la Fuente, De, A., Mateos, J., Fuentes, I., De Toro, F.J., and Blanco, F.J. (2011). Analysis of the chondrogenic potential and secretome of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord stroma. *Stem Cells Dev.* 20, 1199–1212.
- Asghar, W., Shafiee, H., Chen, P., and Tasoglu, S. (2013). In vitro three-dimensional cancer culture models. *Cancer Targeted Drug Delivery* 635–665.
- Assoian, R.K., Komoriya, A., Meyers, C.A., Miller, D.M., and Sporn, M.B. (1983). Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* 258, 7155–7160.
- Aubert-Foucher, E., Mayer, N., Pasedeloup, M., Pagnon, A., Hartmann, D., and Mallein-Gerin, F. (2014). A unique tool to selectively detect the chondrogenic IIB form of human type II procollagen protein. *Matrix Biol.* 34, 80–88.

## B

---

- Bahney, C.S., Hu, D.P., Mclau, T., and Marcucio, R.S. (2015). The Multifaceted Role of the Vasculature in Endochondral Fracture Repair. *Front. Endocrinol.* 6, 489–10.
- Barry, F., and Murphy, M. (2013). Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9, 584–594.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233.
- Bartosh, T.J., Ylöstalo, J.H., Mohammadipoor, A., Bazhanov, N., Coble, K., Claypool, K., Lee, R.H., Choi, H., and Prockop, D.J. (2010). Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 13724–13729.
- Beegle, J., Lakatos, K., Kalomoiris, S., Stewart, H., Isseroff, R.R., Nolte, J.A., and Fierro, F.A. (2015). Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes, enhances survival, and promotes cell retention in vivo. *Stem Cells* 33, 1818–1828.

- Beeravolu, N., Khan, I., McKee, C., Dinda, S., Thibodeau, B., Wilson, G., Perez-Cruet, M., Bahado-Singh, R., and Chaudhry, G.R. (2016). Isolation and comparative analysis of potential stem/progenitor cells from different regions of human umbilical cord. *Stem Cell Res.* 16, 696–711.
- Behrens, P., Bitter, T., Kurz, B., and Russlies, M. (2006). Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)--5-year follow-up. *Knee* 13, 194–202.
- Behzad-Behbahani, A., Pouransari, R., Tabei, S.Z., Rahiminejad, M.S., Robati, M., Yaghobi, R., Nourani, H., Ramzi, M.M., Farhadi-Andarabi, A., Mojiri, A., Rahsaz, M., Banihashemi, M. and Zare, N. (2005). Risk of viral transmission via bone marrow progenitor cells versus umbilical cord blood hematopoietic stem cells in bone marrow transplantation. *Transplant. Proc.* 37, 3211–3212.
- Benedek, T.G. (2006). A history of the understanding of cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* 14, 203–209.
- Benninghoff, A. (1925). Form und Bau der Gelenknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion. *Z Anat. Entwickl. Gesch.* 76, 43–63.
- Benya, P.D., Padilla, S.R., and Nimni, M.E. (1978). Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell* 15, 1313–1321.
- Bianco, P., Cao, X., Frenette, P.S., Mao, J.J., Robey, P.G., Simmons, P.J., and Wang, C.Y. (2013). The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat. Med.* 19, 35–42.
- Bieback, K., Kern, S., Klüter, H., and Eichler, H. (2004). Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 22, 625–634.
- Billing, A.M., Ben Hamidane, H., Dib, S.S., Cotton, R.J., Bhagwat, A.M., Kumar, P., Hayat, S., Yousri, N.A., Goswami, N., Suhre, K., Rafii, A. and Graumann, J. (2016). Comprehensive transcriptomic and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells reveals source specific cellular markers. *Sci. Rep.* 6, 21507.
- Blanco, F.J., Rego, I., and Ruiz-Romero, C. (2011). The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 161–169.
- Bosch, J., Houben, A.P., Radke, T.F., Stapelkamp, D., Bünemann, E., Balan, P., Buchheiser, A., Liedtke, S., and Kögler, G. (2012). Distinct differentiation potential of “MSC” derived from cord blood and umbilical cord: are cord-derived cells true mesenchymal stromal cells? *Stem Cells Dev.* 21, 1977–1988.
- Bottini, N., and Firestein, G.S. (2013). Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9, 24–33.
- Brandt, K.D., Dieppe, P., and Radin, E.L. (2008). Etiopathogenesis of osteoarthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 34, 531–559.
- Branly, T., Bertoni, L., Contentin, R., Rakic, R., Gomez-Leduc, T., Desancé, M., Hervieu, M., Legendre, F., Jacquet, S., Audigié, F., Denoix, J.M., Demoor, M. and Galéra, P. (2017). Characterization and use of Equine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Equine Cartilage Engineering. Study of their Hyaline Cartilage Forming Potential when Cultured under Hypoxia within a Biomaterial in the Presence of BMP-2 and TGF-β1. *Stem Cell Rev.* 55, 1569–20.
- Brittberg, M. (1999). Autologous chondrocyte transplantation. *Clinical Orthopaedics and Related Research* S147–S155.
- Brittberg, M. (2010). Cell carriers as the next generation of cell therapy for cartilage repair: a review of the matrix-induced autologous chondrocyte implantation procedure. *Am. J. Sports Med.* 38, 1259–1271.
- Brittberg, M., and Winalski, C.S. (2003). Evaluation of cartilage injuries and repair. *J. Bone Joint. Surg. Am.* 85-A Suppl 2, 58–69.
- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., and Peterson, L. (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 331, 889–895.
- Burk, J., Ribitsch, I., Gittel, C., Juelke, H., Kasper, C., Staszky, C., and Brehm, W. (2013). Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *Vet. J.* 195, 98–106.

## C

- 
- Cai, J., Weiss, M.L., and Rao, M.S. (2004). In search of "stemness". *Exp. Hematol.* 32, 585–598.

- Callender, G.R., and Kelsner, R.A. (1938). Degenerative arthritis: A comparison of the pathological changes in man and equines. *Am. J. Pathol.* 14, 253–272.259.
- Campagnoli, C., Roberts, I.A., Kumar, S., Bennett, P.R., Bellantuono, I., and Fisk, N.M. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98, 2396–2402.
- Cao, B., Li, Z., Peng, R., and Ding, J. (2015). Effects of cell-cell contact and oxygen tension on chondrogenic differentiation of stem cells. *Biomaterials* 64, 21–32.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9, 641–650.
- Caplan, A.I., and Dennis, J.E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell. Biochem.* 98, 1076–1084.
- Carlin, R., Davis, D., Weiss, M., Schultz, B., and Troyer, D. (2006). Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4, 8.
- Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., and Chakraborti, T. (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol. Cell. Biochem.* 253, 269–285.
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., and Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25, 2739–2749.
- Chao, K.C., Chao, K.F., Fu, Y.-S., and Liu, S.H. (2008). Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. *PLoS ONE* 3, e1451.
- Chen, F.H., Rousche, K.T., and Tuan, R.S. (2006). Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2, 373–382.
- Chen, M.-Y., Lie, P.-C., Li, Z.-L., and Wei, X. (2009). Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.* 37, 629–640.
- Chevalier, X., Eymard, F., and Richette, P. (2013). Biologic agents in osteoarthritis: hopes and disappointments. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9, 400–410.
- Chien, J., Staub, J., Hu, S.-I., Erickson-Johnson, M.R., Couch, F.J., Smith, D.I., Crowl, R.M., Kaufmann, S.H., and Shridhar, V. (2004). A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer. *Oncogene* 23, 1636–1644.
- Cho, Y.-G., Cho, M.-L., Min, S.-Y., and Kim, H.-Y. (2007). Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 7, 65–70.
- Cipolleschi, M.G., Sbarba, Dello, P., and Olivotto, M. (1993). The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* 82, 2031–2037.
- Claus, S., Aubert-Foucher, E., Demoor, M., Camuzeaux, B., Paumier, A., Piperno, M., Damour, O., Duterque-Coquillaud, M., Galera, P., and Mallein-Gerin, F. (2010). Chronic exposure of bone morphogenetic protein-2 favors chondrogenic expression in human articular chondrocytes amplified in monolayer cultures. *J. Cell. Biochem.* 111, 1642–1651.
- Claus, S., Mayer, N., Aubert-Foucher, E., Chajra, H., Perrier-Groult, E., Lafont, J., Piperno, M., Damour, O., and Mallein-Gerin, F. (2012). Cartilage-Characteristic Matrix Reconstruction by Sequential Addition of Soluble Factors During Expansion of Human Articular Chondrocytes and Their Cultivation in Collagen Sponges. *Tissue Eng. Part C Methods* 18, 104–112.
- Cleary, M.A., van Osch, G.J.V.M., Brama, P.A., Hellingman, C.A., and Narcisi, R. (2015). FGF, TGF $\beta$  and Wnt crosstalk: embryonic to in vitro cartilage development from mesenchymal stem cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 9, 332–342.
- Coles, J.M., Zhang, L., Blum, J.J., Warman, M.L., Jay, G.D., Guilak, F., and Zauscher, S. (2010). Loss of cartilage structure, stiffness, and frictional properties in mice lacking PRG4. *Arthritis Rheum.* 62, 1666–1674.
- Corsten, M.F., and Shah, K. (2008). Therapeutic stem-cells for cancer treatment: hopes and hurdles in tactical warfare. *Lancet Oncol.* 9, 376–384.
- Cox, R.W., and Peacock, M.A. (1977). The fine structure of developing elastic cartilage. *J. Anat.* 123, 283–296.
- Croitoru-Lamoury, J., Lamoury, F.M.J., Caristo, M., Suzuki, K., Walker, D., Takikawa, O., Taylor, R., and Brew, B.J. (2011). Interferon- $\gamma$  regulates the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells via activation of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO). *PLoS ONE* 6, e14698.

## D

---

De Luca F, Barnes, K.M., Uyeda, J.A., De-Levi, S., Abad, V., Palese, T., Mericq, V., and Baron, J. (2001). Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology* 142, 430–436.

De Schauwer, C., Meyer, E., Van de Walle, G.R., and Van Soom, A. (2011). Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology* 75, 1431–1443.

Deane, N.J., and Davies, A.S. (1995). The function of the equine carpal joint: A review. *N. Z. Vet. J.* 43, 45–47.

Demoor, M., Ollitrault, D., Gomez-Leduc, T., Bouyoucef, M., Hervieu, M., Fabre, H., Lafont, J., Denoix, J.-M., Audigié, F., Mallein-Gerin, F., Legendre, F. and Galéra, P. (2014). Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 2414–2440.

Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S., and Gianni, A.M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99, 3838–3843.

Djouad, F., Bouffi, C., Ghannam, S., Noël, D., and Jorgensen, C. (2009). Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5, 392–399.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.

