



HAL
open science

Nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des affections articulaires chez le cheval

Romain Contentin

► **To cite this version:**

Romain Contentin. Nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des affections articulaires chez le cheval. Rhumatologie et système ostéo-articulaire. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMC417 . tel-02357952

HAL Id: tel-02357952

<https://theses.hal.science/tel-02357952v1>

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

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des affections articulaires chez le cheval

**Présentée et soutenue par
Romain CONTENTIN**

**Thèse soutenue publiquement le 19/10/2018
devant le jury composé de**

M. JEROME LAFONT	Maître de conférences HDR, UNIVERSITE LYON 1 CLAUDE BERNARD	Rapporteur du jury
Mme EMILIE VELOT	Maître de conférences HDR, UNIVERSITÉ LORRAINE	Rapporteur du jury
M. FRANCK CARREIRAS	Professeur des universités, UNIVERSITE CERGY PONTOISE	Membre du jury
M. HERVÉ KEMPF	Chargé de recherche à l'INSERM, UNIVERSITÉ LORRAINE	Membre du jury
M. JEAN-MARC LEBEL	Professeur des universités, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Président du jury
Mme FRANCOISE REDINI	Directeur de recherche à l'INSERM, UNIVERSITE NANTES	Membre du jury
M. PHILIPPE GALERA	Professeur des universités, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Directeur de thèse
Mme MAGALI DEMOOR	Maître de conférences HDR, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par PHILIPPE GALERA et MAGALI DEMOOR, Biologie, Génétique et Thérapies Ostéo-Articulaires et Respiratoires



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normande de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



Ces travaux de thèse ont été menés au sein de l'équipe MIPDF (Microenvironnement des pathologies dégénératives et fibrotiques) du laboratoire MILPAT, puis 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 co-financé par l'obtention d'une allocation de recherche de l'ex-Région Basse-Normandie et par la fondation Hippolia via le soutien des Fonds Eperon.

L'ensemble des travaux ont pu être menés, au-delà du concours de l'équipe MIPDF/OERAGEN, grâce à l'indispensable soutien financier de la Fondation Hippolia, du Fonds Eperon, de l'ex-Région Basse-Normandie, de la Région Normandie, ainsi que par 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

Tout d'abord, j'adresse de sincères remerciements au professeur **Philippe Galéra** pour m'avoir permis d'intégrer le laboratoire MILPAT lors de mon cursus, pour avoir accepté de m'encadrer lors des stages de master et de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Je te remercie de t'être tant investi pour que les travaux de thèse se déroulent dans les meilleures conditions. Ce fut un plaisir et une fierté que tu diriges ma thèse. Au-delà de tout cela, merci pour l'investissement que tu as pour tous tes étudiants, pour la qualité des passionnants enseignements dispensés à l'Université qui ne sont pas sans influence dans mes choix de parcours. En plus de tes qualités professionnelles, tes qualités humaines sont aussi un exemple. Je te remercie de tes conseils et ton investissement pour la suite de mon parcours.

Je remercie aussi le docteur **Magali Demoor** pour avoir accepté de co-encadrer ma thèse, pour son dévouement dans la direction du laboratoire, pour avoir œuvré à ce que nous travaillions dans des conditions optimales. Je vous remercie aussi pour vos qualités humaines qui contribuent au déroulement de nos tâches quotidiennes dans une agréable atmosphère. Merci aussi de m'avoir permis d'enseigner à l'IUT de Caen, et ainsi de découvrir une possible perspective de carrière.

Au docteur **Thomas Branly**, j'adresse un merci des plus simples mais des plus sincères. Tu m'as suivi depuis le M1 jusqu'à ma soutenance de thèse, à mon plus grand plaisir. J'avais osé dire que tu étais brillant, même si par certains moments la déraison s'empare de toi, je sais que tu l'es avec toute la modestie qui te caractérise.

Philippe, Magali, sans oublier Thomas, je vous remercie pour le temps que vous avez consacré à corriger ce manuscrit.

Je tiens à remercier le professeur **Franck Carreiras** et le docteur **Jérôme Lafont** pour avoir accepté de juger les travaux réalisés lors de cette thèse. Je leur suis reconnaissant du temps accordé pour la lecture critique de ce manuscrit. Merci également au docteur **Hervé Kempf**, au professeur **Jean-Marc Lebel**, et aux docteur **Emilie Vélot** pour avoir accepté de faire partie de ce jury. Docteur **Françoise Rédini** je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse mais aussi d'avoir été la personnalité extérieure référente de mon comité de suivi de thèse.

Rodolphe Rakic, merci pour m'avoir redonné confiance dans les moments de doute. Pour toutes ces discussions ô combien passionnantes, ton unique façon de penser, ton optimisme à toute épreuve. Le déménagement et l'emménagement du laboratoire à tes côtés resteront un excellent souvenir.

Mélanie Desancé, je te remercie pour le temps que tu as consacré au transfert de la technologie « SCO ». Il me plaît à me remémorer la gentillesse et la sympathie dont tu as fait preuve lors de ces manips.

Merci également au docteur **Florence Legendre** pour m'avoir encadré lors de mon M2, pour les conseils que tu as pu m'apporter durant mon expérience au laboratoire. Un grand merci aussi à **Marie-Christine Enos** pour son indispensable support technique et logistique, pour sa gentillesse. Je te souhaite une retraite des plus sereines. Je remercie aussi **Céline Ballandone**. Ton expérience, ton savoir-faire et ton implication sont à prendre en exemple.

Je remercie également les doctorants actuels, **Bastien, Clément, Clovis, Côme, Gabrielle** et **Marie** pour l'esprit de camaraderie qu'ils font régner. Côme, Bastien, et... Rodolphe, au plaisir d'une ballade à bicyclette. Je remercie aussi **Stéphanie**, pour ta gentillesse, l'ensemble de tes folles anecdotes. Merci à l'inimitable **Camille Noblet**. Tes projets de carrière ont fait que tu ne sois pas restée au labo, dommage. Ton passage restera un excellent souvenir.

Finalement, je remercie les stagiaires, que j'ai encadré ou non, **Aurélie, Flavie, Julien, Maelhia, Valentin** et **Victor. Julien**, ce fut un plaisir de te montrer mes manips. Une implication et un sérieux sans faille. Tu as de nombreuses qualités. J'espère que tu trouveras ce que tu cherches, quoi que tu cherches, là où tu vas. **Flavie**, ce fut aussi avec plaisir de répondre à tes quelques questions. Tes qualités à la paillasse sont nombreuses. Tu as tout pour brillamment continuer dans la recherche. **Aurélie**, j'espère que ta première expérience dans l'équipe restera un bon souvenir, et qu'il y en aura d'autres.

Merci à l'ensemble des membres de mon comité de suivi de thèse, **Françoise Rédini, Arnaud Bianchi, Siham Hédir, Michaël Aubert**.

J'adresse également un grand merci à **Amandine Duchemin**. Ce fut un plaisir de réaliser ce stage de M2 en même temps que toi, de partager nos manips, d'être ton camarade de bureau. Merci aussi à **Abdé Benmoussa** pour avoir initié les travaux que nous avons continués lors de notre M2, et tous tes conseils. **Miranda Concari**, ce fut aussi un plaisir de te rencontrer.

Merci à **Thibaud Jacquiel**. Il ne me reste que d'excellents souvenirs des moments passés en ta compagnie au labo. Du Caramel, des plocs plocs, des tubes de 0,2ml, et j'en oublie.

J'adresse aussi mes remerciements aux anciens doctorants **Mouloud** et **Tangni** pour avoir répondu à mes interrogations avec plaisir, pour les quelques moments partagés.

Je remercie aussi **Christine, Erika, Marie-Pierre, Sophie**, ainsi que toutes les personnes assimilées « Labéo » pour leur aide lors de notre emménagement et depuis. Je remercie aussi le personnel du RESPE pour sa gentillesse et bonne humeur au quotidien.

Enfin, je tiens à remercier tous les autres membres du laboratoire pour leur aide, leur gentillesse.

Finalement, je remercie l'ensemble de **mes proches** pour toujours avoir été présents, et surtout dans les moments de doutes, et tout particulièrement **mes parents**. Vous le savez déjà, et encore davantage. **Mégane**, nous avons depuis quelques années aussi bien partagés les plus beaux moments que ceux de doutes. Une aventure qui ne fait encore que commencer. Parfois, certains sentiments ne peuvent être écrits. L'essentiel est de les vivre, de les ressentir et nous le faisons. Merci pour tout.

Sommaire

Remerciements	3
Sommaire	7
Liste des abréviations	11
Liste des figures et tableaux	15
Avant-propos	19
Introduction	23
I. Présentation succincte du système ostéoarticulaire	23
A. Les différentes articulations	23
1. Synarthrose	23
2. Amphiarthrose	23
3. Diarthrose	23
B. Les différents cartilages	25
1. Cartilage élastique	25
2. Cartilage fibreux	25
3. Cartilage hyalin	25
II. Organisation d'une diarthrose	27
A. Structures avoisinantes du cartilage	27
1. La membrane synoviale	27
2. Le liquide synovial	27
3. L'os sous-chondral	27
B. Organisation du cartilage articulaire hyalin	28
1. Chondrogenèse : Un enchaînement d'évènements finement régulés	28
a) La chondrogenèse	28
b) Les régulateurs de la chondrogenèse	31
i) Les microRNA	31
ii) Le microenvironnement	33
• Facteurs de croissance	33
➤ Les IGF	33
➤ Les FGF	33
➤ Les TGF- β	33
➤ Les BMP	36
• L'hypoxie	36
2. Organisation structurale du cartilage hyalin	37
a) La couche superficielle	37
b) La couche intermédiaire	38
c) La couche profonde	38

d) La couche calcifiée	38
3. Organisation biologique et biochimique du cartilage hyalin	39
a) Les cellules souches mésenchymateuses	39
b) Les chondrocytes.....	39
c) La matrice extracellulaire	40
i. Les collagènes	40
ii. Les protéoglycanes	43
iii. Les autres molécules matricielles	45
III. Atteintes cartilagineuses : De la lésion chondrale à l'arthrose	47
A. La lésion chondrale	47
B. L'arthrose	48
1. Épidémiologie et étiologie	48
2. Contexte articulaire global	49
a) Contexte inflammatoire	49
b) Remodelage tissulaire.....	51
3. Effet au niveau du cartilage	51
a) Synthèse d'un fibrocartilage	51
b) Déséquilibre de l'homéostasie du cartilage	53
4. Symptômes et diagnostic	54
a) Les techniques d'imagerie	55
b) Les peptides de dégradation des molécules matricielles	56
5. Traitements actuels	57
a) Les traitements pharmacologiques	57
b) Les traitements chirurgicaux.....	58
IV. Thérapie cellulaire et tissulaire du cartilage : De nouvelles pistes thérapeutiques pour les lésions chondrales	60
A. Généralités	60
B. Différentes sources cellulaires	60
1. Les chondrocytes.....	60
2. Les cellules souches	61
a) Généralités.....	61
b) Un type de cellules souches séduisant, les cellules souches mésenchymateuses	63
i. Localisation tissulaire des CSM.....	63
ii. Caractéristiques.....	65
• Adhésion au support plastique et pouvoir prolifératif	65
• Pouvoir de différenciation	65
• Expression d'un panel de marqueurs membranaires.....	67
• Propriétés immunomodulatrices/sécrétome.....	67
iii. L'intérêt particulier des CSM de MO et SCO	70

C. Evolution des modèles de culture.....	71
1. Premières générations de stratégie de thérapie cellulaire.....	71
2. Les différents outils d'amélioration.....	72
a) Les facteurs chondrogéniques.....	72
b) La culture en hypoxie.....	73
c) L'utilisation de biomatériaux.....	73
d) Les ARN interférents.....	74
3. Stratégie de thérapie cellulaire du cartilage chez le cheval.....	75
4. Utilisations des CSM indifférenciées.....	75
a) Utilisation des CSM en co-culture.....	75
b) Injection intra-articulaire de CSM indifférenciées.....	76
V. Intérêt de l'étude du modèle équin.....	79
A. Modèle d'étude pré-clinique pour l'Homme.....	79
B. Le traitement des affections locomotrices équinés, un enjeu majeur.....	81
VI. Objectifs généraux du projet de thèse.....	82
Résultats.....	83
I. Article #1.....	83
A. Objectifs de l'article #1.....	83
B. Article #1.....	84
C. Conclusions de l'article #1.....	114
II. Article #2.....	115
A. Objectifs de l'article #2.....	115
B. Article #2.....	117
C. Conclusions de l'article #2.....	150
III. Article #3.....	151
A. Objectifs de l'article #3.....	151
B. Article #3.....	152
C. Conclusions de l'article #3.....	189
IV. Article #4.....	190
A. Objectifs de l'article #4.....	190
B. Article #4.....	192
C. Conclusions de l'article #4.....	239
V. Effet du secrétome de CSM sur le phénotype chondrocytaire.....	241
A. Objectifs.....	241
B. Matériel et méthodes.....	243
C. Résultats.....	248
D. Conclusion de l'étude.....	260
Discussion.....	261

I. Avantages et limites des travaux réalisés	262
A. Isolement et caractérisation des CSM	262
B. Différenciation des CSM.....	264
1. Intérêts de l'utilisation d'un biomatériau	264
2. Effet des facteurs de croissance	266
3. Effet de la stratégie d'interférence par l'ARN	267
4. Effet de la condition oxique	268
5. Détermination du temps de culture optimal.....	268
6. Quelle source de CSM est la plus adaptée ?	269
II. Limitations de l'utilisation de CSM différenciées	270
A. Caractérisation, amplification et conservation des CSM	271
B. Difficulté du choix de la source de CSM	273
III. Amélioration des stratégies d'ingénierie tissulaire du cartilage	274
A. Optimisation de la différenciation des CSM	274
B. Utilisation de CSM indifférenciées	276
1. Dédifférenciation chondrocytaire	276
2. Utilisation des CSM <i>in vivo</i>	277
Conclusion générale et perspectives	279
Références	283
Annexes	303
I. Publications scientifiques	303
II. Communications orales	303
III. Communications affichées	304
IV. Encadrement de stagiaires	305
V. Enseignement	306
VI. Formations	306

Liste des abréviations

Abréviations	Signification
3D	Trois Dimensions
ACI :	" Autologous Chondrocyte Implantation "
AH :	Acide Hyaluronique
ADAMTS :	" A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs "
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
AINS :	Anti-Inflammatoire Non-Stéroïdien
ALCAM :	" Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule "
ARN :	Acide RiboNucléique
ARNm :	Acide RiboNucléique messenger
BMP :	" Bone Morphogenetic Protein "
CAE :	Chondrocytes Articulaires Equins
CC :	Cartilage Calcifié
CCL2 :	" Chemokine Ligand2 "
CD :	" Cluster of Differentiation "
CE :	Conforme aux Exigences
CFU-F :	" Colony-Forming Unit-Fibroblast "
CIRALE :	Centre d'Imagerie et de Recherche sur les Affections Locomotrices Equines
CM :	" Conditionned Medium "
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COMP :	" Cartilage Oligomeric Matrix Protein "
CS :	Chondroïtine-Sulfate
CSE :	Cellule Souche Embryonnaire
CSH :	Cellule Souche Hématopoïétique
CSM :	Cellule Souche Mésoenchymateuse
DAMP :	" Damage Associated Molecular Pattern "
DDR-2 :	" Discoidine Domain Receptor-2 "
DGCR 8 :	" Di George Critical Region 8 "
DMEM :	" Dulbecco's Modified Eagle Medium "
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DS :	Dermatane-Sulfate
eAC :	" equine Articular Chondrocyte "
EDTA :	" Ethylenediaminetetraacetic acid "
ESCRT :	" Endosomal Sorting Complexes Required for Transport "
FGF :	" Fibroblast Growth Factor "
GAG :	GlycosAminoGlycanes
GDF :	" Growth and Differentiation Factor "
GLUT :	" GLUcose Transporter "
GMP :	" Good Manufacturing Practices "
HGF :	" Hepatocyte Growth Factor "
HIF :	" Hypoxia Inducible Factor "
HLA-DR :	" Human Leukocyte Antigen-DR "
HMG :	" High-Mobility Group "
HO-1 :	" HemeOxygenase-1 "

HtrA1 :	" High temperature requirement factor A1 "
HS :	Héparane-Sulfate
ICAM-1 :	« InterCellular Adhesion Molecule-1 »
ICRS :	" International Cartilage Research Society "
ICT :	Ingénierie Cellulaire et Tissulaire
IFN :	InterFéroN
IGF :	" Insulin-like Growth Factor "
IL :	InterLeukine
iPSC :	" induced Pluripotent Stem Cells "
IRAP :	" Interleukine Receptor Antagonist Protein "
IRM :	Imagerie par Résonance Magnétique
ISCT :	" International Society for Cellular Therapy "
ISEV :	" International Society for Extracellular Vesicles "
KS :	Kératane-Sulfate
LAP :	" Latency Associated Peptide "
LFA :	" Lymphocyte Function-associated Antigen-1 "
LLC :	" Large Latent Complex "
LIF :	" Leukemia Inhibitory Factor "
LPS :	LipoPolySaccharide
LTBP :	" Latent TGF- β Binding Protein "
MC :	Milieu Conditionné
M-CSF :	" Macrophage-Colony Stimulating Factor "
MEC :	Matrice ExtraCellulaire
miRNA :	" microRNA "
M-MLV :	" Moloney-Murine Leukemia Virus "
MMP :	" Matrix MetalloProteinase "
MO :	Moelle Osseuse
MSC :	" Mesenchymal Stem Cell "
MSZ :	" Most Superficial Zone "
NCC :	" Non Calcified Cartilage "
nEV	" nanoExtracellularVesicles "
O₂ :	Dioxygène
P :	Phosphorylation
PBS :	" Phosphate Buffered Saline "
PCR :	" Polymerase Chain Reaction "
PD-1 :	" Program-Death-1 "
PD-L1 :	" Program-Death-1 Ligand1 "
PGE₂ :	ProstaGlandine E ₂
PG :	ProtéoGlycane
PPAR-γ :	" Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gamma "
PRG₄ :	" PRoteoGlycan 4 "
PRP :	" Platelet Rich Plasma "
PRR :	" Pattern Recognition Receptor "
rAAV :	" recombinant Adeno-Associated Virus "
RISC :	" RNA-Induced Silencing Complex "
ROS :	" Reactive Oxygen Species "
Runx2 :	" Runt-related transcription factor-2 "

RWD :	" Relative Wound Density "
SBP :	" Subchondral Bone Plate "
SCF :	" Stem Cell Factor "
SCO :	Sang de Cordon Ombilical
siRNA :	" short interfering RNA "
SLC :	" Small Latent Complex "
SLRP :	" Small Leucin-rich Repeat Proteoglycans "
SMAD :	" S-Mothers Against Ddp "
SNORC :	" Small NOvel Rich in Cartilage "
Sox :	" SRY-type HMG box "
STB :	" Subchondral Trabecular Bone "
SVF :	Sérum de Veau Fœtal
TCA :	Transplantation de Chondrocytes Autologues
TGase :	TransGlutaminase
TGF-β :	" Transforming Growth Factor- β "
TIMP :	" Tissue Inhibitor of MetalloProteinases "
TNF-α :	" Tumor Necrosis Factor- α "
TSG6 :	" TNF- α -Stimulated Gene6 "
Ub :	Ubiquitination
VCAM-1 :	" Vascular Cell Adhesion Molecule-1 "
VEGF :	" Vascular Endothelial Growth Factor "
VLA-4 :	"Very Late Antigen-4 "

Liste des figures et tableaux

Figures/tableaux	Titre
Figure I-1	Représentation schématique des différents types d'articulation.
Figure I-2	Schématisation en vue frontale d'une articulation synoviale (A) et coupe anatomique de l'articulation métacarpo-phalangienne équine (B).
Figure I-3	Coupes histologiques des différents types de cartilage.
Figure II-1	Coupe histologique présentant la structure du cartilage et de l'os sous-chondral.
Figure II-2	Les différentes étapes de l'ossification endochondrale.
Figure II-3	Régulation des différentes étapes de l'ossification endochondrale.
Figure II-4	Biogenèse des microRNA et leurs modes d'action.
Figure II-5	Implication des microARN dans la chondrogenèse et l'ossification endochondrale.
Figure II-6	Voies de signalisation intracellulaires induites par les membres du TGF- β : l'exemple des « Bone Morphogenetic Protein » (BMP).
Figure II-7	Processus d'activation du TGF- β .
Figure II-8	Stratification du cartilage.
Figure II-9	Schéma de la surface du cartilage articulaire.
Figure II-10	Microscopie électronique d'un chondrocyte articulaire.
Figure II-11	Schéma représentant l'agencement de la MEC du cartilage et des chondrocytes (A) et les proportions des composants matriciels (B).
Figure II-12	Représentation schématique de la structure en triple hélice des collagènes et de leurs arrangements supramoléculaires.
Figure II-13	Représentation schématique de l'épissage alternatif, de la maturation des différentes isoformes du collagène de type II (A) et de leur immunodétection par « western-blot » (B).
Figure II-14	Représentation schématique de la liaison d'une chaîne de GAG à un noyau protéique.

Figure II-15	Représentation schématique d'un agrégat d'agrécane.
Figure III-1	Classification des lésions chondrales proposée par l'ICRS.
Figure III-2	Schéma représentant les modifications structurales lors de l'arthrose.
Figure III-3	Schéma montrant l'implication de l'inflammation dans le développement de l'arthrose.
Figure III-4	Schéma de l'évolution d'une articulation saine vers une arthrose avancée.
Figure III-5	Représentation de l'homéostasie cartilagineuse.
Figure III-6	Radiographie d'une articulation saine (A) et arthrosique (B).
Figure IV-1	Schématisation du protocole utilisé lors de la première TCA réalisée chez l'Homme.
Figure IV-2	Représentation des différents types de cellules souches et de leurs capacités de différenciation en fonction du développement.
Figure IV-3	Représentation d'une niche.
Figure IV-4	Schémas représentant l'implication des CSM dans l'immunomodulation (A) et la réparation tissulaire (B).
Figure IV-5	Mécanismes d'action potentiels des nEV dans la réparation du cartilage.
Figure IV-6	Les différentes pistes d'amélioration des premières générations d'ingénierie tissulaire du cartilage.
Figure IV-7	Structure macroscopique et microscopique des éponges de collagène de types I/III.
Figure IV-8	Le sécrétome des CSM est constitué d'un large panel de molécules impliquées dans différents processus (A). L'injection de CSM dans le cadre de la thérapie cellulaire du cartilage pourrait s'avérer utile dans le but de prévenir certains mécanismes arthrosiques (B).
Figure V-1	Comparaison des différents modèles utilisés dans l'étude des lésions chondrales.
Figure V-2	Création d'une lésion cartilagineuse à la curette sous arthroscopie.
Figure R1	Chondrocyte mRNA expression of ECM molecules and proliferation associated molecules when chondrocytes were seeded in monolayer and cocultured with MSC at different <i>ratio</i> for 7 or 14 days.

Figure R2	Chondrocyte mRNA expression of ECM molecules and proliferation associated molecules when chondrocytes were seeded in 3D and cocultured with MSC at different <i>ratio</i> for 7 or 14 days.
Figure R3	Chondrocyte mRNA expression of ECM molecules and proliferation associated molecules when chondrocytes were cultured in the presence of CM.
Figure R4	Effect of CM on wound healing.
Figure R5	Effect of CM on wound healing.
Figure R6	Effect of CM on wound healing.
Figure R7	Effect of CM on wound healing.
Figure R8	Detection of vesicles in BM-MSC CM with (B) or without filtration (A).
Figure R9	Detection of exosomal markers of nanovesicles by flow cytometry of BM-MSC CM.
Figure C-1	Immunohistochimie des patches cartilagineux à l'issue de leur implantation <i>in vivo</i> .
Tableau I	Classification et dénomination des MMP.
Tableau II	Liste des biomarqueurs avec une possible application en diagnostic.
Tableau III	Récapitulatif des milieux et des différents intervenants habituellement utilisés et étudiés afin de vérifier la multipotence des CSM <i>in vivo</i> .
Tableau R1	Primers used for RT-qPCR

Avant-propos

Le cartilage articulaire, que ce soit chez l'Homme ou le cheval, est un tissu recouvrant les extrémités osseuses au niveau des articulations mobiles. Son rôle est de permettre le bon fonctionnement des articulations, notamment, en protégeant les extrémités osseuses et en amortissant les chocs. C'est un tissu composé de peu de cellules, principalement des chondrocytes, synthétisant une abondante **Matrice ExtraCellulaire (MEC)** constituée de molécules spécifiques à ce tissu, dont le collagène de type II et l'agrécan. Le cartilage articulaire est un tissu possédant une faible capacité de réparation intrinsèque. Dès lors, la répétition de traumatismes articulaires induit un microenvironnement propice à la dégradation du cartilage et, *in fine*, l'émergence de l'arthrose. En effet, la répétition des chocs et la sur-sollicitation de l'articulation induisent un microenvironnement inflammatoire ainsi que des lésions chondrales. En réponse à ce microenvironnement pathologique, les chondrocytes synthétisent un cartilage composé de collagènes atypiques tels que le collagène de type I et ne synthétisent plus les marqueurs spécifiques du cartilage articulaire sain. Ces derniers sont mêmes dégradés, du fait de l'augmentation de la synthèse et de l'activité de protéases. Le tissu néo-formé, appelé fibrocartilage, ne possède pas les mêmes propriétés biomécaniques que le cartilage sain. Il est rapidement dégradé et ne remplit plus sa fonction physiologique, ce qui a pour conséquence l'entrée en contact des pièces osseuses et donc l'émergence de douleurs articulaires, puisque les os sont innervés.

Les traitements utilisés à l'heure actuelle visent uniquement à soulager la douleur, réduire l'inflammation et la progression de l'arthrose. Chez l'Homme, en dernier recours, la solution chirurgicale est utilisée, avec la mise en place d'une prothèse. Cette approche reste temporaire, puisque la prothèse se dégrade, elle n'est de plus pas envisageable dans le modèle équin. Il n'y a donc pas de traitement curatif de l'arthrose que ce soit chez l'Homme ou le cheval, alors que les affections locomotrices sont la première cause de baisse de performances ou d'arrêt de carrière du cheval sportif. Les affections articulaires occupent donc une place dominante par leur fréquence et ont un impact économique majeur (estimation à plus de 100 millions d'euros de coûts directs et indirects par an de ces affections pour la seule filière trot). Il y a donc nécessité de développer de nouvelles approches dans le traitement des lésions chondrales, et par conséquent de l'arthrose, chez le modèle équin. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour traiter les lésions chondrales équines pourrait, par ailleurs, constituer une preuve de concept pour l'Homme et ainsi être transposées en médecine humaine, puisque les propriétés physico-chimiques du cartilage équin et humain sont semblables.

Les stratégies de thérapie cellulaire du cartilage ont été initiées par Brittberg et ses collaborateurs en 1994. Leur procédé consistait à récupérer des chondrocytes d'une zone macroscopiquement saine de l'articulation arthrosique, puis à les amplifier en culture monocouche, et à les réimplanter au niveau de la zone lésée. Cette stratégie avait pour inconvénient, parmi d'autres, le développement d'un fibrocartilage au niveau de la zone lésée, dû à la dédifférenciation des chondrocytes lors de l'amplification en monocouche. Depuis, de nouvelles générations de ce type de stratégie ont émergé, avec l'utilisation d'une amplification cellulaire en **Trois Dimensions (3D)** et en hypoxie pour mimer le microenvironnement du cartilage. La source cellulaire s'est aussi diversifiée, avec l'emploi de différentes cellules souches ayant la capacité de se différencier en chondrocytes.

Les travaux de thèse présentés s'insèrent dans cette démarche de thérapie cellulaire et ingénierie tissulaire du cartilage. Par ailleurs, il se situe dans la continuité de projets réalisés au sein du laboratoire aspirant à la réalisation de greffes de chondrocytes autologues chez l'Homme. Ainsi, les travaux menés au laboratoire ont permis de déterminer un protocole optimal pour obtenir un phénotype chondrocytaire mûre et stable chez l'Homme. La preuve de concept a été réalisée sur un modèle petit animal, la souris *nude*. Néanmoins, du fait des grandes différences entre ce modèle animal et l'Homme, des essais pré-cliniques dans le modèle gros animal (équin) devront être réalisés. Ce projet est par ailleurs mené en étroite collaboration avec le **Centre d'Imagerie et de Recherche sur les Affections Locomotrices Equines (CIRALE, Goustranville)**.

Dans cette visée, nous avons d'abord isolé, à partir de prélèvements de **Sang de Cordon Ombilical (SCO)** et de **Moelle Osseuse (MO)** équins, puis caractérisé des **Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM)**, dans la continuité de deux projets de thèse antérieurs. Nous avons utilisé les critères de caractérisation employés internationalement (auto-renouvellement, multipotence, immunophénotypage). En parallèle, nous nous sommes assurés de l'absence de contamination virale et/ou bactérienne des prélèvements, puis nous avons constitué une banque de CSM.

Le caractère souche et l'innocuité des CSM vérifiés, nous avons réalisé des expériences de différenciation chondrogénique en adoptant en tant que protocole de différenciation initial le protocole établi chez l'Homme. Le phénotype cellulaire obtenu demeurant perfectible, nous avons tenté, dans un second temps, d'améliorer la stratégie de différenciation des CSM en chondrocytes.

En marge de ces travaux, mais néanmoins dans le même objectif d'obtenir le meilleur phénotype chondrocytaire, nous avons réalisé des expériences de co-cultures CSM-chondrocytes afin d'améliorer la redifférenciation de chondrocytes équins. Puis, nous avons

évalué l'effet de **Milieux Conditionnés (MC)** à partir de CSM sur le phénotype chondrocytaire.

L'ensemble des éléments nécessaires à la compréhension de ce projet de thèse sont présentés dans une introduction présentant majoritairement les connaissances acquises chez l'Homme, puisqu'elles sont mieux décrites dans la littérature que celles chez le cheval.

La suite de cet exposé traitera donc principalement de l'appareil locomoteur et des connaissances disciplinaires acquises chez l'Homme, et se focalisera, lorsque nécessaire, ou particulièrement pertinent, sur le cheval, qui n'en demeure pas moins le modèle étudié et développé très majoritairement dans ce projet.

Introduction

I. Présentation succincte du système ostéoarticulaire

La classification phylogénétique tend à regrouper les êtres vivants en fonction de leur degré de parenté, et donc de leurs différentes caractéristiques découlant de cette parenté. Le cheval et l'Homme possèdent un ensemble de caractéristiques permettant de les classer au sein des Vertébrés. En effet, ces deux espèces possèdent un squelette osseux qui conditionne l'architecture de leur corps, la protection d'organes sensibles et leur capacité à se mouvoir. Chez les deux espèces, le squelette se compose de centaines d'os liés entre eux par plusieurs types d'articulations classées selon leur degré de mobilité et leur structure.

A. Les différentes articulations

1. Synarthrose

Ce sont des articulations immobiles. La jonction entre deux os est alors faite par un tissu, le plus souvent fibreux. Pour cette raison, elles sont aussi appelées articulations fibreuses. Par exemple, l'articulation tibiofibulaire distale humaine ou les sutures crâniennes sont des synarthroses.

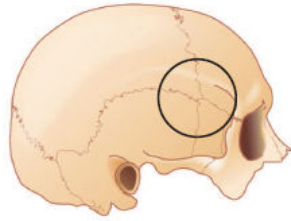
2. Amphiarthrose

Ce sont des articulations semi-mobiles. Les amphiarthroses sont aussi appelées articulations cartilagineuses puisque la liaison entre les os est faite par un coussinet de cartilage fibreux. De plus, les extrémités osseuses sont recouvertes d'un cartilage hyalin. La symphyse pubienne humaine, ou les disques intervertébraux sont des amphiarthroses.

3. Diarthrose

Ce sont des articulations mobiles. Les extrémités osseuses sont recouvertes d'un cartilage hyalin et sont unies par des ligaments. L'articulation est immergée dans la synovie au sein d'une capsule articulaire tapissée de membranes synoviales sur ses faces internes (**Figure I-1; Figure I-2**). C'est la raison pour laquelle elles sont aussi appelées articulations synoviales. Il existe différents sous-types de diarthroses définies par la forme des extrémités osseuses composant l'articulation et leur capacité de mouvement.

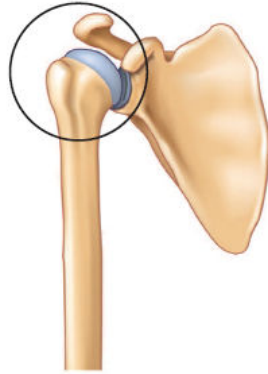
1. Synarthroses : Sutures du crâne



2. Amphiarthroses : Disques intervertébraux



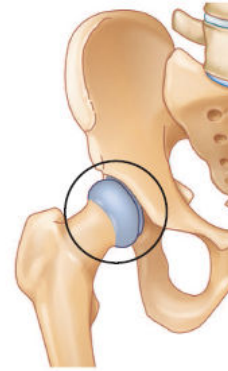
3. Diarthroses



Articulation de l'épaule



Articulation du genou

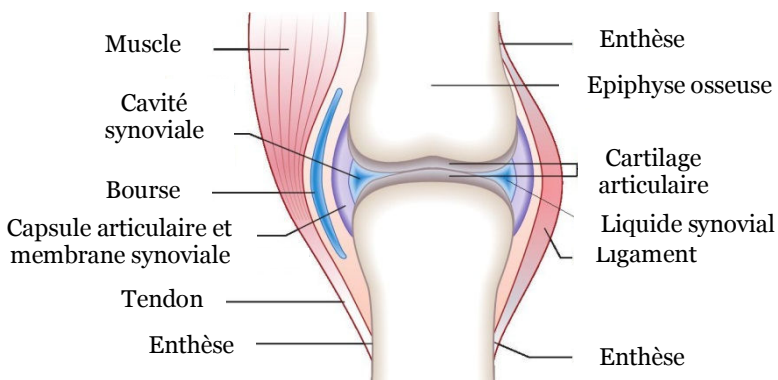


Articulation de la hanche

Figure I-1 : Représentation schématique des différents types d'articulation.

<http://revisionsdespremierssecoursenequipe.fr/anatomie-physiologie-t173.html>

A



B

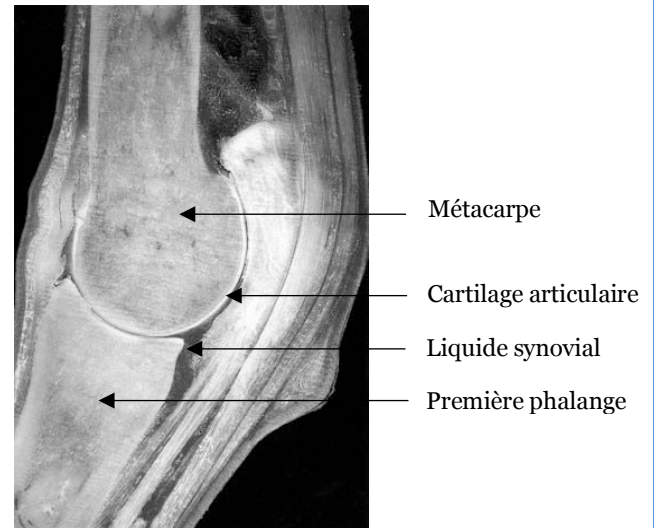
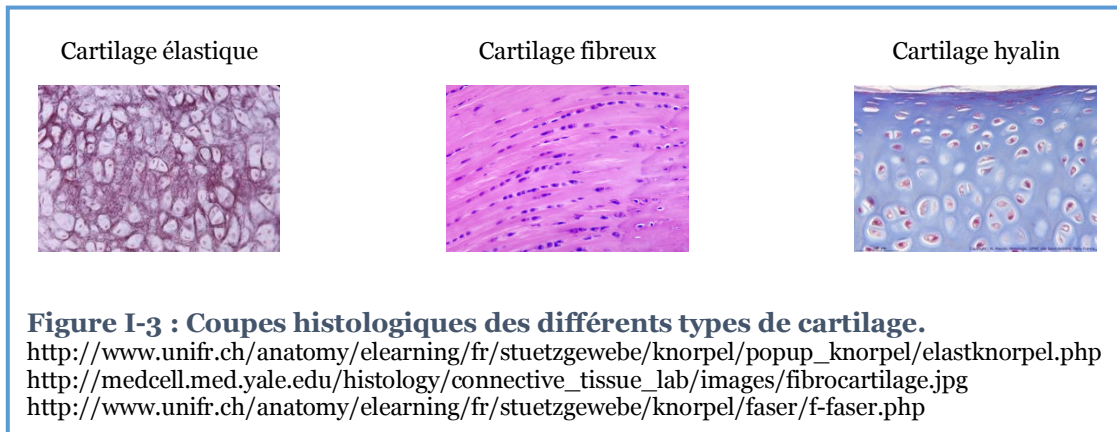


Figure I-2 : Schématisation en vue frontale d'une articulation synoviale (A) et coupe anatomique de l'articulation métacarpo-phalangienne équine (B).

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gewricht_NL.jpg
(d'après Denoix, 2000)

B. Les différents cartilages

Le cartilage est un tissu conjonctif composé d'une MEC, contenant notamment des collagènes et des **Protéoglycanes (PG)**, et d'un type cellulaire majoritaire, le chondrocyte. Ce tissu possède des fonctions essentielles lors du développement du squelette et dans la physiologie ostéoarticulaire. Il existe différents types de cartilages possédant des caractéristiques structurales et fonctionnelles plus ou moins distinctes (**Figure I-3**).



1. Cartilage élastique

Le cartilage élastique est un cartilage peu abondant retrouvé dans le pavillon de l'oreille, au niveau du conduit auditif externe, du larynx et de l'épiglotte. Ce tissu souple possède la capacité de subir de légères déformations réversibles du fait de la présence de nombreuses fibres élastiques au sein de sa MEC, en plus des PG et de certains collagènes. La densité chondrocytaire du cartilage élastique est plus importante que celle retrouvée dans le fibrocartilage et le cartilage hyalin (**Ross & Pawlina, 2011**).

2. Cartilage fibreux

Le cartilage fibreux, aussi appelé fibrocartilage, se situe au niveau des disques intervertébraux, de la symphyse pubienne, des ménisques du genou et de la zone d'insertion de certains tendons. Ce cartilage contient des chondrocytes fusiformes synthétisant une MEC composée principalement de collagène de type I mais aussi d'autres collagènes et de PG. La composition de la MEC du cartilage fibreux lui confère à la fois résistance et élasticité (**Ross & Pawlina, 2011**).