Dunwoodie, S.L. (2009). The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Dev. Cell* 17, 755–773.

Duval, E., Bouyoucef, M., Leclercq, S., Baugé, C., and Boumédiene, K. (2016). Hypoxia inducible factor 1 alpha down-regulates type I collagen through Sp3 transcription factor in human chondrocytes. *IUBMB Life* 68, 756–763.

Duval, E., Leclercq, S., Elissalde, J.-M., Demoor, M., Galéra, P., and Boumédiene, K. (2009). Hypoxia-inducible factor 1alpha inhibits the fibroblast-like markers type I and type III collagen during hypoxia-induced chondrocyte redifferentiation: hypoxia not only induces type II collagen and aggrecan, but it also inhibits type I and type III collagen in the hypoxia-inducible factor 1alpha-dependent redifferentiation of chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 60, 3038–3048.

## E

---

Eames, B.F., Sharpe, P.T., and Helms, J.A. (2004). Hierarchy revealed in the specification of three skeletal fates by Sox9 and Runx2. *Dev. Biol.* 274, 188–200.

Erices, A., Conget, P., and Minguell, J.J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.* 109, 235–242.

Eyre, D.R. (2004). Collagens and cartilage matrix homeostasis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 427S, S118–S122.

Eyre, D.R., Weis, M.A., and Wu, J.-J. (2006). Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *Eur. Cell. Mater.* 12, 57–63.

Eyre, D.R., Weis, M.A., and Wu, J.-J. (2008). Advances in collagen cross-link analysis. *Methods* 45, 65–74.

## F

---

Farrell, E., Both, S.K., Odörfer, K.I., Koevoet, W., Kops, N., O'Brien, F.J., Baatenburg de Jong, R.J., Verhaar, J.A., Cuijpers, V., Jansen, J., Erben, R.G. and van Osch G.J. (2011). In-vivo generation of bone via endochondral ossification by in-vitro chondrogenic priming of adult human and rat mesenchymal stem cells. *BMC Musculoskelet Disord.* 12, 31.

Fell, H.B. (1925). The histogenesis of cartilage and bone in the long bones of the embryonic fowl. *J. Morphol.* 40, 417–459.

Felson, D.T. (2006). Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *N. Engl. J. Med.* 354, 841–848.

Fermor, B., Christensen, S.E., Youn, I., Cernanec, J.M., Davies, C.M., and Weinberg, J.B. (2007). Oxygen, nitric oxide and articular cartilage. *Eur. Cell. Mater.* 13, 56–65–discussion65.

- Fitzpatrick, L.E., and McDevitt, T.C. (2015). Cell-derived matrices for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Biomater. Sci.* 3, 12–24.
- Fong, C.-Y., Subramanian, A., Gauthaman, K., Venugopal, J., Biswas, A., Ramakrishna, S., and Bongso, A. (2011). Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Stem Cells Undergo Enhanced Chondrogenic Differentiation when Grown on Nanofibrous Scaffolds and in a Sequential Two-stage Culture Medium Environment. *Stem Cell Rev. and Rep.* 8, 195–209.
- Fouillard, L., Bensidhoum, M., Bories, D., Bonte, H., Lopez, M., Moseley, A.-M., Smith, A., Lesage, S., Beaujean, F., Thierry, D., Gourmelon, P., Najman, A. and Gorin, N.C. (2003). Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia* 17, 474–476.
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., and Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3, 393–403.
- Frisbie, D.D., and Smith, R.K.W. (2010). Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Vet. J.* 42, 86–89.
- Frisbie, D.D., Bowman, S.M., Colhoun, H.A., DiCarlo, E.F., Kawcak, C.E., and McIlwraith, C.W. (2008). Evaluation of autologous chondrocyte transplantation via a collagen membrane in equine articular defects: results at 12 and 18 months. *Osteoarthr. Cartil.* 16, 667–679.
- Frisbie, D.D., Kisiday, J.D., Kawcak, C.E., Werpy, N.M., and McIlwraith, C.W. (2009). Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* 27, 1675–1680.
- Fu, Y.-S., Cheng, Y.-C., Lin, M.-Y.A., Cheng, H., Chu, P.-M., Chou, S.-C., Shih, Y.-H., Ko, M.-H., and Sung, M.-S. (2006). Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells* 24, 115–124.
- Furumatsu, T., Ozaki, T., and Asahara, H. (2009). Smad3 activates the Sox9-dependent transcription on chromatin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1198–1204.

## G

---

- Gadjanski, I., Spiller, K., and Vunjak-Novakovic, G. (2012). Time-dependent processes in stem cell-based tissue engineering of articular cartilage. *Stem Cell Rev.* 8, 863–881.
- Galéra, P., Ollitrault, D., Legendre, F., Demoor, M., Mallein-Gerin, F., Boumédiène, K., Herbage, B., Duterque-Coquillaud, M., and Damour, O. (2012). Method for obtaining differentiated articular chondrocytes in vitro or ex vivo and uses of same. C12N5/077(2010.01).
- Galéra, P., Vivien, D., Pronost, S., Bonaventure, J., Rédini, F., Loyau, G., and Pujol, J.-P. (1992). Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) up-regulation of collagen type II in primary cultures of rabbit articular chondrocytes (RAC) involves increased mRNA levels without affecting mRNA stability and procollagen processing. *J. Cell. Physiol.* 153, 596–606.
- Gang, E.J., Jeong, J.A., Hong, S.H., Hwang, S.H., Kim, S.W., Yang, I.H., Ahn, C., Han, H., and Kim, H. (2004). Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells* 22, 617–624.
- Corbin-Gardey, C. (2001). Pathologie du vieux cheval : Etude d'une population de chevaux en retraite à Pech Petit (Doctoral dissertation, Ecole nationale vétérinaire de Lyon).
- Gebler, A., Zabel, O., and Seliger, B. (2012). The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol. Med.* 18, 128–134.
- Gelse, K., Pöschl, E., and Aigner, T. (2003). Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 1531–1546.
- Ghone, N.V., and Grayson, W.L. (2012). Recapitulation of mesenchymal condensation enhances in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* 227, 3701–3708.
- Gibson, J.S., Milner, P.I., White, R., Fairfax, T.P.A., and Wilkins, R.J. (2008). Oxygen and reactive oxygen species in articular cartilage: modulators of ionic homeostasis. *Pflugers Arch.* 455, 563–573.
- Giles, A.J., Chien, C.D., Reid, C.M., Fry, T.J., Park, D.M., Kaplan, R.N., and Gilbert, M.R. (2016). The functional interplay between systemic cancer and the hematopoietic stem cell niche. *Pharmacol. Ther.* 168, 53–60.

- Goers, L., Freemont, P., and Polizzi, K.M. (2014). Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *J. R. Soc. Interface* 11.
- Goldring, M.B., Tsuchimochi, K., and Ijiri, K. (2006). The control of chondrogenesis. *J. Cell. Biochem.* 97, 33–44.
- Goldring, M.B., Fukuo, K., Birkhead, J.R., Dudek, E., and Sandell, L.J. (1994). Transcriptional suppression by interleukin-1 and interferon- $\gamma$  of type II collagen gene expression in human chondrocytes. *J. Cell. Biochem.* 54, 85–99.
- Goldring, M.B., Otero, M., Plumb, D.A., Dragomir, C., Favero, M., Hachem, El, K., Hashimoto, K., Roach, H.I., Olivotto, E., Borzi, R.M. and Marcu, K.B. (2011). Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur. Cell. Mater.* 21, 202–220.
- Goldring, M.B., Tsuchimochi, K., and Ijiri, K. (2006). The control of chondrogenesis. *J. Cell. Biochem.* 97, 33–44.
- Gomez-Leduc, T., Hervieu, M., Legendre, F., Bouyoucef, M., Gruchy, N., Poulain, L., de Vienne, C., Herlicoviez, M., Demoor, M., and Galéra, P. (2016). Chondrogenic commitment of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in collagen matrices for cartilage engineering. *Sci. Rep.* 6, 32786.
- Goodrich, L.R., and Nixon, A.J. (2006). Medical treatment of osteoarthritis in the horse – A review. *Vet. J.* 171, 51–69.
- Goyal, D., Goyal, A., Keyhani, S., Lee, E.H., and Hui, J.H.P. (2013). Evidence-based status of second- and third-generation autologous chondrocyte implantation over first generation: a systematic review of level I and II studies. *Arthroscopy* 29, 1872–1878.
- Grau, S., Richards, P.J., Kerr, B., Hughes, C., Caterson, B., Williams, A.S., Junker, U., Jones, S.A., Clausen, T., and Ehrmann, M. (2006). The role of human HtrA1 in arthritic disease. *J. Biol. Chem.* 281, 6124–6129.
- Grayson, W.L., Zhao, F., Izadpanah, R., Bunnell, B., and Ma, T. (2006). Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J. Cell. Physiol.* 207, 331–339.
- Gregory, C. (2011). *Gregory's textbook of farriery*. Heartland Horseshoeing School.
- Griffin, D.J., Bonnevie, E.D., Lachowsky, D.J., Hart, J.C.A., Sparks, H.D., Moran, N., Matthews, G., Nixon, A.J., Cohen, I., and Bonassar, L.J. (2015). Mechanical characterization of matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI®) grafts in an equine model at 53 weeks. *J Biomech* 48, 1944–1949.
- Grogan, S.P., Miyaki, S., Asahara, H., D'Lima, D.D., and Lotz, M.K. (2009). Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 11, R85.
- Guilak, F., Alexopoulos, L.G., Upton, M.L., Youn, I., Choi, J.B., Cao, L., Setton, L.A., and Haider, M.A. (2006). The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1068, 498–512.
- Guo, G., Luc, S., Marco, E., Lin, T.-W., Peng, C., Kerényi, M.A., Beyaz, S., Kim, W., Xu, J., Das, P.P., Neff, T., Zou, K., Yuan, G.C. and Orkin, S.H. (2013). Mapping cellular hierarchy by single-cell analysis of the cell surface repertoire. *Cell Stem Cell* 13, 492–505.

## H

---

- Haddo, O., Mahroof, S., Higgs, D., David, L., Pringle, J., Bayliss, M., Cannon, S.R., and Briggs, T.W.R. (2004). The use of chondroglide membrane in autologous chondrocyte implantation. *Knee* 11, 51–55.
- Hagiwara, Y., Ando, A., Chimoto, E., Tsuchiya, M., Takahashi, I., Sasano, Y., Onoda, Y., Suda, H., and Itoi, E. (2010). Expression of collagen types I and II on articular cartilage in a rat knee contracture model. *Connect. Tissue Res.* 51, 22–30.
- Halász, K., Kassner, A., Mörgelin, M., and Heinegård, D. (2007). COMP acts as a catalyst in collagen fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* 282, 31166–31173.
- Hall, B.K., and Miyake, T. (2000). All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* 22, 138–147.
- Ham, O., Lee, C.Y., Song, B.-W., Lee, S.-Y., Kim, R., Park, J.-H., Lee, J., Seo, H.-H., Lee, C.Y., Chung, Y.-A., Maeng, L.S., Lee, M.Y., Kim, J. and Hwang, J. (2014). Upregulation of miR-23b enhances the autologous therapeutic potential for degenerative arthritis by targeting PRKACB in synovial fluid-derived mesenchymal stem cells from patients. *Mol. Cells* 37, 449–456.