3. Cartilage hyalin

Ce cartilage est le plus abondant. Il possède un rôle essentiel dans le développement embryonnaire puisqu'il forme le premier squelette de l'embryon avant qu'il soit remplacé par un squelette osseux. Ensuite, ce cartilage se localise au niveau du nez, de l'insertion sternale

des côtes, des voies respiratoires et recouvre les surfaces articulaires des os. Les chondrocytes de ce cartilage, arrondis et volumineux, synthétisent une abondante MEC composée, notamment, de collagènes de types II, IX et XI et de nombreux PG tels que l'agrécane (**Ross & Pawlina, 2011**).

II. Organisation d'une diarthrose

Les articulations mobiles sont composées de différents éléments communicant entre eux afin d'assurer le bon fonctionnement de l'articulation. Parmi ces structures, le cartilage articulaire à un rôle essentiel puisqu'il protège les extrémités osseuses innervées. Cependant, le maintien physiologique du cartilage articulaire nécessite un certain nombre de structures.

A. Structures avoisinantes du cartilage

1. La membrane synoviale

Deux types cellulaires composent principalement cette membrane. Il y a des cellules immunitaires ou des cellules d'origine mésenchymateuse. Dans les deux cas, ces cellules sont appelées synoviocytes. La membrane synoviale est irriguée par des vaisseaux sanguins, qui représentent la seule vascularisation intra-articulaire. Sous-jacent à cette membrane, se trouvent des tissus fibreux ou adipeux. L'ensemble des éléments de la membrane synoviale contribue à la synthèse du liquide synovial (**Freemont, 1996**).

2. Le liquide synovial

Il est directement en contact avec les membranes synoviales et le cartilage. La seule barrière est la MEC des tissus. Ce liquide est principalement formé par les membranes synoviales et le cartilage. Ainsi, ce liquide hypocellulaire est composé à partir du sang, et complété par les synthèses des synoviocytes et des chondrocytes. Les éléments composant le liquide synovial lui confèrent des propriétés lubrificatrices indispensables à la physiologie articulaire (**Freemont, 1996**). Les deux principales molécules impliquées dans ces propriétés sont « **PRoteoGlycan 4** » (**PRG4**) et l'**Acide Hyaluronique (AH)**. Au-delà de la lubrification, le liquide synovial permet le transport des nutriments et l'élimination des déchets entre les membranes synoviales vascularisées et le cartilage avasculaire (**Hui et al., 2012**).

3. L'os sous-chondral

Il est séparé de la cavité articulaire par le cartilage articulaire. L'os sous-chondral peut être décomposé en deux zones anatomiques distinctes, la plaque et l'os trabéculaire de l'os sous-chondral (**Figure II-1**). La plaque de l'os sous-chondral se juxtapose directement au cartilage. Elle est poreuse, parcourue de canaux faisant le lien entre l'os et le cartilage. Dans ces canaux, on retrouve de nombreux vaisseaux sanguins et nerfs qui se prolongent sous forme de petites branches jusque dans la zone de cartilage apposée à l'os. En s'éloignant un

peu plus de la surface articulaire se trouve l'os trabéculaire. Il possède la capacité d'absorber les chocs et permet l'apport de certains nutriments au cartilage. Cette partie de l'os sous-chondral est richement vascularisée, innervée, et contient de la MO. La physiologie de l'os sous-chondral influence celle du cartilage, et inversement (**Li et al., 2013**).

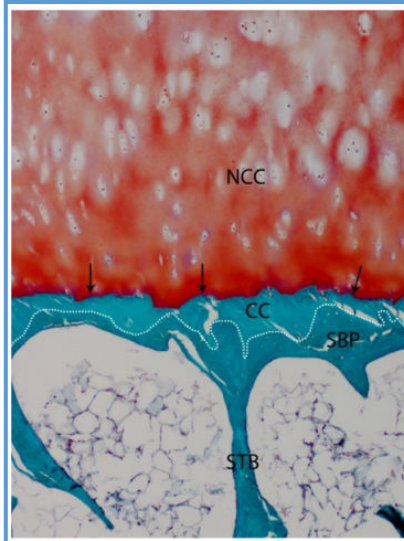


Figure II-1 : Coupe histologique présentant la structure du cartilage et de l'os sous-chondral.

CC : Cartilage Calcifié; NCC : Cartilage non calcifié; SBP : « Subchondral Bone Plate » ; STB : « Subchondral Trabecular Bone ».
(Li et al., 2013)

B. Organisation du cartilage articulaire hyalin

Le cartilage articulaire hyalin est un tissu avasculaire, alymphatique, non innervé et élastique perdurant pendant toute la vie de l'organisme, avec un taux de renouvellement très bas. Son épaisseur varie de quelques millimètres (2 à 7 mm) selon la localisation et les contraintes de l'articulation. Le cartilage articulaire hyalin permet d'assurer le glissement de pièces osseuses entre elles avec un minimum de frictions, en répartissant et amortissant les pressions soumises lors des déplacements et des mouvements.

1. Chondrogenèse : Un enchaînement d'évènements finement régulés

a) La chondrogenèse

La première étape est la condensation des CSM. Elle est associée à une augmentation des contacts cellulaires et au recrutement de cellules de tissus environnants (**Hall & Miyak, 2000**). Au cours de cette étape, de nombreux facteurs solubles, tels que les membres de la famille du « **Transforming Growth Factor- β** » (**TGF- β**), sont présents dans le microenvironnement et induisent la synthèse de molécules d'adhésion qui seraient impliquées dans la différenciation chondrogénique (**Tavella et al., 1994**). A ce stade, la MEC synthétisée se compose, entre autres, de collagène de types I et IIA et d'AH (**Sandell et al., 1994**).

L'expression concomitante des facteurs de transcription « **SRY type High Mobility Group (HMG) box** » (**Sox**) 9, L-Sox5 et Sox6 est essentielle à la différenciation des CSM en chondrocytes (**Yang et al., 2011**). En effet, ces facteurs de transcription sont impliqués dans l'activation transcriptionnelle des gènes des collagènes de types II, IX, XI et de l'agrécan, molécules typiques du cartilage hyalin, alors que la synthèse du collagène de type I, collagène atypique du cartilage hyalin, est réduite (**de Crombrughe et al., 2000; Lefebvre et al., 2001**). Les cellules différenciées en chondrocytes synthétisent alors une MEC hyaline contenant notamment du collagène de type IIB, marqueur du statut différencié des chondrocytes.

Cependant, la chondrogenèse fait aussi partie intégrante de l'ossification enchondrale nécessaire au développement et à la mise en place des os longs. Ce type d'ossification est mis en opposition avec l'ossification membranaire, qui concerne plutôt les os plats (**Karsenty, 2003**). En effet, alors que l'ossification membranaire fait intervenir une différenciation directe des CSM en ostéoblastes, l'ossification enchondrale passe par un stade cartilagineux ou maquette cartilagineuse, qui est, ensuite, progressivement remplacé par le tissu osseux (**Figure II-2**).

En effet, suite à la condensation des CSM et à la différenciation chondrocytaire dans la région centrale de l'os en formation, les chondrocytes s'hypertrophient sous l'action de facteurs de transcription comme « **Runt related transcription factor 2** » (**Runx2**) ou ostéix (**Nishimura et al., 2012**) (**Figure II-3**). L'hypertrophie des chondrocytes est marquée par la synthèse de collagène de type X et de « **Vascular Endothelial Growth Factor** » (**VEGF**), initiée par Runx2, et par la dégradation de la matrice cartilagineuse notamment par la « **Matrix MetalloProteinase** » (**MMP**) 13 (**Nishimura et al., 2012; Zelzer et al., 2001**). Les chondrocytes hypertrophiques meurent et laissent place aux ostéoblastes, qui sécrètent une matrice osseuse, acheminés par la néo-vascularisation induite par le VEGF. Par ailleurs, il a été montré que certains chondrocytes hypertrophiques pouvaient se transdifférencier en ostéoblastes (**Yang et al., 2014**).

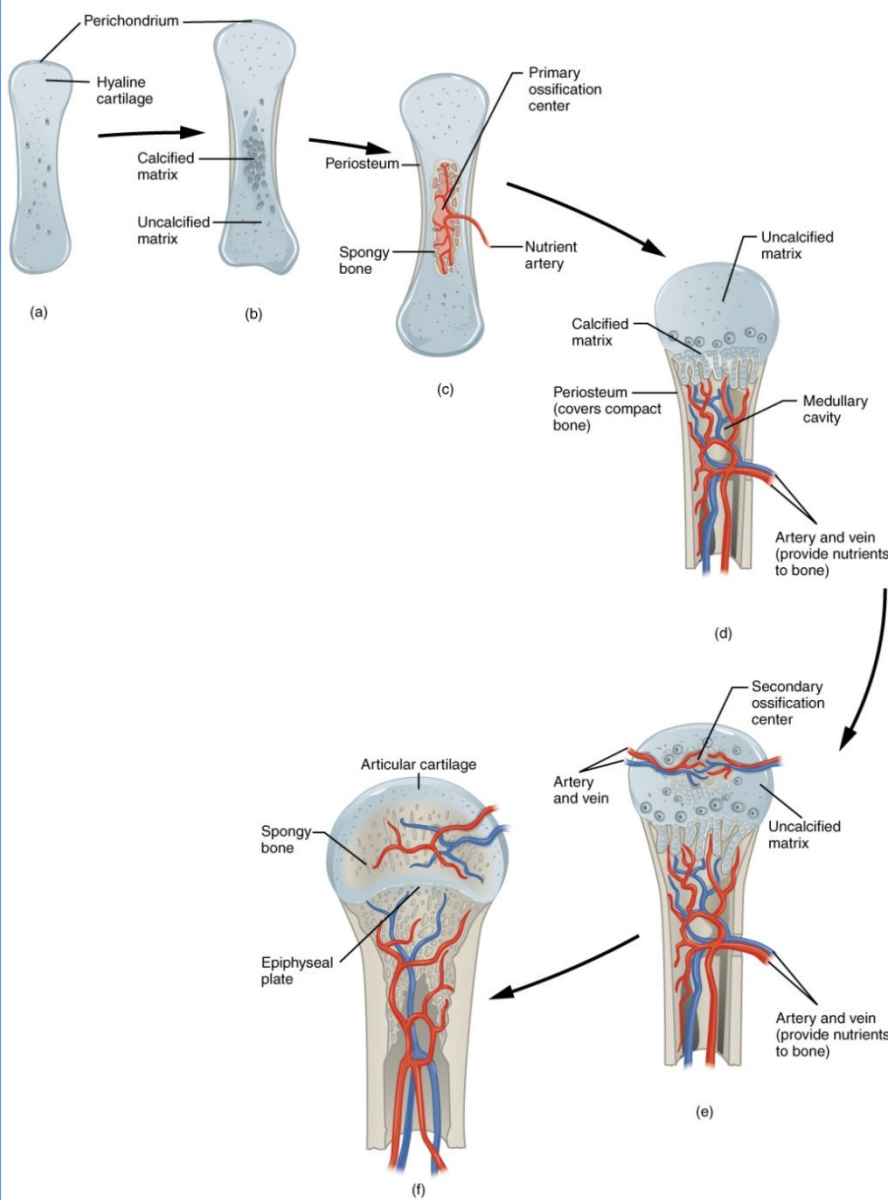


Figure II-2 : Les différentes étapes de l'ossification endochondrale.

Les CSM se différencient en chondrocytes (a). La maquette cartilagineuse du futur squelette et le périchondre se forment (b). Les vaisseaux sanguins envahissent le cartilage, le périchondre se différencie en périoste. Le centre d'ossification primaire se développe (c). Le cartilage continue de se développer à l'extrémité des os (d). Un centre d'ossification secondaire se met en place (e). Le cartilage persiste au niveau des plaques de croissance (épiphyses) et des surfaces des extrémités osseuses.

<https://cnx.org/contents/tgHlwQwg@4/Bone-Formation-and-Development>

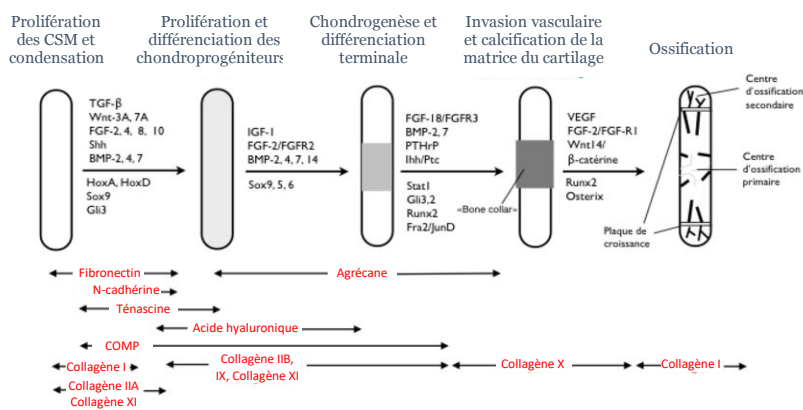


Figure II-3 : Régulation des différentes étapes de l'ossification endochondrale.

Différents facteurs de croissance et de transcription interviennent dans l'expression des gènes à chaque étape de la chondrogenèse et de l'ostéogenèse. (Goldring *et al.*, 2006)

b) Les régulateurs de la chondrogenèse

i) Les microRNA

Les **microRNA (miRNA)** (ou miR) sont de petits **Acides RiboNucléiques (ARN)** non codants (environ 20 paires de bases) régulant l'expression des gènes grâce à des mécanismes de complémentarité imparfaite (**Figure II-4**) (**Mandilaras *et al.*, 2017**). Cette régulation se produit généralement après la transcription, par inhibition de la traduction ou dégradation de l'**Acide RiboNucléique messager (ARNm)** ciblé. Il s'agit du mécanisme d'ARN interférence. Contrairement aux « **small interfering RNA** » (**siRNA**), les miRNA ciblent plusieurs ARNm (**Di leva *et al.*, 2014**).

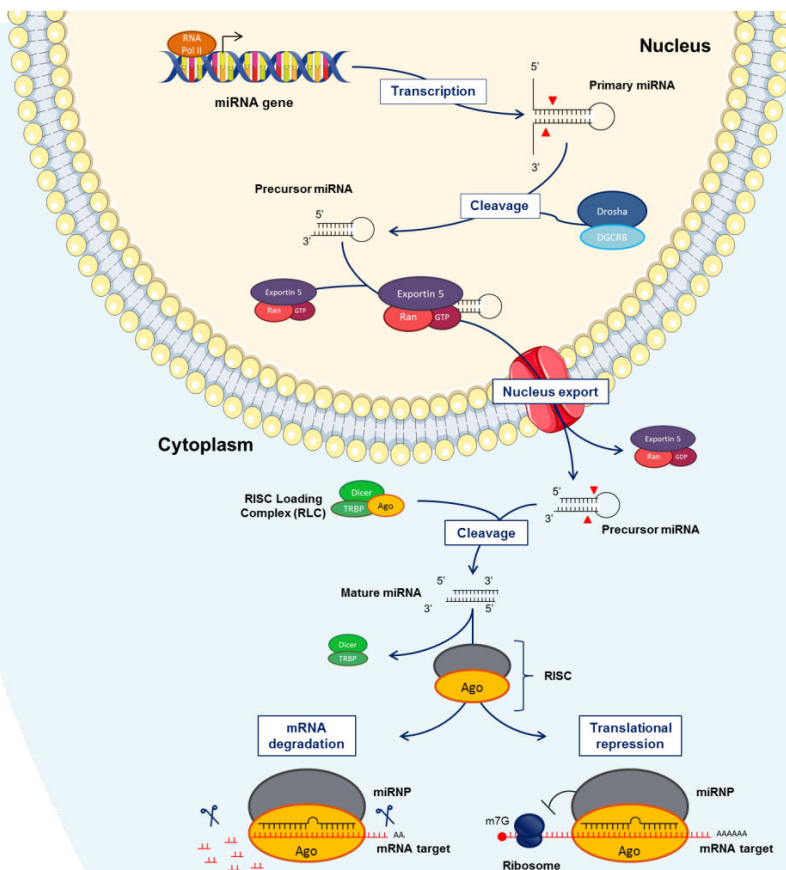


Figure II-4 : Biogenèse des microRNA et leurs modes d'action.

Les microRNA primaires (pri-miRNA) sont transcrits par l'ARN polymérase II (1). Puis, Droscha et DGCR 8 clivent le pri-miRNA en un microARN précurseur (2) (pré-miRNA) qui est ensuite exporté vers le cytoplasme par des exportines (3). Une fois dans le cytoplasme, le pré-miRNA est pris en charge par Dicer (4). Ensuite, le brin mature est incorporé dans le complexe RISC (5) afin de dégrader ses cibles ou d'empêcher leur traduction. DGCR 8 : « Di George Critical Region 8 »; RISC : « RNA-Induced Silencing Complex ».
(Mandilaras *et al.*, 2017)

Plusieurs facteurs de transcription, cytokines, facteurs de croissance interviennent en tant que régulateurs lors des différentes étapes de la chondrogenèse. De la même manière, différents miRNA agissent sur l'expression génique de ces régulateurs de la chondrogenèse (**Figure II-5**) (**Wu *et al.*, 2014**). En effet, lors de la différenciation de CSM d'origine humaine en chondrocytes, l'expression de certains miRNA est modulée (**Han *et al.*, 2010**). Par exemple, lors de la différenciation de CSM de tissu adipeux en chondrocytes, l'expression des miR-193b, miR-199a-3p/miR-199b-3p, miR-455-3p, miR-210, miR-381, miR-92a, miR-320c, miR-136 est augmentée alors que celle des miR-490-5p, miR-4287, miR-BART8*, miR-US25-1* est diminuée (**Zhang *et al.*, 2012**).

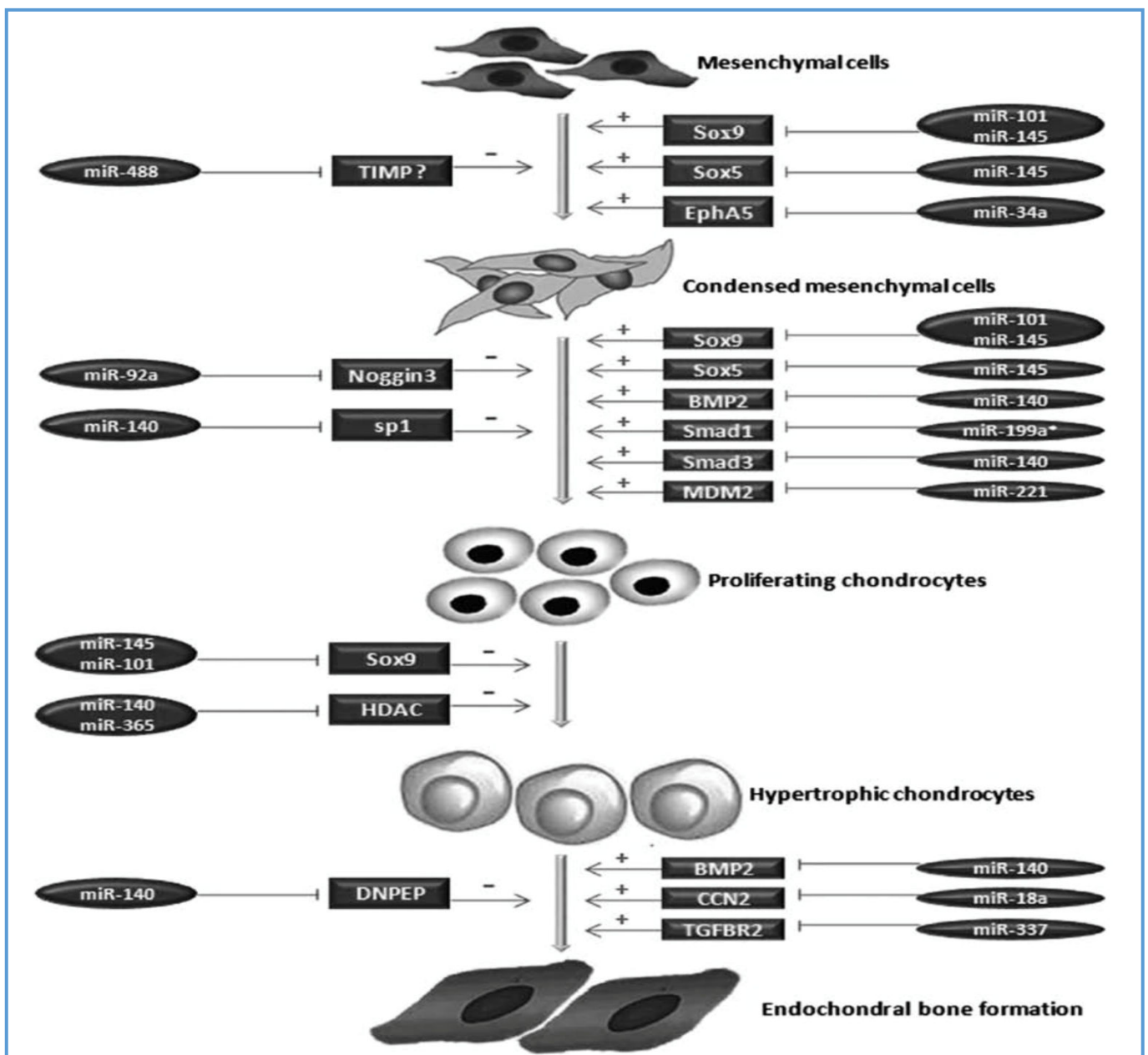


Figure II-5 : Implication des microRNA dans la chondrogenèse et l'ossification endochondrale. (Wu *et al.*, 2014)

ii) Le microenvironnement

- Facteurs de croissance

- Les IGF

Les « **Insulin-like Growth Factors** » (**IGF**) sont des facteurs de croissance impliqués dans la croissance, la différenciation, la migration et la survie cellulaire. Il en existe deux formes : L'IGF-1 et l'IGF-2. IGF-1 constitue le principal facteur de croissance anabolique pour le cartilage articulaire (**Schmidt et al., 2006**). Il permet de stimuler la croissance du cartilage de conjugaison en induisant la différenciation des CSM en pré-chondrocytes et en stimulant la prolifération des chondrocytes (**Van Wyk & Smith, 1999**). L'IGF-1 a un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du cartilage en régulant la synthèse et la dégradation des PG (**Schmidt et al., 2006**). L'IGF-1 favorise également l'expression du gène du collagène de type II en favorisant l'activité de liaison de ses régulateurs transcriptionnels Sox9, L-Sox5 et Sox6 (**Renard et al., 2012**). Cependant, il provoque aussi la synthèse des collagènes atypiques du cartilage comme les collagènes de types I et X (**Legendre et al., 2013**).

- Les FGF

Il existe 22 molécules appartenant à la famille des « **Fibroblast Growth Factors** » (**FGF**) identifiées chez l'Homme. Les FGF sont généralement impliqués dans la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire. Les isoformes les plus exprimées au sein du cartilage ont une expression tissulaire hétérogène. En fonction de la localisation tissulaire et de l'isoforme mise en jeu, les effets diffèrent. En effet, le FGF augmente la prolifération des chondrocytes dans les couches superficielles du cartilage alors qu'il favorise l'ossification de la zone hypertrophique (**Lazarus et al., 2007**). A l'heure actuelle, les membres les mieux caractérisés sont le FGF-2, le FGF-8, et le FGF-18 (**Ellman et al., 2013**). L'effet du FGF-2 demeure controversé. Alors qu'il aurait des effets cataboliques chez l'Homme, il a des effets chondroprotecteurs chez la souris ou le lapin. Ces différences seraient dues à une expression des récepteurs du FGF qui varie d'un modèle d'étude à l'autre. Le FGF-8 est associé à la dégradation du cartilage, alors que le FGF-18 est impliqué dans son anabolisme.

- Les TGF- β

Les TGF- β appartiennent à la superfamille des TGF- β , qui comprend plus de 30 membres impliqués dans de nombreux processus physiologiques, dont le développement du squelette et du cartilage (**Hinck & Huang, 2013**). Les protéines de la superfamille du TGF- β

induisent une signalisation en se liant à des récepteurs transmembranaires de types I et II. La liaison d'un ligand aux récepteurs provoque le rapprochement des deux types de récepteurs conduisant à l'activation de l'activité kinasique du domaine intracellulaire des récepteurs. Les domaines à activité kinase des récepteurs induisent ensuite la phosphorylation d'effecteurs cytoplasmiques, les « **S-Mothers Against Ddp** » (**SMAD**). Il existe aussi une signalisation induite par les membres de la superfamille du TGF- β indépendante des SMAD, comme la voie des MAP-kinases (**Figure II-6**) (**Chen et al., 2012**).

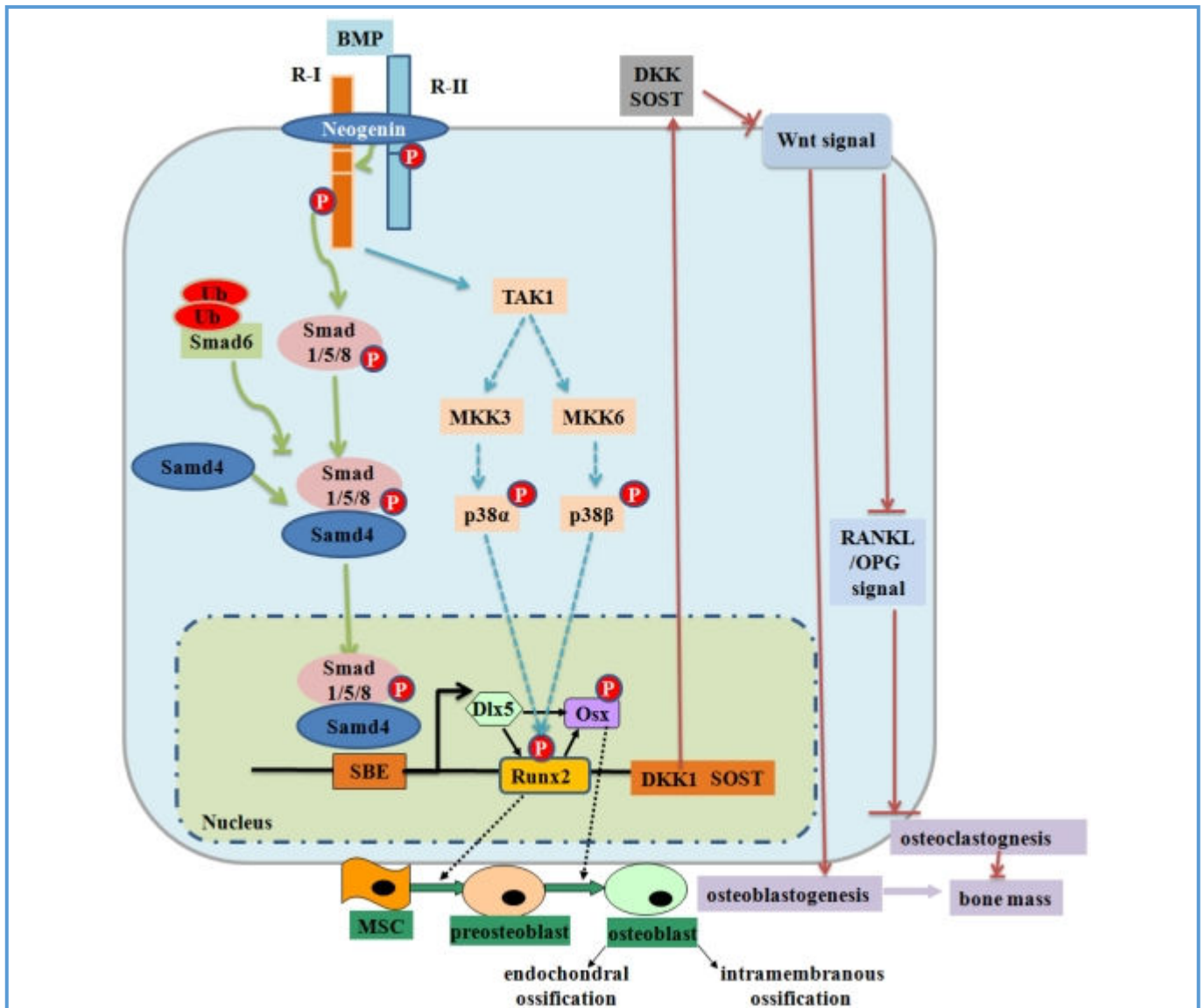


Figure II-6 : Voies de signalisation intracellulaires induites par les membres du TGF- β : L'exemple des « Bone Morphogenetic Protein » (BMP).

L'interaction de la BMP avec ses récepteurs induit une activation des SMAD 1/5/8. Les SMAD forment alors un complexe avec SMAD 4 puis, le complexe est transloqué dans le noyau où il interagit avec d'autres facteurs de transcription afin de moduler l'expression de gènes cibles impliqués dans la chondrogenèse et le métabolisme osseux. SMAD 6 est impliqué dans la régulation de cette voie de signalisation. Il se lie aux récepteurs et empêche l'activation des SMAD 1/5/8. P : phosphorylation ; Ub : ubiquitination. (Chen et al., 2012)

Sur les 5 isoformes décrites du TGF- β , seulement 3 sont retrouvées chez les mammifères : Le TGF- β 1, le TGF- β 2 et le TGF- β 3. Chaque isoforme est codée par un gène différent, puis, après des étapes de maturation intracellulaire, des dimères de TGF- β sont sécrétés au sein de la MEC sous forme inactive. Les TGF- β latents sont maintenus dans un état inactif et stockés dans la MEC par la présence du « **Latency Associated Peptide** » (**LAP**) et de protéines associées au TGF- β latent. L'activation des TGF- β résulte notamment du clivage du LAP par des protéases et de son interaction avec des intégrines (**Grimaud *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2011**) (**Figure II-7**).

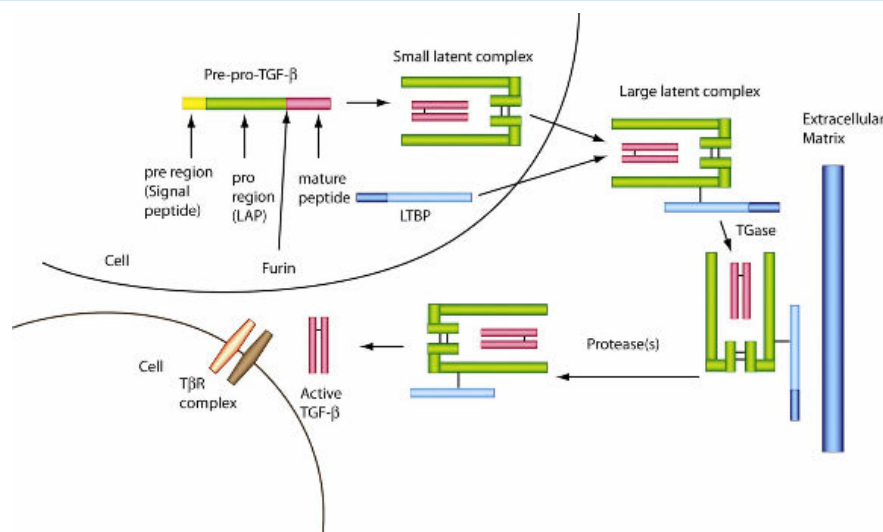


Figure II-7 : Processus d'activation du TGF- β .

Le TGF- β est synthétisé par les cellules sous la forme d'un long précurseur (prépro-TGF- β). La séquence signal hydrophobe, située dans la partie aminotermine, est clivée et permet la libération du pro-TGF- β . Le LAP reste associé au TGF- β mature par des liaisons non covalentes pour former un complexe latent biologiquement inactif dénommé SLC. Il forme un complexe plus volumineux, le grand complexe latent LLC, en s'associant à la protéine LTBP. Les LTBP permettent la fixation du TGF- β à la MEC et son stockage. Différentes protéases clivent le complexe et permettent la libération du TGF- β sous une forme bioactive mature.

LAP : « Latency Associated Peptide »; LLC : « Large Latent Complex »; LTBP : « Latent TGF- β Binding Protein »; SLC : « Small Latent Complex »; TGase : TransGlutaminase.

<http://www.biologend.com/NewsLegend/052611/index.htm>

Les 3 isoformes actives ainsi obtenues sont des homodimères de 25 kDa présentant des homologies de séquence de 64 à 82% (**Archer *et al.*, 1993**). Le TGF- β induit la différenciation de CSM en chondrocytes, leur prolifération, stimule leurs synthèses matricielles et inhibe les phénomènes d'ossification endochondrale (**Grimaud *et al.*, 2002; Joyce *et al.*, 1990**). En effet, l'action du TGF- β 1 sur des chondrocytes en culture se traduit par l'augmentation de la synthèse du collagène de type II et de l'agrécane (**Galéra *et al.*, 1992**). Le TGF- β peut aussi s'opposer à la dégradation de la MEC par l'inhibition de l'expression de protéases telles que les MMP et la protéase à serine « **High temperature requirement A1** » (**HtrA1**) et en augmentant l'expression d'inhibiteurs de protéases comme les « **Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases** » (**TIMP**) (**James *et al.*, 2009**). Cependant, il a été aussi montré que le TGF- β 1 induisait l'expression de « **A**

Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs » (ADAMTS) dans des cultures de chondrocytes humains suggérant un rôle du TGF- β dans le remodelage tissulaire (**Moulharat et al., 2004**).

➤ Les BMP

Les « **Bone Morphogenetic Protein** » (**BMP**) appartiennent aussi à la superfamille des TGF- β . Les BMP sont aussi synthétisées et sécrétées dans la MEC sous forme de dimères inactifs. La partie active de la molécule est libérée par clivage (**Nakashima & Reddi, 2003**). Il existe une vingtaine de BMP, classées selon leurs homologues de séquences et leurs fonctions, en 4 sous familles. Ainsi, certaines BMP sont impliquées dans la formation du cartilage, telles que les BMP-2, -4, -7 alors que d'autres BMP jouent un rôle dans le développement folliculaire, telles que les « **Growth and Differentiation Factor** »-9,-15 (**GDF -9, -15**) (**Carreira et al., 2014**).

Des études *in vitro* sur des chondrocytes articulaires ont montré que les BMP-2 et -7 augmentent la synthèse de collagène de type II et de l'agrécan (**Chubinskaya et al., 2011; Gründer et al., 2004**). De plus, la BMP-2 favorise la synthèse de la forme mature du collagène de type II, le collagène de type IIB, par des chondrocytes articulaires humains (**Aubert-Foucher et al., 2013**).

Notre équipe a aussi montré le potentiel chondrogénique de la BMP-2 pour redifférencier des chondrocytes articulaires humains amplifiés en monocouche. En effet, une stratégie de redifférenciation de chondrocytes mettant en jeu des conditions hypoxiques, l'utilisation d'un biomatériau constitué de collagène de type I, d'un siRNA ciblant la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type I et d'un traitement par la BMP-2 permet d'obtenir des chondrocytes synthétisant une MEC hyaline caractérisée par l'expression du collagène de type IIB et d'agrécan sans aucun signe d'hypertrophie ou d'ostéogénèse (**Legendre et al., 2013**).

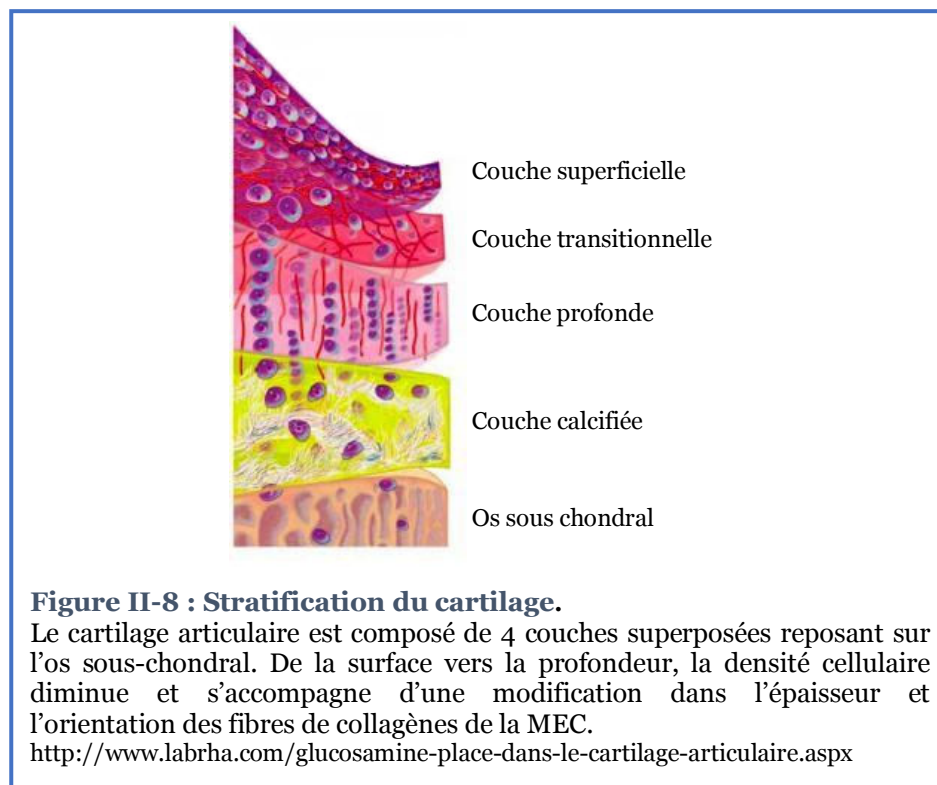
• L'hypoxie

Lors des premières étapes de la chondrogénèse, un remodelage de la vascularisation rend les condensats de CSM avasculaires. Cette régression des vaisseaux sanguins a pour conséquence l'émergence de niches hypoxiques (**Kozhemyakina et al., 2015**). La faible tension en **dioxygène (O_2)** induit, notamment, le maintien du facteur de transcription de la famille des « **Hypoxia Inducible Factor** » (**HIF**). HIF-1 est dégradé en présence d'une plus forte tension en O_2 . Ce facteur de transcription est un régulateur positif de la chondrogénèse. En effet, HIF-1 induit l'expression de Sox9, d'enzymes glycolytiques et de transporteurs au glucose, ce qui permet la différenciation chondrogénique et de s'adapter aux conditions hypoxiques (**Kozhemyakina et al., 2015**). Bien que HIF-2 induise l'expression de

molécules associées à l'hypertrophie chondrocytaire, telles que le collagène de type X et la MMP-13, l'hypoxie permet d'augmenter les synthèses matricielles spécifiques des chondrocytes matures, telles que le collagène de type II et l'agrécan et une diminution concomitante du collagène de type X (Markway *et al.*, 2013; Thoms *et al.*, 2013). Ainsi, l'hypoxie a un effet positif sur le phénotype chondrocytaire (Lafont, 2010).