- Handorf, A.M., and Li, W.-J. (2014). Induction of mesenchymal stem cell chondrogenesis through sequential administration of growth factors within specific temporal windows. *J. Cell. Physiol.* 229, 162–171.
- Hardin, J.A., Cobelli, N., and Santambrogio, L. (2015). Consequences of metabolic and oxidative modifications of cartilage tissue. *Nat. Rev. Rheumatol.* 11, 521–529.
- Hardingham, T.E., and Fosang, A.J. (1992). Proteoglycans: many forms and many functions. *Faseb J.* 6, 861–870.
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., and Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun. Signal* 9, 12.
- Haugh, M.G., Meyer, E.G., Thorpe, S.D., Vinardell, T., Duffy, G.P., and Kelly, D.J. (2011). Temporal and spatial changes in cartilage-matrix-specific gene expression in mesenchymal stem cells in response to dynamic compression. *Tissue Eng. Part A* 17, 3085–3093.
- Heinegård, D. (2009). Proteoglycans and more--from molecules to biology. *Int J Exp Pathol* 90, 575–586.
- Heinegård, D., and Saxne, T. (2011). The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 50–56.
- Hennig, T., Lorenz, H., Thiel, A., Goetzke, K., Dickhut, A., Geiger, F., and Richter, W. (2007). Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. *J. Cell. Physiol.* 211, 682–691.
- Hildner, F., Wolbank, S., Redl, H., van Griensven, M., and Peterbauer, A. (2010). How chondrogenic are human umbilical cord matrix cells? A comparison to adipose-derived stem cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 4, 242–245.
- Hilz, F.M., Ahrens, P., Grad, S., Stoddart, M.J., Dahmani, C., Wilken, F.L., Sauerschnig, M., Niemeyer, P., Zwingmann, J., Burgkart, R., von Eisenhart-Rothe, Rüdiger., Südkamp, P.N., Weyh, T., Imhoff, B.A., Alini, M. and Salzmann, M.G. (2014). Influence of extremely low frequency, low energy electromagnetic fields and combined mechanical stimulation on chondrocytes in 3-D constructs for cartilage tissue engineering. *Bioelectromagnetics* 35, 116–128.
- Hochedlinger, K., and Plath, K. (2009). Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* 136, 509–523.
- Hong, S.H., Gang, E.J., Jeong, J.A., Ahn, C., Hwang, S.H., Yang, I.H., Park, H.K., Han, H., and Kim, H. (2005). In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 1153–1161.
- Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., and Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393–395.
- Huang, G.T.J., Gronthos, S., and Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J. Dent. Res.* 88, 792–806.
- Hubka, K.M., Dahlin, R.L., Meretoja, V.V., Kasper, F.K., and Mikos, A.G. (2014). Enhancing chondrogenic phenotype for cartilage tissue engineering: monoculture and coculture of articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part B Rev.* 20, 641–654.
- Hunter, W. (1742). *Of the structure and diseases of articulating cartilages*, by William Hunter, surgeon. *Philosophical Transactions*.
- Hutmacher, D.W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21, 2529–2543.
- 
- Im, H.-J., Muddasani, P., Natarajan, V., Schmid, T.M., Block, J.A., Davis, F., van Wijnen, A.J., and Loeser, R.F. (2007). Basic fibroblast growth factor stimulates matrix metalloproteinase-13 via the molecular cross-talk between the mitogen-activated protein kinases and protein kinase Cdelta pathways in human adult articular chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 282, 11110–11121.
- Islam, S., Kjällquist, U., Moliner, A., Zajac, P., Fan, J.-B., Lönnerberg, P., and Linnarsson, S. (2011). Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq. *Genome Res.* 21, 1160–1167.
- Ito, K., and Suda, T. (2014). Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 243–256.

## J

---

- Jain, S., Kaur, H., Pandav, G., and DeWan, A. (2014). Collagen: basis of life. *Univ. Res. J. Dent.* 4, 1.
- Jaiswal, R.K., Jaiswal, N., Bruder, S.P., Mbalaviele, G., Marshak, D.R., and Pittenger, M.F. (2000). Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 275, 9645–9652.
- Jiang, Y., and Tuan, R.S. (2015). Origin and function of cartilage stem/progenitor cells in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 11, 206–212.

## K

---

- Kadler, K.E., Hill, A., and Canty-Laird, E.G. (2008). Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 495–501.
- Kalaszczynska, I., and Ferdyn, K. (2015). Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells: future of regenerative medicine? Recent findings and clinical significance. *Biomed. Res. Int.* 2015, 430847.
- Kaneko, S., Satoh, T., Chiba, J., Ju, C., Inoue, K., and Kagawa, J. (2000). Interleukin-6 and interleukin-8 levels in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Cytokines Cell. Mol. Ther.* 6, 71–79.
- Kanichai, M., Ferguson, D., Prendergast, P.J., and Campbell, V.A. (2008). Hypoxia promotes chondrogenesis in rat mesenchymal stem cells: a role for AKT and hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ . *J. Cell. Physiol.* 216, 708–715.
- Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J.-P., and Fahmi, H. (2011). Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 33–42.
- Karagianni, M., Brinkmann, I., Kinzebach, S., Grassl, M., Weiss, C., Bugert, P., and Bieback, K. (2013). A comparative analysis of the adipogenic potential in human mesenchymal stromal cells from cord blood and other sources. *Cytotherapy* 15, 76–88.
- Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G.G., Demiralp, D.Ö., Tukun, A., Uckan, D., and Can, A. (2007). Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys. *Stem Cells* 25, 319–331.
- Kassem, M. (2004). Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning Stem Cells* 6, 369–374.
- Keeney, M., and Pandit, A. (2009). The osteochondral junction and its repair via bi-phasic tissue engineering scaffolds. *Tissue Eng. Part B Rev.* 15, 55–73.
- Kern, B., Shen, J., Starbuck, M., and Karsenty, G. (2001). Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *J. Biol. Chem.* 276, 7101–7107.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., and Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24, 1294–1301.
- Kevorkian, L., Young, D.A., Darrah, C., Donell, S.T., Shepstone, L., Porter, S., Brockbank, S.M.V., Edwards, D.R., Parker, A.E., and Clark, I.M. (2004). Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis Rheum.* 50, 131–141.
- Kheir, E., and Shaw, D. (2009). Hyaline articular cartilage. *Orthop. Trauma.* 23, 450–455.
- Kiani, C., Chen, L., Wu, Y.J., Yee, A.J., and Yang, B.B. (2002). Structure and function of aggrecan. *Cell Res.* 12, 19–32.
- Kiezun, A., Artzi, S., Modai, S., Volk, N., Isakov, O., and Shomron, N. (2012). miRviewer: a multispecies microRNA homologous viewer. *BMC Res. Notes* 5, 92.
- Kim, M.-C., Lee, S.-W., Ryu, D.-Y., Cui, F.-J., Bhak, J., and Kim, Y. (2014). Identification and characterization of microRNAs in normal equine tissues by Next Generation Sequencing. *PLoS ONE* 9, e93662.
- Klein, T.J., Rizzi, S.C., Reichert, J.C., Georgi, N., Malda, J., Schuurman, W., Crawford, R.W., and Hutmacher, D.W. (2009). Strategies for zonal cartilage repair using hydrogels. *Macromol. Biosci.* 9, 1049–1058.

Klontzas, M.E., Kenanidis, E.I., Heliotis, M., Tsiroidis, E., and Mantalaris, A. (2015). Bone and cartilage regeneration with the use of umbilical cord mesenchymal stem cells. *Expert Opin. Biol. Ther.* 15, 1541–1552.

Komarova, S., Roth, J., Alvarez, R., Curiel, D.T., and Pereboeva, L. (2010). Targeting of mesenchymal stem cells to ovarian tumors via an artificial receptor. *J. Ovarian Res.* 3, 12.

Komori, T. (2011). Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. *J. Cell. Biochem.* 112, 750–755.

Krampera, M., Galipeau, J., Shi, Y., Tarte, K., and Sensebé, L. (2013). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy* 15, 1054–1061.

Kronenberg, H.M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423, 332–336.

## L

Lafont, J.E., Poujade, F.A., Padeloup, M., Neyret, P., and Mallein-Gerin, F. (2016). Hypoxia potentiates the BMP-2 driven COL2A1 stimulation in human articular chondrocytes via p38 MAPK. *Osteoarthr. Cartil.* 24, 856–867.

Lancaster, M.A., and Knoblich, J.A. (2014). Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 345, 1247125.

Lane, L.B., Villacin, A., and Bullough, P.G. (1977). The vascularity and remodelling of subchondrial bone and calcified cartilage in adult human femoral and humeral heads. An age- and stress-related phenomenon. *J. Bone Joint Surg. Br.* 59, 272–278.

Lane, S.W., Williams, D.A., and Watt, F.M. (2014). Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nat. Biotechnol.* 32, 795–803.

Lau, T.T., Peck, Y., Huang, W., and Wang, D.-A. (2015). Optimization of chondrocyte isolation and phenotype characterization for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng. Part C Methods* 21, 105–111.

Laugier, C. (2016). Etude rétrospective des principales causes de mortalité des poulains au cours de la première semaine de vie. *J.D.G.* 2978, 18-21.

Lavery, K., Swain, P., Falb, D., and Alaoui-Ismaili, M.H. (2008). BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Biol. Chem.* 283, 20948–20958.

Lavrentieva, A., Majore, I., Kasper, C., and Hass, R. (2010). Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun. Signal* 8, 18.

Le Pen, C., Reygrobelle, C., and Gérentes, I. (2005). Financial cost of osteoarthritis in France. The “COART” France study. *Joint Bone Spine* 72, 567–570.

Lee, A.S., Ellman, M.B., Yan, D., Kroin, J.S., Cole, B.J., van Wijnen, A.J., and Im, H.-J. (2013). A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene* 527, 440–447.

Lee, H.-H., Chang, C.-C., Shieh, M.-J., Wang, J.-P., Chen, Y.-T., Young, T.-H., and Hung, S.-C. (2013). Hypoxia enhances chondrogenesis and prevents terminal differentiation through PI3K/Akt/FoxO dependent anti-apoptotic effect. *Sci. Rep.* 3, 2683.