2. Organisation structurale du cartilage hyalin

La structure du cartilage articulaire adulte est divisée en quatre couches que l'on peut distinguer par leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles (Figure II-8).



a) La couche superficielle

Elle est aussi appelée zone tangentielle et représente environ 10% de l'épaisseur totale du cartilage (Fox *et al.*, 2009). Elle contient une quantité relativement importante de cellules aplaties synthétisant une MEC composée, notamment, de fibronectine et de fibres de collagène, essentiellement de types II et IX, disposées parallèlement à la surface articulaire. Cette couche est essentielle pour la résistance du tissu aux forces de frottement et de compression. La couche superficielle est surmontée d'une couche acellulaire d'une épaisseur de 6 à 15 μm , la « **Most Superficial Zone** » (MSZ), au contact du liquide synovial. La MSZ serait composée de 4 feuillets (Figure II-9) (Fujioka *et al.*, 2013). Néanmoins, sa

structure et sa composition demeurent controversées du fait que l'ensemble des feuillets ne soient pas détectable par différentes techniques d'étude.

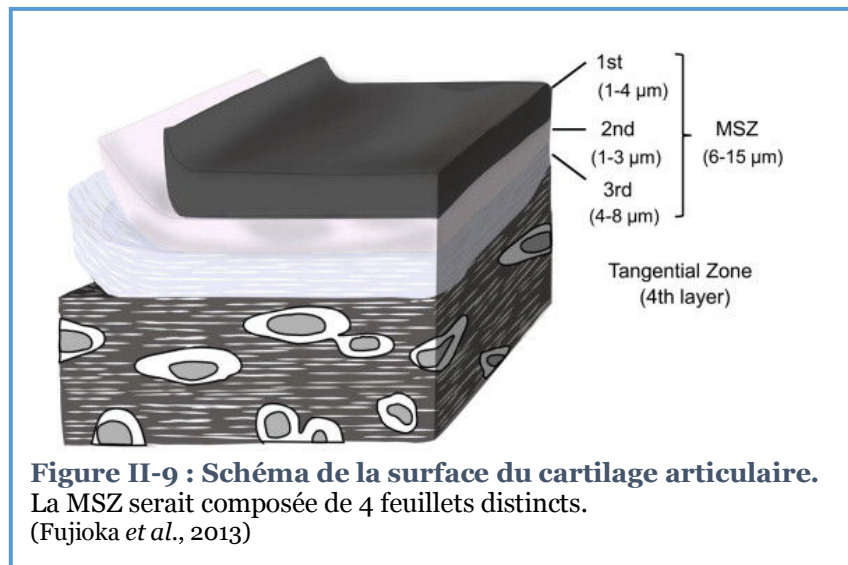


Figure II-9 : Schéma de la surface du cartilage articulaire.
La MSZ serait composée de 4 feuillets distincts.
(Fujioka *et al.*, 2013)

b) La couche intermédiaire

Cette zone représente 40 à 60% du volume total du cartilage et contient de nombreux PG et des fibres de collagène. Les épaisses fibres de collagène s'orientent progressivement perpendiculairement à la surface du cartilage. Les chondrocytes, arrondis, et les fibres de collagène sont moins nombreuses que dans la couche superficielle (**Fox *et al.*, 2009**).

c) La couche profonde

Cette couche représente environ 30% du volume du cartilage. Au sein de cette couche, les fibres de collagène sont épaisses et ont une orientation perpendiculaire à la surface articulaire. La quantité de PG y est la plus importante du cartilage, alors que la concentration en eau y est la plus faible. Cette couche confère au cartilage une résistance importante aux forces de compression. Les chondrocytes sont disposés en colonne et ont une forte activité métabolique (**Poole *et al.*, 2001**).

d) La couche calcifiée

Cette couche sert principalement de jonction avec l'os sous-chondral. Elle permet d'ancrer les fibres de collagène de la couche profonde à l'os sous-chondral (**Fox *et al.*, 2009**). Les chondrocytes de cette couche sont peu nombreux et hypertrophiques. Ils expriment du collagène de type X.

3. Organisation biologique et biochimique du cartilage hyalin

a) Les cellules souches mésenchymateuses

Bien que le chondrocyte soit le type cellulaire résident majoritaire du cartilage, différentes études ont démontré la présence de CSM au sein de cartilage articulaire sain et arthrosique (**Alsalameh et al., 2004; Nelson et al., 2014; Pretzel et al., 2011**). Ces cellules sont multipotentes, présentent un certain nombre de marqueurs de surface caractéristiques des CSM et ont une forte capacité de prolifération (**Williams et al., 2010**). Leur proportion, assez faible en contexte physiologique, est augmentée dans le cartilage arthrosique.

b) Les chondrocytes

Les chondrocytes constituent le type cellulaire principal du cartilage. Cependant, du fait de l'abondante MEC qu'ils synthétisent durant le développement du cartilage, les chondrocytes ne représentent qu'une faible proportion du volume total du cartilage (1 à 5%). Les chondrocytes sont généralement ronds ou polygonaux, même si leur forme et activité métabolique varient en fonction de leur localisation au sein du tissu (**Figure II-10**) (**Archer & Francis-West, 2003; Goldring & Marcu, 2009**).

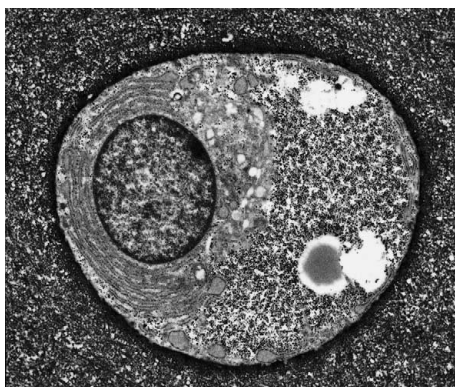


Figure II-10 : Microscopie électronique d'un chondrocyte articulaire.
(Archer & Francis-West, 2003)

A l'âge adulte, les chondrocytes produisent certaines molécules capables de dégrader la MEC (collagénases, ADAMTS,...) mais maintiennent une faible activité anabolique permettant le renouvellement physiologique de la MEC (**Goldring & Marcu, 2009**). Le glucose est la principale source d'énergie des chondrocytes et est un précurseur essentiel de la synthèse des **GlycosAminoGlycanes (GAG)**. Du fait de l'absence d'accès à la vascularisation, les chondrocytes expriment de manière constitutive des « **GLUcose Transporter** » (**GLUT**) et des transporteurs membranaires actifs afin de bénéficier de façon optimale du gradient de concentration de nutriments qui diffusent depuis le liquide synovial. A l'image des nutriments, la concentration en O_2 au sein du cartilage suit un gradient qui varie de 10% dans

les couches superficielles à 1% dans les couches les plus profondes du tissu. Il a d'ailleurs été démontré *in vitro* que les chondrocytes s'adaptent à l'hypoxie en surexprimant HIF-1 α , ce qui permet de stimuler l'expression des GLUT et certains gènes associés à l'anabolisme et la différenciation chondrogénique (**Mobasher et al., 2005; Robins et al., 2005**).

c) La matrice extracellulaire

La MEC du cartilage représente 95% du volume du cartilage. Celle-ci est principalement constituée d'eau (70 à 80%) liée aux PG, comme l'agrécane, et de collagènes, notamment de type II (**Figure II-11**). C'est cette forte proportion en eau, combinée à l'agencement des composés matriciels, qui permet au cartilage articulaire sa résistance aux forces de compression.

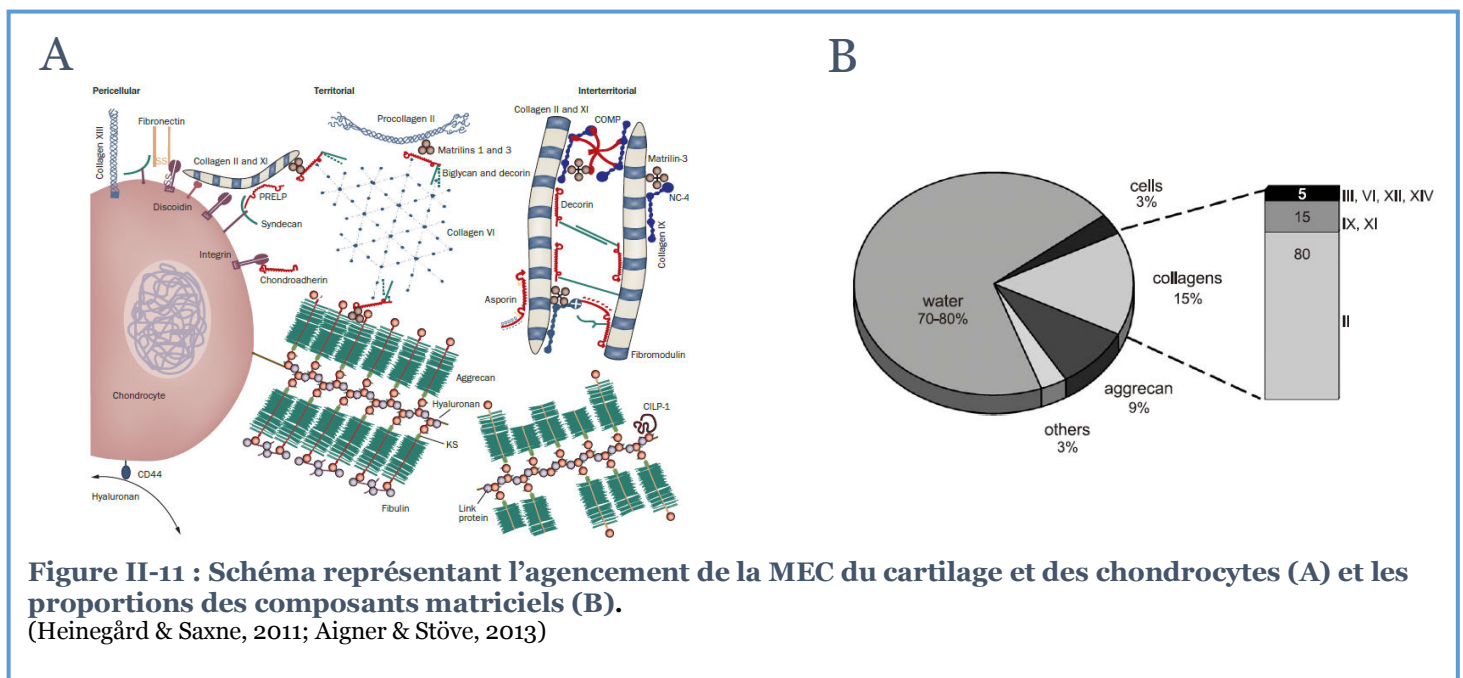


Figure II-11 : Schéma représentant l'agencement de la MEC du cartilage et des chondrocytes (A) et les proportions des composants matriciels (B).
(Heinegård & Saxne, 2011; Aigner & Stöve, 2013)

La composition de la MEC varie en fonction des différentes couches du cartilage mais aussi en fonction de la distance qui la sépare des chondrocytes. On distingue alors plusieurs subdivisions au sein de la MEC. La matrice pericellulaire est à proximité immédiate des cellules; la matrice interterritoriale, la plus éloignée des cellules, représente la majeure partie de la MEC et la matrice territoriale située entre la matrice pericellulaire et les composants de la matrice interterritoriale (**Heinegård & Saxne, 2011**).

i. Les collagènes

Les collagènes représentent les composés matriciels les plus abondants du cartilage. La famille des collagènes se compose de 28 types qui sont classifiés en fonction de la structure et des propriétés des collagènes (**Ricard-Blum, 2011**).

Ce sont des protéines formant une triple hélice de trois chaînes polypeptidiques α identiques ou non (**Gelse et al., 2003**). Le prérequis structural pour la formation de la triple hélice est la présence de glycine, acide aminé retrouvé toutes les 3 positions et résultant en la formation de domaines à répétitions Gly-X-Y caractéristiques des collagènes. Les positions X et Y sont souvent occupées par la proline et l'hydroxyproline (**Figure II-12**).

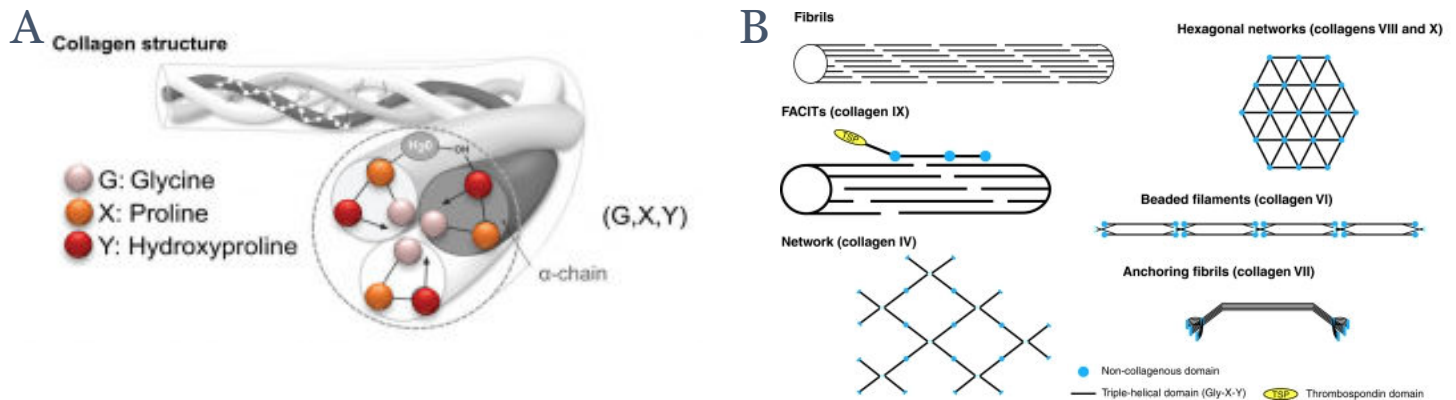


Figure II-12 : Représentation schématique de la structure en triple hélice des collagènes (A) et de leurs arrangements supramoléculaires (B).

<http://www.collagen-colway.com/everything-you-wanted-to-know-about-native-collagen/>
(Ricard-Blum, 2011)

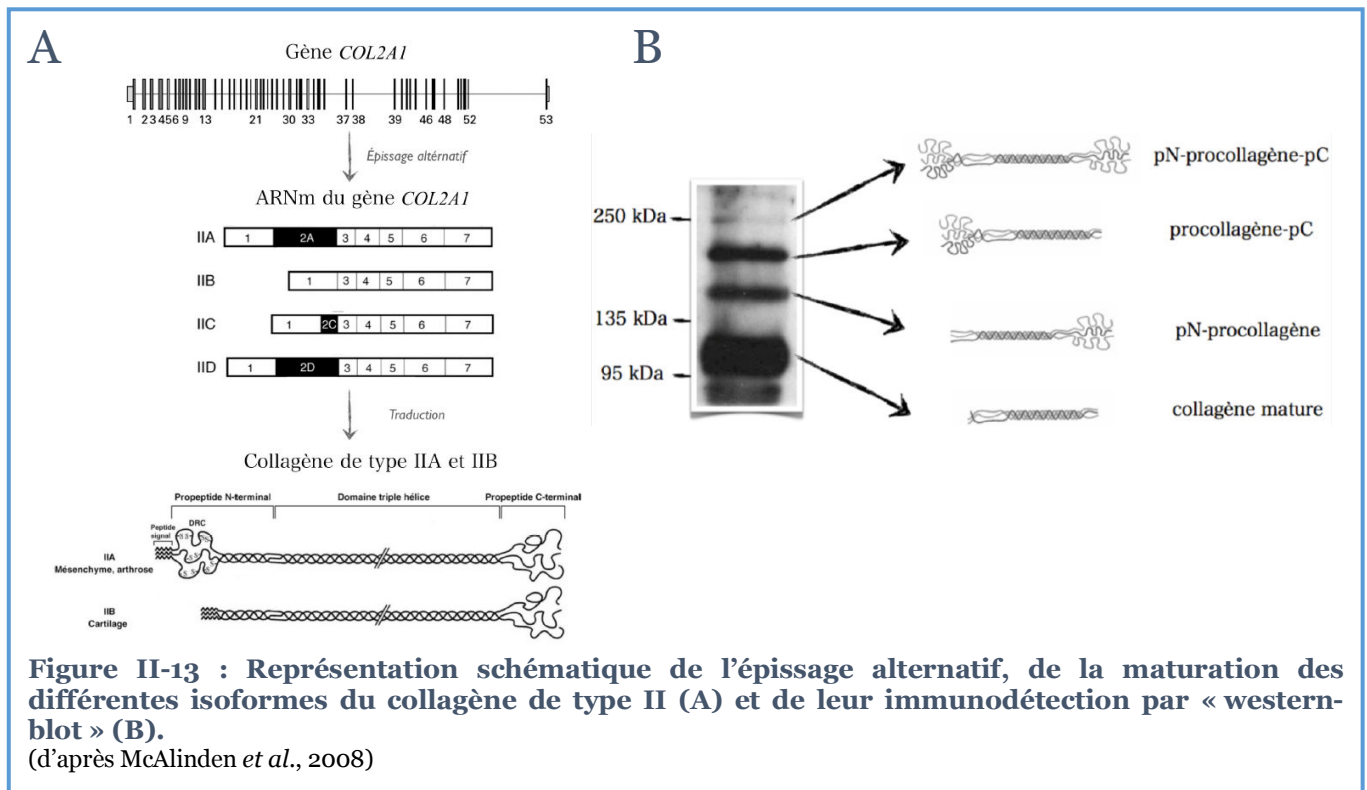
90% des collagènes sont fibrillaires mais il existe également des collagènes non fibrillaires. Ils regroupent l'ensemble des molécules de collagène dont la structure n'est pas une triple hélice uniforme. Alors que les collagènes fibrillaires permettent la structuration du réseau matriciel, les collagènes non fibrillaires, en s'associant notamment aux collagènes fibrillaires, servent d'ancrage protéique ou cellulaire à cette MEC.

Il existe différents types de collagène dans le cartilage qui se distinguent par leur structure interne, leur aspect fibrillaire ou non fibrillaire, leur diamètre et leur orientation. Parmi les différents collagènes présents dans le cartilage articulaire sain, le collagène de type II représente 80% des collagènes du cartilage. Par ailleurs, 15% des collagènes du cartilage sont de types IX et XI et les 5% restants correspondent à d'autres types collagéniques (les collagènes de types III, VI, X et XII) (**Aigner & Stove, 2003**).

Le collagène de type II est considéré comme l'un des marqueurs du phénotype chondrocytaire (**Galéra et al., 1992; Miller & Matukas, 1969**). Les fibrilles rigides de collagène, en assurant solidité et compressibilité à la MEC, confèrent aux articulations la capacité d'absorber les chocs.

Le gène *COL2A1* peut être transcrit en 4 isoformes (IIA, IIB, IIC, IID) distinctes résultant de l'épissage alternatif de l'exon 2 (**Figure II-13 A**) (**McAlinden et al., 2008; Ryan & Sandell, 1990**). Les formes majoritaires sont les formes IIA, la forme la plus longue et

exprimée au début de la chondrogenèse, et la forme IIB, dépourvue de l'exon 2 et exprimée par les chondrocytes matures dans le cartilage articulaire (**Sandell et al., 1991**). Les ARNm matures sont ensuite traduits et subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles, telles que des hydroxylations et glycosylations. La triple hélice de chaînes alpha 1 se forme, puis est sécrétée dans l'environnement extracellulaire sous forme immature. Le collagène de type II mature est obtenu après clivage des extrémités C- et N-propeptidiques (**Figure II-13 B**) (**Prockop et al., 1998**).



Les collagènes de types IX et XI sont des hétérotrimères codés, respectivement, par 3 gènes distincts *COL9A1*, *COL9A2*, *COL9A3* et *COL11A1*, *COL11A2*, *COL2A1*.

Le collagène de type IX est lié à intervalles réguliers le long des fibrilles de collagène de type II (**Diab et al., 1996**). Il assure le maillage des fibres de collagène avec les autres protéines matricielles.

Le collagène de type XI est aussi associé aux fibrilles de collagène de type II et est impliqué dans la formation des fibrilles de collagène de type II (**Mendler et al., 1989**).

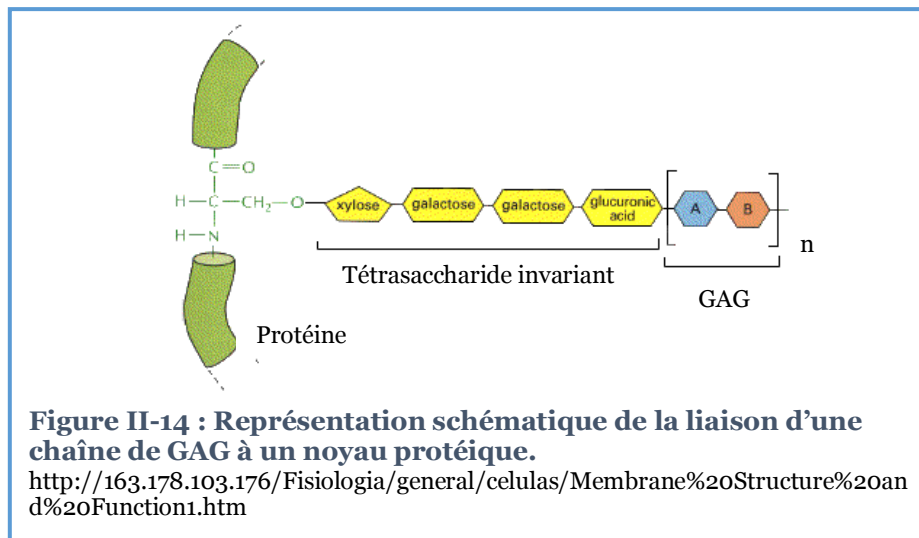
Le collagène de type VI est un hétérotrimère présent dans la matrice péricellulaire du chondrocyte. Il permet la liaison du chondrocyte *via* les intégrines et interagit avec les autres composants de la matrice péricellulaire tels que certains collagènes, l'AH et la fibronectine (**Söder et al., 2002**).

Le collagène de type X est un collagène fibrillaire homotrimérique composé de 3 chaînes courtes $\alpha_1(X)$ codées par *COL10A1*. Au niveau du cartilage articulaire, le collagène de type X produit par les chondrocytes hypertrophiques représente 45% des collagènes synthétisés par ces chondrocytes et est considéré comme un marqueur spécifique de ce type de cartilage (**Shen et al., 2005**). Ce collagène a surtout un rôle essentiel lors du développement embryonnaire et de la croissance en intervenant dans la minéralisation de la MEC cartilagineuse.

D'autres types de collagène 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. Parmi ces collagènes se trouvent les collagènes de types XII, XIV, XVI et XXII (**Luo et al., 2017**).

ii. Les protéoglycanes

Les PG sont constitués d'un corps protéique relié à des chaînes de GAG fixés de manière covalente à des résidus sérine par l'intermédiaire d'un tétrasaccharide invariant (**Figure II-14**).



Les GAG sont formés d'une succession de disaccharides constitués d'une hexosamine et d'un acide uronique. En fonction de la combinaison des deux saccharides, ces GAG peuvent être du type **Chondroïtine-Sulfate (CS)**, **Dermatane-Sulfate (DS)**, **Héparane-Sulfate (HS)** ou encore **Kératane-Sulfate (KS)**. Les composés disaccharides des GAG ont une forte charge négative et ils attirent donc des cations comme le Na^+ . Cela crée une force osmotique permettant au tissu de retenir l'eau. Les PG sont donc responsables de l'état d'hydratation du tissu cartilagineux.

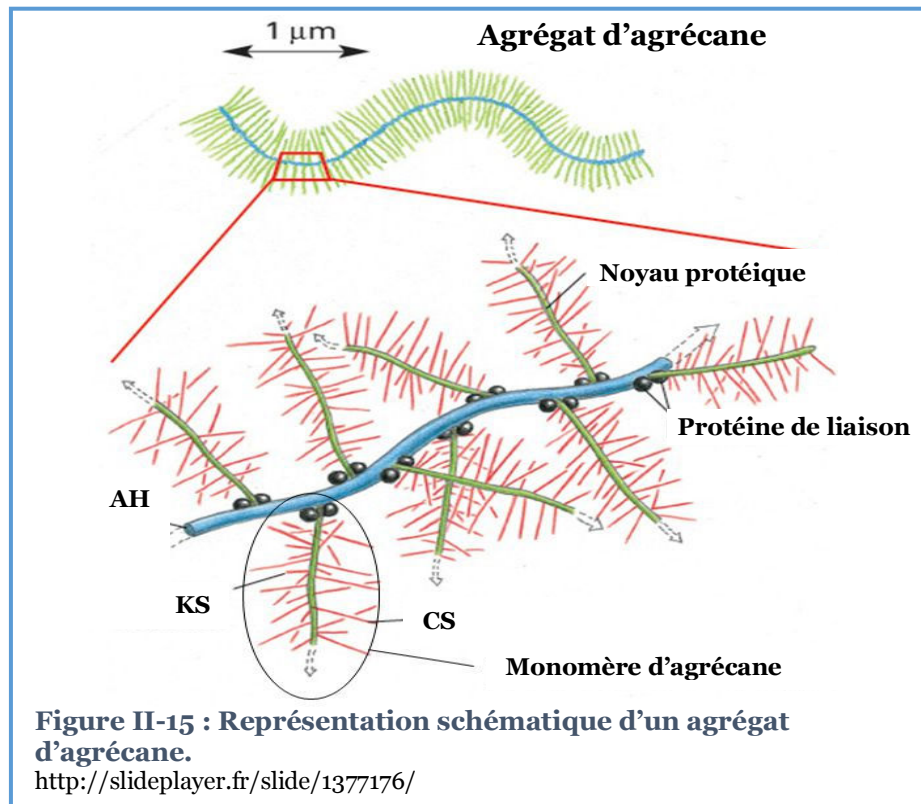
Il existe différentes catégories de PG présentes dans le cartilage articulaire :

Les « **Small Leucin-rich Repeat Proteoglycans** » (**SLRP**) font partie des PG minoritaires du cartilage mais ont un rôle essentiel. Leur corps protéique se compose de séquences répétées d'acides aminés riches en leucine et flanquées en N et C terminal par des cystéines permettant la mise en place de ponts disulfures. La séquence consensus est LXX-LXLXXNXL, où X représente n'importe quel acide aminé, L une leucine, une isoleucine ou une valine, et N une asparagine, une cystéine ou une thréonine. Les SLRP sont capables de se fixer aux molécules de collagène et participent à la formation des fibrilles collagéniques (**Heinegård et al., 2009**). Les principaux SLRP du cartilage sont la décorine, le biglycane et la fibromoduline. La décorine et la fibromoduline interagissent avec les fibres de collagène de type II alors que le biglycane, présent dans l'environnement péri-cellulaire du chondrocyte, interagit avec le collagène de type VI (**Fox et al., 2009**).

Les PG de surface comprennent les syndécanes, le bétaglycane, le glypican, le perlécane et le « **Cluster of Differentiation** » (**CD**) 44. Les PG peuvent intervenir dans la transduction de signaux extracellulaires à l'intérieur de la cellule, à l'image des intégrines. De plus, ils sont souvent assimilés à des réservoirs de cytokines dont ils régulent l'activité, la biodisponibilité et la stabilité. Un nouveau PG transmembranaire de 121 acides aminés nommé « **Small NOvel Rich in Cartilage** » (**Snorc**) a été décrit récemment chez la souris. Les travaux de Heinonen et collaborateurs suggèrent qu'il serait un marqueur spécifique du cartilage (**Heinonen et al., 2011**). La séquence protéique serait hautement conservée chez les mammifères avec 86% d'homologie entre la protéine murine et humaine. De plus, l'expression de Snorc est augmentée dans la zone proliférative et pré-hypertrophique du cartilage durant le développement. Finalement, de récents travaux parus en 2017 suggèrent que Snorc aurait un rôle dans le phénotype chondrocytaire pré-hypertrophique et l'ossification endochondrale (**Heinonen et al., 2017**).

L'agrécan est le principal PG du cartilage et est considéré comme un marqueur phénotypique, au même titre que le collagène de type II (**Kiani et al., 2002**). Il se compose d'un corps protéique constitué de 3 domaines globulaires entrecoupés de régions où se lient les chaînes de GAG, principalement des CS mais aussi des KS (**Figure II-15**). Elles composent 90% de la masse totale de l'agrécan. Ses caractéristiques structurales lui permettent d'interagir avec d'autres molécules matricielles telles que l'AH. L'AH est un GAG particulier qui ne possède pas de région protéique et est constitué d'une longue chaîne unique de plusieurs centaines de résidus glucidiques totalement dépourvus de groupements sulfates (**Fraser et al., 1997**). Plusieurs molécules d'agrécan peuvent ainsi se lier à l'AH et former des agrégats pouvant atteindre 200 000 kDa (**Lohmander, 1988**). L'agrécan détient un rôle essentiel dans l'organisation structurale du cartilage grâce à sa capacité à former des agrégats pour rendre le cartilage rigide, mais possède aussi un rôle biochimique. En effet, ses

importantes chaînes de GAG chargés négativement permettent de créer un déséquilibre osmotique avec les tissus environnants et d'attirer, puis piéger, l'eau au sein du cartilage. Les chaînes de GAG participent donc aux propriétés visco-élastiques du cartilage (**Kiani et al., 2002**).



iii. Les autres molécules matricielles

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 a une très forte affinité pour les collagènes et peut interagir simultanément avec plusieurs molécules, permettant ainsi la création d'un réseau collagénique en participant à la formation des fibrilles (**Halász et al., 2007**). D'autres molécules non collagéniques sont présentes au sein du cartilage et ont un rôle dans la cohésion de la MEC et des chondrocytes. On retrouve ainsi des protéines membranaires de type anchorine II, intégrines et des molécules matricielles telles que la fibronectine, la matriline, la ténascine (**Söder et al., 2002**).

L'ensemble des composants du cartilage articulaire lui confère des propriétés biomécaniques lui permettant d'assurer ses fonctions. Le principal type cellulaire, le chondrocyte, assure un équilibre entre dégradation et synthèse

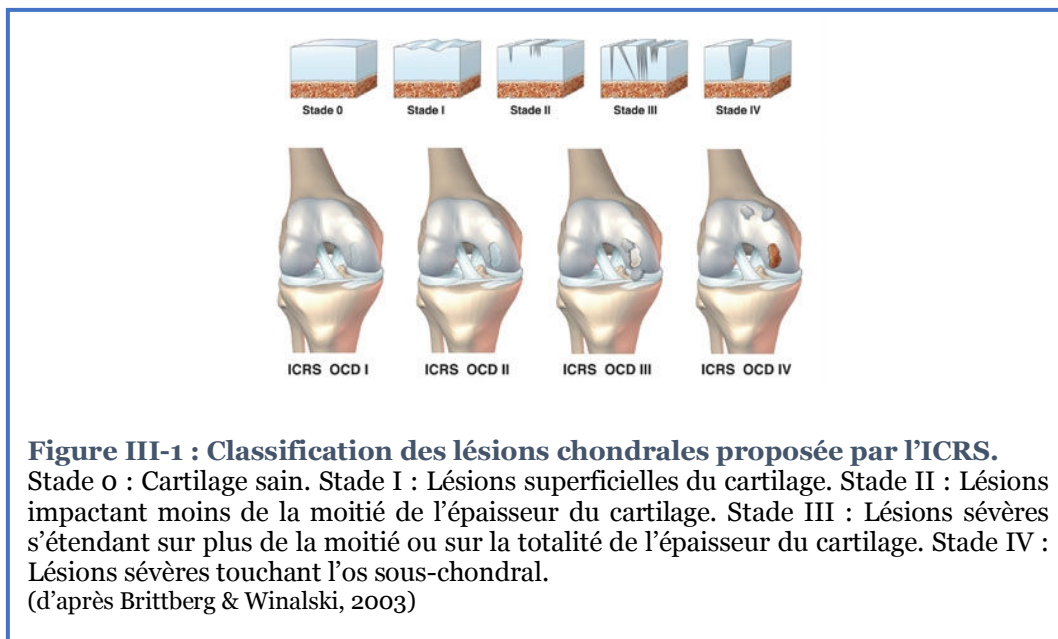
des molécules matricielles permettant le maintien de l'homéostasie et de la fonctionnalité du tissu. Cependant, que ce soit chez l'Homme ou le cheval, cet équilibre peut être rompu et laisser place à une situation pathologique conduisant à une dégénération du cartilage.

III. Atteintes cartilagineuses : De la lésion chondrale à l'arthrose

A. La lésion chondrale

Une lésion chondrale est définie comme une altération localisée du cartilage articulaire. Ces lésions sont dites focales. Lorsque la lésion atteint l'os sous-chondral, on parle de lésion ostéochondrale. Que ce soit chez l'Homme ou le cheval, elles sont le plus souvent dues à des contraintes mécaniques.

La société internationale de la recherche sur le cartilage « **International Cartilage Research Society** » (**ICRS**) a établi une classification de ces lésions tenant compte de l'importance de l'affection et de sa profondeur (**Brittberg & Winalski, 2003**). Il est donc possible de distinguer les lésions chondrales, touchant uniquement le cartilage articulaire, des lésions ostéochondrales (**Figure III-1**).



L'inflammation inhérente à la répétition de traumatismes responsables des lésions chondrales, couplée à la faible capacité de réparation intrinsèque du cartilage, peut être à l'origine d'une inflammation plus généralisée de l'articulation contribuant à la survenue de pathologies dégénératives du cartilage articulaire, dont l'arthrose (**McIlwraith et al., 2012**).

B. L'arthrose

L'arthrose est une maladie dégénérative affectant les articulations. Elle peut toucher n'importe quelle articulation mais, le plus souvent, elle atteint les articulations les plus sollicitées. L'arthrose se caractérise par une dégradation du cartilage articulaire ainsi qu'une perturbation de la physiologie des tissus environnants. L'évolution de la maladie est lente mais inéluctable puisque le cartilage ne possède qu'une faible capacité de réparation intrinsèque. La dégradation du cartilage se traduit par un amincissement de l'interligne articulaire qui aboutit, dans les cas les plus sévères, à la douloureuse entrée en contact des pièces osseuses de l'articulation.

1. Épidémiologie et étiologie

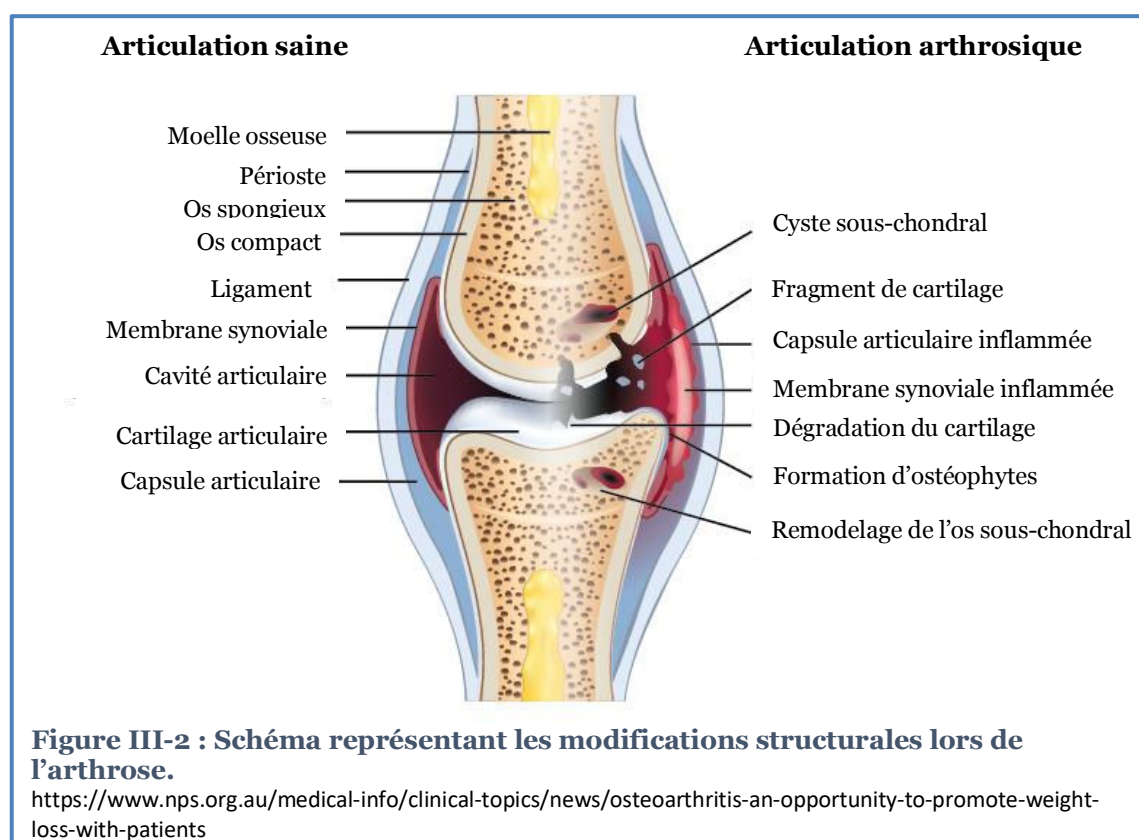
L'arthrose est une maladie dont la cause ne peut être imputée à un seul facteur. On distingue les arthroses structurales des arthroses mécaniques. En effet, les arthroses structurales ont pour origine une fragilité anormale du cartilage alors que les arthroses mécaniques sont dues à une sur-sollicitation d'une articulation. Ainsi, des prédispositions génétiques, une modification du statut hormonal, un régime alimentaire pauvre en antioxydant par exemple, un contexte articulaire pathologique peuvent être mis en cause lors d'arthroses structurales alors que les arthroses mécaniques peuvent émerger suite à une surcharge pondérale, des activités sportives ou professionnelles trop intenses. Bien que l'arthrose ait une étiologie multifactorielle, le vieillissement demeure le principal facteur de risque (**Adatia et al., 2011**). En effet, avec le vieillissement, le cartilage subit des modifications structurales, puis, certaines molécules matricielles ne sont plus aptes à remplir leur fonction entraînant une fragilité accrue du tissu (**Wells et al., 2003**).