Lee, K., Silva, E.A., and Mooney, D.J. (2011). Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J. R. Soc. Interface* 8, 153–170.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.

Lee, R.H., Oh, J.Y., Choi, H., and Bazhanov, N. (2011). Therapeutic factors secreted by mesenchymal stromal cells and tissue repair. *J. Cell. Biochem.* 112, 3073–3078.

Lee, S., Park, B.-J., Kim, J.Y., Jekarl, D., Choi, H.Y., Lee, S.Y., Kim, M., Kim, Y., and Park, M.-S. (2015). The effect of fibroblast growth factor on distinct differentiation potential of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Cytotherapy* 17, 1723–1731.

Lefebvre, V., Behringer, R.R., and de Crombrughe, B. (2001). L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthr. Cartil.* 9 Suppl A, S69–S75.

- Lefebvre, V., Li, P., and de Crombrughe, B. (1998). A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *Embo J.* 17, 5718–5733.
- Legendre, F., Dudhia, J., Pujol, J.-P., and Bogdanowicz, P. (2003). JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of Type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. Association with a down-regulation of SOX9 expression. *J. Biol. Chem.* 278, 2903–2912.
- Legendre, F., Ollitrault, D., Gomez-Leduc, T., Bouyoucef, M., Hervieu, M., Gruchy, N., Mallein-Gerin, F., Leclercq, S., Demoor, M., and Galéra, P. (2017). Enhanced chondrogenesis of bone marrow-derived stem cells by using a combinatory cell therapy strategy with BMP-2/TGF- $\beta$ 1, hypoxia, and COL1A1/HtrA1 siRNAs. *Sci. Rep.* 7, 3406.
- Legendre, F., Ollitrault, D., Hervieu, M., Baugé, C., Maneix, L., Goux, D., Chajra, H., Mallein-Gerin, F., Boumédiene, K., Galéra, P. and Demoor, M. (2013). Enhanced hyaline cartilage matrix synthesis in collagen sponge scaffolds by using siRNA to stabilize chondrocytes phenotype cultured with bone morphogenetic protein-2 under hypoxia. *Tissue Eng. Part C Methods* 19, 550–567.
- Lengner, C.J., Drissi, H., Choi, J.-Y., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S., and Lian, J.B. (2002). Activation of the bone-related Runx2/Cbfa1 promoter in mesenchymal condensations and developing chondrocytes of the axial skeleton. *Mech. Dev.* 114, 167–170.
- Li, R., and Zhang, Q. (2015). HtrA1 may regulate the osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells by TGF- $\beta$ 1. *J. Mol. Histol.* 46, 137–144.
- Li, W.-J., Chiang, H., Kuo, T.-F., Lee, H.-S., Jiang, C.-C., and Tuan, R.S. (2009). Evaluation of articular cartilage repair using biodegradable nanofibrous scaffolds in a swine model: a pilot study. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 3, 1–10.
- Lianxu, C., Hongti, J., and Changlong, Y. (2006). NF-kappaBp65-specific siRNA inhibits expression of genes of COX-2, NOS-2 and MMP-9 in rat IL-1beta-induced and TNF-alpha-induced chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* 14, 367–376.
- Lin, E.A., Kong, L., Bai, X.-H., Luan, Y., and Liu, C.-J. (2009). miR-199a, a bone morphogenic protein 2-responsive MicroRNA, regulates chondrogenesis via direct targeting to Smad1. *J. Biol. Chem.* 284, 11326–11335.
- Liu, G., Kawaguchi, H., Ogasawara, T., Asawa, Y., Kishimoto, J., Takahashi, T., Chung, U.-I., Yamaoka, H., Asato, H., Nakamura, K., Takato, T. and Hoshi, K. (2007). Optimal combination of soluble factors for tissue engineering of permanent cartilage from cultured human chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 282, 20407–20415.
- Liu, S., Hou, K.D., Yuan, M., Peng, J., Zhang, L., Sui, X., Zhao, B., Xu, W., Wang, A., Lu, S., and Guo, Q. (2014). Characteristics of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly of human umbilical cord and for fabrication of non-scaffold tissue-engineered cartilage. *J. Biosci. Bioeng.* 117, 229–235.
- Lo, W.-C., Chen, W.-H., Lin, T.-C., Hwang, S.-M., Zeng, R., Hsu, W.-C., Chiang, Y.-M., Liu, M.-C., Williams, D.F., and Deng, W.-P. (2013). Preferential therapy for osteoarthritis by cord blood MSCs through regulation of chondrogenic cytokines. *Biomaterials* 34, 4739–4748.
- Lohmander, S. (1988). Proteoglycans of joint cartilage. Structure, function, turnover and role as markers of joint disease. *Baillieres Clin. Rheumatol.* 2, 37–62.
- Long, F., Zhang, X.M., Karp, S., Yang, Y., and McMahon, A.P. (2001). Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development* 128, 5099–5108.
- Lotz, M., Hashimoto, S., and Kühn, K. (1999). Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthr. Cartil.* 7, 389–391.
- Lovati, A.B., Corradetti, B., Lange Consiglio, A., Recordati, C., Bonacina, E., Bizzaro, D., and Cremonesi, F. (2011). Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. *Vet. Res. Commun.* 35, 103–121.
- ## M
- 
- Mackie, E.J., Ahmed, Y.A., Tatarczuch, L., Chen, K.S., and Mirams, M. (2008). Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 46–62.
- Maes, C., Carmeliet, G., and Schipani, E. (2012). Hypoxia-driven pathways in bone development, regeneration and disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 358–366.
- Mafi, R., Hindocha, S., Mafi, P., Griffin, M., and Khan, W.S. (2011). Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculoskeletal applications - a systematic review of the literature. *Open Orthop. J.* 5 Suppl 2, 242–248.

- Magee, C., Nurminkaya, M., Faverman, L., Galéra, P., and Linsenmayer, T.F. (2005). SP3/SP1 transcription activity regulates specific expression of collagen type X in hypertrophic chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 25331–25338.
- Makris, E.A., Gomoll, A.H., Malizos, K.N., Hu, J.C., and Athanasiou, K.A. (2015). Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat. Rev. Rheumatol.* 11, 21–34.
- Malda, J., Benders, K.E.M., Klein, T.J., de Grauw, J.C., Kik, M.J.L., Hutmacher, D.W., Saris, D.B.F., van Weeren, P.R., and Dhert, W.J.A. (2012). Comparative study of depth-dependent characteristics of equine and human osteochondral tissue from the medial and lateral femoral condyles. *Osteoarthr. Cartil.* 20, 1147–1151.
- Mareschi, K., Ferrero, I., Rustichelli, D., Aschero, S., Gammaitoni, L., Aglietta, M., Madon, E., and Fagioli, F. (2006). Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J. Cell. Biochem.* 97, 744–754.
- Marlovits, S., Hombauer, M., Truppe, M., Vécsei, V., and Schlegel, W. (2004). Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *J. Bone. Joint. Surg. Br.* 86, 286–295.
- Marlovits, S., Zeller, P., Singer, P., Resinger, C., and Vécsei, V. (2006). Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation. *Eur. J. Radiol.* 57, 24–31.
- Martin, I., Jakob, M., Schäfer, D., Dick, W., Spagnoli, G., and Heberer, M. (2001). Quantitative analysis of gene expression in human articular cartilage from normal and osteoarthritic joints. *Osteoarthr. Cartil.* 9, 112–118.
- Mayer, N., Lopa, S., Talò, G., Lovati, A.B., Pasedeloup, M., Riboldi, S.A., Moretti, M., and Mallein-Gerin, F. (2016). Interstitial Perfusion Culture with Specific Soluble Factors Inhibits Type I Collagen Production from Human Osteoarthritic Chondrocytes in Clinical-Grade Collagen Sponges. *PLoS ONE* 11, e0161479.
- McAlinden, A., Johnstone, B., Kollar, J., Kazmi, N., and Hering, T.M. (2008). Expression of two novel alternatively spliced COL2A1 isoforms during chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* 27, 254–266.
- McGlashan, S.R., Cluett, E.C., Jensen, C.G., and Poole, C.A. (2008). Primary cilia in osteoarthritic chondrocytes: from chondrons to clusters. *Dev. Dyn.* 237, 2013–2020.
- McGuckin, C.P., Forraz, N., Baradez, M.-O., Navran, S., Zhao, J., Urban, R., Tilton, R., and Denner, L. (2005). Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif.* 38, 245–255.
- McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., and Kawcak, C.E. (2012). The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Joint Res* 1, 297–309.
- McIntosh, K.R., Mosca, J.D. and Klyushnenkova, E.N. Mesenchymal stem cells for prevention and treatment of immune responses in transplantation. 6368636 WO 1999047163 A2.
- Mee, A.M., Cripps, P.J., and Jones, R.S. (1998). A retrospective study of mortality associated with general anaesthesia in horses: emergency procedures. *Veterinary Record* 142, 307–309.
- Meirelles, L.D.S., Fontes, A.M., Covas, D.T., and Caplan, A.I. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20, 419–427.
- Mendelson, A., and Frenette, P.S. (2014). Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat. Med.* 20, 833–846.
- Millard, S.M., and Fisk, N.M. (2013). Mesenchymal stem cells for systemic therapy: shotgun approach or magic bullets? *Bioessays* 35, 173–182.
- Miller, E.J., and Matukas, V.J. (1969). Chick cartilage collagen: a new type of alpha 1 chain not present in bone or skin of the species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 64, 1264–1268.
- Millward-Sadler, S.J., and Salter, D.M. (2004). Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction. *Ann. Biomed. Eng.* 32, 435–446.
- Miosge, N., Hartmann, M., Maelicke, C., and Herken, R. (2004). Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis. *Histochem. Cell Biol.* 122, 229–236.
- Miot, S., Woodfield, T., Daniels, A.U., Suetterlin, R., Peterschmitt, I., Heberer, M., van Blitterswijk, C.A., Riesle, J., and Martin, I. (2005). Effects of scaffold composition and architecture on human nasal chondrocyte redifferentiation and cartilaginous matrix deposition. *Biomaterials* 26, 2479–2489.

Mitchell, K.E., Weiss, M.L., Mitchell, B.M., Martin, P., Davis, D., Morales, L., Helwig, B., Beerenstrauch, M., Abou Easa, K., Hildreth, T., Troyer, D. and Medicetty, S. (2003). Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 21, 50–60.

Mokbel, A.N., Tookhy, El, O.S., Shamaa, A.A., Rashed, L.A., Sabry, D., and Sayed, El, A.M. (2011). Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model. *BMC Musculoskelet Disord.* 12, 259.