La prévalence varie donc en fonction de l'articulation étudiée, de l'âge, de la zone géographique et du sexe de la population étudiée. Ainsi, la proportion de personnes atteintes augmente avec l'âge. En 2005, 26 millions d'américains souffraient d'arthrose (**Litwic et al., 2013**). De plus, 70 millions d'européens sont touchés, ce qui représente un coût direct d'environ 2 milliards d'euros (**Cucchiarini et al., 2016**). C'est la raison pour laquelle l'arthrose est aussi bien considérée comme un fardeau social qu'économique pour l'Homme.

Chez le cheval, l'arthrose représente la principale cause de boiterie. Elle est la cause de 60% des boiteries et affecte ainsi des millions de chevaux (**Oke et al., 2010**). Les affections locomotrices sont la première cause de baisse de performances ou d'arrêt de carrière des chevaux de courses et de sports et sont en cause dans 80% de ces situations (**Perkins et al., 2005**). L'arthrose a aussi un impact économique majeur dans la filière équine puisque son coût par cheval et par an est estimé à plusieurs milliers de dollars (**Oke et al., 2010**).

2. Contexte articulaire global

L'arthrose se caractérise par une dégradation du cartilage articulaire et une modification globale de l'articulation. En effet, l'arthrose se caractérise par d'autres modifications secondaires tels que le remodelage de l'os sous-chondral, la formation d'ostéophytes, un remodelage de la synovie, de la capsule articulaire, des ligaments, *etc* (**Figure III-2**) (**Man & Mologhianu, 2014**).

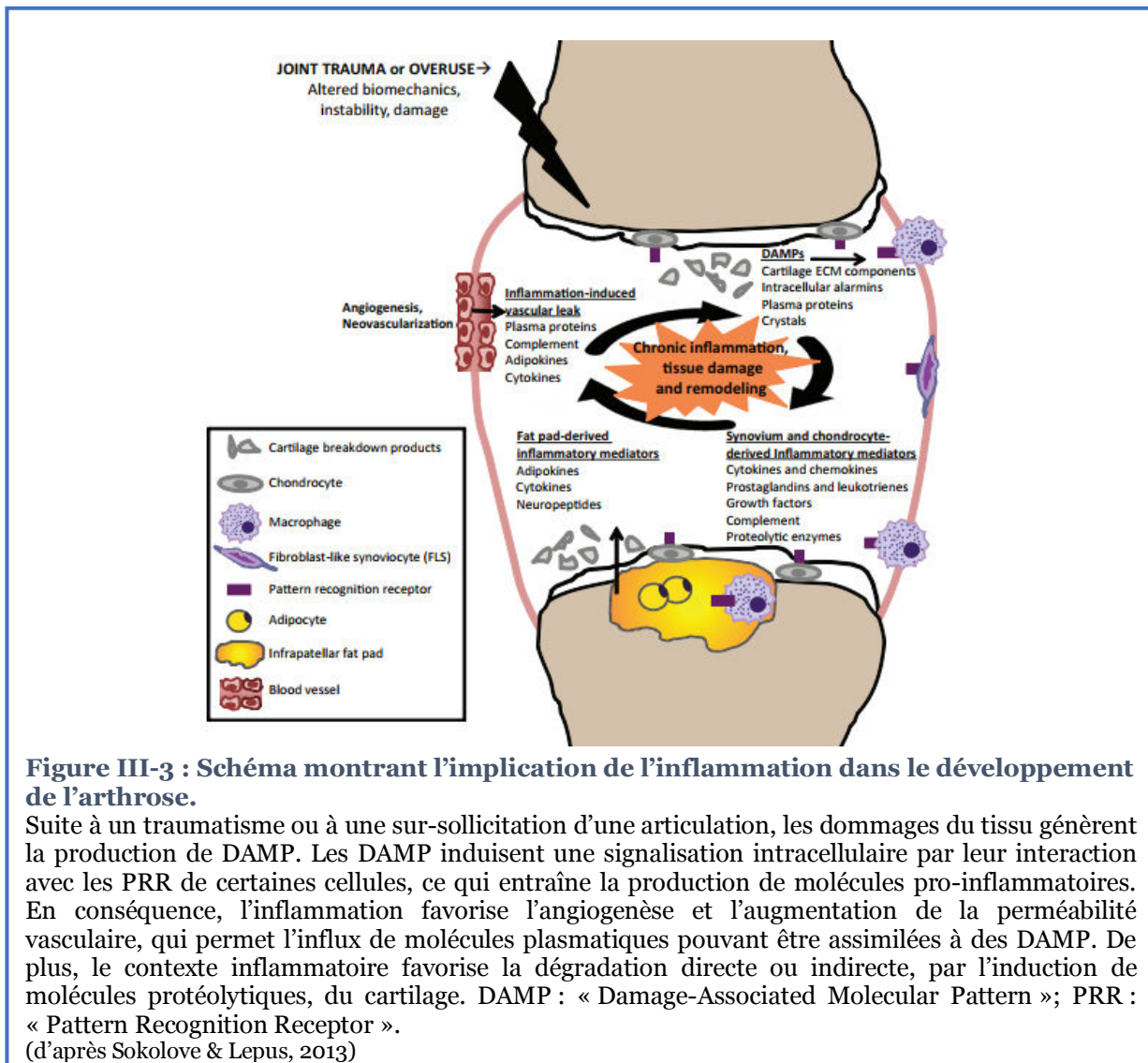


a) Contexte inflammatoire

Dès les premiers stades du développement de l'arthrose, la composante inflammatoire est présente. Bien que la synovie ne soit pas le seul tissu de l'articulation lié à l'inflammation globale de l'articulation, elle détient un rôle prépondérant. En effet, des arthroscopies réalisées sur des patients atteints d'arthrose précoce du genou ont montré la présence d'une inflammation de la synovie et sa relation avec la future dégradation du cartilage (**Sokolove *et al.*, 2013**). De plus, l'inflammation est amplifiée lors des premières étapes de dégradation du cartilage puisque les fragments générés représentent des « **Damage Association Molecular Patterns** » (**DAMP**) reconnus par les « **Pattern Recognition Receptors** » (**PRR**) des macrophages présents au sein de l'articulation ainsi que les synoviocytes et les chondrocytes. L'interaction PRR-DAMP entraîne la production de médiateurs pro-

inflammatoires et de protéases contribuant à la dégradation du cartilage, au remodelage des tissus articulaires et ainsi à l'amplification du phénomène inflammatoire (**Figure III-3**). De nombreuses molécules sont impliquées dans ce phénomène, néanmoins, on distingue 3 acteurs majeurs dans la progression de la pathologie : **L'interleukine (IL) -1 β** , l'IL-6 et le « **Tumor Necrosis Factor- α** » (TNF- α).

Des études dans le modèle animal ont montré une implication du complément dans l'évolution de l'arthrose. En effet, des souris déficientes pour des effecteurs du complément étaient insensibles aux modèles expérimentaux d'arthrose alors que la maladie s'aggravait lorsque les souris étaient déficientes pour un inhibiteur (CD59) du complément (**Wang et al., 2011**).



b) Remodelage tissulaire

Bien que la principale caractéristique de l'arthrose soit la dégradation du cartilage, il s'agit d'une maladie affectant l'ensemble des tissus de l'articulation (**Man & Mologhianu, 2014**). Ainsi, elle s'accompagne d'un remaniement de l'os sous-chondral. En effet, il s'épaissit progressivement, son architecture est modifiée et des ostéophytes se développent en bordure de l'articulation. Ces modifications induisent une altération des propriétés de l'articulation, induisant une diminution de sa capacité à absorber les chocs et dissiper l'énergie, favorisant ainsi une déformation de la surface articulaire.

La membrane synoviale s'épaissit, présente une vascularisation et une perméabilité vasculaire plus importante. Ces modifications de la membrane synoviale engendrent un certain nombre d'événements associés au développement de l'arthrose, comme l'amplification de l'inflammation. Certains changements de la membrane synoviale, comme la quantité de fibrine présente ainsi que l'infiltration de leucocytes, sont corrélés à la sévérité de l'arthrose (**Man & Mologhianu, 2014**).

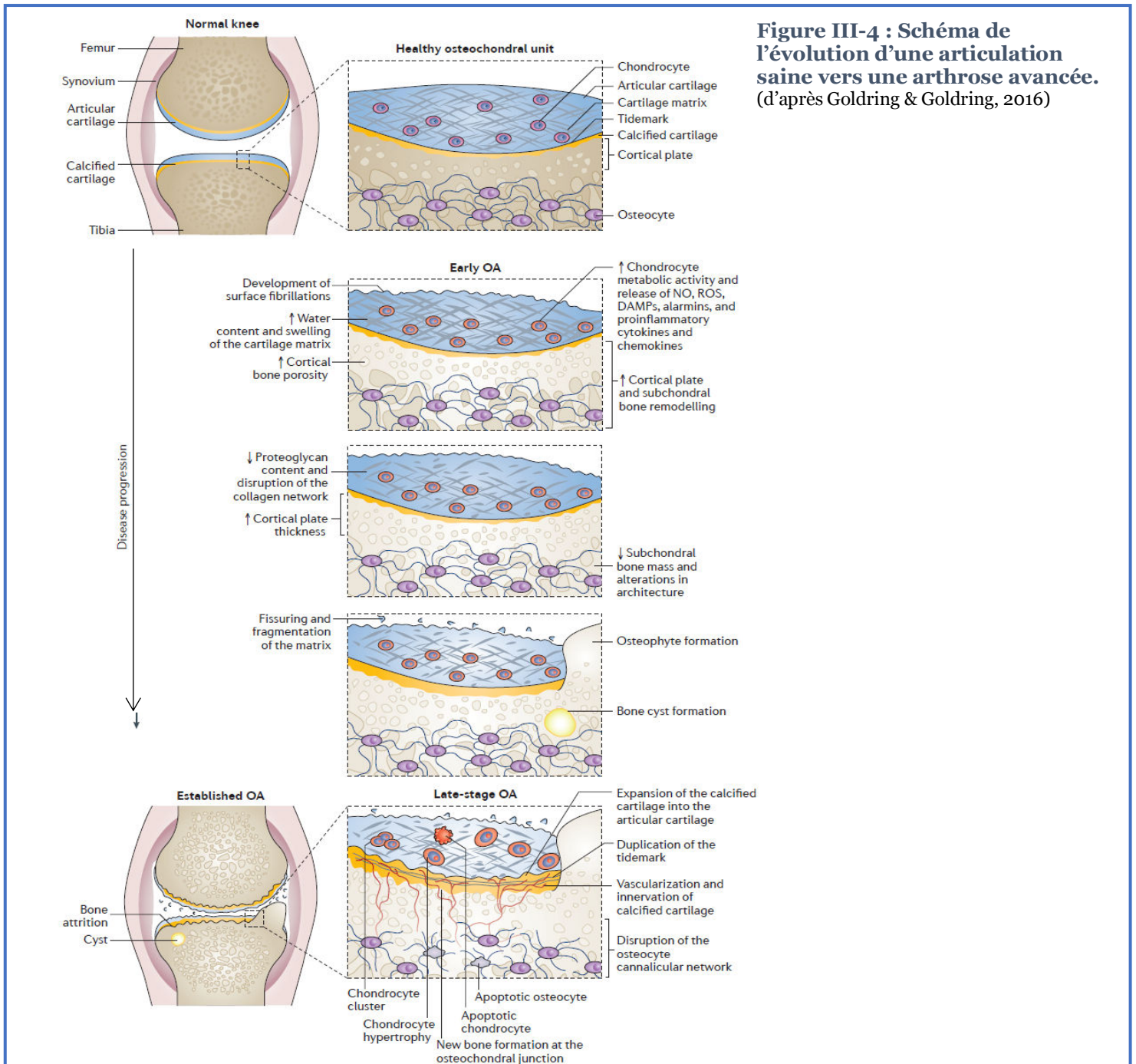
L'arthrose affecte aussi les ménisques. En effet, la composition de leur MEC est altérée, ce qui entraîne une diminution de leur capacité à supporter les charges et à stabiliser l'articulation. La modification de leur composition couplée au contexte arthrosique global de l'articulation entraîne une dégénérescence des ménisques.

3. Effet au niveau du cartilage

a) Synthèse d'un fibrocartilage

Lors des premières étapes de l'arthrose, le cartilage est intact (**Figure III-4**). En effet, sa composition et l'organisation de sa MEC sont d'abord altérés. En réponse à la situation pathologique, les chondrocytes articulaires, bien qu'ils possèdent une faible capacité de réparation intrinsèque et une faible activité métabolique dans des conditions physiologiques, prolifèrent en cluster et leur synthèse de composants matriciels est augmentée. En parallèle, les chondrocytes sécrètent des facteurs de croissance et cytokines anti-inflammatoires (**Henrotin & Reginster, 1998**). L'action combinée de ces molécules aboutit à une hypertrophie et différenciation du phénotype cellulaire. Les composants matriciels synthétisés sont alors atypiques d'un cartilage hyalin, riches notamment en collagène de types I, IIA, III et X, au détriment des molécules caractéristiques d'un cartilage hyalin (**Aigner & Dudhia, 1997**). 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 subit le même type de maturation extracellulaire que le collagène de type II. Il est le constituant principal de la matrice des tissus conjonctifs et est majoritairement retrouvé dans

la peau et l'os. Ce collagène, comme les autres molécules atypiques d'un cartilage hyalin, ne possède pas les mêmes propriétés biomécaniques que les molécules caractéristiques, comme le collagène de type II. En effet, il conduit à la mise en place d'un fibrocartilage qui ne possède plus les capacités de résistance du cartilage originel et qui, avec le temps, tend à se dégrader de façon irréversible. Par ailleurs, cette réponse anabolique des chondrocytes est, en partie, à l'origine de la formation des ostéophytes.



b) Déséquilibre de l'homéostasie du cartilage

Consécutivement à la réponse primaire des chondrocytes, l'arthrose se caractérise par une rupture du fin équilibre de l'homéostasie du cartilage qui existe dans une situation physiologique (**Figure III-5**).

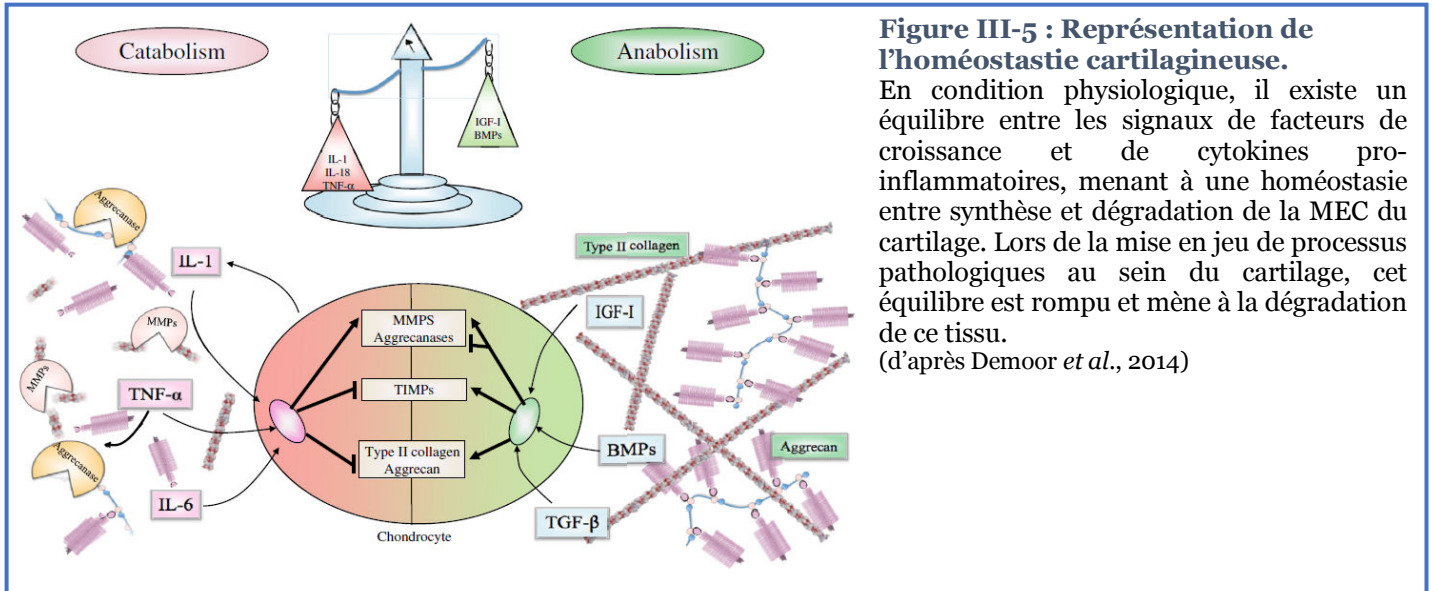


Figure III-5 : Représentation de l'homéostasie cartilagineuse.

En condition physiologique, il existe un équilibre entre les signaux de facteurs de croissance et de cytokines pro-inflammatoires, menant à une homéostasie entre synthèse et dégradation de la MEC du cartilage. Lors de la mise en jeu de processus pathologiques au sein du cartilage, cet équilibre est rompu et mène à la dégradation de ce tissu. (d'après Demoor *et al.*, 2014)

En effet, bien que les chondrocytes synthétisent d'abord des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, IL13, ...), l'articulation entre dans un contexte global inflammatoire, comme nous l'avons décrit précédemment. En conséquence, de nombreuses molécules impliquées dans la protéolyse des constituants de la MEC sont synthétisées par les différents types cellulaires de l'articulation (**Goldring & Marcu, 2009**). Ces molécules sont des enzymes appartenant principalement à deux familles distinctes de métalloprotéases à zinc : Les MMP et les ADAMTS (**Tableau I**).

Les MMP-1, -8 et -13 sont les principales MMP impliquées dans le catabolisme des collagènes de la MEC du cartilage. Les MMP-1 et -8 sont exprimées essentiellement au niveau de la couche superficielle du cartilage et interviennent dans les phases destructrices primaires initiées par l'inflammation. La MMP-13 est, quant à elle, surtout retrouvée dans les couches profondes du cartilage lors du remodelage matriciel (**Rengel *et al.*, 2007**).

Les ADAMTS, aussi appelées agrécanasés, sont les principales protéases impliquées dans la dégradation de l'aggrécane lors des premières étapes du remodelage tissulaire inhérent à l'arthrose. Les ADAMTS-4 (aggrécane-1) et ADAMTS-5 (aggrécane-2) sont les agrécanasés présentes au sein du cartilage arthrosique.

Durant les premières phases de l'arthrose, les différents types cellulaires synthétisent certains inhibiteurs de ces protéases, les TIMP, mais la production de ces inhibiteurs est inversement

corrélée à l'augmentation des synthèses/activations des protéases au cours de l'évolution de la maladie (**Dean et al., 1989**).

La protéase à sérine HtrA1 est largement impliquée dans la pathogenèse de l'arthrose. En effet, cette protéase est surexprimée au cours de l'arthrose et a pour substrat différentes molécules matricielles (collagènes et agrécanes). En outre, sa capacité à dégrader la matrice péricellulaire permet l'interaction des récepteur membranaire « **Discoïdine Domain Receptor-2** » **DDR-2** avec des collagènes, ce qui induit la surexpression de la MMP-13 (**Xu et al., 2014**). Cette protéase est aussi capable d'inhiber les voies de signalisation mises en jeu par l'action des facteurs de croissance BMP-2, -4 et TGF- β 1 (**Oka et al., 2004**).

Famille	Nom
Matrilysines	MMP-7 : matrilysine 1 MMP-26 : matrilysine 2
Collagénases	MMP-1 : collagénase interstitielle MMP-8 : collagénase neutrophile MMP-13 : collagénase 3
Gélatinases	MMP-2 : gélatinase A MMP-9 : gélatinase B
Stromélysines	MMP-3 : stromélysine 1 MMP-10 : stromélysine 2 MMP-11 : stromélysine 3
MT-MMP	MMP-14 : MT1-MMP MMP-15 : MT2-MMP MMP-16 : MT3-MMP MMP-17 : MT4-MMP MMP-24 : MT5-MMP MMP-25 : MT6-MMP

Enfin, les chondrocytes articulaires finissent par devenir sénescents et mourir par apoptose (**Xia et al., 2014**). La dégradation totale du cartilage articulaire devient inéluctable, et s'accompagne des principaux symptômes de la maladie.

4. Symptômes et diagnostic

L'Homme et le cheval présentent globalement les mêmes symptômes et les mêmes stratégies de diagnostic peuvent être employées.

L'arthrose est une maladie asymptomatique durant les premières phases de son évolution. Sa découverte est alors fortuite. Cependant, à des stades plus avancés, la dégradation du cartilage entraîne la mise en contact des pièces osseuses entre elles. Ces contacts induisent des douleurs constituant le principal symptôme de la maladie. Chez le cheval, ces douleurs

sont repérables par une boiterie de l'animal. Néanmoins, un gonflement, dû à un excès de production de liquide articulaire, des raideurs et déformations articulaires peuvent se produire.

a) Les techniques d'imagerie

Bien qu'il y ait le développement de nouvelles techniques d'imagerie, la radiographie demeure l'outil le plus accessible pour diagnostiquer l'arthrose. Elle permet de visualiser les ostéophytes et le pincement de l'interligne articulaire (**Figure III-6**) (**Braun & Gold, 2012**). Néanmoins, cette technique utilise des rayons X et génère des clichés moins nets que ceux que l'on peut avoir par **Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)**.

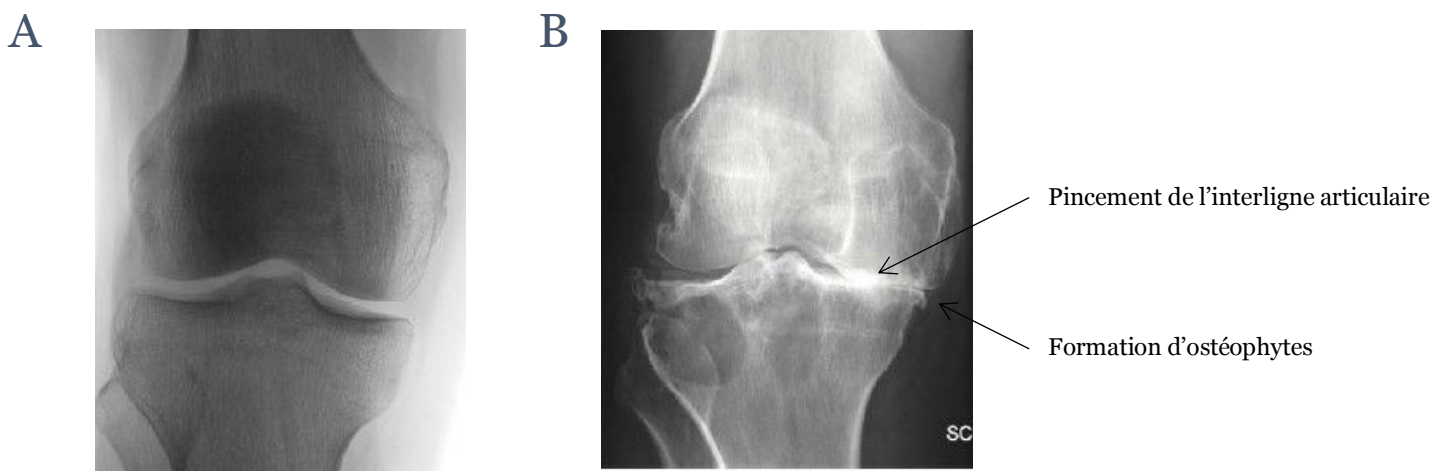


Figure III-6 : Radiographie d'une articulation saine (A) et arthrosique (B).
<http://www.chu-toulouse.fr/-l-arthrose->

Les techniques d'IRM présentent l'avantage de renseigner sur les différentes structures de l'articulation, et ainsi permettre un suivi plus précis de l'évolution de la pathologie. De plus, cette technique est sans danger pour les patients. Cependant, son coût est élevé et peut nécessiter l'utilisation de produits de contraste.

La tomographie en cohérence optique permet de capter des images en 3D d'un tissu grâce à une lumière infrarouge. Cette technique fournit des informations quantitatives sur l'état du cartilage. Elle est sensible à la modification structurale, notamment des collagènes et du tissu. Cependant, cette technique nécessite de placer un endoscope au contact du cartilage, lors d'une arthroscopie. Par conséquent, il faut au préalable avoir identifié l'articulation atteinte.

Enfin, les techniques d'ultrasons permettent de visualiser les différents tissus de l'articulation tout en n'utilisant aucun produit de contraste, ni radiations. Cependant, il faut adapter les appareils en fonction de l'articulation à explorer (sondes à hautes fréquences pour les petites

articulations et sondes à basses fréquences pour les grosses articulations). La qualité des images, qui dépend de l'appareil, nécessite que l'opérateur soit expérimenté pour interpréter au mieux les résultats.

b) Les peptides de dégradation des molécules matricielles

Comme nous l'avons déjà vu, l'arthrose est une maladie affectant les principaux tissus de l'articulation. Ainsi, les fragments des molécules structurales, cytokines et facteurs de croissance dérivant de ces tissus constituent de possibles biomarqueurs (**Tableau II**) (**Ourradi & Sharif, 2017**). A l'heure actuelle, les molécules les plus étudiées en tant que biomarqueurs sont liées à la dégradation ou à la synthèse des tissus articulaires. Par exemple, une étude longitudinale de 5 ans a montré qu'une concentration sérique élevée en télopeptide C-terminal du collagène de type II, CTX-II, et qu'une concentration urinaire élevée en propeptide N-terminal du collagène de type IIA, PIIANP, sont associées à une progression de l'arthrose (**Sharif et al., 2007**). De même, des concentrations plasmatiques, synoviales et urinaires élevées en fragments d'agrécane (ARGS) sont associées à l'arthrose. Les fragments de dégradation des molécules matricielles pourraient aussi être utilisés en tant qu'outil pronostic. En effet, une concentration sérique en COMP élevée est associée au risque de développer une arthrose du genou dans les 10 ans (**Blumenfeld et al., 2013**).

Les récents progrès dans les techniques de protéomique ont permis d'étudier de nombreux échantillons biologiques, et ainsi d'identifier de nouveaux biomarqueurs potentiels. Cependant, le biomarqueur idéal devra être mesurable en faible quantité dans des fluides du patient que l'on peut prélever facilement (sang, urine), de manière non invasive et à moindre coût. L'identification d'un biomarqueur devrait permettre de pouvoir évaluer finement l'efficacité des candidats thérapeutiques utilisés lors d'essais cliniques mais aussi de rendre le diagnostic plus précoce afin d'améliorer la prise en charge actuelle des patients atteints d'arthrose.

Tableau II : Liste des biomarqueurs avec une possible application en diagnostic.(d'après Ourradi *et al.*, 2017)

Biomarqueurs	Description
ARGS	Fragment de l'agrécan
BDNF	« Brain Derived Neurotrophic Factor »
C3f	Fragment du complément c3
COMP	« Cartilage Oligomeric Matrix Protein »
CTX-II	Télopeptide du collagène de type II
Fib3-1 et Fib3-2	Peptides de la fibuline
PIIANP	N propeptide du collagène de type IIA
PIIINP	N propeptide du collagène de type III
S100A12	« Calcium binding protein A12 »
V65	Sous unité de la vitronectine
YKL-40	Glycoprotéine sécrétée

5. Traitements actuels

Au-delà de l'adaptation du mode de vie et de ménagement de l'articulation lésée, les solutions thérapeutiques actuelles peuvent être scindées en deux catégories.

a) Les traitements pharmacologiques

Chez l'Homme et le cheval, les traitements actuels visent à soulager les symptômes, diminuer l'inflammation, et au mieux, à retarder l'évolution de la maladie. Le traitement passe donc par la prescription d'analgésiques, de chondroprotecteurs, d'**Anti-Inflammatoire Non Stéroïdiens (AINS)** et stéroïdiens comme les corticoïdes. Des injections intra-articulaires de glucocorticoïdes ou d'AH peuvent être réalisées mais peuvent présenter un risque infectieux, même s'il est mineur (**Pham, 2009**). De plus, bien que les études réalisées s'accordent sur la diminution de la douleur articulaire et du confort de vie dans un laps de temps réduit suivant ces injections, aucune ne montre la régénération du cartilage (**Ayhan et al., 2014**). Par ailleurs, des injections de « **Platelet Rich Plasma** » (**PRP**) peuvent aussi être réalisées (**Grunke & Schulze-Koops, 2006**). Les injections de PRP, obtenus à partir du sang du patient, mais 4 fois plus concentré en plaquette, ont l'avantage de contenir un large spectre de facteurs de croissance pouvant théoriquement participer à la réparation tissulaire. Les injections de PRP permettent de soulager la douleur, d'augmenter la mobilité

de l'articulation, la qualité de vie, mais aucune étude ne montre de régénération du cartilage consécutivement à ces injections. D'autres traitements ciblent directement les cytokines. Par exemple, l'« **Interleukin Receptor Antagonist Protein** » (**IRAP**) est un traitement visant à court-circuiter la signalisation inflammatoire due aux interleukines en empêchant, par l'ajout de protéines antagonistes au sein de l'articulation, leur liaison à leurs récepteurs. Il s'agit d'un traitement autologue puisque les protéines antagonistes sont obtenues à partir du sang du patient. Ce traitement est aussi bien utilisé chez l'Homme que chez le cheval. D'autres stratégies ciblant de la même manière les cytokines existent, comme par exemple l'Adalimumab qui cible le TNF- α (**Grunke & Schulze-Koops, 2006**). Lorsque la situation devient trop handicapante, les solutions pharmacologiques laissent place aux traitements chirurgicaux.

b) Les traitements chirurgicaux

Parmi ces solutions, le lavage arthroscopique consiste à laver l'intérieur d'une articulation afin d'éliminer les débris cartilagineux présents dans le liquide synovial (**Thiede et al., 2012**). Ce type d'intervention permet de soulager l'inflammation en éliminant les médiateurs de l'inflammation. Souvent couplé au lavage arthroscopique, le débridement est une technique consistant à retirer les portions de cartilage lésées afin de réduire l'érosion. Cependant, lorsque le processus arthrosique est initié, ces dernières techniques ne permettent qu'un soulagement de courte durée et des alternatives plus lourdes, comme la pose de prothèse, sont envisagées. Cependant, cette solution n'est pas applicable à toutes les articulations, la durée de vie de la prothèse est limitée et l'usure de la prothèse entraîne la libération de microparticules, néfastes pour le microenvironnement cellulaire, qui vont conduire à l'apparition d'une inflammation au niveau de la jonction entre la prothèse et l'os pouvant générer une fracture consécutive à une diminution locale de la densité osseuse (**Rand et al., 2003**). D'autres traitements moins lourds permettent de stimuler la réparation du cartilage ou d'implanter des blocs ostéochondraux : Il s'agit de la microfracture et de la mosaïque-plastie. La microfracture consiste en la réalisation de forages au niveau de la zone cartilagineuse lésée, de manière à atteindre la vascularisation de l'os sous-chondral. La rupture de la vascularisation de l'os sous-chondral provoque un saignement, la formation d'un caillot permettant la migration/prolifération de CSM participant à la synthèse d'un fibrocartilage au niveau de la surface articulaire lésée. Quant à la mosaïque-plastie, elle consiste en le prélèvement de blocs ostéochondraux au niveau d'une zone macroscopiquement saine de l'articulation et leur transfert au niveau de la région lésée. Néanmoins, le cartilage néo-formé est de type fibreux. Ainsi, l'ensemble de ces solutions a pour inconvénient la formation d'un fibrocartilage au niveau de la zone traitée, qui peut se généraliser à toute la surface cartilagineuse.

Concernant le modèle équin, ces différents types de chirurgie ont pu être réalisés par des équipes de recherche, et, comme pour l'Homme, mènent à la formation d'un fibrocartilage **(Ortved & Nixon, 2015)**.

L'ensemble de ces approches ne constituent pas des solutions thérapeutiques définitives. Aucun de ces traitements ne permet de recréer une articulation physiologique. Dans ce contexte, les approches de thérapie cellulaire et tissulaire du cartilage pourraient s'avérer pertinentes dans la prise en charge des lésions cartilagineuses.

IV. Thérapie cellulaire et tissulaire du cartilage : De nouvelles pistes thérapeutiques pour les lésions chondrales

A. Généralités

La thérapie cellulaire consiste à injecter des cellules vivantes au sein d'un organisme afin de traiter une pathologie. Les cellules utilisées peuvent provenir de l'individu à traiter ou d'un individu appartenant à la même espèce. La transfusion sanguine fût le premier type de thérapie cellulaire, avec le récit de transfusions sanguines d'Homme à Homme réalisées dès le 18^{ème} siècle, quoique peu concluantes. Depuis, d'autres types de thérapie cellulaire sont utilisés en routine afin de traiter diverses pathologies. En effet, des greffes de MO sont couramment employées pour traiter des atteintes immunitaires ou des cancers.

Concernant les arthropathies, ce type d'approche vise à remplacer les cellules pathologiques par des cellules saines, voire un tissu sain, afin de recréer un cartilage capable de remplir les fonctions qu'il exerce au sein d'une articulation saine. Les premières tentatives de thérapie cellulaire et tissulaire appliquée au cartilage utilisaient des chondrocytes comme type cellulaire à transférer, mais, depuis, certains travaux relatent l'utilisation de cellules souches.

B. Différentes sources cellulaires

1. Les chondrocytes

Dès 1989, des expériences de la **Transplantation de Chondrocytes Autologues (TCA)** dans le modèle lagomorphe ont montré la formation d'un néo-cartilage recouvrant 82% de la zone initialement lésée (**Grande et al., 1989**). D'autres études chez le lapin ont mis en évidence l'importance de la présence du chondrocyte dans la régénération de cartilage (**Brittberg et al., 1996**). De plus, des études chez la chèvre ont montré que les chondrocytes persistaient au niveau de leur implantation d'origine au moins pendant 6 semaines, ce qui permet de leur attribuer la réparation du site lésionnel (**Dell'Accio et al., 2003**).

La TCA est l'approche la plus répandue concernant les thérapies cellulaires du cartilage chez l'Homme. Cette technique fût mise au point chez l'Homme par Brittberg et ses collaborateurs (**Brittberg et al., 1994**). Une première chirurgie était nécessaire pour réaliser une biopsie

de cartilage sur une zone non portante de l'articulation arthrosique, puis le fragment de cartilage était soumis à une digestion enzymatique afin d'isoler les chondrocytes du tissu. Les cellules récupérées étaient ensuite amplifiées dans le but d'avoir une quantité de cellules suffisante pour combler la lésion chondrale lors d'une seconde intervention chirurgicale. L'ensemble des cellules était maintenu en place grâce à la suture d'une membrane de périoste recouvrant la zone traitée (**Figure IV-1**).

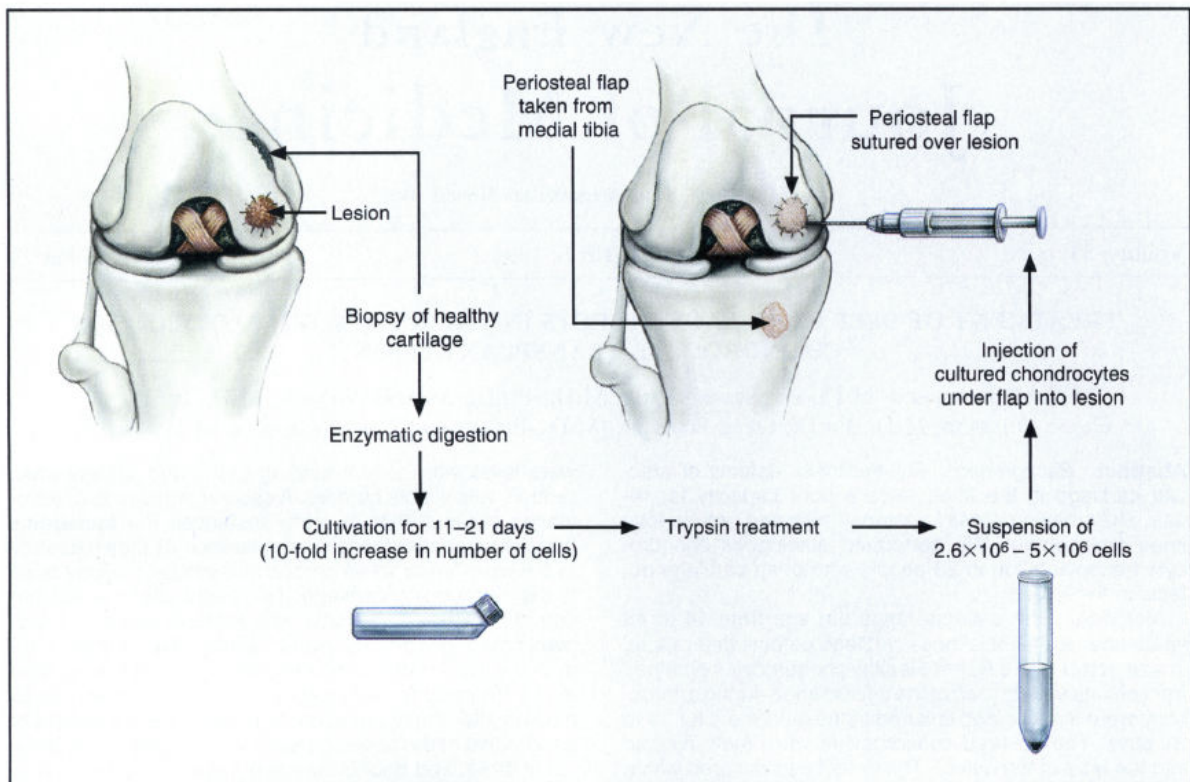


Figure IV-1 : Schématisation du protocole utilisé lors de la première TCA réalisée chez l'Homme. (d'après Brittberg *et al.*, 1994)

Malgré tous ces essais cliniques encourageants, cette stratégie de TCA présente quelques inconvénients, essentiellement dus au coût et à la complexité des actes chirurgicaux, à la réponse biologique de la membrane de périoste ainsi qu'à la dédifférenciation des chondrocytes, due à leur amplification *in vitro*, aboutissant à la synthèse d'un fibrocartilage.

2. Les cellules souches

a) Généralités

Le corps humain comprend plus de 200 types cellulaires différents organisés en tissus et organes afin d'assurer les fonctions essentielles à la survie de l'individu et de l'espèce (**Watt & Driskell, 2010**). L'embryogenèse commence par la rencontre entre un gamète mâle et

femelle et ainsi, la formation du zygote. Cette cellule œuf est à l'origine de l'ensemble des cellules de l'organisme adulte. En effet, les divisions subséquentes à la fécondation permettent de générer des cellules qui vont se spécialiser, en fonction des *stimuli* microenvironnementaux qu'elles reçoivent, de manière à constituer un organisme entier. Du stade zygote au stade adulte, les cellules ont des capacités de différenciation distinctes. On peut alors distinguer quatre grands types de cellules souches : Les cellules totipotentes (les seules à pouvoir générer un organisme entier), pluripotentes (ces cellules pourront générer des types cellulaires issus des trois feuillet embryonnaires), multipotentes (capables de se différencier en différentes cellules issues du même feuillet embryonnaire), et unipotentes (qui ne généreront qu'un seul type cellulaire). Les cellules souches sont toutes douées d'une double capacité, la capacité d'autorenouvellement et la capacité de s'engager dans une voie de différenciation cellulaire (**Figure IV-2**). Par ailleurs, on peut distinguer les **Cellules Souches Embryonnaires (CSE)** des cellules souches adultes. En effet, les CSE sont vouées à former *de novo* l'organisme alors que les cellules souches adultes sont présentes pour maintenir l'homéostasie cellulaire et tissulaire et remplacer les cellules qui meurent suite à une blessure ou maladie. De plus, les cellules souches adultes ont des capacités prolifératives et de différenciation diminuées avec le vieillissement de l'individu (**Ahmed et al., 2017**). En effet, les cellules souches adultes sont soumises à des phénomènes de sénescence cellulaire dus à l'absence d'activité télomérase. Enfin, en 2006, Takahashi et Yamanaka ont montré la possibilité d'induire la pluripotence. En effet, en transfectant un cocktail de facteurs de transcription à des fibroblastes murins, ils ont induit leur pluripotence, formant ainsi des « **induced Pluripotent Stem Cells** » (**iPSC**) (**Takahashi & Yamanaka, 2006**).

Puisqu'une cellule souche adulte n'a pas la capacité à régénérer tous les tissus, la présence de différents types de cellules souches adultes est essentielle et existe pour assurer un renouvellement de toutes les cellules de l'organisme. Par exemple, les cellules souches neurales sont localisées dans les tissus nerveux, et lorsque leur microenvironnement est propice, elles sont capables de se différencier en neurones, astrocytes et oligodendrocytes. La formation des nouvelles cellules sanguines et immunitaires se fait, quant à elle, par la différenciation de **Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH)** localisées dans la MO rouge (**Ahmed et al., 2017**). Dans le cadre de la thérapie cellulaire du cartilage, le type de cellule souche le plus approprié est celui capable de se différencier en cellules issues du mésoderme, puisque l'origine embryonnaire des chondrocytes articulaires du cartilage hyalin est mésodermique (**Karsenty, 1998**). A ce titre, les CSM semblent être de bonnes candidates pour la thérapie du cartilage.

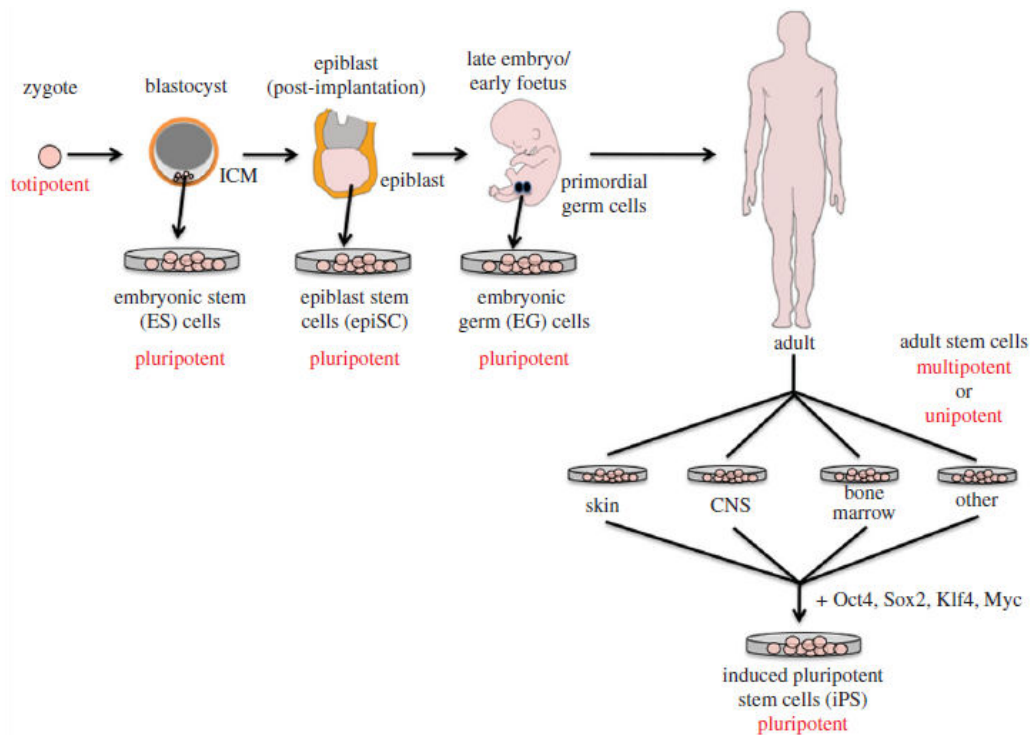


Figure IV-2 : Représentation des différents types de cellules souches et de leurs capacités de différenciation en fonction du développement.
(d'après Watt & Driskell, 2010)

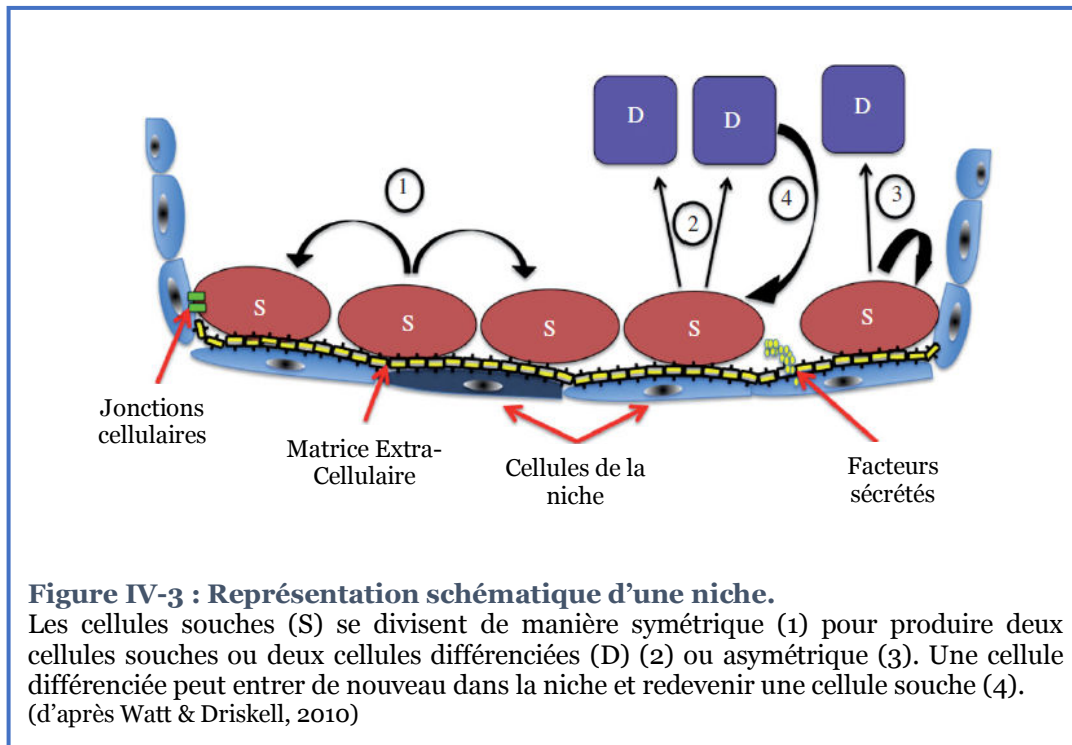
b) Un type de cellules souches séduisant, les cellules souches mésenchymateuses

L'avantage principal d'utiliser des cellules souches adultes est de contourner les problèmes éthiques inhérents à l'utilisation de CSE, mais aussi la formation de tératome *in vivo*, tout en gardant une certaine capacité de différenciation. En ce sens, les CSM sont adultes, multipotentes et capables de former différents type cellulaires issus du mésoderme, entre autres. Ces cellules ont pour la première fois été isolées dans les années 1970 par Friedenstein et ses collaborateurs. Ils remarquèrent la présence, dans la MO de cochon d'Inde, de cellules fibroblastoïdes capables de former des colonies par adhésion sur boîte de culture et dotées d'un pouvoir de différenciation (**Friedenstein *et al.*, 1970**). Depuis, ces cellules ont pu être isolées à partir de la plupart des tissus (**Ahmed *et al.*, 2017**).

i. Localisation tissulaire des CSM

Au sein d'un organisme, les cellules souches se localisent en des sites définis, que l'on désigne « niche ».

En effet, Schofield et ses collaborateurs décrivent des niches de CSM dès 1978 (**Figure IV-3**) (**Schofield et al., 1978**). Une niche comprend tous les éléments entourant les cellules souches naïves, incluant d'autres cellules, la MEC et les molécules solubles présentes dans ce microenvironnement qui est hypoxique. L'ensemble de ces éléments permet de maintenir l'état indifférencié des cellules souches. Néanmoins, certains signaux peuvent atteindre les cellules souches et déclencher leur différenciation, lorsqu'elle est nécessaire, par exemple lorsque la réparation/renouvellement du tissu doit être réalisé.



Il semblerait que la localisation des niches de cellules souches soit périvasculaire, ce qui serait en accord avec les phénomènes de « homing ». En effet, lorsqu'un tissu est altéré, une partie de la réparation tissulaire peut être conduite par les cellules différenciées du tissu mais certains signaux sont aussi émis afin de recruter des cellules souches et progéniteurs. Le fait que les niches se situent à proximité de la circulation sanguine rend leur mobilisation rapide (**Kolf et al., 2007**).

Un certain nombre de molécules solubles sont présentes au sein de la niche, mais leur rôle n'est pas connu. Certaines études *in vitro* ont permis d'identifier des molécules pouvant induire la différenciation de cellules souches, mais aucune capable d'induire un « effet niche » sur les CSM. Il en est de même pour les composants de la MEC (**Kolf et al., 2007**).

Bien que la description des localisations *in situ* des CSM chez le cheval ne soit pas réellement publiée, des protocoles d'isolement similaires à ceux retrouvés chez l'Homme sont décrits, et

permettent l'isolement et le stockage des CSM équine issues de sources similaires à celles retrouvées chez l'humain (**Vidal et al., 2012**).

ii. Caractéristiques

En 2006, l'«**International Society for Cellular Therapy**» (**ISCT**) publia un article définissant trois critères essentiels permettant de définir une CSM (**Dominici et al., 2006**). Le premier demande à ce que les cellules soient caractérisées *in vitro* par leur capacité d'adhérence à un support de culture en plastique. Le deuxième correspond à la vérification, par immunophénotypage, de l'expression d'un panel de marqueurs membranaires caractéristiques parallèlement à l'absence d'expression de certains marqueurs membranaires. En troisième lieu, il est indispensable de vérifier la multipotence des cellules, à *minima* leur tripotence. En effet, les cellules doivent être capables de se différencier en trois types cellulaires d'origine mésodermique lorsque les *stimuli* appropriés leur sont fournis.

- Adhésion au support plastique et pouvoir prolifératif

De la capacité des CSM à former des clones découle leur capacité à proliférer *in vitro*. Lors de la mise en culture à faible densité, les cellules adhèrent au plastique et forment des colonies individuelles à partir d'une cellule isolée appelée «**Colony-Forming Unit Fibroblast**» (**CFU-F**) (**Castro-Malaspina et al., 1980**). Les colonies dérivées des CFU-F sont hétérogènes en morphologie, en taille et en potentiel de différenciation. Après un passage, les cellules vont alors s'amplifier et former un tapis confluent. Leur potentiel prolifératif est une caractéristique essentielle pour leur emploi en thérapie cellulaire.

Bien que les CSM aient un potentiel de division important, elles sont soumises à des phénomènes de sénescence cellulaire dus à l'absence d'activité télomérase (**Li et al., 2011**). Ainsi, après un certain nombre de passage, qui est fonction du type de CSM, ces dernières deviennent sénescents. Leurs capacités prolifératives et de différenciation sont alors largement réduites.

- Pouvoir de différenciation

Les CSM sont capables de se différencier en différents types cellulaires. Cette capacité constitue une de leur particularité, indispensable à vérifier afin de les caractériser. Ainsi, pour être qualifiées de multipotentes, elles doivent être capables de s'engager dans le lignage chondrocytaire, ostéoblastique et adipocytaire (**Pittenger et al., 1999**). Leur capacité à se différencier dépend de l'environnement dans lequel elles évoluent. En effet, la différenciation

en un type cellulaire précis requiert des *stimuli* précis (**Tableau III**). La caractérisation des cellules différenciées obtenues se fait par l'étude des ARNm et protéines spécifiques de chaque lignage étudié, ou par la coloration de plaques de culture après induction de la différenciation. Ainsi, la différenciation adipogénique peut être vérifiée par l'étude des messagers de «**Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma**» (**PPAR- γ**) et par la vérification de la présence de vacuoles lipidiques dans les cellules après coloration par le «Oil Red O». La différenciation ostéogénique est vérifiée par l'étude des messagers de *Runx2*, ou *ostérix* et la présence de dépôts calciques par coloration par le rouge d'Alizarine. La différenciation chondrocytaire est contrôlée par l'étude des messagers des marqueurs phénotypiques habituellement déterminés (*COL2A1*, *ACAN*) et une coloration des PG sulfatés par le bleu alcian ou le bleu de toluidine (**Tableau III**).

Tableau III : Récapitulatif des milieux et des différents intervenants habituellement utilisés et étudiés afin de vérifier la multipotence des CSM *in vivo*.

Runx2 : « Runt-related transcription factor 2 »; *Sox9* : « SRY-type HMG box 9 »; PPAR- γ : « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma ».

Différenciation	Milieu	Facteur de transcription	Marqueurs du phénotype	Histologie
Ostéogénique	Acide ascorbique Dexaméthasone β -glycérophosphate 10% de sérum de veau foetal	<i>Runx2</i> <i>Ostérix</i>	Ostéocalcine Collagène de type I Phosphatase alcaline	Rouge d'alizarine Von Kossa
Adipogénique	1-méthyl-3-isobutylxanthine Dexaméthasone Indométhacine Insuline 10% de sérum de veau foetal	<i>Ppar-γ</i>	Lectine Adipine	« Oil red O »
Chondrogénique	Dexaméthasone Insuline-transferrine-sélénium L-Proline Sodium Pyruvate Acide ascorbique TGF- β / BMP	<i>Sox9</i>	Collagène de type II Agrécan	Bleu de toluidine Bleu alcian Safranine O Trichrome de Masson

Bien que seules les différenciations en adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes soient requises pour juger du caractère multipotent des CSM putatives, elles peuvent se différencier en d'autres types cellulaires d'origine mésodermique ou non mésodermique. En effet, certaines études ont montré que les CSM pouvaient se différencier en cellules ressemblant à des neurones. Cependant, ces cellules étaient incapables de conduire un potentiel d'action (**Hofstetter *et al.*, 2002**).

Des évidences grandissantes indiquent que les populations de CSM sont hétérogènes et présentent des sous-populations n'ayant pas les mêmes capacités de différenciation (**Augello**

& De Bari, 2010). Par exemple, des CSM originaires de la membrane synoviale étaient toutes capables de se différencier en ostéoblastes et chondrocytes alors que seulement 30% pouvaient se différencier en adipocytes (**Karystinou et al., 2009**). Cette hétérogénéité est aussi visible lorsque l'on étudie les marqueurs de surface des CSM.

- Expression d'un panel de marqueurs membranaires

Aucun marqueur de surface spécifique des CSM n'a été décrit dans la littérature (**Dominici et al., 2006**) et il convient d'utiliser les critères définis par l'ISCT en 2006, ainsi que les marqueurs admis depuis par la communauté scientifique comme pertinents afin de définir ce type de cellules. Ainsi, il est généralement admis que les CSM expriment entre autres les marqueurs membranaires CD29 (Intégrine β 1), CD44 (Récepteur à l'AH), CD73 (Ecto-5'-nucleotidase), CD90 (Antigène de surface Thy-1), CD105 (Endogline), et CD166 («**Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule**» (**ALCAM**)). En outre, ces cellules doivent être dépourvues des marqueurs hématopoïétiques CD11b («**Macrophage-1 antigen**»), CD14, CD34, CD45 (Récepteur à la tyrosine phosphatase de type C), CD64 (FC-gamma récepteur 1), CD79a et «**Human Leukocyte Antigen-DR**» (**HLA-DR**), une molécule du **Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)** de classe II).

Les profils d'expression des marqueurs de surface des CSM peuvent être modifiés lors de l'expansion *in vitro*. Ainsi, STRO-1, CD146 et CD271 présents au début de la culture voient leur expression diminuer au cours de la culture cellulaire (**Gronthos et al., 1994; Jones et al., 2010; Sacchetti et al., 2007**). De plus, il existe des sous-populations exprimant des panels de marqueurs membranaires différents (**Li et al., 2016**).

- Propriétés immunomodulatrices/sécrétome

La propriété d'immunomodulation des CSM n'est pas requise pour leur caractérisation, mais demeure une des caractéristiques de ces cellules qui leur confère un potentiel intérêt dans le traitement des pathologies inflammatoires, dont l'arthrose.

Bien que les interactions cellules cibles–CSM puissent jouer un rôle, l'effet immunomodulateur passe principalement par la sécrétion de molécules solubles dont l'expression peut être induite ou augmentée. Les facteurs solubles produits par les CSM sont le « **Stem Cell Factor** » (**SCF**), l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10, l'IL12, la **ProstanGlandine E2 (PGE2)**, le VEGF, le « **Macrophage-Colony Stimulating Factor** » (**M-CSF**), l'« **Hepatocyte Growth Factor** » (**HGF**) et le TGF- β 1 (**Abumaree et al., 2012**). De cette manière, les CSM sont capables de moduler la réponse immunitaire en exerçant un effet sur

la maturation de certaines cellules de l'immunité par la voie de facteurs solubles, entre autres.

En plus du rôle des CSM dans la modulation de la réponse immunitaire, leur sécrétome possède un rôle dans la réparation tissulaire. En effet, au-delà de leur capacité à se différencier en un type cellulaire précis afin de combler un manque, en réponse à certains signaux associés à un dommage tissulaire, certaines CSM vont être recrutées au niveau de la zone lésée. Puis, elles adapteront leur sécrétome afin de sécréter des molécules promouvant le développement de fibroblastes, cellules endothéliales, progéniteurs, dans le but de réparer le tissu altéré (**Figure IV-4**) (**Ma et al., 2014**).

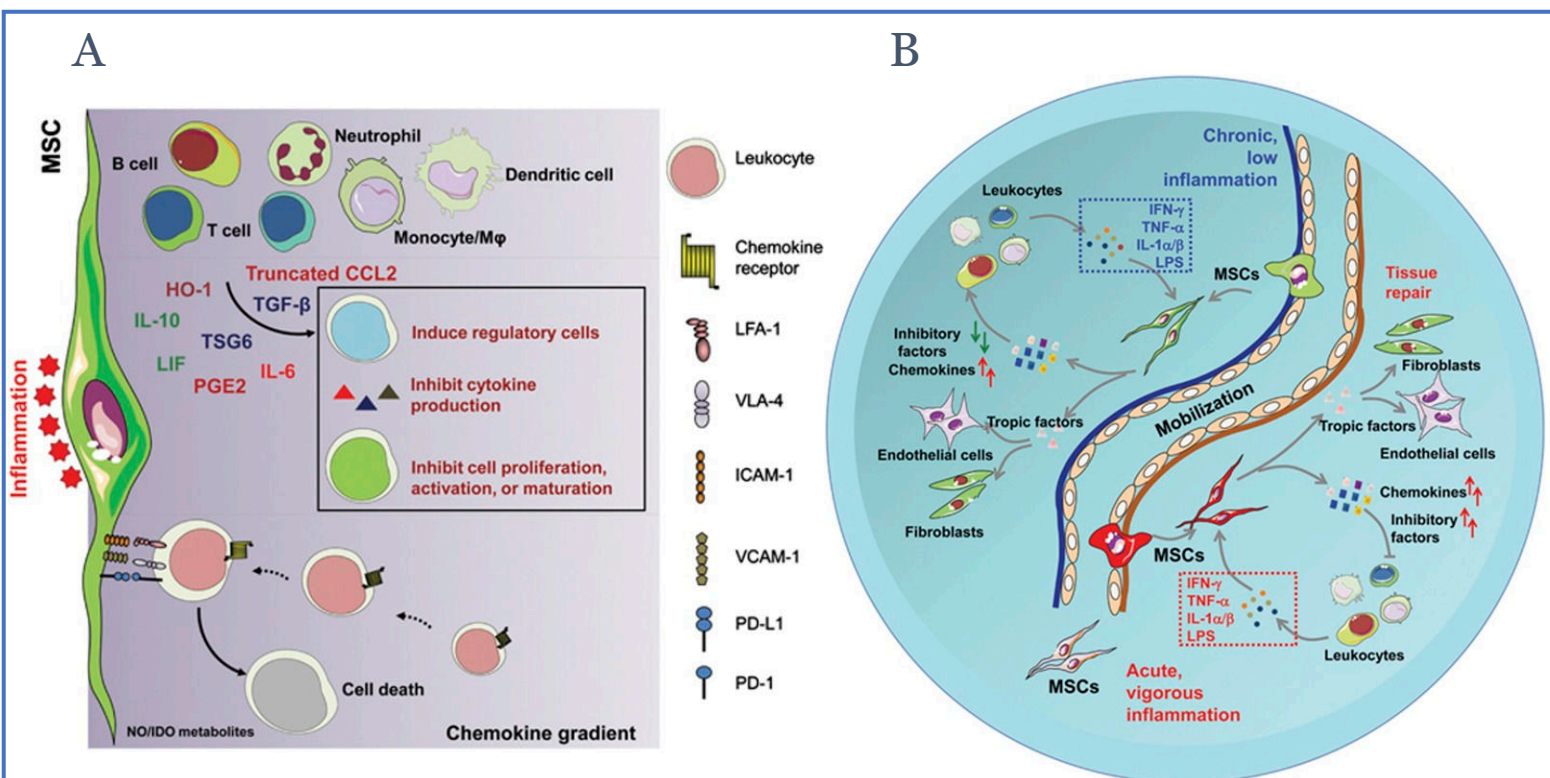


Figure IV-4 : Schémas représentant l'implication des CSM dans l'immunomodulation (A) et la réparation tissulaire (B). CCL2 : « Chemokine Ligand2 »; HO-1 : « HemeOxygenase-1 »; ICAM-1 : « InterCellular Adhesion Molecule-1 »; IFN: Interféron; IL-1 : Interleukine-1; IL-6 : Interleukine-6; IL-10 : Interleukine-10; LFA-1 : « Lymphocyte Function-associated Antigen-1 »; LIF : « Leukemia Inhibitory Factor »; LPS : LipoPolySaccharide; MSC : « Mesenchymal Stem Cell »; PD-1 : « Program-Death-1 »; PD-L1 : « Program-Death-1 Ligand1 »; PGE2 : ProstaGlandine E2; TNF-α : « Tumor Necrosis Factor-α »; TSG6 : « TNF-α-Stimulated Gene6 »; VCAM-1 : « Vascular Cell Adhesion Molecule-1 »; VLA-4 : « Very Late Antigen-4 »; (d'après Ma et al., 2014)

Par ailleurs, une partie des propriétés du sécrétome des CSM implique la sécrétion de vésicules (**Toh et al., 2016**). Parmi ces vésicules, et selon la nomenclature la plus récente de l'« **International Society for Extracellular Vesicles** » (**ISEV**), on retrouve les **nanovésicules extracellulaires (nEV)** communément appelées exosomes d'une taille inférieure à 150 nm (**Phinney & Pittenger, 2017**). Les nEV peuvent être distingués des autres vésicules extracellulaires par la présence d'un panel de molécules spécifiques de la famille des tétraspanines, notamment impliquées dans leur formation (CD9, CD63, CD81 et CD82) mais aussi le CMH I et II, et l'absence des molécules résidentes de la membrane

plasmique (**Edgar JR, 2017**). Ils sont formés à partir d'endosomes ayant fusionnés avec la surface cellulaire, qui sont ensuite libérés à l'extérieur de la cellule, mais tous les endosomes ne génèrent pas des nEV (**Edgar JR, 2017**). Les proportions de cholestérol dans les membranes de ces vésicules conditionnent leur devenir et leur sécrétion en tant que nEV ou leur fusion intracellulaire avec un lysosome. De plus, le mécanisme de formation des nEV n'est pas complètement compris, et il semblerait qu'il y ait deux mécanismes de formation distincts. Un de ces mécanisme serait dépendant de la machinerie « **Endosomal Sorting Complexes Required for Transport** » (**ESCRT**) alors que l'autre mécanisme nécessiterait la présence de la tétraspanine CD63. Une fois formés, les nEV sont secrétées dans le milieu extracellulaire et permettent le transfert d'information entre différentes cellules, puisqu'elles contiennent une grande variété de molécules comme des miRNA, ARNm, cytokines, facteurs de croissance. Les nEV peuvent être internalisées par endocytose ou fusion avec la membrane plasmique de cellules cibles ou rester à leur surface et interagir avec des protéines membranaires. Ainsi, les nEV sont impliquées dans différents processus physiologiques et pathologiques (**Phinney & Pittenger, 2017**).

Les CSM sont des cellules possédant un système endomembranaire et sont par conséquent capables de produire des nEV. Différentes études ont montré que les nEV produites par les CSM ont des activités cardio-, réno- et neuroprotectrices, et aussi des effets bénéfiques dans différentes pathologies telles que l'ischémie cérébrale, les fibroses hépatiques, et d'autres pathologies pulmonaires (**Phinney & Pittenger, 2017**). De plus, les nEV des CSM conservent une partie des propriétés immunomodulatrices des CSM et permettent de diminuer la réponse immunitaire et ainsi le rejet de greffes allogéniques de peau chez la souris. Dans le cadre de l'arthrose, les nEV de CSM pourraient favoriser la réparation du cartilage (**Toh et al., 2016**) (**Figure IV-5**). Finalement, dans l'optique d'une thérapie visant à traiter l'arthrose, les nEV présentent l'avantage de s'affranchir des inconvénients inhérents à la thérapie cellulaire tout en conservant des propriétés régénératrices intéressantes.

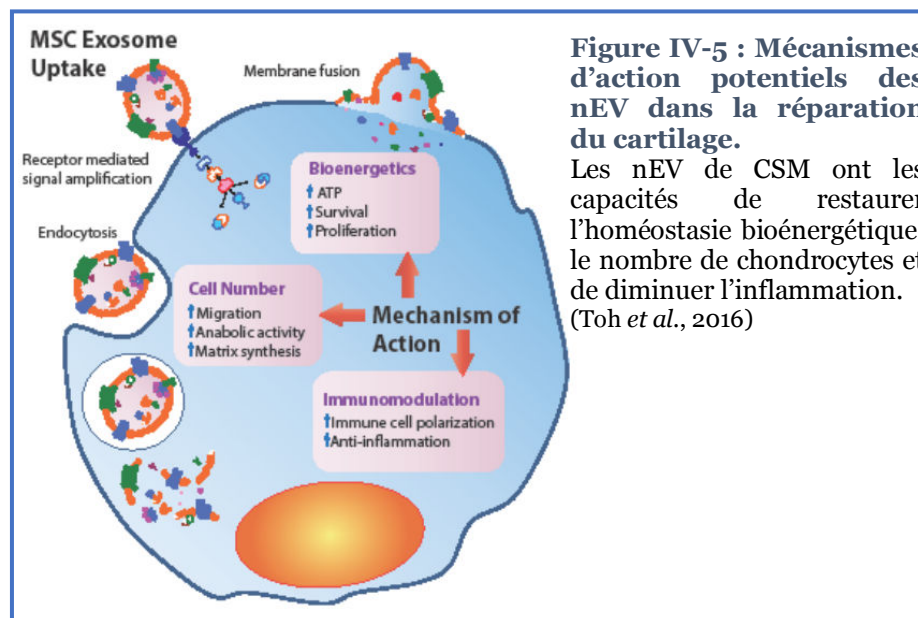


Figure IV-5 : Mécanismes d'action potentiels des nEV dans la réparation du cartilage.

Les nEV de CSM ont les capacités de restaurer l'homéostasie bioénergétique, le nombre de chondrocytes et de diminuer l'inflammation. (Toh et al., 2016)

L'ensemble des propriétés des CSM leur permet d'être considérées comme de séduisantes candidates aux stratégies de thérapies cellulaires.

iii. L'intérêt particulier des CSM de MO et SCO

Les CSM furent pour la première fois isolée à partir de MO humaine dans les années 1970. De ce fait, les CSM de MO ont largement été étudiées chez l'Homme mais aussi dans le modèle équin (**Gutierrez-Nibeyro, 2011**). Le prélèvement de MO humaine est une procédure douloureuse et invasive. Au contraire, un prélèvement de MO équine se fait, le plus souvent, par simple ponction sternale et nécessite seulement une sédation de l'animal (**Penny et al., 2012**). Les CSM sont ensuite isolées par une centrifugation sur gradient de concentration suivie d'une culture sur support plastique.

La réussite de l'isolement des CSM semble être corrélée à l'âge. En effet, le nombre de CSM semblerait diminuer avec l'âge. De plus, chez l'Homme, les CSM prélevées chez des patients âgés ont des propriétés modulées. En effet, ces CSM ont une durée de vie plus limitée et présentent une sénescence cellulaire accélérée (**Stenderup et al., 2003**). Chez le cheval, l'effet de l'âge de l'animal sur les propriétés des CSM de MO n'a pas encore été étudié mais les données chez l'Homme pourraient vraisemblablement être extrapolées vers le modèle équin. En effet, l'hypothèse d'un âge avancé lors du prélèvement de MO chez l'Homme expliquerait les différences retrouvées quant au nombre de CSM isolées par rapport aux données de la littérature où l'âge des chevaux est généralement compris entre 2 et 5 ans (**Delling et al., 2012**).

Le problème de l'âge des donneurs inhérent aux prélèvements de MO n'existe pas pour les prélèvements de SCO. En effet, le prélèvement du SCO se fait dès la fin de la mise-bas chez le cheval, par ponction sanguine à partir de la veine ombilicale (**Koch et al., 2007**). L'isolement des CSM de SCO est réalisé de la même manière que celui des CSM de MO.

En plus de s'affranchir de l'âge du donneur, les CSM de SCO sont moins immunogènes et contrairement aux autres sources, leur recueil n'est pas invasif pour l'animal et peut être effectué sans nuire au poulain ou à la jument (**Hoynowski et al., 2007**).

C. Evolution des modèles de culture

1. Premières générations de stratégie de thérapie cellulaire

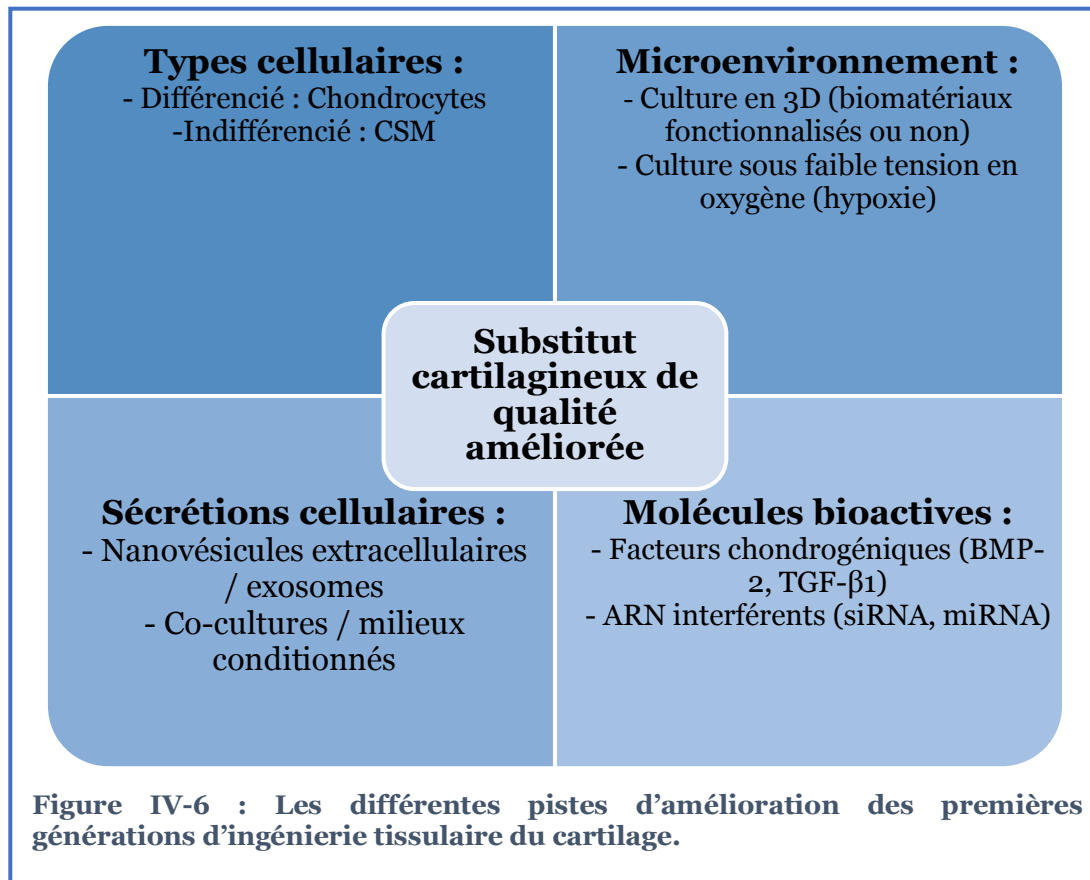
Actuellement, la seule approche d'ingénierie tissulaire à base de cellules qui est autorisée pour une utilisation chez les patients est la TCA, ou « **Autologous Chondrocyte Implantation** » (**ACI**). La première génération a été décrite tout d'abord chez le lapin par Grande et ses collaborateurs et plus tard chez l'Homme par Brittberg et ses collaborateurs (**Brittberg et al., 1994; Grande et al., 1989**). La TCA implique une arthroscopie initiale qui permet d'évaluer les caractéristiques de la lésion et d'effectuer une biopsie de cartilage sain au niveau de zones non portantes. Le cartilage macroscopiquement sain subit une digestion enzymatique afin de récupérer les chondrocytes. Les cellules sont ensuite amplifiées en monocouche *in vitro* avant d'être implantée au niveau de la lésion cartilagineuse. L'implantation consiste en l'injection des chondrocytes amplifiés sous un lambeau de périoste, préalablement prélevé sur le tibia du patient, suturé en marge de la lésion. Cette étape nécessite une arthrotomie (**Figure IV-1**) (**Brittberg et al., 1994**).

Cette technique représente la première génération de la transplantation de chondrocytes. Cette technique permet de combler la lésion par un néo-cartilage mais présente aussi certaines limites. En effet, le prélèvement initial de chondrocytes constitue une lésion chondrale qui peut évoluer en une généralisation d'un phénotype chondrocytaire pathologique. Puis, l'amplification des chondrocytes aboutit à leur dédifférenciation (**Benya et al., 1978**). Finalement, l'implantation des chondrocytes amplifiés nécessite une intervention chirurgicale lourde, participant notamment à l'inflammation de l'articulation, et l'utilisation d'une membrane de périoste qui s'hypertrophie avec le temps, induisant ainsi la calcification de la surface cartilagineuse. L'ensemble de ces éléments aboutissent à la formation d'un néo-cartilage fibreux, riche en collagène de type I (**Demoor et al., 2014**).

C'est pour ces raisons que la première génération a évolué afin de surmonter ces limites.

Les premières améliorations concernaient la procédure de transplantation des chondrocytes, avec l'utilisation de membrane de collagène à la place de la membrane de périoste et d'un biomatériau afin de concentrer les chondrocytes au niveau de la lésion. A l'heure actuelle, les nouvelles stratégies tentent de limiter la dédifférenciation chondrocytaire inhérente à leur amplification *in vitro* par l'utilisation de différents outils (**Figure IV-6**) (**Dewan et al., 2014**). L'objectif est de trouver le meilleur compromis afin d'avoir des cellules présentant un phénotype de chondrocyte articulaire sain, tout en ayant une quantité de cellules suffisante pour combler la lésion (**Demoor et al., 2014**). Ainsi, l'objectif est de maintenir le

phénotype des chondrocytes lors de leur amplification ou juste après, ou alors, de différencier des cellules souches en chondrocytes.