Montserrat, N., Nivet, E., Sancho-Martinez, I., Hishida, T., Kumar, S., Miquel, L., Cortina, C., Hishida, Y., Xia, Y., Esteban, C.R., and Izpisua Belmonte, C.J. (2013). Reprogramming of human fibroblasts to pluripotency with lineage specifiers. *Cell Stem Cell* 13, 341–350.

Moran, C.J., Ramesh, A., Brama, P.A.J., O'Byrne, J.M., O'Brien, F.J., and Levingstone, T.J. (2016). The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair. *J. Exp. Orthop.* 3, 1.

Mörgelin, M., Paulsson, M., Hardingham, T.E., Heinegård, D., and Engel, J. (1988). Cartilage proteoglycans. Assembly with hyaluronate and link protein as studied by electron microscopy. *Biochem. J.* 253, 175–185.

Moriyama, H., Yoshimura, O., Kawamata, S., Takayanagi, K., Kurose, T., Kubota, A., Hosoda, M., and Tobimatsu, Y. (2008). Alteration in articular cartilage of rat knee joints after spinal cord injury. *Osteoarthr. Cartil.* 16, 392–398.

Mouw, J.K., Ou, G., and Weaver, V.M. (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 771–785.

Muguruma, Y., Yahata, T., Miyatake, H., Sato, T., Uno, T., Itoh, J., Kato, S., Ito, M., Hotta, T., and Ando, K. (2006). Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood* 107, 1878–1887.

Muraglia, A., Cancedda, R., and Quarto, R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J. Cell. Sci.* 113 ( Pt 7), 1161–1166.

Murata, M., Yudoh, K., and Masuko, K. (2008). The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage: how the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis? *Osteoarthr. Cartil.* 16, 279–286.

Murwantoko, Y., Yano, M., Ueta, Y., Murasaki, A., Kanda, H., Oka, C., and Kawaichi, M. (2004). Binding of proteins to the PDZ domain regulates proteolytic activity of HtrA1 serine protease. *Biochem. J.* 381, 895–904.

Mwale, F., Stachura, D., Roughley, P., and Antoniou, J. (2006). Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation. *J. Orthop. Res.* 24, 1791–1798.

## N

---

Nagase, H., and Kashiwagi, M. (2003). Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res. Ther.* 5, 94–103.

Nagase, H., Visse, R., and Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* 69, 562–573.

Nakase, Y., Hagiwara, A., Nakamura, T., Kin, S., Nakashima, S., Yoshikawa, T., Fukuda, K.-I., Kuriu, Y., Miyagawa, K., Sakakura, C., Otsuji, E., Shimizu, Y., Ikada, Y. and Yamagishi, H. (2006). Tissue engineering of small intestinal tissue using collagen sponge scaffolds seeded with smooth muscle cells. *Tissue Eng.* 12, 403–412.

Narcisi, R., Quarto, R., Ulivi, V., Muraglia, A., Molfetta, L., and Giannoni, P. (2012). TGF  $\beta$ -1 administration during Ex vivo expansion of human articular chondrocytes in a serum-free medium redirects the cell phenotype toward hypertrophy. *J. Cell. Physiol.* 227, 3282–3290.

Nauta, A.J., and Fibbe, W.E. (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110, 3499–3506.

Nekanti, U., Mohanty, L., Venugopal, P., Balasubramanian, S., Totey, S., and Ta, M. (2010). Optimization and scale-up of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications. *Stem Cell Res.* 5, 244–254.

Niehage, C., Steenblock, C., Pursche, T., Bornhäuser, M., Corbeil, D., and Hoflacker, B. (2011). The cell surface proteome of human mesenchymal stromal cells. *PLoS ONE* 6, e20399.

Nirmal, R.S., and Nair, P.D. (2013). Significance of soluble growth factors in the chondrogenic response of human umbilical cord matrix stem cells in a porous three dimensional scaffold. *Eur. Cell. Mater.* 26, 234–251.

Nixon, A.J., Dahlgren, L.A., Haupt, J.L., Yeager, A.E., and Ward, D.L. (2008). Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am. J. Vet. Res.* 69, 928–937.

Nombela-Arrieta, C., Ritz, J., and Silberstein, L.E. (2011). The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 126–131.

## O

---

Oakley, S.P., and Lassere, M.N. (2003). A critical appraisal of quantitative arthroscopy as an outcome measure in osteoarthritis of the knee. *Semin. Arthritis Rheum.* 33, 83–105.

Oka, C., Tsujimoto, R., Kajikawa, M., Koshiba-Takeuchi, K., Ina, J., Yano, M., Tsuchiya, A., Ueta, Y., Soma, A., Kanda, H., Matsumoto, M. and Kawaichi, M. (2004). HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins. *Development* 131, 1041–1053.

Oke, S.L., and McIlwraith, C.W. (2010). Review of the economic impact of osteoarthritis and oral joint-health supplements in horses. 56th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners 4-8 December 2010, 12–16.

Ollitrault, D., Legendre, F., Drougard, C., Briand, M., Bénateau, H., Goux, D., Chajra, H., Poulain, L., Hartmann, D., Vivien, D., Shridhar, S., Baldi, A., Mallein-Gerin, F., Boumédiène, K., Demoor, M. and Galéra, P. (2015). BMP-2, hypoxia, and COL1A1/HtrA1 siRNAs favor neo-cartilage hyaline matrix formation in chondrocytes. *Tissue Eng. Part C Methods* 21, 133–147.

Omar, El, R., Beroud, J., Stoltz, J.-F., Menu, P., Velot, E., and Decot, V. (2014). Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Eng. Part B Rev.* 20, 523–544.

Ortved, K.F., and Nixon, A.J. (2016). Cell-based cartilage repair strategies in the horse. *Vet. J.* 208, 1–12.

Ouyang, X., Wei, B., Mao, F., Zhang, X., Xu, Y., and Wang, L. (2015). Uncultured bone marrow mononuclear cells delay the dedifferentiation of unexpanded chondrocytes in pellet culture. *Cell Tissue Res.* 361, 811–821.

## P

---

Pacifici, M., Koyama, E., and Iwamoto, M. (2005). Mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation: Recent advances, but many lingering mysteries. *Birth. Defect Res. C* 75, 237–248.

Parsch, D., Brümmendorf, T.H., Richter, W., and Fellenberg, J. (2002). Replicative aging of human articular chondrocytes during ex vivo expansion. *Arthritis Rheum.* 46, 2911–2916.

Péault, B. (1996). Hematopoietic stem cell emergence in embryonic life: developmental hematology revisited. *J Hematother* 5, 369–378.

Pevsner-Fischer, M., Levin, S., and Zipori, D. (2011). The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. *Stem Cell Rev.* 7, 560–568.

Pevsner-Fischer, M., Levin, S., and Zipori, D. (2011). The Origins of Mesenchymal Stromal Cell Heterogeneity. *Stem Cell Rev. and Rep.* 7, 560–568.

Pfander, D., Kobayashi, T., Knight, M.C., Zelzer, E., Chan, D.A., Olsen, B.R., Giaccia, A.J., Johnson, R.S., Haase, V.H., and Schipani, E. (2004). Deletion of Vhlh in chondrocytes reduces cell proliferation and increases matrix deposition during growth plate development. *Development* 131, 2497–2508.

Phinney, D.G. (2012). Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy. *J. Cell. Biochem.* 113, 2806–2812.

Pitsillides, A.A., and Beier, F. (2011). Cartilage biology in osteoarthritis —lessons from developmental biology. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 654–663.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147.

Plumb, D.A., Ferrara, L., Torbica, T., Knowles, L., Mironov, A., Kadler, K.E., Briggs, M.D., and Boot-Handford, R.P. (2011). Collagen XXVII organises the pericellular matrix in the growth plate. *PLoS ONE* 6, e29422.

Ponte, A.L., Marais, E., Gallay, N., Langonné, A., Delorme, B., Hérault, O., Charbord, P., and Domenech, J. (2007). The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25, 1737–1745.

Poole, C.A. (1997). Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J. Anat.* 191 ( Pt 1), 1–13.

Porée, B., Kypriotou, M., Chadjichristos, C., Beauchef, G., Renard, E., Legendre, F., Melin, M., Gueret, S., Hartmann, D.-J., Mallein-Gerin, F., Pujol, J.P., Boumédiène, K. and Galéra, P. (2008). Interleukin-6 (IL-6) and/or Soluble IL-6 Receptor Down-regulation of Human Type II Collagen Gene Expression in Articular Chondrocytes Requires a Decrease of Sp1-Sp3 Ratio and of the Binding Activity of Both Factors to the COL2A1 Promoter. *J. Biol. Chem.* 283, 4850–4865.

Prasanna, S.J., Gopalakrishnan, D., Shankar, S.R., and Vasandan, A.B. (2010). Pro-inflammatory cytokines, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS ONE* 5, e9016.

Pretzel, D., Linss, S., Rochler, S., Endres, M., Kaps, C., Alsalameh, S., and Kinne, R.W. (2011). Relative percentage and zonal distribution of mesenchymal progenitor cells in human osteoarthritic and normal cartilage. *Arthritis Res. Ther.* 13, R64.

## R

---

Reed, S.A., and Johnson, S.E. (2008). Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. *J. Cell. Physiol.* 215, 329–336.

Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C., and Shi, Y. (2008). Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2, 141–150.

Ren, X., Wang, F., Chen, C., Gong, X., Yin, L., and Yang, L. (2016). Engineering zonal cartilage through bioprinting collagen type II hydrogel constructs with biomimetic chondrocyte density gradient. *BMC Musculoskelet Disord.* 1–10.

Reppel, L., Schiavi, J., Charif, N., Leger, L., Yu, H., Pinzano, A., Henrionnet, C., Stoltz, J.-F., Bensoussan, D., and Huselstein, C. (2015). Chondrogenic induction of mesenchymal stromal/stem cells from Wharton's jelly embedded in alginate hydrogel and without added growth factor: an alternative stem cell source for cartilage tissue engineering. *Stem Cell Res. Ther.* 6, 260.

Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a004978–a004978.

Roddy, G.W., Oh, J.Y., Lee, R.H., Bartosh, T.J., Ylostalo, J., Coble, K., Rosa, R.H., and Prockop, D.J. (2011). Action at a distance: systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF- $\alpha$  stimulated gene/protein 6. *Stem Cells* 29, 1572–1579.

Romanov, Y.A., Svintsitskaya, V.A., and Smirnov, V.N. (2003). Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 21, 105–110.

Rosen, V., Nove, J., Song, J.J., Thies, R.S., Cox, K., and Wozney, J.M. (1994). Responsiveness of clonal limb bud cell lines to bone morphogenetic protein 2 reveals a sequential relationship between cartilage and bone cell phenotypes. *J. Bone Miner. Res.* 9, 1759–1768.