2. Les différents outils d'amélioration

a) Les facteurs chondrogéniques

Du fait de l'importance des facteurs de croissance dans la chondrogenèse, ils se présentent comme de bons candidats pour améliorer les stratégies de thérapie cellulaire du cartilage. Désormais, les stratégies visant à redifférencier les chondrocytes ou celles à différencier des CSM en chondrocytes emploient des facteurs de croissance. Parmi ces molécules, on retrouve certains membres de la superfamille du TGF- β tels que le TGF- β 1, le TGF- β 3, la BMP-2, la BMP-4, la BMP-7 et le GDF-5. Le TGF- β 1 stimule les activités de synthèse des chondrocytes et agit contre l'activité catabolique de certaines molécules pro-inflammatoires (**Danisovic et al., 2012**). Il permet aussi d'augmenter la synthèse des marqueurs chondrogéniques des CSM. Le TGF- β 3 présente des effets semblables. Toutefois, leur utilisation induit *in vitro* l'expression de collagène de type X, marqueur d'hypertrophie et de l'arthrose, non retrouvé chez les chondrocytes articulaires matures (**Kafienah et al., 2007**). Les effets du TGF- β 3 sont augmentés lorsqu'ils sont combinés à la BMP-2 (**Freyria & Mallein Gerin, 2012**). En plus de cet effet, la BMP-2, couplée à un protocole de différenciation précis, permet d'induire

une augmentation de la synthèse des marqueurs chondrocytaires hyalins par des chondrocytes dédifférenciés (**Legendre et al., 2013; Rakic et al., 2017**).

b) La culture en hypoxie

Les chondrocytes articulaires évoluent en présence d'une faible tension en O₂. Afin de mimer le contexte oxygène physiologique des chondrocytes, les stratégies de redifférenciation de chondrocytes devraient se dérouler en hypoxie. Les résultats obtenus au sein de notre laboratoire montrent que la culture de chondrocytes articulaires en hypoxie (<5% O₂) augmente l'expression de *SOX9*, *COL2A1* et *ACAN* et diminue l'expression de *COL1A1*, *COL1A2* et *COL3A1* par rapport à la normoxie (21% O₂) (**Duval et al., 2009; Legendre et al., 2013**). De plus, les synthèses associées à l'hypertrophie chondrocytaire, après différenciation de CSM, inhérentes à l'utilisation de facteurs de croissance peuvent être contrecarrées par une culture en présence d'une faible tension en O₂ (**Gomez-Leduc et al., 2017**).

c) L'utilisation de biomatériaux

Dans le souci de disposer d'une culture *in vitro* s'approchant au mieux de la situation *in vivo*, l'utilisation d'un biomatériau est essentielle. En effet, il permet de reproduire les interactions directes et indirectes entre les cellules elles-mêmes et entre les cellules et la MEC. Désormais, les biomatériaux font partie des stratégies de différenciation de CSM ou de redifférenciation des chondrocytes dédifférenciés (**Gomez-Leduc et al., 2017; Legendre et al., 2013; Rakic et al., 2017**).

A ce jour, de nombreuses matrices ont été testées *in vitro* et *in vivo* pour la réparation du cartilage. Ces dernières peuvent être classées selon leur nature (protéiques, polysaccharidiques, synthétiques et naturelles) ou leur forme (hydrogels, éponges et constructions hybrides). Quel que soit le biomatériau, il doit remplir certains critères pour être utilisé en thérapie cellulaire du cartilage. En effet, il doit être bio-compatible, doit présenter une certaine porosité afin de permettre la migration des cellules, la diffusion des molécules, des nutriments, de l'oxygène, de telle sorte à favoriser l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire. En outre, il doit aussi être facilement implantable au niveau d'une zone lésée et conserver son intégrité après implantation, tout en demeurant biodégradable afin de s'intégrer dans les processus physiologiques de remodelage tissulaire.

Les éponges de collagènes constituent un des biomatériaux couramment utilisés à des fins de thérapie cellulaire du cartilage (**Figure IV-7**). Les éponges de collagènes sont habituellement composées d'atélocollagène de types I et III qui sont chimiquement réticulés afin d'éliminer les déterminants antigéniques et de les rendre ainsi biologiquement inactives

(matrikines). Ces éponges ont été utilisées lors de plusieurs études et ont contribué à la redifférenciation de chondrocytes dans le modèle humain et équin (**Demoor et al., 2014; Legendre et al., 2013; Rakic et al., 2017**). De plus, ces éponges de collagène de types I et III sont d'ores et déjà utilisées en clinique humaine et sont conformes aux exigences essentielles de santé et de sécurité (elles possèdent un marquage CE). Leur innocuité est donc attestée. Des éponges de collagène de type II ont aussi été étudiées, mais peuvent être immunogènes et induire une hypertrophie des cellules (**Mukaida et al., 2005**).

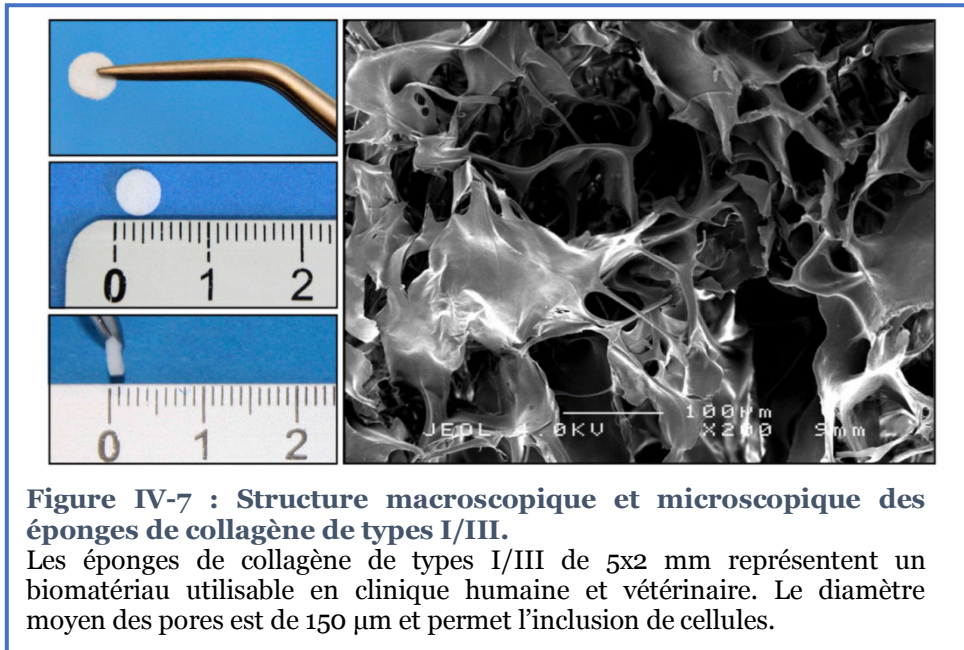


Figure IV-7 : Structure macroscopique et microscopique des éponges de collagène de types I/III.

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.

d) Les ARN interférents

En 2008, Kobayashi *et al.*, ont montré que l'inactivation de la machinerie de synthèse des miRNA entraîne des anomalies de prolifération et de différenciation des chondrocytes, démontrant l'importance des miRNA dans la chondrogenèse et la stabilisation du phénotype (**Kobayashi et al., 2008**). Depuis, certaines études se sont intéressées à des miRNA en particulier et ont montré leur rôle dans la chondrogenèse (**Demoor et al., 2014**).

Les siRNA, un autre type d'ARN interférent, peuvent s'avérer intéressants pour les stratégies de thérapie cellulaire du cartilage du fait qu'ils ciblent un ARNm précis. Des études menées au sein de l'équipe se sont d'ailleurs penchées sur l'utilisation d'un siRNA ciblant l'ARNm codant la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type I et d'un second siRNA ciblant l'ARNm codant HtrA1 (**Legendre et al., 2013; Ollitrault et al., 2015**). Les résultats montrent ainsi une très forte inhibition de l'expression des ARNm cibles, associés à la diminution des taux matriciels du collagène de type I et d'HtrA1.

3. Stratégie de thérapie cellulaire du cartilage chez le cheval

Les techniques de TCA correspondant aux premières générations chez l'Homme ont été évaluées chez le cheval (**Ortved & Nixon, 2015**). Une réparation des défauts cartilagineux fût observée, avec une expression de collagène de type II. Cependant, les limites de cette technique de première génération observées chez l'Homme (arthrotomie, dédifférenciation chondrocytaire, hypertrophie) furent aussi observées. Dès lors, la TCA chez le cheval a connu les mêmes améliorations, les CSM furent étudiées. A l'image de chez l'Homme, les CSM équines sont retrouvées dans de nombreux tissus, comme le tissu adipeux, la membrane synoviale, le SCO, la MO, *etc.* Cependant, les travaux les plus aboutis dans la différenciation chondrogénique concernent les CSM de MO. Celles-ci présentent l'avantage d'être faciles à prélever au niveau du sternum ou de l'os iliaque, et de manière non invasive, contrairement aux prélèvements de chondrocytes. L'injection de CSM pré-différenciées par un traitement par le TGF- β 3, concomitamment à une injection de PRP, est pratiquée en routine en vue de traiter les lésions chondrales équines. Néanmoins, certaines limites persistent, principalement concernant leur statut de différenciation et leur hypertrophie (**Ortved & Nixon, 2015**). Une alternative aux limites des CSM pourrait être l'utilisation de cellules pluripotentes puisqu'une équipe a réussi à produire des iPSC à partir de fibroblastes équins. Cependant, leur redifférenciation en chondrocytes n'a pas été étudiée (**Breton et al., 2013**).

4. Utilisations des CSM indifférenciées

La capacité de multipotence des CSM rend ce type cellulaire intéressant à des fins de thérapie cellulaire. Cependant, l'intérêt de l'utilisation des CSM pour la thérapie cellulaire ne se restreint pas à leur multipotence. En effet, le sécrétome/pouvoir immunomodulateur des CSM représente aussi une solution attractive de thérapie cellulaire et acellulaire, notamment dans le but d'améliorer les traitements actuels des arthropathies (**Hofer & Tuan 2016**).

a) Utilisation des CSM en co-culture

La co-culture est une technique de culture qui permet l'interaction directe ou indirecte entre deux types cellulaires *via* leurs sécrétomes. Dans le cadre des arthropathies, des co-cultures CSM-chondrocytes ont été réalisées afin d'induire la différenciation de CSM ou d'améliorer le phénotype des chondrocytes. Par exemple, un ensemencement de chondrocytes et de CSM dans un même biomatériau aboutit à un niveau de GAG et collagènes supérieur à un biomatériau ensemencé avec un seul type cellulaire (**Bian et al., 2011**). Au contraire, une diminution de l'expression du collagène de type X est observée. L'effet bénéfique de la co-culture directe n'est pas retrouvé, dans cette étude, en absence de contacts directs entre les cellules. Une autre étude a mis en avant l'augmentation de l'expression du collagène de type

II et de Sox 9, concomitamment à une diminution de l'expression du collagène de type I, lorsqu'une co-culture de CSM et de chondrocytes indirecte est réalisée (**Li et al., 2016**). Cette même étude montre qu'une co-culture directe aboutit à la formation d'un fibrocartilage. Les travaux de Levorson et ses collaborateurs tendent à montrer aussi le bénéfice de cultiver des CSM et des chondrocytes de manière indirecte, puisque, pour une même quantité de chondrocytes ensemencés, la co-culture indirecte permet de produire une quantité de GAG et collagène supérieure à ce qui est observé lorsque la co-culture est directe (**Levorson et al., 2014**).

Enfin, au-delà de l'aspect phénotypique des chondrocytes, l'utilisation des CSM en co-culture pourrait s'avérer pertinente afin d'améliorer la prolifération des chondrocytes et leur survie. En effet, il a été montré que le sécrétome des CSM diminue l'expression de molécules pro-apoptotiques par les cardiomyocytes dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le rat (**Vizoso et al., 2017**). En ce sens, une co-culture de CSM humaines issues du tissu adipeux avec des chondrocytes permet de diminuer l'apoptose des chondrocytes (**Maumus et al., 2013**).

La co-culture semble donc être une méthode appropriée pour améliorer le phénotype chondrocytaire, la survie et la prolifération des chondrocytes. Cependant, d'autres études semblent nécessaires afin de mieux connaître la co-culture la plus adaptée (directe, indirecte), et cela dans les différents modèles expérimentaux. L'efficacité d'une co-culture indirecte permettrait d'envisager le remplacement du type cellulaire par son MC.

b) Injection intra-articulaire de CSM indifférenciées

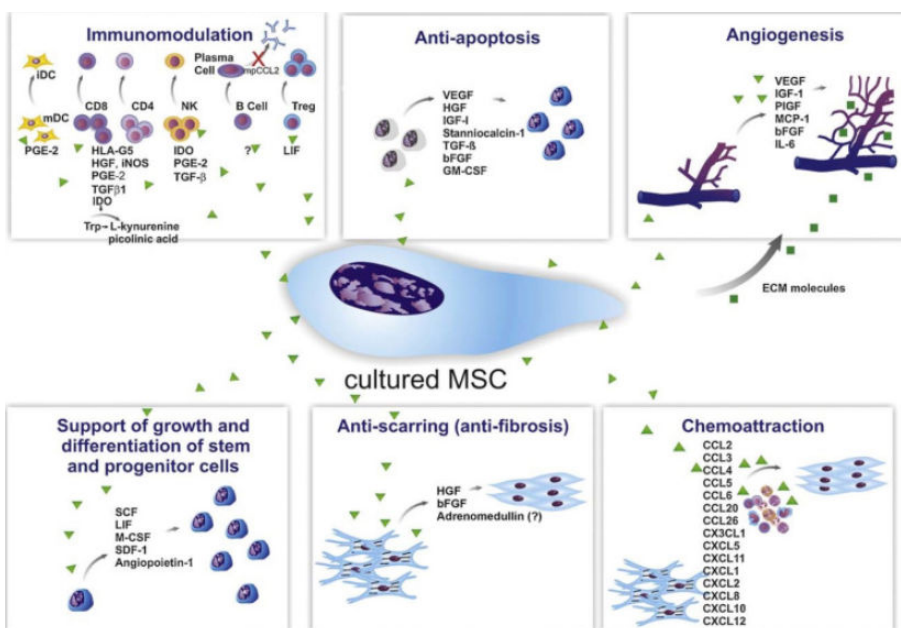
Du fait du large spectre de molécules présentes dans les sécrétions des CSM, une injection des CSM au niveau de l'articulation arthrosique pourrait constituer une approche thérapeutique innovante (**Figure IV-8 A et B**).

Des études précliniques chez la souris ont permis de réaliser une preuve de concept et de s'assurer de l'efficacité des injections intra-articulaires de CSM (**Kong et al., 2017**). Par exemple, dès 2007, Lee et ses collaborateurs ont montré qu'une injection de CSM de MO resuspendues dans de l'AH induisait une amélioration de la réparation de défauts cartilagineux induits chez le porc (**Lee et al., 2007**). Dans le modèle équin, les mêmes observations sont faites. En effet, une injection de CSM permet d'améliorer la réparation de défauts cartilagineux (**Ortved & Nixon, 2015**). Des injections de CSM pourraient être réalisées afin d'améliorer les techniques chirurgicales existantes. En effet, lorsque la microfracture est couplée à une injection de concentré de MO, de meilleurs résultats sont obtenus, comparé à la microfracture seule.

Des essais cliniques chez l'Homme ont d'ores et déjà eu lieu (**Kong et al., 2017**). Une étude a permis de montrer le rôle de l'injection de CSM dans la régénération du cartilage et la réduction de l'environnement inflammatoire. Plusieurs autres études ont rapporté les effets bénéfiques d'injections intra-articulaires de CSM. Ainsi, 24 semaines après l'injection de CSM de MO autologues, les patients présentaient une régénération du cartilage, une augmentation de la mobilité de l'articulation et une diminution de la douleur. Une autre étude montre des effets bénéfiques semblables 6 mois après l'injection des CSM de MO. Il semblerait que ces résultats soient semblables lorsque les CSM injectées sont isolées à partir du tissu adipeux.

L'utilisation d'injections intra-articulaires de CSM dans le traitement des arthropathies présente donc un intérêt. A l'image de la co-culture, il serait intéressant de mieux caractériser le mode d'action des CSM ; est-il dû à des interactions directes entre les différents types cellulaires, ou, le sécrétome des CSM est-il responsable de l'essentiel des effets? La réponse à ces questions permettrait d'envisager, ou non, des thérapies acellulaires composées des sécrétions de CSM.

A



B

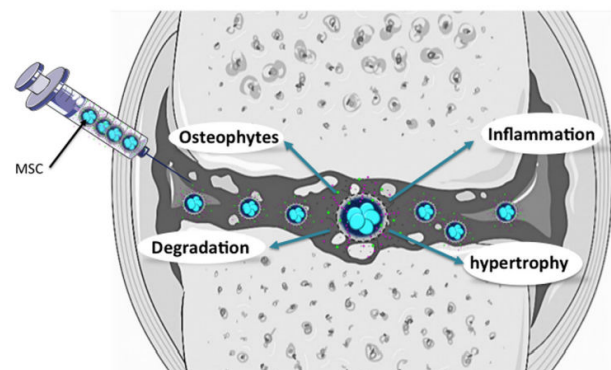


Figure IV-8 : Le sécrétome des CSM est constitué d'un large panel de molécules impliquées dans différents processus (A). L'injection de CSM dans le cadre de la thérapie cellulaire du cartilage pourrait s'avérer utile dans le but de prévenir certains mécanismes arthrosiques (B).

(Kong et al., 2017; d'après Vinatier & Guicheux, 2016)

Toutes les études in vitro de thérapie cellulaire constituent des modèles thérapeutiques innovants pour le traitement des arthropathies arthrosiques mais, néanmoins souvent perfectibles, de manière à, in fine, retrouver une situation articulaire physiologique. Cependant, après les études in vitro visant à obtenir un phénotype chondrocytaire hyalin sain, des étapes essentielles restent à approfondir, comme la validation de l'innocuité du type cellulaire employé. De plus, la validation des stratégies établies in vitro doit passer par des preuves de concept sur le modèle animal. Ainsi, des études in vivo sur le modèle gros animal pourraient servir d'essai clinique dans le modèle animal à l'étude et préclinique pour l'Homme.

V. Intérêt de l'étude du modèle équin

A. Modèle d'étude pré-clinique pour l'Homme

Les modèles petits animaux ont les avantages d'être relativement peu coûteux, faciles à établir et assez facilement manipulables. C'est la raison pour laquelle ils sont utilisés pour étudier la pathogenèse et la physiopathologie de l'arthrose. Ils peuvent aussi être utilisés pour tester des traitements. Cependant, certains traitements efficaces dans le modèle petit animal ne le sont pas pour l'Homme du fait des importantes différences dans l'anatomie, l'histologie et la physiologie de ces animaux avec l'Homme. Contrairement aux modèles petits animaux, les modèles gros animaux présentent les avantages d'avoir des similarités anatomiques avec l'Homme, de présenter une plus grande occurrence d'arthrose naturellement développée, de pouvoir diagnostiquer de manière précise la pathologie par imagerie, de pouvoir prélever de manière répétée le liquide synovial, *etc.* Ainsi, les modèles gros animaux sont les modèles expérimentaux les plus pertinents pour l'étude de l'arthrose de l'Homme, même si certains inconvénients demeurent, tels que le coût et la logistique (**McCoy, 2015**). Les études dans le modèle gros animal sont donc indispensables avant d'envisager d'éventuels essais cliniques chez l'Homme (**Kuyinu et al., 2016**). L'intérêt de développer des modèles d'arthrose chez le cheval est double : L'arthrose est une pathologie se développant naturellement, et répandue dans cette espèce et le cheval constitue un excellent modèle animal pour l'Homme du fait des homologues entre le cartilage équin et humain. En effet, parmi les modèles gros animaux, le cheval est l'animal qui présente un cartilage le plus comparable à celui de l'Homme, que ce soit en termes d'épaisseur, de structure, de cellularité, de propriétés biomécaniques (**Figure V-1**). De plus, la grosse taille de ses articulations permet de réaliser des arthroscopies en routine pour créer des lésions cartilagineuses ou pour appliquer les stratégies thérapeutiques à l'étude et, éventuellement pour suivre le processus de réparation du cartilage à différents temps (**Moran et al., 2016**).

En plus des similarités entre les cartilages humain et équin, ce modèle animal peut aussi développer des lésions chondrales spontanément. En effet, à l'image de l'Homme, les chevaux sportifs sur-sollicitent leurs articulations entraînant l'émergence de lésions cartilagineuses. Ainsi, comme chez l'Homme, les articulations le plus souvent atteintes sont celles les plus sollicitées (**McCoy, 2015**). Ces défauts cartilagineux pourront provoquer chez l'animal des douleurs, et sa mise au repos. A terme, comme chez l'humain, une mauvaise prise en charge mènera inévitablement à la mise en place d'arthrose et d'ostéophytes provoquant des douleurs importantes et une forte diminution des capacités motrices du cheval. De plus, comme l'Homme, un cheval vieillissant a de fortes probabilités de développer une arthrose.

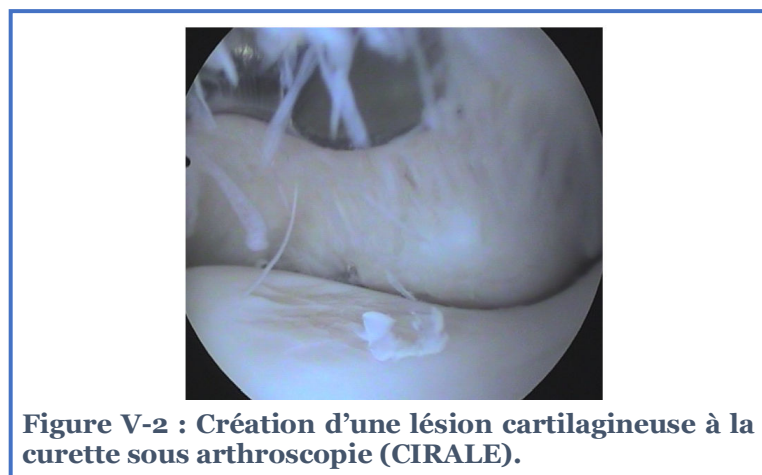
Ainsi, le cheval développe des pathologies ostéoarticulaires dont l'étiologie est similaire à ce qui est retrouvé chez l'Homme (**McIlwraith *et al.*, 2012**).

Species	Breed	Age of skeletal maturity	Adult weight	Cartilage thickness	Calcified cartilage layer thickness	Bone plate thickness	Critical size defect
Human		18–22 years	60–90 kg	2.4–2.6 mm	0.1 mm	0.2–0.5 mm	10 mm
Rabbit	New Zealand White	9 months	3–4 kg	0.16–0.75 mm	0.1–0.15 mm	0.4–0.5 mm	3 mm
Dog	Mongrel, Beagle	1–2 years	15–30 kg	0.95–1.3 mm	-	-	4 mm
Mini-pig	Gottingen Mini-pig, Yucatan, Lee-sung	10 months–1 year	20–40 kg	1.5 mm–2.0 mm	-	-	6 mm
Pig	Large White	2 years	250 kg	1.5 mm–2.0 mm	-	-	6 mm
Goat	Spanish, Dairy, Boer Cross, Saanan	2–3 years	40–70 kg	0.8–2 mm	0.2 mm	0.3 mm	6 mm
Sheep	Suffolk, Texel	2–3 years	35–80 kg	0.7–1.7 mm	0.2 mm	0.7 mm	7 mm
Horse	Mixed, Thoroughbred, Quarter Horse	2–4 years	500–600 kg	2.0–3.0 mm	0.2 mm	0.7 mm	9 mm

Figure V-1 : Comparaison des différents modèles utilisés dans l'étude des lésions chondrales.
(d'après Moran *et al.*, 2016)

L'ensemble de ces éléments font du cheval un modèle animal bien adapté pour l'étude du cartilage et de la lésion chondrale.

Différents types d'induction de modèle d'arthrose expérimentale existent (**Kuyinu *et al.*, 2016**). Cependant, le plus souvent, les arthroses induites chez le cheval impliquent la création d'une lésion ostéochondrale au niveau de l'articulation du carpe, même si certaines études utilisent l'articulation métacarpophalangienne ou le condyle fémoral (**McCoy, 2015**). Pour la création d'une lésion cartilagineuse, elle peut être effectuée par curetage de la surface du cartilage ; en prenant soins de ne pas atteindre l'os (**Figure V-2**).



B. Le traitement des affections locomotrices équinés, un enjeu majeur

Les affections locomotrices sont la première cause de baisse de performances ou d'arrêt de carrière des chevaux de courses et de sport (**Perkins et al., 2005**). De plus, le risque de développer de nouveau un trouble musculo-squelettique, après une première affection, locomotrice, lors du retour à l'entraînement, est plus élevé. Une étude portant sur les performances équinés chez 40 pur-sang a montré que 37 chevaux présentaient des boiteries au cours des six premiers mois d'entraînement, dans la plupart des cas (27 d'entre eux), à cause de lésions articulaires (**Preston et al., 2008**).

Par ailleurs, comme pour l'Homme, aucun traitement curatif n'existe. Les seuls traitements généralement utilisés visent à soulager la douleur et à diminuer l'inflammation. Ces traitements sont donc utilisés sur le long terme. C'est une des raisons pour laquelle les coûts engendrés par cette pathologie sont élevés, *a fortiori* lorsque le cheval athlète est incapable de courir. Une étude estime à plus de 15 000 dollars par an et par cheval les frais et pertes financières causées par la survenue de la pathologie (**Oke & McIlwraith, 2010**). En ce sens, il est important d'améliorer les stratégies thérapeutiques.

Le modèle équin constitue donc un modèle pertinent pour l'étude des arthropathies, que ce soit en vue de futures applications chez l'Homme ou le cheval.

VI. Objectifs généraux du projet de thèse

Le projet de recherche développé dans le cadre de ces travaux de thèse a pour objectif général de développer une approche intégrée pour le traitement des arthropathies équinnes, ces dernières représentant des pertes financières substantielles pour l'ensemble de la filière et notamment dans le cadre des courses hippiques. Sur le plus long terme, l'ensemble de ces travaux nous permettra potentiellement d'envisager des essais cliniques pour l'Homme.

Les résultats peuvent se scinder en 4 parties :

- 1) La première étape a consisté à isoler les CSM équinnes, les caractériser, puis à évaluer l'absence de contamination virologique et bactériologique. Dans un second temps, nous avons réalisé des expériences de différenciation chondrogénique en adoptant en tant que protocole de différenciation initial le protocole établi auparavant chez l'Homme. Le protocole établi chez l'Homme impliquait une culture des cellules pendant 14 jours au sein d'éponge de collagènes, en hypoxie, en présence des facteurs chondrogéniques, la BMP-2 et le TGF- β 1, et de siRNA ciblant la chaîne alpha 1 du collagène de type et/ou ciblant HtrA1. Le phénotype cellulaire obtenu demeurant perfectible, nous avons tenté, dans un second temps, d'améliorer la stratégie de différenciation des CSM en chondrocytes en modulant la stratégie d'interférence par l'ARN, la durée de la culture, et en utilisant un autre facteur de croissance, le TGF- β 3.
- 2) La deuxième partie s'est déroulée en parallèle de la première et transpose ce qui est réalisé pour les CSM de MO à des CSM issues de SCO.
- 3) Du fait que les différents types de CSM peuvent présenter des capacités de différenciation chondrogénique différentes, la troisième partie s'est attachée à comparer les deux types de CSM utilisées afin de définir le candidat au meilleur potentiel thérapeutique pour la génération d'un néo-cartilage hyalin *in vitro*. La comparaison a été réalisée aussi bien sur leur caractérisation que sur leur capacité de différenciation en chondrocytes.
- 4) La quatrième partie a consisté à réaliser des expériences de co-culture CSM-chondrocytes afin d'améliorer la redifférenciation de chondrocytes équinnes. Puis, nous avons évalué l'effet de MC à partir de CSM indifférenciées sur le phénotype chondrocytaire.

Résultats

I. Article #1

Characterization and use of equine bone marrow mesenchymal stem cells in equine cartilage engineering. Study of their hyaline cartilage forming potential when cultured in hypoxia within a biomaterial in the presence of BMP-2 and TGF- β 1.

Thomas Branly*, Lélia Bertoni*, **Romain Contentin**, Rodolphe Rakic, Tangni Gomez-Leduc, Mélanie Desancé, Magalie Hervieu, Florence Legendre, Sandrine Jacquet, Fabrice Audigié, Jean-Marie Denoix, Magali Demoor & Philippe Galéra.

* : Contribution équivalente

A. Objectifs de l'article #1

Le cartilage articulaire hyalin est le tissu recouvrant les extrémités des os au sein des articulations synoviales, et permet leur bon fonctionnement. Cependant, des lésions de ce tissu entraînent la perte irrémédiable de sa fonction et en conséquence un contexte articulaire global pathologique douloureux. Ces lésions chondrales, qui peuvent évoluer vers l'arthrose, représentent un véritable fardeau économique, que ce soit pour la filière équine ou chez l'Homme. En effet, les affections locomotrices équines sont la première cause de baisse de performances ou d'arrêt de carrière des chevaux de course et de sport. De plus, les traitements actuels, que ce soit chez l'Homme ou le cheval, sont utilisés sur de longs termes puisqu'ils visent uniquement à diminuer les douleurs, l'inflammation et au mieux à retarder l'évolution des atteintes chondrales. Dans ce contexte, les stratégies d'ingénierie tissulaire représentent une alternative pertinente pour soigner ces atteintes de manière durable. Nous avons choisi d'étudier le modèle équin pour les différentes raisons sus-citées, et parce qu'il y a de très fortes similitudes entre le cartilage articulaire équin et humain. Ainsi, les premières approches développées chez l'Homme pourraient être employées chez le cheval. En retour, de futurs essais cliniques chez le modèle équin pourraient constituer des essais pré-cliniques pour l'Homme.

Les objectifs de cet article ont donc été d'isoler, puis caractériser des CSM à partir de MO équine et de les différencier en chondrocytes grâce à une stratégie préalablement développée avec des CSM de MO humaine.

B. Article #1

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- β 1

Thomas Branly^{1,2} · Lélia Bertoni³ · Romain Contentin^{1,2} · Rodolphe Rakic^{1,2} · Tangni Gomez-Leduc^{1,2} · Mélanie Desancé^{1,2} · Magalie Hervieu^{1,2} · Florence Legendre^{1,2} · Sandrine Jacquet³ · Fabrice Audigié³ · Jean-Marie Denoix³ · Magali Demoor^{1,2} · Philippe Galéra^{1,2}

© Springer Science+Business Media, LLC 2017

Abstract Articular cartilage presents a poor capacity for self-repair. Its structure-function are frequently disrupted or damaged upon physical trauma or osteoarthritis in humans. Similar musculoskeletal disorders also affect horses and are the leading cause of poor performance or early retirement of sport- and racehorses. To develop a therapeutic solution for

horses, we tested the autologous chondrocyte implantation technique developed on human bone marrow (BM) mesenchymal stem cells (MSCs) on horse BM-MSCs. This technique involves BM-MSC chondrogenesis using a combinatory approach based on the association of 3D-culture in collagen sponges, under hypoxia in the presence of chondrogenic

Thomas Branly and Lélia Bertoni contributed equally

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12015-017-9748-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Philippe Galéra
philippe.galera@unicaen.fr

Thomas Branly
tbranly@gmail.com

Lélia Bertoni
lelia.bertoni@vet-alfort.fr

Romain Contentin
romaincontentin@hotmail.fr

Rodolphe Rakic
rodolphe.rakic@gmail.com

Tangni Gomez-Leduc
tangnigl@free.fr

Mélanie Desancé
melanie359@hotmail.fr

Magalie Hervieu
magalie.hervieu@gmail.com

Florence Legendre
florence.legendre@unicaen.fr

Sandrine Jacquet
sandrine.jacquet@vet-alfort.fr

Fabrice Audigié
fabrice.audigie@vet-alfort.fr

Jean-Marie Denoix
jmdenoix@vet-alfort.fr

Magali Demoor
magali.demoor@unicaen.fr

¹ Normandy University, Caen, France

² UNICAEN BIOTARGEN (Biologie, génétique et thérapies ostéoarticulaires et respiratoires), EA7450; UFR Santé, Université de Caen Normandie, 14000 Caen, France

³ Center of Imaging and Research on Locomotor Affections in Equines, Ecole Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, 14430 Goustranville, France

factors (BMP-2 + TGF- β_1) and siRNA to knockdown collagen I and HtrA1. Horse BM-MSCs were characterized before being cultured in chondrogenic conditions to find the best combination to enhance, stabilize, the chondrocyte phenotype. Our results show a very high proliferation of MSCs and these cells satisfy the criteria defining stem cells (pluripotency-surface markers expression). The combination of BMP-2 + TGF- β_1 strongly induces the chondrogenic differentiation of MSCs and prevents HtrA1 expression. siRNAs targeting *Coll1a1* and *Htra1* were functionally validated. Ultimately, the combined use of specific culture conditions defined here with specific growth factors and a *Coll1a1* siRNAs (50 nM) association leads to the in vitro synthesis of a hyaline-type neocartilage whose chondrocytes present an optimal phenotypic index similar to that of healthy, differentiated chondrocytes. Our results lead the way to setting up pre-clinical trials in horses to better understand the reaction of neocartilage substitute and to carry out a proof-of-concept of this therapeutic strategy on a large animal model.

Keywords Horse · Mesenchymal stem cells · Chondrocytes · Bone marrow · Cartilage engineering · RNA interference · Osteoarthritis · Chondral defects · Chondrogenesis · Extracellular matrix

Introduction

Hyaline articular cartilage is a highly specialized connective tissue covering the articular surfaces of bone. This tissue is mainly composed of one major cell type, chondrocytes, which synthesize an abundant extracellular matrix (ECM) and represent only 1–2% of the total tissue volume [1]. Mesenchymal stem cells (MSCs) are also present in cartilage, in the synovial membrane and synovial fluid, and provide cartilage cell renewal [2, 3]. The ECM of this tissue consists mostly of type II, IX, XI collagens and aggrecan [1]. Additionally, although they have low metabolic activity, chondrocytes regulate cartilage homeostasis in response to micro-environmental signals. In a physiological state, there is a fine-tuned balance between the signals leading to tissue anabolism, in particular regulated by growth factors — such as the members of the transforming growth factors (TGF) family (bone morphogenetic proteins (BMPs), TGF- β s) — and those governed by pro-inflammatory cytokines — such as interleukin-1 (IL)-1 and tumor necrosis factor- α (TNF)- α , which cause the degradation of the ECM through increased synthesis and activation of several proteases, including matrix metalloproteinases (MMPs) and aggrecanases (for review, [4]). In this regard, the serine protease HtrA1, which is overexpressed in osteoarthritis (OA), also plays a crucial role in the degradation of cartilage by inducing the proteolysis of aggrecan and causing a decrease in the accumulation of glycosaminoglycans [5]. In

addition, HtrA1 appears to induce the degradation of TGF- β receptors, responsible for the pro-chondrogenic signals during endochondral ossification and in the maintenance of the chondrocyte phenotype in cartilage during adulthood ([6]; for review [4]).

At the onset of OA, the most multifactorial degenerative human osteoarticular disease worldwide, an imbalance of cartilage homeostasis occurs, leading to exacerbated tissue degradation, exposure of bone and severe pain. In the early stages of the disease, chondrocytes synthesize a fibrocartilage that consists mainly of type I collagen, the major specific phenotypic marker of the dedifferentiated hyaline cartilage and OA [7]. Type I collagen does not have the same biomechanical properties as type II collagen, and degrades rapidly. In addition, due to the synthesis of matrix components and the atypical, adverse inflammatory micro-environment, chondrocytes show increased metabolic activity before entering apoptosis, which exacerbates cartilage degradation [8]. In the most advanced stages of OA, articular cartilage is completely destroyed. Current human therapeutic strategies are very limited and can be described as allopathic treatments that do not solve the causes of pain, and ultimately by prosthetic surgery for larger joints, which are the most commonly affected by OA [9, 10]. Therefore, this is a high incentive for developing new therapeutic strategies in human medicine, including the autologous chondrocyte transplantation (ACT) method, introduced by [11]. ACT involves sampling healthy cartilage in a non-loading region of the joint, amplifying the isolated chondrocytes in vitro, and reimplanting them under a periosteum membrane in the cartilage defect [11]. However, although this technique provides a significant advance in the treatment of OA, it has some limitations, such as the low number of chondrocytes obtained after in vitro culture and cell dedifferentiation. Amplified chondrocytes synthesize ECM made up of a large proportion of type I collagen, leading to fibrocartilage formation in vivo that is rapidly degraded, and in addition, some post-operative complications appear, including a tendency of the neo-construct to detach and degrade [12].

Subsequent ACT generations have focused on improving this procedure in four ways. First, various studies have examined the use of MSCs to overcome the low proliferation rate when using autologous chondrocytes [13]. Second, culturing these cells in a biomaterial instead of in a monolayer culture provides a directly implantable cartilaginous substitute with characteristics similar to healthy articular cartilage [14]. For example, collagen sponges are commonly used in cell and tissue engineering of cartilage and are naturally degraded by collagenase and serine proteases a few weeks after implantation in articular site. Furthermore, their use, in association with chondrocytes or MSCs, increases the synthesis of type II collagen and aggrecan compared with cells cultured in monolayer [15]. Third, growth factors also play a key role. The use of

BMP-2 at low concentrations during the chondrocyte amplification phase ensures maintenance of a chondrocyte phenotype characterized by a greater synthesis of type II collagen and aggrecan in the newly synthesized ECM [15]. Similar effects are found with human bone marrow (BM) MSCs, but also requires the use of a more complex growth factor cocktail. Thus, the use of TGF- β 1 is necessary to obtain differentiated chondrocytes [16]. However, the use of TGF- β in vitro induces the expression of type X collagen, which is not found in hyaline articular cartilage and is the main marker of chondrocyte hypertrophy [17]. To overcome this drawback, the use of fibroblast growth factor (FGF)-2 during the in vitro chondrogenesis of MSCs has been shown to induce inhibition of the expression of *Coll10a1* mRNA concomitantly to that of *Col2a1* [18]. Alternatively, hypertrophy can be controlled by using hypoxia. Low oxygen tension decreases the expression of type X collagen in BM-MSCs undergoing differentiation [19]. Moreover, the use of hypoxia mimics the chondrocyte micro-environment in articular cartilage. The culture of human articular chondrocytes under hypoxia increases the expression of *Sox9*, *Col2a1* and *Acan* and decreases the expression of *Colla1*, *Colla2* and *Col3a1* compared with normoxia [15, 20]. Fourth, some studies have explored the use of RNA interference (siRNA) techniques to increase the functional index of differentiated chondrocytes [15, 21, 22]. In these strategies, the goal is to decrease the in vitro synthesis of proteins that are atypical in hyaline cartilage to optimize the phenotype of the cells that are subsequently reimplanted in situ.

Thus, a method was developed in the laboratory that combines all four approaches to improve the original ACT technique. Our previous studies have shown that the use of human MSCs from the BM cultured in a type I/III collagen sponge under hypoxia and in the presence of BMP-2 and TGF- β 1 for 14 days leads to the production of an implantable hyaline-type cartilage substitute. Furthermore, the use of siRNAs directed against *Colla1* mRNA leads to a partial inhibition of the expression of this transcript, and a sharp decrease in type I collagen protein production, improving the functional index of the neocartilage generated in vitro [15, 21, 23, 24].