Ross M & Pawlina W (2011) *Histology A Text and Atlas*. Lippincott Williams & Wilkins: 1–996

Russell, K.C., Phinney, D.G., Lacey, M.R., Barrilleaux, B.L., Meyertholen, K.E., and O'Connor, K.C. (2010). In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells* 28, 788–798.

## S

---

Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K., and Muneta, T. (2005). Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* 52, 2521–2529.

Saklatvala, J. (1986). Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* 322, 547–549.

- Salentey, V., Claus, S., Bougault, C., Paumier, A., Aubert-Foucher, E., Perrier-Groult, E., Ronzière, M.C., Freyria, A.M., Galera, P., Beauchef, G., Duterque-Coquillaud, M., Piperno, M., Damour, O., Herbage, B. and Mallein-Gerin, F. (2009). Human chondrocyte responsiveness to bone morphogenetic protein-2 after their in vitro dedifferentiation: potential use of bone morphogenetic protein-2 for cartilage cell therapy. *Pathol. Biol.* 57, 282–289.
- Samuelson, E.M., and Brown, D.E. (2012). Cost-effectiveness analysis of autologous chondrocyte implantation: a comparison of periosteal patch versus type I/III collagen membrane. *Am. J. Sports Med.* 40, 1252–1258.
- Sandell, L.J., Nalin, A.M., and Reife, R.A. (1994). Alternative splice form of type II procollagen mRNA (IIA) is predominant in skeletal precursors and non-cartilaginous tissues during early mouse development. *Dev. Dyn.* 199, 129–140.
- Sanyal, A., Oursler, M.J., Clemens, V.R., Fukumoto, T., Fitzsimmons, J.S., and O'Driscoll, S.W. (2002). Temporal expression patterns of BMP receptors and collagen II (B) during periosteal chondrogenesis. *J. Orthop. Res.* 20, 58–65.
- Sarugaser, R., Hanoun, L., Keating, A., Stanford, W.L., and Davies, J.E. (2009). Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy. *PLoS ONE* 4, e6498.
- Sato, M., Uchida, K., Nakajima, H., Miyazaki, T., Guerrero, A.R., Watanabe, S., Roberts, S., and Baba, H. (2012). Direct transplantation of mesenchymal stem cells into the knee joints of Hartley strain guinea pigs with spontaneous osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 14, R31.
- Saulnier, N., Viguier, E., Perrier-Groult, E., Chenu, C., Pillet, E., Roger, T., Maddens, S., and Boulocher, C. (2015). Intra-articular administration of xenogeneic neonatal Mesenchymal Stromal Cells early after meniscal injury down-regulates metalloproteinase gene expression in synovium and prevents cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 23, 122–133.
- Schaefer, L., and Iozzo, R.V. (2008). Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J. Biol. Chem.* 283, 21305–21309.
- Schiller, J., and Huster, D. (2012). New methods to study the composition and structure of the extracellular matrix in natural and bioengineered tissues. *Biomater.* 2, 115–131.
- Schipani, E., Ryan, H.E., Didrickson, S., Kobayashi, T., Knight, M., and Johnson, R.S. (2001). Hypoxia in cartilage: HIF-1 $\alpha$  is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev.* 15, 2865–2876.
- Schnabel, L.V., Fortier, L.A., McIlwraith, C.W., and Nobert, K.M. (2013). Therapeutic use of stem cells in horses: which type, how, and when? *Vet. J.* 197, 570–577.
- Schulze-Tanzil, G., Mobasheri, A., de Souza, P., John, T., and Shakibaei, M. (2004). Loss of chondrogenic potential in dedifferentiated chondrocytes correlates with deficient Shc-Erk interaction and apoptosis. *Osteoarthr. Cartil.* 12, 448–458.
- Seshareddy, K., Troyer, D., and Weiss, M.L. (2008). Method to isolate mesenchymal-like cells from Wharton's Jelly of umbilical cord. *Methods Cell Biol.* 86, 101–119.
- Shapiro, I.M., Adams, C.S., Freeman, T., and Srinivas, V. (2005). Fate of the hypertrophic chondrocyte: Microenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate. *Birth. Defect. Res. C* 75, 330–339.
- Sheehy, E.J., Vinardell, T., Buckley, C.T., and Kelly, D.J. (2013). Engineering osteochondral constructs through spatial regulation of endochondral ossification. *Acta Biomater.* 9, 5484–5492.
- Shen, B., Wei, A., Whittaker, S., Williams, L.A., Tao, H., Ma, D.D.F., and Diwan, A.D. (2010). The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. *J. Cell. Biochem.* 109, 406–416.
- Shen, G. (2005). The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthod. Craniofac. Res.* 8, 11–17.
- Shi, Y., Hu, G., Su, J., Li, W., Chen, Q., Shou, P., Xu, C., Chen, X., Huang, Y., Zhu, Z., Huang, X., Han, X., Xie, N. and Ren, G. (2010). Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res.* 20, 510–518.
- Shirasawa, S., Sekiya, I., Sakaguchi, Y., Yagishita, K., Ichinose, S., and Muneta, T. (2006). In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J. Cell. Biochem.* 97, 84–97.

- Simon, M.C., and Keith, B. (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 285–296.
- Singh, P., and Schwarzbauer, J.E. (2014). Fibronectin matrix assembly is essential for cell condensation during chondrogenesis. *J. Cell. Sci.* 127, 4420–4428.
- Söder, S., Hambach, L., Lissner, R., Kirchner, T., and Aigner, T. (2002). Ultrastructural localization of type VI collagen in normal adult and osteoarthritic human articular cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* 10, 464–470.
- Song, J., Lee, M., Kim, D., Han, J., Chun, C.-H., and Jin, E.-J. (2013). MicroRNA-181b regulates articular chondrocytes differentiation and cartilage integrity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 431, 210–214.
- Sophia Fox, A.J., Bedi, A., and Rodeo, S.A. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* 1, 461–468.
- Struglics, A., Larsson, S., Pratta, M.A., Kumar, S., Lark, M.W., and Lohmander, L.S. (2006). Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase- and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments. *Osteoarthr. Cartil.* 14, 101–113.
- Suzuki, S., Kawai, K., Ashoori, F., Morimoto, N., Nishimura, Y., and Ikada, Y. (2000). Long-term follow-up study of artificial dermis composed of outer silicone layer and inner collagen sponge. *Br. J. Plast. Surg.* 53, 659–666.

## T

---

- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Takashima, Y., Era, T., Nakao, K., Kondo, S., Kasuga, M., Smith, A.G., and Nishikawa, S.-I. (2007). Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* 129, 1377–1388.
- Tang, F., Lao, K., and Surani, M.A. (2011). Development and applications of single-cell transcriptome analysis. *Nat. Methods* 8, S6–S11.
- Tanthaisong, P., Imsoonthornruksa, S., Ngernsoungnern, A., Ngernsoungnern, P., Ketudat-Cairns, M., and Parnpai, R. (2017). Enhanced Chondrogenic Differentiation of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells by GSK-3 Inhibitors. *PLoS ONE* 12, e0168059.
- Tetlow, L.C., Adlam, D.J., and Woolley, D.E. (2001). Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum.* 44, 585–594.
- Tew, S.R., and Clegg, P.D. (2011). Analysis of post transcriptional regulation of SOX9 mRNA during in vitro chondrogenesis. *Tissue Eng. Part A* 17, 1801–1807.
- Tiaden, A.N., and Richards, P.J. (2013). The emerging roles of HTRA1 in musculoskeletal disease. *Am. J. Pathol.* 182, 1482–1488.
- Tiaden, A.N., Bahrenberg, G., Mirsaidi, A., Glanz, S., Blüher, M., and Richards, P.J. (2016). Novel Function of Serine Protease HTRA1 in Inhibiting Adipogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells via MAP Kinase-Mediated MMP Upregulation. *Stem Cells* 34, 1601–1614.
- Tiaden, A.N., Breiden, M., Mirsaidi, A., Weber, F.A., Bahrenberg, G., Glanz, S., Cinelli, P., Ehrmann, M., and Richards, P.J. (2012). Human serine protease HTRA1 positively regulates osteogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mineralization of differentiating bone-forming cells through the modulation of extracellular matrix protein. *Stem Cells* 30, 2271–2282.
- Tortorella, M.D., Burn, T.C., Pratta, M.A., Abbaszade, I., Hollis, J.M., Liu, R., Rosenfeld, S.A., Copeland, R.A., Decicco, C.P., Wynn, R., Rockwell, A., Yang, F., Duke, J.L., Solomon, K., George, H., Bruckner, R., Nagase, H., Itoh, Y., Ellis, D.M., Ross, H., Wiswall, B.H., Murphy, K., Hillman, M.C., Hollis, G.F., Newton, R.C., Magolda, R.L., Trzaskos, J.M. and Arner, E.C. (1999). Purification and Cloning of Aggrecanase-1: A Member of the ADAMTS Family of Proteins. *Science* 284, 1664–1666.
- Troeberg, L., and Nagase, H. (2012). Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 133–145.

Troyer, D.L., and Weiss, M.L. (2008). Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 26, 591–599.

Tsukitani, M., Okamoto, R., and Fukuzaki, H. (1984). Effect of hypoxia on cholesterol accumulation in cultured rabbit aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 52, 167–174.

## U

---

Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 726–736.

Ullah, I., Subbarao, R.B., and Rho, G.J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci. Rep.* 35.

## V

---

Valcourt, U., Gouttenoire, J., Aubert-Foucher, E., Herbage, D., and Mallein-Gerin, F. (2003). Alternative splicing of type II procollagen pre-mRNA in chondrocytes is oppositely regulated by BMP-2 and TGF-beta1. *FEBS Lett.* 545, 115–119.

Valcourt, U., Ronzière, M.C., Winkler, P., Rosen, V., Herbage, D., and Mallein-Gerin, F. (1999). Different effects of bone morphogenetic proteins 2, 4, 12, and 13 on the expression of cartilage and bone markers in the MC615 chondrocyte cell line. *Exp. Cell Res.* 251, 264–274.

Valdes, A.M., and Spector, T.D. (2011). Genetic epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 23–32.

van den Borne, M.P.J., Raijmakers, N.J.H., Vanlauwe, J., Victor, J., de Jong, S.N., Bellemans, J., Saris, D.B.F. (2007). International Cartilage Repair Society (ICRS) and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) and microfracture. *Osteoarthr. Cartil.* 15, 1397–1402.

van Wijk, B., Moorman, A.F.M., and van den Hoff, M.J.B. (2007). Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation. *Cardiovasc. Res.* 74, 244–255.

Verzijl, N., DeGroot, J., Thorpe, S.R., Bank, R.A., Shaw, J.N., Lyons, T.J., Bijlsma, J.W., Lafeber, F.P., Baynes, J.W., and TeKoppele, J.M. (2000). Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* 275, 39027–39031.