The proof-of-concept must be now developed in vivo in a pre-clinical animal model. Thus, in the context of the development of therapies to treat OA, the horse (*Equus caballus*) is a model of choice because its cartilage is similar to that of humans in terms of structure, thickness and cellularity [25, 26]. In addition, competition horses can be compared to human athletes, and the first known study comparing equine cartilage defects to those of humans goes back almost a century ago [27]. During physical exercise, the horse's joints are extremely solicited, and cartilage defects can appear, causing pain and chronic standing. Ultimately, poor management often leads to the onset of OA, causing significant pain and a sharp decline in the motor abilities of the horse [28]. Thus, the development of therapeutic strategies can benefit not only horses

for the treatment of equine cartilage lesions, but also for humans due to the strong similarities between their tissues. Therefore, approaches similar to those used to treat the pathology in humans are found in veterinary (equine) clinical medicine.

The overall objective of this study is to transfer the protocol of human BM-MSC differentiation to equine BM-MSCs. To do so, the MSCs were isolated from horse sternum samples and amplified. Cells were first checked that they met the three International Society for Cellular Therapy (ISCT) criteria for MSCs: ability to adhere to a plastic culture surface, expression of a panel of characteristic surface proteins, and multipotent capacity to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes [29]. Then, these cells were processed according to the protocol originally developed for human MSCs [24], to study the quality of the newly synthesized ECM in terms of mRNA species and matrix proteins typical and atypical of hyaline articular cartilage. The absence of terminal differentiation into osteoblasts, as well as the abundance of MMPs was studied. Moreover, an RNA interference strategy targeting *Colla1* and *Htra1* transcripts, two markers overexpressed in OA, was established to assess their usefulness for increasing the functional index of equine chondrocytes derived from BM-MSCs.

Material and Methods

Cell Isolation and Cell Culture

All samples of bone marrow and cartilage were collected at the « Centre d'Imagerie et de Recherche sur les Affections Locomotrices Equines » (CIRALE, Goustranville, France). The equine BM was collected from sternal puncture in a cohort of horses with ages ranging from 2 to 4 years. The volume of bone marrow collected was from 30 to 40 ml. The BM samples were collected into sterile flasks containing 40 ml of citrate phosphate dextrose anticoagulant, stored at room temperature, and processed within 1 to 2 h after collection. To isolate mononuclear cells (MNCs), each MSCs unit was diluted 1:1 with phosphate-buffered saline (PBS) and carefully mixed with Ficoll-Paque PREMIUM (GE Healthcare Bio-Sciences) medium. After density gradient centrifugation at 400 \times g for 30 min at room temperature, MNCs were washed once with PBS. MSCs-derived MNCs were seeded in culture flasks in low glucose-Dulbecco's modified Eagle Medium (LG-DMEM; Invitrogen) containing 30% fetal calf serum (FCS, Invitrogen Life Technologies), 10^{-7} M dexamethasone (Sigma-Aldrich) and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. A cocktail of antimicrobials composed of 100 IU/ml of penicillin, 100 μ g/ml of erythromycin, and 0.25 mg/ml of fungizone was added to all the media used in this study. Non-adherent cells were removed 24 h after initial plating. The

medium was changed twice weekly until adherent cells appeared, defined as passage zero (P0). After the appearance of several colonies in samples, cells were detached using trypsin/EDTA (Invitrogen) and then reseeded at 5000 cells/cm² (passage one, P1). Cell expansion was performed in the LG-DMEM media containing 20% FCS. The culture medium was changed three times per week and cells were passaged at 80% confluency until passage 15 (P15). The absence of bacterial or viral contamination in isolated MSCs was carried out by an external laboratory according to their internal protocols (Labéo Frank Duncombe, Saint-Contest, France).

Equine articular chondrocytes (EAC) were prepared from healthy metacarpal joints. Cartilage samples were cut into small slices, then chondrocytes were isolated by sequential digestion for 45 min at 37 °C with 2 mg/ml of type XIV protease (Sigma) and then overnight at 37 °C with 1 mg/ml of type I collagenase (from *Clostridium histolyticum*; Invitrogen). The cell suspension was filtered through a 70 µm mesh nylon membrane and centrifuged at 200×g for 10 min. The pelleted cells were re-suspended in Trizol (Invitrogen) and RNA extraction was carried out according to the manufacturer's protocol. For Western-blot experiments, small cartilage slices were ground in liquid nitrogen and protein extraction was performed with RIPA buffer. EAC extracts were used in real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western-blot as controls.

To determine the population-doubling level, MSCs are seeded at a concentration of 5000 cells/cm² and trypsinized once a week in order to count them. The population-doubling level was calculated for each passage (from P1 to P15) according to the following equation: population doublings = [log₁₀(NH) - log₁₀(NI)]/log₁₀(2), where NI is the number of inoculated cells and NH is the number of harvested cells. When the cells were cultured in the presence of FGF-2 to determine the population-doubling level, FGF-2 (5 ng/ml, Miltenyi Biotec) was added to the amplification medium previously described.

Immunophenotyping

MSCs (from P3 to P4) were harvested, washed, and resuspended in PBS-sodium azide buffer (0.1%) at a density of 10⁶ cells/ml. Cell suspensions were incubated with monoclonal antibodies for 25 min at 4 °C in a dark room. The following mouse monoclonal anti-human antibodies were used: CD29-Allophycocyanin (APC) (BioLegend), CD44-Phycoerythrin (PE) (IOTest), CD45-Pacific Blue (PB) (AbD Serotec), CD73-APC (Abcam), CD90-Fluorescein isothiocyanate (FITC) (InvestCare), CD105-FITC (Abcam) and type II MHC-RPE (AbD Serotec). The respective mouse isotype antibodies served as controls. These monoclonal antibodies cross with the horse cells, and specificity was verified by passing a blood sample in the cytometer, after isolation of

MNCs. Subsequently, the cells were washed and resuspended in 300 µl PBS-azide. Data acquisition was performed in a Beckman Coulter Gallios flow cytometer (Federative Research Structure ICORE platform, University of Caen Normandy, France) and analyzed with FlowJo Software (TreeStar).

Chondrogenic, Osteoblastic and Adipogenic Differentiation

The capacity of equine BM-MSCs to differentiate in osteogenic and adipogenic lineages was determined at P4. For this purpose, cells were seeded in 6-well plates. All the reagents used in the osteogenic and adipogenic differentiation experiments were purchased from Sigma.

Osteogenic differentiation was initiated when cells reached 50% of confluence in LG-DMEM supplemented with 10% FCS, 10⁻⁷ M dexamethasone, 100 µM ascorbic acid-2-phosphate, and 10 mM β-glycerophosphate. The culture medium was changed once a week and the cells were incubated for 3 weeks. Osteogenic differentiation was assessed by Alizarin red S staining. Briefly, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature, washed once with PBS (pH 4.1) and stained for 20 min with Alizarin red S at room temperature.

Adipogenic differentiation was induced when cells reached 80% confluency. Induction was obtained by using induction medium, which consisted of LG-DMEM supplemented with 10% FCS, 10⁻⁶ M dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine, 0.2 mM indomethacin, and 10 µg/ml recombinant human (rh) insulin. Cells were incubated for 3 weeks. Adipocytes were revealed by intracellular accumulation of lipid vacuoles using Oil red O staining and identified by their bright red color. Briefly, cells were fixed, washed and stained with 0.3% Oil red O in isopropanol and incubated for 10 min at room temperature.

Chondrogenic differentiation was induced when cells were at 90% confluency, the culture medium was substituted with a chondrocyte differentiation medium composed of: Incomplete Chondrogenic Medium (ICM, containing high glucose-DMEM (HG-DMEM), dexamethasone 10⁻⁷ M, ascorbic acid-2-phosphate (50 µg/ml), proline (Merck, 40 µg/ml), sodium pyruvate (Gibco, 1 nM), Insulin Transferrin Selenium (ITS, Sigma, diluted 1%) with BMP-2 (Inductos, 50 ng/ml, 12 mg diboterm alpha, Medtronic BioPharma B.V.) and TGF-β1 (Miltenyi Biotec, 10 ng/ml). This medium was changed twice a week for 14 days. Chondrocytes were revealed with a Alcian blue solution 1% in chloridric acid 1 M (pH 1) for 30 min. The sulfated proteoglycans stained blue.

As negative controls for chondrogenic, osteogenic and adipogenic differentiations, cells were cultured in LG-DMEM supplemented only with 10% FCS.

Chondrogenic Differentiation in 3D

The scaffold was manufactured by Symatèse Biomatériaux (Chaponost, France). These collagen sponges (100% of collagen, 2 mm thickness, 5 mm diameter, corresponding to a volume of 0.04 cm³, around 100 µm pore size) are composed of native type I (90–95%) and type III (5–10%) collagens from calf skin; they are crosslinked with glutaraldehyde to increase their stability. They are sterilized with β-radiation and they do not swell after rehydration.

MSCs were grown for 14 days in this 3D scaffold to induce chondrogenesis according to the following protocol. Briefly, cells were subcultured as monolayers until P3, trypsinized, and suspended in ICM. Cell seeding onto the collagen sponges was performed by dropping 20 µl of the cell suspension on the sponge (5 × 10⁵ cells/sponge) in 96-well culture plates and incubating the plates at 37 °C under 5% CO₂. After 1 h, the cell constructs were transferred to 24-well plates with ICM in the presence or absence of BMP-2 (50 ng/ml) and TGF-β1 (10 ng/ml). Constructs were then cultured in hypoxia (3% O₂) and the medium was changed on days 4, 7 and 11. Sponges were harvested for RNA and protein analyses on day 14. MSCs monolayers before induction were used as controls (day zero, D0). At D0 and D7, MSCs were transfected with a mix of INTERFERin (Polyplus-transfection SA, 6 µl/ml), OptiMEM (Invitrogen, 20% of the total volume of medium) and siRNAs for 10 min at room temperature. siRNAs were used at 5, 25, 50, 100 and 200 nM. Then, the INTERFERin-siRNA complexes were added to the culture medium in which are present the collagen sponges seeded with cells. siRNAs specifically targeted the *Colla1* mRNA (siRNA sequence: 5'-CAGUCACCUUGCAUACAGGA-3', Invitrogen, France), the *Htra1* mRNA (siRNA sequence: 5'-UGGCCAGA GUUGCCUCUUU-3', Eurogentec). A control siRNA was equally used (siRNA sequence: 5'-UUCUCCGA ACGUGUCACGU-3', Eurogentec).

RNA Isolation and RT-qPCR

After treatment, sponges seeded with cells were rinsed once with ice-cold phosphate-buffered saline and total RNA was extracted using Trizol Reagent according to manufacturer's instructions. One microgram of RNA was reverse transcribed into cDNA using reverse transcriptase (MMLV, Invitrogen) and oligodT (Eurogentec). PCR was performed on a StepOnePlus Real-Time PCR Systems using Power SYBR Green PCR (Applied Biosystems), as previously described [23]. Sequences of the primers used are listed in Table 1. Relative gene expression was calculated using the 2^{-ΔΔCT} method and expressed as the mean of triplicate samples. Each sample was normalized to *β-actin*.

Table 1 Primers used for RT-qPCR analysis

Gene	Primer sequence (5'-3') (F: Forward; R: Reverse)
<i>β-actin</i>	F: AGGCACCAGGGCGTGAT R: CTCTTGCTCTGGGCCTCGT
<i>Acan</i>	F: TGTCAACAACAATGCCCAAGAC R: CTTCTTCCGCCCAAAGGTCC
<i>Colla1</i>	F: TGCCGTGACCTCAAGATGTG R: CGTCTCCATGTTGCAGAAGA
<i>Col2a1</i>	F: GGCAATAGCAGGTTACGTACA R: CGATAACAGTCTTGCCCCACTT
<i>Coll10a1</i>	F: GCACCCAGTAATGTACACCTATG R: GAGCCACACCTGGTCATTTTC
<i>Htra1</i>	F: GGACTTCATGTTCCCTCAA R: GTTCTGCTGAACAAGCAACA
<i>Mmp1</i>	F: CGAAGGGAACCCCTCGGTGGGA R: TGGCCTGGTCCACATCTGCTC
<i>Mmp3</i>	F: TGAAGACCCGAACCCTAAACAT R: GAAGACTGGTGATGGCATCAAG
<i>Mmp13</i>	F: TGAAGACCCGAACCCTAAACAT R: GAAGACTGGTGATGGCATCAAG
<i>Ostc</i>	F: AGAGTCTGGCAGAGGTGCAG R: TCGTCACAGTCTGGGTTGAG
<i>Runx2</i>	F: GCAGTTCCAAGCATTTTCAT R: CACTCTGGCTTTGGGAAGAG

Western-Blots

After treatment, sponges containing cells were rinsed once with ice-cold PBS, crushed and total proteins were extracted using the RIPA-lysis buffer with a protease inhibitor cocktail, as previously described [23]. Protein concentration was assessed according to the Bradford colorimetric procedure (Bio-Rad SA). Then, 15 µg of total proteins were separated in 10% polyacrylamide gels containing 0.1% SDS and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, Millipore). Unspecific binding sites of the membranes were blocked with 10% non-fat milk powder in Tris-buffered saline with 0.1% Tween (TBST) for 2 h. Then, membranes were incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-human type I collagen (Novotec), rabbit anti-human type II collagen (Novotec), mouse anti-human type X collagen (Sigma), rabbit anti-human Htra1 (Merck Millipore) or rabbit anti-human β-tubulin (Santa Cruz Biotechnology). The following day, membranes were washed three times, followed by an incubation with HRP-conjugated goat anti-rabbit or mouse IgG antibody (Jackson ImmunoResearch). Signals were visualized with the chemiluminescence method (ECL plus western blotting detection reagent +, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and developed on X-ray film.

Statistical Analysis

All experiments were repeated at least five times with cells coming from different horses (at least 5). Values are reported as means \pm SD or box plots. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney U-test or Student's t test to determine significant differences between two groups. Statistical analyses were done using Prism (Graphpad, San Diego, USA) or Excel 2016 (Microsoft, Redmond, USA). A *P*-value of ≤ 0.05 was considered to be significant.

Results

Isolation of the MSCs from Equine Bone Marrow

Isolations of MSCs from equine BM was performed on a total of 32 strains which were processed from samples excised from horse sternums. Approximately 35 ml of BM was obtained from each horse, and cell clusters (1 to 50 clusters) appeared after 5 to 8 days in all cases, indicating 100% isolation success. A total of 250 vials of cells were stored in liquid nitrogen, at passages ranging from P2 to P5 for cell characterization and future in vitro and in vivo studies. Six strains were randomly selected to count the total cells present in the samples, just after density gradient centrifugation. We obtained an average of 140.1 million cells in the cell pellet, with a viability of 95% before the first seeding in plastic flasks. In parallel, various quality controls were carried out on cell suspensions (Fig. S1), and all cell batches were free of any bacterial or viral contamination, with the exception of four strains that tested positive for type 2 equine herpes virus.

Characterization of the Isolated MSCs

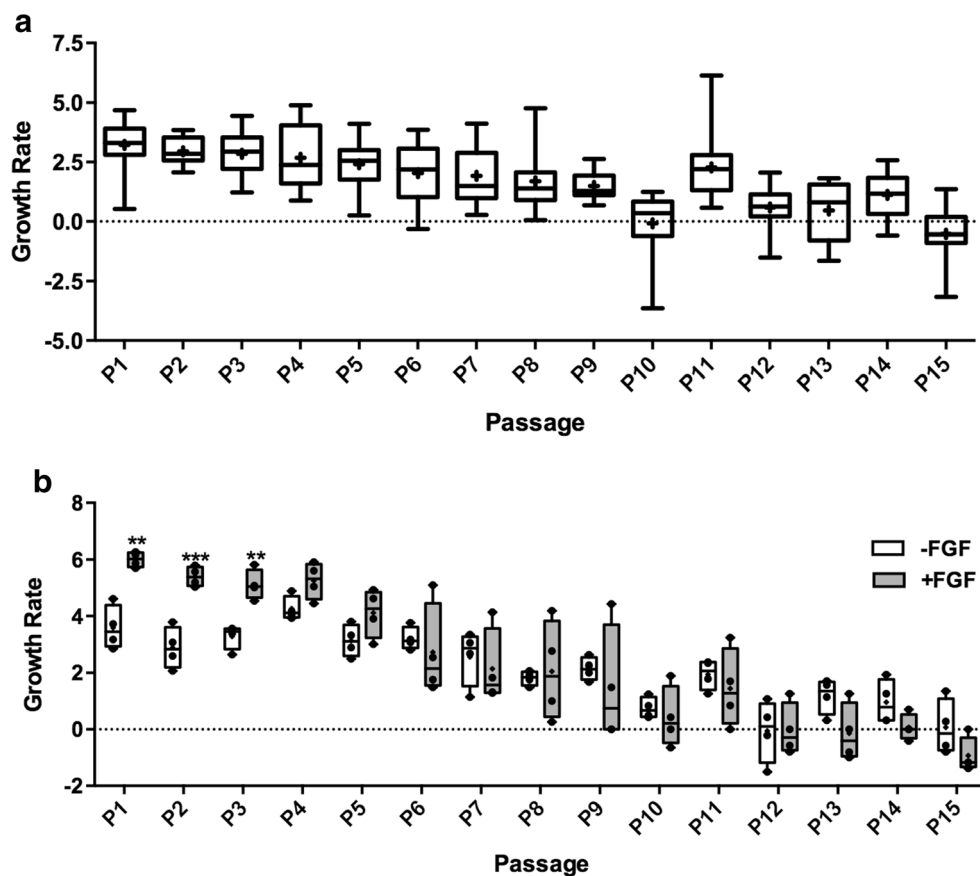
Following the initial isolation of the cells from BM and after the first passage, the proliferative capacity was studied in 19 strains, from passage 1 (P1) to P15 included. To do so, the cells were seeded at 5000 cells/cm² and a trypsin passage was performed weekly. The cells were then counted and re-seeded at the initial concentration to determine their growth rate. Isolated cells showed a relatively high proliferative potential for at least nine passages (Fig. 1A), with approximately three divisions for the cells initially seeded by passage. This proliferative potential was however limited, decreasing with passage number to no cell division by P12 to P15, depending on the strain studied. Four strains were cultured in the presence of FGF-2 in addition to the initial culture medium, containing among other components of the FCS (fetal calf serum). These culture conditions also showed a decrease in the proliferative potential of cells according to passage number, regardless of the culture condition considered (Fig. 1B). This proliferative potential decreased more rapidly when the cells were cultured in the presence of FGF-2. However, addition of FGF-2 led to a very high and highly

significant increase in cell proliferation at early passages. Thus, between P1 and P4, approximately six cell divisions took place in the presence of FGF-2, whereas less than four divisions occurred between P1 and P3 when the cells were cultured in the presence of FCS alone.

Immunophenotyping of the cells was carried out at P3 and P4 to determine the presence or absence of various surface markers in the MSCs. These experiments were performed according to the human antibodies available on the market. A total of 14 strains were studied (Fig. 2A), including 5 of which were at P3 (Fig. 2B) and 9 at P4 (Fig. 2C). In addition, a blood sample was collected on two horses along with the bone marrow sample to determine the cellular profile of the nucleated cells in the blood, and verify antibody specificity. All the results obtained are summarized in Fig. 2D. Expression of CD29, CD44 and CD90 was detected for all cell populations of each strain; expression of CD45 and type II MHC were not detected. CD73 was detected in P3 cells, but its expression appeared to decrease or even disappear for some strains in the following passage (82% of the cells expressed CD73 at P3, but only 31% at P4). Similarly, CD105 was weakly expressed by the cell population studied at P3 (25% of the population), and its expression tended to disappear entirely at P4. Blood samples showed several cell sub-populations, and only some expressed CD29 (65%), CD44 (84%), CD73 (62.4%), CD105 (24.2%) and type II MHC (27.2%). CD45 was not detected in the samples studied. Furthermore, our results indicate a large variation in the sub-populations that express these surface markers, as indicated by the presence of significant standard deviations for each of the antibodies used.

To characterize MSCs, and determine their stem cell character, the analysis of their multipotency was performed in monolayer cultures, using conventional protocols for stem cell differentiation into osteoblasts (Fig. 3A), adipocytes (Fig. 3B) and chondrocytes (Fig. 3C). Our data show a strong potential for the cells to differentiate significantly and in a reproducible manner into osteoblasts ($n = 9$), highlighted by the presence of large-sized calcium deposits upon Alizarin red staining. Control cultures (grown in amplification medium) showed no staining. This significant occurrence of ECM mineralization led to some disappointments during cell culture, because the cell layers tended to detach. Differentiation into adipocytes was also verified and validated ($n = 10$): oil Red O staining showed the presence of cytoplasmic lipid droplets when the cells were cultured with the differentiation medium. Finally, regarding differentiation into chondrocytes, our data indicate that when cultured in normoxia, in monolayers and in the presence of BMP-2 + TGF- β 1, the MSC proliferative potential increased and their morphology changed compared with the cells cultured in the control medium, without leading to high synthesis of sulfated proteoglycans. In some strains, Alcian blue staining revealed the presence of a light bluish color. All of these results therefore lead us to conclude that

Fig. 1 Proliferative capacity of equine MSCs isolated from BM. The MSCs from the BM were isolated and seeded at 5000 cells/cm². A passage with trypsin-EDTA was performed every 7 days, followed by counting and re-seeding at the same cell density, without (A; $n = 19$) or with (B; $n = 4$) FGF-2 (5 ng/ml). The significance of the results was evaluated using Student's t -test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)



the cells isolated from equine BM samples meet the various criteria for MSCs, although the potential for chondrogenic differentiation appeared very limited. A more elaborated protocol is required to test whether this limited potential comes from the cell population itself or from an inappropriate protocol.

Chondrogenic Differentiation Potential of Equine BM-MSCs when Cultured Using the Protocol Originally Developed for Human Cells

To verify the capacity and feasibility of transferring our procedure for human MSC differentiation into chondrocytes to the equine model, we used a more sophisticated protocol. More specifically, equine BM-MSCs were cultured in type I/III collagen sponges under hypoxia in ICM medium. This medium was enriched with BMP-2 and TGF- β 1 (B + T). Thus, in B + T culture conditions, there was a significant increase in *Col2a1* mRNA steady-state amounts compared with undifferentiated cells (D0) or with cells cultured without BMP-2 and TGF- β 1 (ICM) (Fig. 4A). Furthermore, the mRNAs levels were quantitatively of the same order of magnitude as those from healthy equine articular chondrocytes (EACs). Almost identical results were obtained for *Acan* mRNA amounts (Fig. 4D). However, the use of the B + T

culture conditions also led to a strong (20-fold) increase in *Colla1* mRNAs levels (Fig. 4B). The *Col2a1:Colla1* ratio, a ratio that indicates the quality of the newly synthesized ECM and therefore of articular cartilage produced by MSCs, nonetheless increased significantly, being multiplied by a factor of 1000 compared with MSCs grown in the absence of chondrogenic factors (i.e. B + T) (Fig. 4C). However, this ratio was slightly lower than that of EACs because equine chondrocytes synthesize almost no type I collagen. The relative expression of *Htra1* followed the same trend as *Colla1* mRNA, and the transcripts of this serine protease increased three-fold (Fig. 4E). Regarding the expression of *Runx2* mRNA, which represents an early marker of osteogenesis, it increased slightly in the B + T conditions compared to the ICM control. Nevertheless, the effects were not statistically significant (Fig. 4F). In contrast, no transcripts of *Oste*, the terminal differentiation marker of osteogenesis, were detected (Fig. 4G). The study of *Mmp13* mRNA expression, which is considered as the latest marker of chondrocyte hypertrophy, showed that our protocol does not cause hypertrophy of equine BM-MSCs (Fig. 4H). Furthermore, our data indicated that this experimental procedure does not induce an increase in *Mmp1* or *Mmp3* mRNAs levels, two markers of cartilage degradation (Fig. S2). In summary, our results show that the study of mRNAs encoding different specific and nonspecific

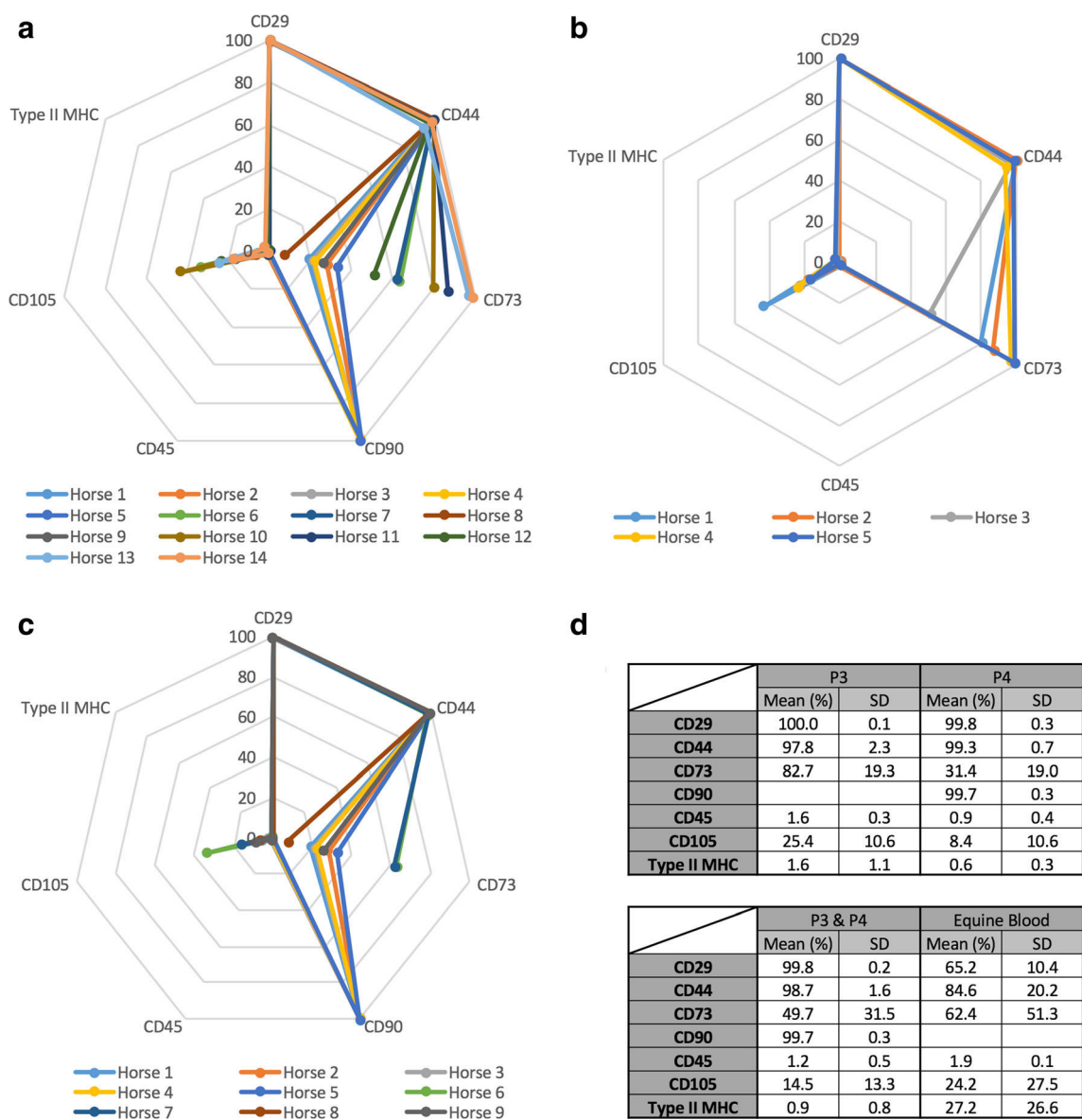


Fig. 2 Immunophenotyping of the isolated and amplified MSCs. The cells were detached and suspended at 10 million cells per ml in PBS. They were incubated with the indicated specific monoclonal antibodies, or relevant anti-IgG isotype controls for 30 min at 4 °C in a dark room. The cells were then washed and resuspended in PBS. The acquisitions involved a minimum of 10,000 events collected for each analysis. The

results are expressed as the mean of the values obtained for each run. The results are presented as radar (A-C) independently of passage (A; $n = 14$ except for CD90, $n = 5$), in P3 (B; $n = 5$), in P4 (C; $n = 9$ except for CD90, $n = 5$) or as a summary (D). CD: cluster of differentiation; SD: standard deviation; MHC: major histocompatibility complex

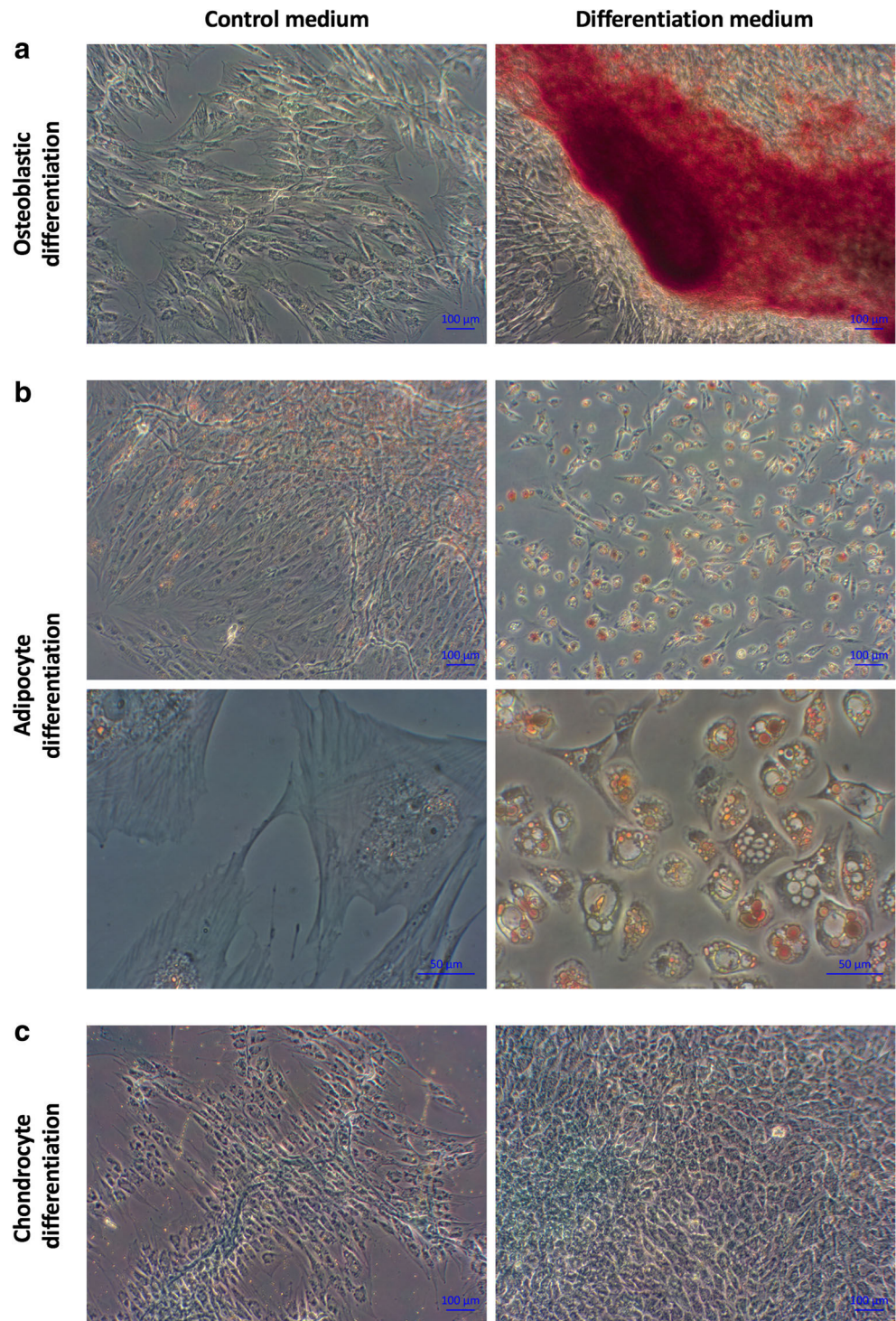
markers of articular cartilage, after differentiation of equine MSCs into chondrocytes by using our protocol, leads to a phenotype similar to that found in the EAC, despite enhanced expression of *Col1a1* and *Htra1* (Fig. 5).

Transfection of *Col1a1* and/or *Htra1* siRNAs to Improve the *Col2a1:Col1a1* Functional Index of Chondrocytes Derived from BM-MSCs

In an attempt to obtain a biological cartilaginous substitute devoid of type I collagen and Htra1 mRNA and protein

expression (see below for proteins, Fig. 9), we developed an RNA interference approach consisting of siRNA transfection. Before considering such strategies, it is necessary to verify that the transfection of the siRNA itself does not cause side effects, namely an off-target effect. Thus, the BM-MSCs from five horses underwent the same culture protocol as described above, but were also transfected with control siRNA at different concentrations (5, 25, 50, 100 and 200 nM) for 14 days. The siRNA transfection did not cause any changes in *Col2a1* or *Htra1* mRNAs levels in the B + T condition compared with the condition without control siRNA (-) (Fig. 6a and b). In

Fig. 3 Multipotency ability of MSCs to differentiate into osteoblasts (a), adipocytes (b) and chondrocytes (c). The cells were amplified at P4 and cultured at 50% confluence with media specific for osteoblastic ($n = 9$), adipocyte ($n = 10$) or chondrogenic ($n = 6$) differentiation (right panel) or amplification medium (left panel) for 14 days. After fixing with paraformaldehyde, cells were stained with Alizarin red, Oil Red O and Alcian blue to respectively reveal the presence of calcium deposits, lipid droplets and sulfated proteoglycans



contrast, a weak nonsignificant increase in *Colla1* mRNA levels was observed, starting from the concentration of 25 nM, when the cells are cultured with or without B + T (Fig. 6c). Therefore, the *Col2a1:Colla1* ratio increased in a dose-dependent manner between 5 and 50 nM control siRNA transfected when the cells were cultured in ICM, whereas it was not modulated when BM-MSCs are incubated in the

presence of chondrogenic factors. Chondrogenic factors thus remains necessary to obtain a *Col2a1:Colla1* ratio similar to that of EACs (Fig. 6d). In conclusion, transfection of control siRNA does not appear to cause any significant variation in the studied mRNA amounts.

Thereafter, siRNAs targeting *Colla1* and/or *Htra1* mRNAs were transfected at various concentrations on the

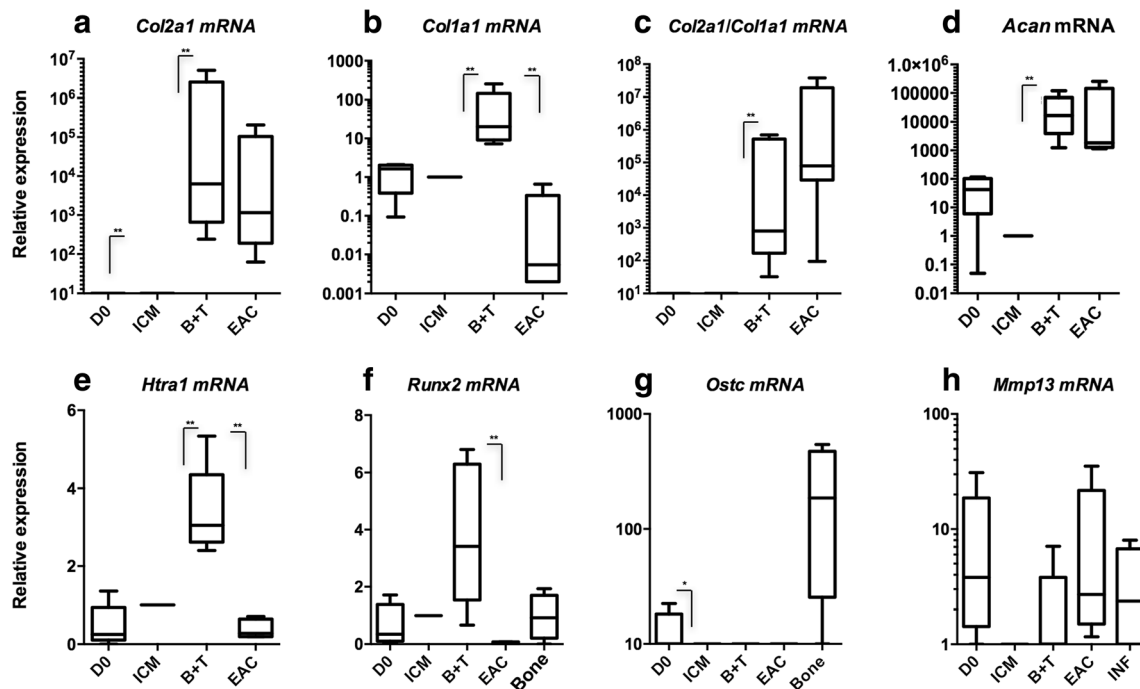


Fig. 4 Effect of culture of equine BM-MSCs under hypoxia, within type I/III collagen sponges in the presence of BMP-2 and TGF- β 1 on the steady-state mRNA amounts of specific and nonspecific markers of chondrocytes. Equine MSCs derived from BM were amplified and seeded in type I/III collagen sponges at P4 ($n = 5$). They were then cultured under hypoxia (3% O₂) for 14 days in Incomplete Chondrogenic Medium (ICM) with or without BMP-2 (50 ng / ml) and TGF- β 1 (10 ng / ml) (B + T). The D0 condition corresponds to MSCs cultured in monolayer at P4 in the amplification medium, whereas the

equine articular chondrocyte (EAC) condition corresponds to the mRNAs extracted from EACs obtained after enzymatic digestion of healthy cartilage. mRNAs were also extracted from equine inflammatory tendon. mRNA levels of *Col2a1* (a), *Col1a1* (b), *Col2a1 / Col1a1* (c) *Acan* (d) *Htra1* (e), *Runx2* (f) *Ostc* (g) and *Mmp13* (h) were estimated by RT-qPCR after normalization versus the β -actin reference gene. The significance of the values was evaluated using the Mann-Whitney test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

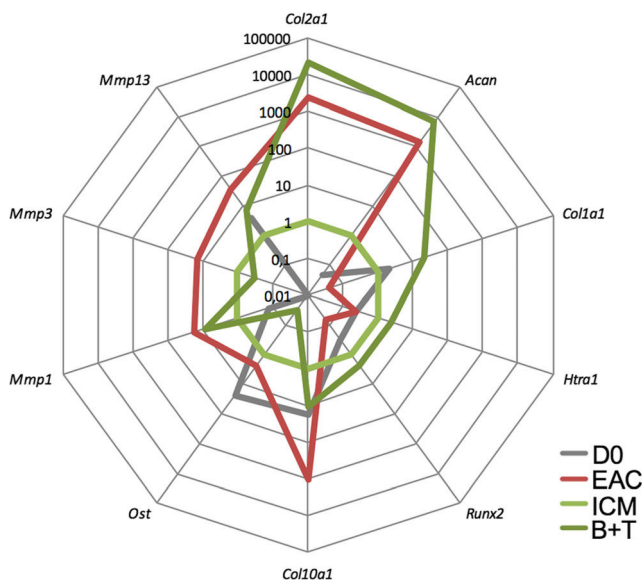


Fig. 5 Effect of culture of equine BM-MSCs under hypoxia, within type I/III collagen sponges with BMP-2 and TGF- β 1 on the steady-state mRNA amounts of markers specific and nonspecific to chondrocytes. The experimental conditions were exactly the same as those described in Fig. 4. The only difference is that the data are represented as a radar in comparison with EAC

same BM-MSC strains at concentrations of 5, 25, 50 and 100 nM. The results were compared with the control siRNA condition at the same concentration. Overall, our data show a high variability in cell response, in particular when considering *Col1a1* (Fig. 7a) or *Htra1* (Fig. 7b). Focusing specifically on the expression of the *Col1a1* mRNAs (Fig. 7a) in the ICM condition, the concentrations of 5 and 25 nM of *Col1a1* siRNA did not cause any knockdown of *Col1a1*. At 50 nM, a modest decrease in the expression of the *Col1a1* messengers was observed in three strains, with values comprised between 90 and 40% of the initial expression in the control siRNA treatment. Similar effects were also found in three strains at a concentration of 100 nM of siRNAs. The simultaneous transfection of *Col1a1* and *Htra1* siRNAs does not lead to an enhanced modulation of *Col1a1* mRNA amounts.