Vinater, C., Mrugala, D., Jorgensen, C., Guicheux, J., and Noël, D. (2009). Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol.* 27, 307–314.

## W

---

Wade, C.M., Giulotto, E., Sigurdsson, S., Zoli, M., Gnerre, S., Imsland, F., Lear, T.L., Adelson, D.L., Bailey, E., Bellone, R.R., et al. (2009). Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science* 326, 865–867.

Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansoorge, W. and Ho, A. (2005). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* 33, 1402–1416.

Wang, D., and Bodovitz, S. (2010). Single cell analysis: the new frontier in 'omics'. *Trends Biotechnol.* 28, 281–290.

Wang, H.-S., Hung, S.-C., Peng, S.-T., Huang, C.-C., Wei, H.-M., Guo, Y.-J., Fu, Y.-S., Lai, M.-C., and Chen, C.-C. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 22, 1330–1337.

Wang, L., Tran, I., Seshareddy, K., Weiss, M.L., and Detamore, M.S. (2009). A comparison of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng. Part A* 15, 2259–2266.

Wang, M., Yang, Y., Yang, D., Luo, F., Liang, W., Guo, S., and Xu, J. (2009). The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Immunology* 126, 220–232.

Wang, Y., Chen, X., Cao, W., and Shi, Y. (2014). Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat. Immunol.* 15, 1009–1016.

- Warner, S.C., and Valdes, A.M. (2016). The genetics of osteoarthritis: A review. *J. Funct. Morphol. Kinesiol.* 1, 140–153.
- Weiskirchen, R., Meurer, S.K., Gressner, O.A., Herrmann, J., Borkham-Kamphorst, E., and Gressner, A.M. (2009). BMP-7 as antagonist of organ fibrosis. *Front. Biosci.* 14, 4992–5012.
- Weiss, M.L., and Troyer, D.L. (2006). Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Rev. and Rep.* 2, 155–162.
- Weiss, M.L., Anderson, C., Medicetty, S., Seshareddy, K.B., Weiss, R.J., VanderWerff, I., Troyer, D., and McIntosh, K.R. (2008). Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells* 26, 2865–2874.
- Weiss, M.L., Anderson, C., Medicetty, S., Seshareddy, K.B., Weiss, R.J., VanderWerff, I., Troyer, D., and McIntosh, K.R. (2008). Immune Properties of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly-Derived Cells. *Stem Cells* 26, 2865–2874.
- Weiss, M.L., Medicetty, S., Bledsoe, A.R., Rachakatla, R.S., Choi, M., Merchav, S., Luo, Y., Rao, M.S., Velagaleti, G., and Troyer, D. (2006). Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 24, 781–792.
- Weiss, S., Hennig, T., Bock, R., Steck, E., and Richter, W. (2010). Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* 223, 84–93.
- Wiberg, C., Hedbom, E., Khairullina, A., Lamandé, S.R., Oldberg, A., Timpl, R., Mörgelin, M., and Heinegård, D. (2001). Biglycan and decorin bind close to the n-terminal region of the collagen VI triple helix. *J. Biol. Chem.* 276, 18947–18952.
- Williams, R.M., Zipfel, W.R., Tinsley, M.L., and Farnum, C.E. (2007). Solute transport in growth plate cartilage: in vitro and in vivo. *Biophys. J.* 93, 1039–1050.
- Wittrup, A., and Lieberman, J. (2015). Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat. Rev. Genet.* 16, 543–552.
- Wu, X., Chim, S.M., Kuek, V., Lim, B.S., Chow, S.T., Zhao, J., Yang, S., Rosen, V., Tickner, J., and Xu, J. (2014). HtrA1 is upregulated during RANKL-induced osteoclastogenesis, and negatively regulates osteoblast differentiation and BMP2-induced Smad1/5/8, ERK and p38 phosphorylation. *FEBS Lett.* 588, 143–150.

## X

---

- Xu, L., Golshirazian, I., Asbury, B.J., and Li, Y. (2014). Induction of high temperature requirement A1, a serine protease, by TGF-beta1 in articular chondrocytes of mouse models of OA. *Histol. Histopathol.* 29, 609–618.

## Y

---

- Yamashita, S., Andoh, M., Ueno-Kudoh, H., Sato, T., Miyaki, S., and Asahara, H. (2009). Sox9 directly promotes Bapx1 gene expression to repress Runx2 in chondrocytes. *Exp. Cell Res.* 315, 2231–2240.
- Yan, D., Chen, D., Cool, S.M., van Wijnen, A.J., Mikecz, K., Murphy, G., and Im, H.J. (2011). Fibroblast growth factor receptor 1 is principally responsible for fibroblast growth factor 2-induced catabolic activities in human articular chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* 13, R130.
- Yang, B., Guo, H., Zhang, Y., Chen, L., Ying, D., and Dong, S. (2011). MicroRNA-145 regulates chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells by targeting Sox9. *PLoS ONE* 6, e21679.
- Yang, L., Tsang, K.Y., Tang, H.C., Chan, D., and Cheah, K.S.E. (2014). Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 12097–12102.
- Yang, Z., Camp, N.J., Sun, H., Tong, Z., Gibbs, D., Cameron, D.J., Chen, H., Zhao, Y., Pearson, E., Li, X., Chien, J., Dewan, A., Harmon, J., Bernstein, P.S., Shridhar, V., Zabriskie, N.A., Hoh, J., Howes, K. and Zhang, K. (2006). A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science* 314, 992–993.
- Yeatts, A.B., and Fisher, J.P. (2011). Bone tissue engineering bioreactors: dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone* 48, 171–181.
- Yeatts, A.B., Choquette, D.T., and Fisher, J.P. (2013). Bioreactors to influence stem cell fate: augmentation of mesenchymal stem cell signaling pathways via dynamic culture systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 2470–2480.

## Z

---

Zhang, X., Hirai, M., Cantero, S., Ciubotariu, R., Dobrila, L., Hirsh, A., Igura, K., Satoh, H., Yokomi, I., Nishimura, T., Yamaguchi, S., Yoshimura, K., Rubinstein, P. and Takahashi, T.A. (2011). Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *J. Cell. Biochem.* 112, 1206–1218.

Zhu, Y., Oganessian, A., Keene, D.R., and Sandell, L.J. (1999). Type IIA procollagen containing the cysteine-rich amino propeptide is deposited in the extracellular matrix of prechondrogenic tissue and binds to TGF-beta1 and BMP-2. *J. Cell Biol.* 144, 1069–1080.

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., and Hedrick, M.H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279–4295.

# Annexes

---

## I. Publications.

Saulnier, N., Loriau, J., Febre, M., Robert, C., **Rakic, R.**, Bonte, T., Buff, S. and Maddens, S. (2016). Canine placenta: A promising potential source of highly proliferative and immunomodulatory mesenchymal stromal cells? *Vet. Immunol. Immunopathol.* 171, 47–55.

Branly, T., Bertoni, L., Contentin, R., **Rakic, R.**, Gomez-Leduc, T., Desancé, M., Hervieu, M., Legendre, F., Jacquet, S., Audigié, F., Denoix, J.M., Demoor, M. and Galéra, P. (2017). Characterization and use of Equine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Equine Cartilage Engineering. Study of their Hyaline Cartilage Forming Potential when Cultured under Hypoxia within a Biomaterial in the Presence of BMP-2 and TGF- $\beta$ 1. *Stem Cell Rev.* 55, 1569–20.

Bouyoucef, M., **Rakic, R.**, Gomez-Leduc, T., Latire, T., Marin, F., Leclercq, S., Carreiras, F., Serpentine, A., Lebel, JM., Galéra, P. and Legendre, F. Regulation of Extracellular Matrix Synthesis by Shell Extracts from the Marine Bivalve *Pecten maximus* in Human Articular Chondrocytes. Application for Cartilage Engineering. (Soumis à Marine Biotechnology).

**Rakic, R.**, Bourdon, B., Hervieu, M., Branly, T., Legendre, F., Saulnier, N., Audigié, F., Maddens, S., Demoor, M. and Galéra, P. RNA interference and BMP-2 stimulation allows equine chondrocytes redifferentiation in 3D-hypoxia cell culture model: Application for matrix-induced autologous chondrocyte implantation. (En révision : *International Journal of Molecular Biology*).

**Rakic, R.**, Bourdon, B., Demoor, M., Maddens, S., Saulnier, N. and Galéra, P. Major differences in the intrinsic chondrogenic potential of equine umbilical cord matrix and umbilical cord blood mesenchymal stromal stem cells: Comparison of MSC sources for the use in cartilage regeneration. (En préparation).

Branly, T., Contentin, R., Desancé, M., Concari, M., Jacquet, T., **Rakic, R.**, Bertoni, L., Jacquet, S., Mallein-Gerin, F., Denoix, J.M., Legendre, F., Audigié, F., Demoor, M. and Galéra, P. Improvement of the chondrocyte-specific phenotype upon equine bone marrow mesenchymal stem cell differentiation. Influence of culture time, transforming growth factors and type I collagen siRNAs on the differentiation index. (En préparation).

## II. Communications affichées.

Branly, T., Hervieu, M., Jacquet, S., Bertoni, L., Gomez-Leduc, T., Desancé, M., **Rakic, R.**, Bouyoucef, M., Audigié, F., Legendre, F., Demoor, M., Denoix, JM. and Galéra, P. Characterization and use of equine bone marrow mesenchymal stem cells in horse cartilage engineering. Osteoarthritis Research Society International (OARSI) World Congress 2014, Paris, 2014. - 22<sup>e</sup> Annual congress of SFBMEC, Limoges, 2014.

Gomez-Leduc, T., Hervieu, M., Bouyoucef, M., Legendre, F., Desancé, M., Branly, T., **Rakic, R.**, Gruchy, N., Devienne, C., Herlicoviez, M., Demoor, M. et Galéra, P. Isolement et caractérisation des cellules souches mésenchymateuses humaines issues du sang de cordon ombilical : intérêt en médecine régénérative du cartilage. journée de Biomédecine de l'Université de Caen Basse-Normandie, Caen, 2014.

Desancé, M., Bertoni, L., Gomez-Leduc, T., Branly, T., Concari, M., **Rakic, R.**, Jacquet, S., Legendre, F., Galéra, P., Audigié, F. and Demoor, M. Characterization and kinetics differentiation of equine umbilical cord blood mesenchymal stem cells in cartilage engineering. 18èmes Journées de l'Ecole Doctorale EdNBISE (Rouen, 2015).

**Rakic, R.**, Hervieu, M., Branly, T., Legendre, F., Saulnier, N., Audigier, F., Maddens, S., Demoor, M. And Galéra, P. RNA interference and BMP-2 stimulation allow amplified chondrocyte redifferentiation in a 3D hypoxia cell culture model: Application for matrix-associated autologous chondrocyte implantation. 18èmes Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisées (JFBTM). Nancy, 2016.

Desancé, M., Bertoni, L., Contentin, R., Branly, T., Gomez-Ledic, T., **Rakic, R.**, Jacquet, S., Legendre, F., Audigié, F., Galéra, P., and Demoor, M. Characterization and differentiation of equine umbilical cord blood mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering. 18èmes Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisées (JFBTM). Nancy, 2016.

Branly, T., Contentin, R., Desancé, M., Bertoni, L., Jacquet, S., **Rakic, R.**, Legendre, F., Audigié, F., Demoor, M., Denoix, J.M. and Galéra, P. Characterization of equine bone marrow mesenchymal stem cells which are able to differentiate into phenotypically stabilized chondrocytes synthesizing a hyaline-like neo-matrix. 19èmes Journées de l'Ecole Doctorale EdNBISE, Caen, 2016.

Desancé, M., Bertoni, L., Jacquet, S., **Rakic, R.**, Legendre, F., Audigié, F., Demoor, M., Denoix, J.M. and Galéra, P. Characterization of equine bone marrow mesenchymal stem cells which are able to differentiate into phenotypically stabilized chondrocytes synthesizing a hyaline-like neo-matrix. 19èmes Journées de l'Ecole Doctorale EdNBISE, Caen, 2016.

Contentin, R., Branly, T., Desancé, M., Concari, M., Jacquet, T., **Rakic, R.**, Bertoni, L., Jacquet, S., Mallein-Gerin, F., Denoix, J.M., Legendre, F., Audigié, F., Demoor, M. and Galéra, P. Improvement of the chondrocyte-specific phenotype upon equine bone marrow mesenchymal stem cell differentiation. Influence of TGF- $\beta$ 1 or TGF- $\beta$ 3, associated with BMP-2 and type I collagen siRNAs. 20èmes Journées de l'Ecole Doctorale EdNBISE, Caen, 2017.

### **III. Communications orales.**

Desancé, M., Bertoni, L., Gomez-Leduc, T., Branly, T., Concari, M., **Rakic, R.**, Jacquet, S., Legendre, F., Galéra, P., Audigié, F. and Demoor, M. Characterization and kinetics differentiation of equine umbilical cord blood mesenchymal stem cells in cartilage engineering. 18èmes Journées de l'Ecole Doctorale EdNBISE, Rouen, 2015.

Branly, T., Hervieu, M., Jacquet, S., Bertoni, L., Gomez-Leduc, T., Desancé, M., **Rakic, R.**, Bouyoucef, M., Audigié, F., Legendre, F., Demoor, M., Denoix, JM. and Galéra, P. Characterization and use of equine bone marrow mesenchymal stem cells in horse cartilage engineering. GDR GRIMIT, Lyon, 2014 - 23<sup>e</sup> Annual congress of SFBMEC, Lyon, 2015

**Rakic, R.** Lauréat de la 2e journée des doctorants de la filière équine sur le thème « ma thèse en 180s » (<https://www.youtube.com/watch?v=26Vgw6Z18mM>) IFCE. Paris, 2015.

**Rakic, R.**, Zaworski, J, Yacoubi, N., Bittel, M., Chinesa, M. et Cophignon, A. Lauréats du concours des 24h chrono de l'entrepreneuriat, 5ème édition spéciale doctorants CIFRE ANRT-Novencia Business School ([http://www.anrt.asso.fr/fr/espace\\_cifre/entrepreneuriat-2015.jsp#.WWSntMbpO1s](http://www.anrt.asso.fr/fr/espace_cifre/entrepreneuriat-2015.jsp#.WWSntMbpO1s)). Paris, 2015.

**Rakic, R.**, Zaworski, J, Yacoubi, N., Bittel, M., Chinesa, M. et Cophignon, A. Présentation du projet d'entrepreneuriat devant Thierry Mandon, secrétaire d'État, en charge de l'Enseignement

supérieur et de la Recherche. Prix du concours des 24h chrono de l'entrepreneuriat, 5ème édition spéciale doctorants CIFRE ANRT. Paris, 2016.

## **IV. Formations et bénévolats.**

Bénévolat en tant qu'animateur scientifique : Jeux équestres mondiaux FEI Alltech 2014. Exposition digitale « science en Selle » (<http://www.sciencesenselle.org/fr/accueil/>). Relais d'sciences/ Fondation Hippolia. Caen, 2014 - Hippodrome de Paris-Vincennes, Paris-Vincennes, 2014.

Formation en anglais orale et communication en publique (32 h). International communication in English formation. Caen, 2017 :

Formation à la médiation scientifique (une journée), Relais d'sciences. Caen, 2014.

Formation théorique et pratique en cytométrie en flux (trois jours), Bioticla. Caen, 2014.

Formation à la valorisation d'un projet d'entrepreneuriat à l'international (une journée) ANRT. Paris, 2016.

Voyage d'étude à Cambridge. Prix du concours des 24h chrono de l'entrepreneuriat, 5ème édition spéciale doctorants CIFRE. Communication orale et formation à l'entrepreneuriat (une semaine) ANRT - CEDAR, Anglia Ruskin University, Cambridge, 2016.

## **V. Encadrement de stage.**

Encadrement d'un stagiaire de première année de Master Recherche (2 mois). 2016.

Encadrement d'un stagiaire de deuxième année de Master Recherche (6 mois). 2017.

## Nouvelles stratégies thérapeutiques des affections articulaires du cheval. Evaluation du potentiel thérapeutique des chondrocytes autologues et des cellules souches de cordon ombilical (sang et gelée de Wharton) : Vers l'industrialisation de cellules médicaments.

**Résumé** : Les affections articulaires touchant le cartilage, telles que les lésions focales et l'arthrose, correspondent aux principales causes de baisse de performance et d'arrêt prématuré de la carrière sportive du cheval. Ainsi, le traitement des affections du cartilage représente un enjeu vétérinaire majeur dans le monde équin, du fait des importantes pertes financières qu'elles occasionnent à la filière. Les faibles capacités de réparation intrinsèque du cartilage, ainsi que l'absence de thérapie à long terme des dommages cartilagineux, nécessitent le recours à des thérapies de nouvelles générations telle que l'ingénierie tissulaire du cartilage. Dans ce cadre, notre étude s'est attachée à comparer différents types cellulaires pour la génération de cartilage *in vitro*, afin d'envisager une implantation pour traiter les atteintes cartilagineuses chez le cheval. Une technique initialement développée chez l'Homme, la transplantation de chondrocytes autologues, représente toujours un « gold standard » en ingénierie tissulaire du cartilage. Dans ce travail de thèse, après avoir développé une nouvelle génération de substitut cartilagineux de haute qualité biologique, à partir de chondrocytes articulaires équins, des limites techniques et biologiques inhérentes au type cellulaire persistent. Ainsi, nos travaux se sont tournés vers la recherche de types cellulaires alternatifs. Les cellules souches/stromales mésenchymateuses (CSM) néonatales issues de cordon ombilical telles que les CSM de sang placentaire (CSM-SPL) et les CSM de gelée de Wharton (CSM-GW) pourraient représenter un avantage thérapeutique du fait de leur isolement non-invasif, de leur forte prolifération cellulaire et de leur capacité de différenciation en chondrocyte. Il est néanmoins indispensable de définir le meilleur candidat thérapeutique, parmi ces deux sources cellulaires, pour l'obtention d'un substitut cartilagineux de qualité biologique optimale. Ces résultats de thèse ont montré d'importantes différences dans le processus de chondrogenèse de ces deux sources de CSM néonatales et plaident en faveur de l'utilisation des CSM-SPL dans le cadre d'une stratégie thérapeutique d'ingénierie tissulaire du cartilage équin. Ces travaux ont permis une meilleure compréhension de la biologie du chondrocyte et des CSM. De surcroît, ces travaux permettent d'envisager de futurs essais cliniques chez le cheval, afin de traiter les affections articulaires de ce modèle gros animal.

**Mots clés** : Cheval, ingénierie tissulaire du cartilage, chondrocyte, transplantation de chondrocytes autologues, cellules souches/stromales mésenchymateuses, sang placentaire, gelée de Wharton, arthrose, atteinte cartilagineuse, chondrogenèse, matrice extracellulaire.

### New therapeutic strategies for articular disorders in the equine model. Therapeutic potential evaluation of autologous chondrocytes and umbilical cord stem cells (from umbilical cord blood and Wharton jelly): toward industrialization of drug cells.

**Abstract** : Articular cartilage disorders, such as focal defects and osteoarthritis, are the main causes of decreased performance or early retirement of sport- and racehorses. Thus, cartilage disorders represent a major veterinary issue in the equine industry, due to significant financial losses. Poor intrinsic cartilage repair properties and the absence of long-term therapy for cartilage defects lead to the development and use of new generation therapies such as autologous chondrocytes implantation. In this context, our study aimed to compare different cell types for the *in vitro* cartilage generation, in order to implant the biological substitute to treat cartilage defects in the horse. A therapeutic strategy initially developed in human medicine, the autologous chondrocytes transplantation, always represents a "gold standard" in cartilage tissue engineering. In the present study, after developing a new generation of cartilaginous substitute of high biological quality, composed of equine articular chondrocytes, technical and biological limits inherent to the cell type persist. Thus, we have used alternative cell types such as neonatal mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) from umbilical cord, such as umbilical cord blood MSC (UCB-MSCs) and umbilical cord matrix or Wharton jelly MSCs (UCM-MSCs). These MSCs sources could represent a therapeutic advantage due to their non-invasive isolation, their high cell proliferation and their ability to differentiate into chondrocytes. Nevertheless, it is essential to define the best therapeutic candidate between these two MSCs sources, to obtain an optimal quality for the neocartilaginous substitute. Our data highlighted important differences in the chondrogenesis process of these two neonatal MSCs sources, allowing us to consider UCB-MSCs as the best therapeutic candidate for equine cartilage tissue engineering. This work allows a better understanding of the chondrocyte and MSCs biology. Moreover, this work leads the way to setting-up future clinical trials in the horse, in order to treat articular defects of this large animal model.

**Keyword** : Horse, cartilage tissue engineering, chondrocyte, matrix-induced autologous chondrocytes implantation, mesenchymal stem/stromal cells, umbilical cord blood, umbilical cord matrix, osteoarthritis, chondral defects, chondrogenesis, extracellular matrix.

Laboratoire BioTARGen, EA 7450 (Biologie, génétique et thérapies ostéoarticulaires et respiratoires) - Université de Caen Normandie - UFR de Médecine - 3 Rue Nelson Mandela - 14280 Saint-Contest - Rodolphe Rakic - rodolphe.rakic@gmail.com