When MSCs were incubated in the presence of chondrogenic factors, transfection of *Col1a1* siRNA caused a more or less marked effect on its target, at concentrations as low as 5 nM, compared with the control siRNA treatment at the same concentration. This effect was modest for three strains, where inhibition was only 10 to 40%, but the decrease rose to 90% for two other strains. This inhibition was only

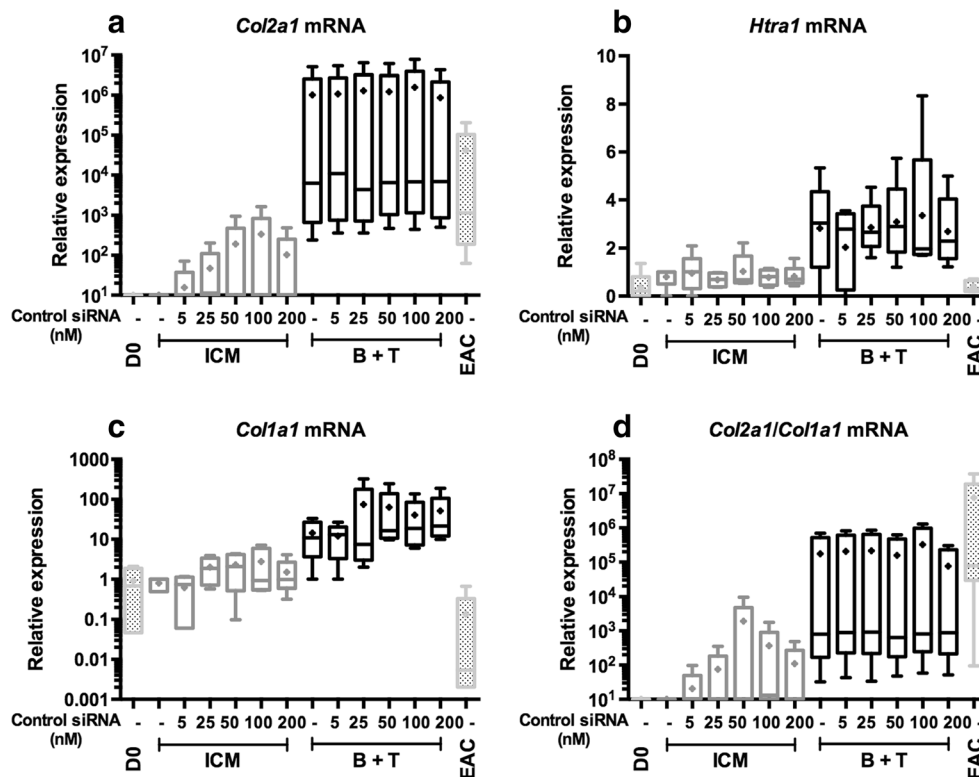


Fig. 6 Effect of the transfection of a control siRNA on the chondrogenic differentiation status of equine MSCs cultured under hypoxia, in type I collagen sponges in the presence of BMP-2 and TGF- β 1. Equine MSCs derived from BM were amplified and then seeded in collagen sponges at P4 ($n = 5$). They were then cultured under hypoxia (3% O₂) for 14 days in the presence of Incomplete Chondrogenic Medium (ICM) supplemented with or without BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- β 1 (10 ng/ml) (B + T). The D0 condition corresponds to MSCs cultured in monolayer at P4 in

the amplification medium, whereas the equine articular chondrocyte (EAC) condition corresponds to the mRNAs extracted from EACs obtained from enzymatic digestion of healthy cartilage. mRNAs levels of *Col2a1* (A) *Htra1* (B) and *Col1a1* (C) were estimated by RT-qPCR after normalization versus the β -actin reference gene. The *Col2a1:Col1a1* ratio is presented in panel D. The significance of the values was evaluated using the Mann-Whitney test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

found for three strains at 25 nM, and for all strains at 50 nM. At 100 nM, off-target effects were observed, with a modest decline in *Col1a1* mRNA amounts for two strains, and an increase in these messengers for the three others. The co-transfection of both *Col1a1* and *Htra1* siRNA diminished the effect of *Col1a1* siRNA on its target. At 5 nM, *Col1a1* expression was reduced for only three strains, with consistently more modest effects, between 10 and 70% of inhibition compared with the control siRNA treatment. This inhibition was consistently less marked relative to simple transfection with *Col1a1* siRNA. Similar effects were found at 25 nM, except for Horse 1 in which the double transfection led to an inhibition of more than 90% of the *Col1a1* messengers compared with the control siRNA treatment. There was no significant decrease in *Col1a1* transcripts during double transfection at concentrations of 50 and 100 nM. In conclusion, when comparing the averages of the five MSC strains assayed, we detected significant inhibition of about 50% of the *Col1a1* mRNA amounts at a concentration of 50 nM when the *Col1a1* siRNA was transfected alone, compared with the siRNA control treatment at the same concentration (Fig. 8). The *Col2a1:Col1a1* ratio therefore increased for all strains

studied at siRNA transfections at 50 nM, but was not consistently enhanced at other transfection molarities (Fig. S3).

The effect of *Col1a1* and/or *Htra1* siRNA transfection on *Htra1* mRNAs (Fig. 7b) also showed high inter-strain variability. However, the effect of *Htra1* siRNA on its target appears to be correlated with the siRNA concentration employed. This effect appeared to vary less when the cells were simultaneously transfected with *Col1a1* and *Htra1* siRNAs in the B + T condition. Moreover, in the presence of these chondrogenic factors, transfection of 5 nM of *Htra1* siRNA led to a decrease in the expression of the target by approximately 50% compared with the control siRNA condition. Similar effects, although usually smaller, were observed at concentrations of 25 and 50 nM. In contrast, at 100 nM, *Htra1* siRNA had an effect on its target in all strains, with inhibition of the targeted mRNA of 20 to 70% compared with the control siRNA treatment. Interestingly, relatively similar effects were obtained with the *Col1a1* and *Htra1* siRNA double transfection. Furthermore, no significant changes in the steady-state amounts of *Runx2* mRNAs were observed, regardless of the considered transfection treatment (Fig. S4).

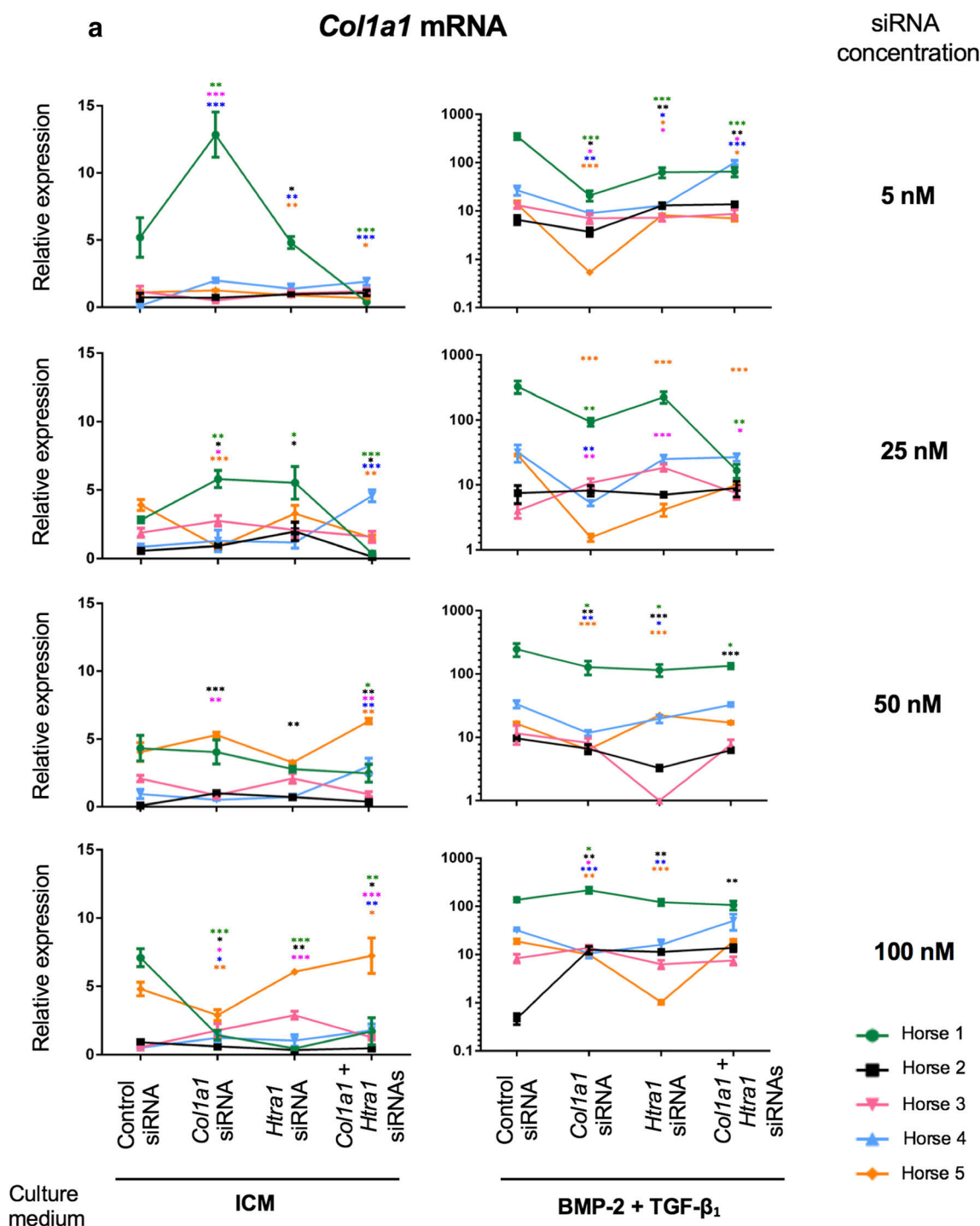


Fig. 7 Effect of *Col1a1* and/or *Htra1* siRNAs on the steady-state mRNA amounts of *Col1a1* (a) and *Htra1* (b) during the differentiation of equine MSCs into chondrocytes. The differentiation of MSCs from equine bone marrow into chondrocytes was performed by incubating the cells in type I/III collagen sponges, under hypoxia (3% O₂) in the presence or absence of BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- β 1 (10 ng/ml) for 14 days. The MSCs

were transfected with a control siRNA or a *Col1a1* and/or *Htra1* siRNA, used alone or in combination, at various concentrations (5, 25, 50 and 100 nM). mRNA levels of *Col1a1* (A) and *Htra1* (B) were estimated by RT-qPCR after normalization versus the β -actin reference gene. The significance of the values was evaluated using Student's *t*-test for each strain individually (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001)

Our data on mRNAs encoding specific and nonspecific markers of articular cartilage, after chondrogenic differentiation of equine MSCs, led to a phenotype close to that found in

EACs (see Figs. 4 and 5; Fig. S2). We then analyzed protein expression by Western blot and demonstrated that the mRNA data were correlated with protein levels in a reproducible

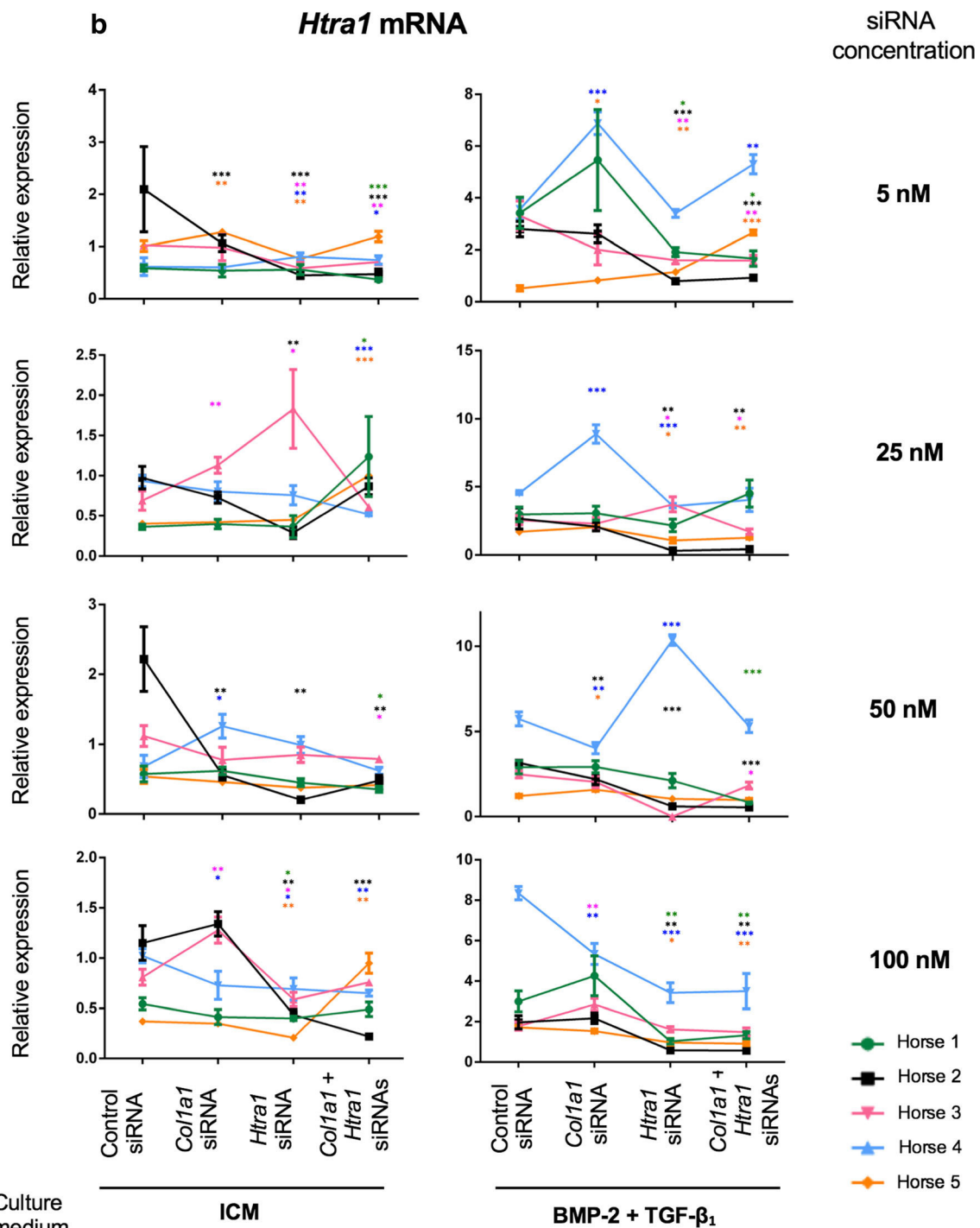


Fig. 7 (continued)

manner (Fig. 9). With the three strains tested, the B + T condition invariably led to a highly significant increase in the intensities of the specific bands of immature and mature forms of type II collagen, compared to the D0 condition or the C condition (corresponding to the culture in ICM). Its expression was nonetheless higher in EACs. Similarly, the immature form of type I collagen was detectable when the cells were at an undifferentiated state, but the addition of ICM led to the

appearance of a lower molecular weight form of type I collagen corresponding to the mature form, with a concomitant increase in the protein levels of its immature forms. Incubation of MSCs in the presence of B + T appeared to lead to a partial loss of immature forms of this collagen isotype, and led to its maturation compared with the two previous conditions. In contrast, type I collagen was not detected in EACs. MSCs differentiated into chondrocytes did very

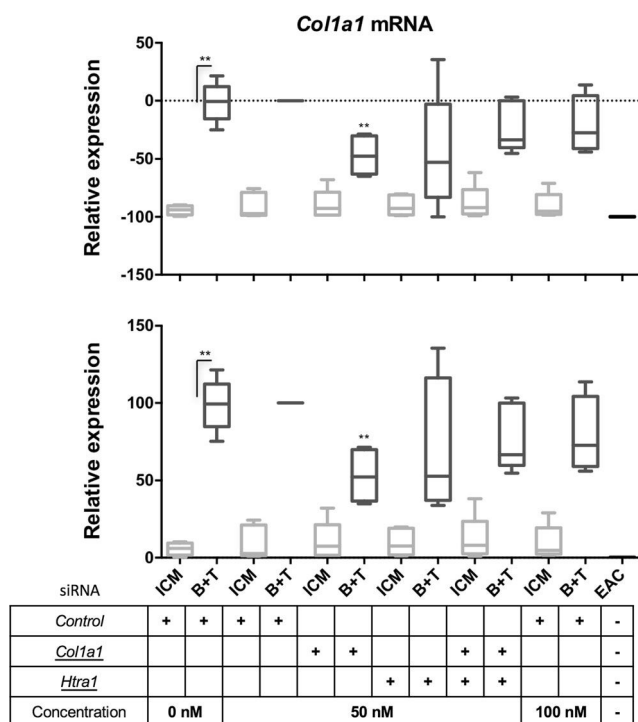


Fig. 8 Effect of *Coll1a1* and/or *Htra1* siRNAs on *Coll1a1* mRNAs during the differentiation of MSCs into chondrocytes. The differentiation of MSCs from equine bone marrow in chondrocyte was investigated in collagen sponges, under hypoxia (3% O₂) with or without BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- β 1 (10 ng/ml) (B + T and ICM respectively) for 14 days ($n = 5$). The MSCs were transfected with a control siRNA or *Coll1a1* and/or *Htra1* siRNAs, used alone or in combination (50 nM). The *Coll1a1* mRNA levels were estimated by RT-qPCR after normalization versus the β -actin reference gene. The significance of the values was evaluated using the Mann-Whitney test ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$)

weakly express the 59 kDa form of type X collagen expected in denatured-reduced conditions.

Additionally, the culture of MSCs in the presence of ICM induced the expression of HtrA1. Although its expression persisted, it decreased in the B + T condition. In contrast to *Htra1* mRNA levels, the addition of chondrogenic factors did not amplify protein expression — and even decreased it —, although this undesirable protease remained nonetheless weakly expressed. All other RT-qPCR results experiments confirmed the protein expression of the various components of the newly synthesized ECM. Moreover, the undesirable expression of type I collagen and HtrA1 remained. Therefore, it would be appropriate to try to limit the expression of these two markers to obtain a cartilaginous substitute more similar to hyaline-type cartilage.

To attempt to correlate the data obtained in RT-qPCR experiments on the effects of *Coll1a1* and *Htra1* siRNAs, Western blotting was performed on three MSC strains (Fig. 9). Once again, our results confirm some variability between each strain studied, and are illustrated by several Western blots representative of the effects obtained on each

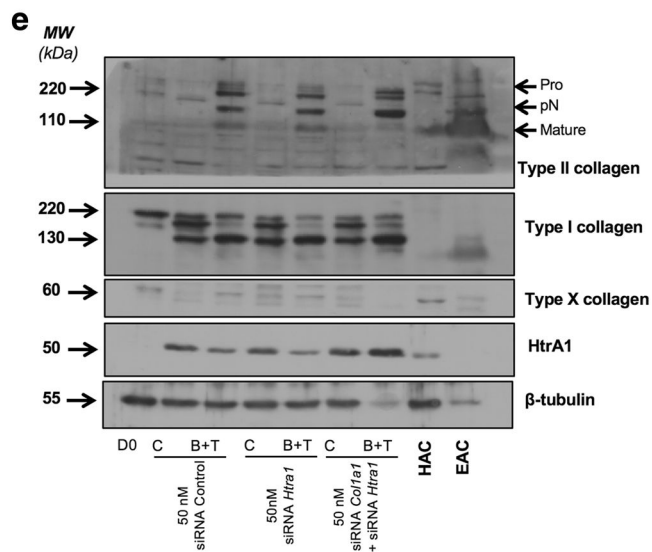
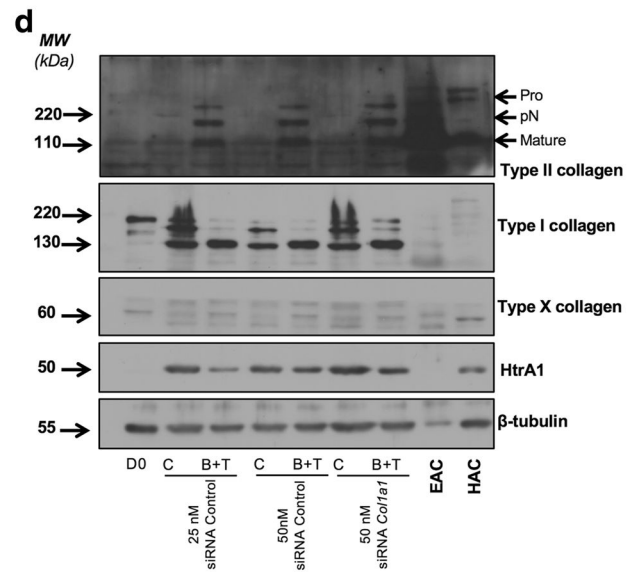
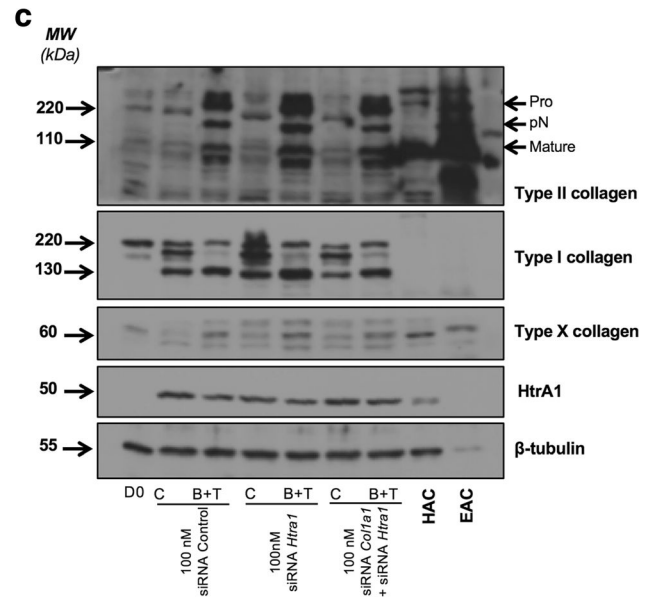
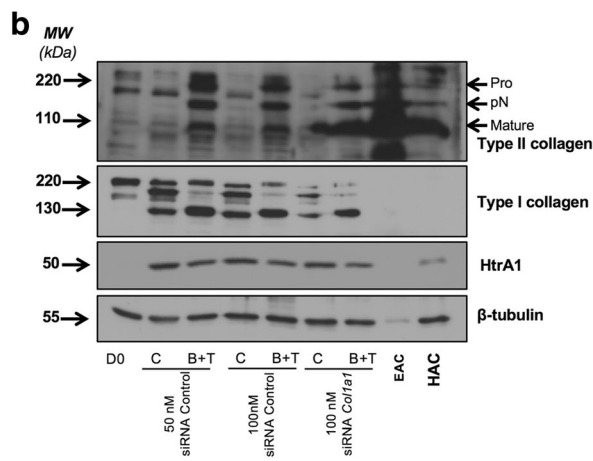
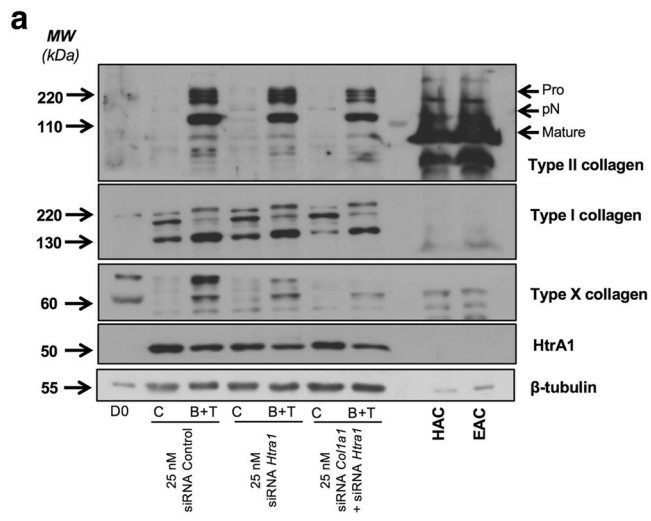
of the three MSCs strains. We focus on the B + T culture conditions, because these conditions are conducive to the differentiation of BM-MSCs into chondrocytes (see above). For the first strain, our results show that the transfection of 25 nM of a *Htra1* siRNA led to a decrease in HtrA1 expression (Fig. 9a). This effect was also observed, or slightly amplified, upon the transfection of both *Coll1a1* and *Htra1* siRNAs simultaneously compared with the control siRNA treatment at the same concentration. Moreover, this double transfection led to a decrease in the specific band of the mature form of type I collagen (130 kDa), although we did not observe intensities comparable to those found in the ICM conditions, in human cartilage or in EACs. The two bands of higher molecular weights, corresponding to the immature forms of type I collagen, appeared to be slightly decreased upon siRNAs transfection. Furthermore, this double transfection appeared to generate a weak off-target effect on type II collagen, leading to a modest decrease in its expression. However, type II collagen was not modulated by a simple *Htra1* siRNA transfection compared to the control siRNA treatment. Once again, there was no evidence of chondrocyte hypertrophy in these culture conditions, highlighted by the analysis of type X collagen expression which is very weak after a longer exposure of the autoradiographic films.

For the second strain studied (Fig. 9b), transfection in B + T conditions with the *Coll1a1* siRNA at 100 nM led to a sharp decrease in protein levels of immature forms of type I collagen, and a more measured decline in its mature form. In parallel, the inhibitory effect of the combination B + T on HtrA1 appeared amplified by this transfection. Finally, these desired effects were also associated with an increase in the mature form of type II collagen, compared with the control siRNA conditions.

For the third strain studied (Fig. 9c), the results were less clear-cut. *Htra1* siRNA alone or in combination with *Coll1a1* siRNA at 100 nM neither modulated significantly protein expression of type I collagen or HtrA1.

At 50 nM, the *Coll1a1* siRNA exerted similar effects on type I collagen as that described for simple transfection at

Fig. 9 Effect of *Coll1a1* and/or *Htra1* siRNAs on cartilage ECM proteins synthesis. The differentiation of MSCs from equine bone marrow into chondrocytes was induced in collagen sponges, under hypoxia (3% O₂) with or without BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- β 1 (10 ng/ml) for 14 days ($n = 3$, representative experiments are shown). The MSCs were transfected with a control siRNA or *Coll1a1* and/or *Htra1* siRNAs, used alone or in combination (A: 25 nM; B, C: 100 nM; D, E: 50 nM). The sponges were removed and crushed. The total protein extracts were separated by electrophoresis on a 10% acrylamide gel in denaturing conditions. The proteins were then transferred onto a PVDF membrane and then incubated with the anti-collagen II primary antibody, anti-collagen I, anti-collagen X, anti-HtrA1 or anti- β -tubulin. The molecular weight marker (MW, kDa) is indicated on the left side of the panels. D0: stem cells grown in amplification medium; HAC: human articular cartilage; EAC: equine articular cartilage



100 nM (Fig. 9d), or in combination with the *HtrA1* siRNA (Fig. 9e), except that it no more provokes a decrease on HtrA1 when the co-transfection of the siRNAs was done, indicating an off-target effect on HtrA1 expression.

In all these conditions, the effects of *Colla1* and *HtrA1* siRNA transfections, alone or in combination, had a beneficial effect on type II collagen expression. Therefore, transfection of these siRNAs always increased the functional index of the neocartilage produced in vitro.

Moreover, we always observed the positive effect of chondrogenic factors compared with ICM, on type II collagen and HtrA1. To support the different results presented here, additional gels from these strains are presented and show that the effects reported here are reproducible (Fig. S5).

The protocol designed in our study not only induced chondrocyte differentiation of MSCs from equine BM, but also decreased — without completely eliminating — the expression of protein markers atypical of hyaline articular cartilage. In conclusion, the best conditions combine culture conditions that include B + T for a positive effect on type II collagen expression and an inhibitory effect on HtrA1 synthesis and *Colla1* siRNA transfection at 50 nM to knockdown type I collagen protein to obtain an improved functional chondrocyte index.

Discussion

The general objective of this study was to provide a proof-of-concept that MSCs from equine BM can differentiate into chondrocytes with the protocol originally developed for human MSCs [24]. The first essential step for the success of this study was to isolate MSCs from equine BM, and check the quality of the isolated cells. The isolation protocol used was consistently successful, because MSCs were able to form clones in vitro. When cultured at low density, the cells adhered to plastic and formed individual colonies [30]. Perfect isolation success has also been reported in various studies on human BM-MSCs, indicating that this cell source is advantageous relative to other MSC sources. Isolation success is typically low for other sources of MSCs; for example MSCs from umbilical cord blood give an isolation success of around 30% [31]. One disadvantage of human BM-MSCs is that the cells are generally derived from elderly patients, and age inevitably leads to the occurrence of various alterations at the cellular level and thus lower quality cells [32]. In our study, the horses sampled were relatively young, around 4 years old, which corresponds to the end of growth phase in horses. Furthermore, our isolated cells were free of viral and bacterial contamination, with the exception of type 2 equine herpes virus, for which half of the samples tested positive. Generally speaking, this virus appears to be ubiquitous in horses: a study carried out in Germany in 1997 showed that

51% of 171 horses included in a cohort study were infected with this virus [33].

After BM-MSC isolation, characterization is necessary to verify that the isolated cells meet MSC criteria. Thus, their proliferative potential was investigated. The MSCs do not have unlimited proliferative potential, and a decrease in growth is usually observed after 20 cell divisions [34]. Furthermore, for safety reasons for their use in medicine, it is generally believed that cells must not remain in the proliferation phase for more than 3 weeks to limit the risks of using senescent cells or cells with an unstable genome [35]. Moreover, the onset of MSC senescence leads to the loss of the differentiation potential, other than osteogenesis [36]. Similar studies performed in the equine model led to similar conclusions [37]. Here, we observed a gradual decline in MSC proliferation, which was correlated with passage number. Beyond nine passages and around 25 divisions, the cells all but ceased proliferating and they stop multiplying after 15 passages. When using FGF-2, the MSCs proliferated more rapidly during the earliest passages, i.e. up to P4 where 24 divisions were detected, whereas only 16 occurred in its absence. However, no significant difference was observed beyond P4, and cells cultured in the presence of FGF-2 seemed to reduce their proliferation at a faster rate and a comparable total number of cells was obtained after 15 passages. Some studies also suggest that the use of FGF-2 during the amplification phase of equine MSCs leads to an increase in their ability to differentiate into chondrocytes [38]. Similarly, another study on chondro-progenitors present in the synovial fluid shows an increase in the expression of specific phenotypic markers of hyaline articular cartilage after amplification in the presence of FGF-2. This amplification phase yielded a larger population of cells after two passages in the presence of FGF-2, without altering the immunophenotyping of the cell population [39]. Experiments to study equine MSCs multipotency amplified in the presence of FGF-2 in the laboratory, however, do not demonstrate an increased capacity of multipotency for isolated cells (data not shown), although the use of this growth factor provided a greater number of cells in a shorter time, thereby saving time for in vivo approaches in the equine model while minimizing the risk of cellular integrity loss or possible contamination. For this reason, our subsequent studies were performed with FCS only.

Immunophenotyping was performed in accordance with ISCT recommendations, by analyzing surface markers described to be characteristics for this cell type and according also to the antibodies available for studies on horse. According to the ISCT, MSCs must test positive for CD44, CD73 and CD90 [29]. It has been shown that equine MSCs express CD44 and CD90, but do not seem to express the CD73 consistently, in contrast to human MSCs [40]. More recently, it has been shown that equine MSCs express CD29, CD44, CD90 and CD105 but not CD14, CD34,

CD73 or type 2 MHC [41]. Our results partly contradict these studies. Although our MSCs expressed CD29, CD44 and CD90, they also expressed CD73 in a passage-dependent manner, and the fraction of the cell population that expressed CD105 was very small. For CD73, its relatively large presence in blood samples suggests that this marker is not specific to equine MSCs, particularly because its expression appears to be reduced in cells between P3 and P4. Nevertheless, this CD is present at higher passages in equine MSCs. Regarding CD105, we cannot conclude on its characteristic presence in equine MSCs, because it was weakly expressed and was also found in comparable proportions in blood samples. However, like CD73, its expression decreased at P4 compared to P3 cells, suggesting nonspecificity for MSCs. Alternatively, mRNA steady-state amounts encoding these surface markers can be quantified to evaluate the quality of the isolated cells [42]. Nevertheless, this approach seems to be insufficient to characterize the cells, because it does not definitively demonstrate the actual presence of surface proteins in the cell population.

We then verified and validated the multipotency of the isolated cells in accordance with ISCT recommendations. We showed that BM-MSCs have a significant potential for osteogenic and adipogenic differentiation. However, chondrocyte differentiation was more difficult to produce and it was not reproducible with a classical, basic protocol, e.g. monolayer culture for 14 days. Furthermore, protocols that are used to test the pluripotency of the MSCs must often be adjusted. For example, Arnhold et al. [43] reached multipotency on equine MSCs by culturing cells in pellets for 3 weeks. However, our data indicate the possibility for the MSCs studied here to follow the three different differentiation lineages.

Potential for MSC differentiation into chondrocytes using chondrogenic factors such as BMP-2 and TGF- β 1 has already been described in the literature [44]. Moreover, these growth factors are also used to induce the re-differentiation of dedifferentiated chondrocytes in vitro [15, 21, 45]. However, these chondrogenic factors can mediate undesirable effects, such as the appearance of chondrocyte hypertrophy. Additionally, at very high concentrations, they lead to osteoblast differentiation of BM-MSCs [46] and BMP-2 (Inductos) is prescribed in bone repair approaches [47]. Beyond these growth factors, some hormones such as 17 β -estradiol promote the synthesis of type II collagen and therefore could be considered as chondrogenic factors in cartilage engineering strategies [48]. However, growth factors appear to have high chondrogenic potential, especially when used in the presence of micro-environmental stimuli such as hypoxia and the culture of cells within a biomaterial. Here, the results obtained on equine BM-MSCs show the efficiency of this protocol, characterized by a great increase in the synthesis of markers specific to hyaline cartilage, effects observed at the mRNA levels as well as the protein level. The *Col2a1* and *Acan* mRNAs

levels were comparable to those found in healthy equine articular chondrocytes. Our protocol therefore appears to lead to an enhanced cellular response compared with that obtained for human BM-MSCs. Moreover, there was a modest increase in the hypertrophy marker *Runx2*, but the expression of type X collagen was almost virtually absent at the protein level, evidence for the absence of a true chondrocyte hypertrophy which was confirmed at the level of *MMP-13* expression. Moreover, a new batch of the same monoclonal antibody from the same manufacturer reveals almost no expression of type X collagen (Fig. S6). Additionally, MSCs samples are composed of a heterogeneous cell population and it remains possible that a very small number of cells undergo hypertrophic maturation. Furthermore, there is no evidence that MSCs undergo osteoblastic differentiation in our procedure.

The approach used here to reduce the amounts of type I collagen and HtrA1 proteins, two undesirable markers overexpressed in OA, is based on RNA interference, specifically using siRNAs. A major challenge in the use of this approach is an off-target effect, whose absence must be verified. Various studies have shown that off-target siRNA effects can take place due to their ability to bind to partial complementary sequences [49] or the entry of these siRNAs in the specific regulatory machinery of the miRNAs [50]. We did not observe any off-target effects when using control siRNA. However, off-target effects were sometimes detected at concentrations greater than 50 nM of *Colla1* and/or *Htra1* siRNAs. Our results suggest that the simultaneous use of both *Colla1* and *Htra1* siRNAs may lead to the rapid onset of off-target effects when employing a high concentration of *Colla1* siRNA. However, in view of our results, the use of BMP-2 and TGF- β 1 invariably decreased the protein levels of HtrA1, a result that contrasts with results on human MSCs. In addition, our results suggest that the use of BMP-2 and TGF- β 1 decreases the protein synthesis of immature forms of type I collagen. It is possible to hypothesize that this treatment with growth factors promotes the maturation of type I procollagen in its mature form and/or inhibits de novo synthesis of intracellular type I procollagen. A recent publication has shown that this phenomenon occurred during the redifferentiation of human articular chondrocytes [51]. During the first week of culture, the chondrocytes synthesizes intracellular type I procollagen which is released into the matrix, then this synthesis is slowed after 14 days of culture and becomes non-existent after 21 days. Only the type I collagen synthesized during the first days of culture remains, while type II collagen synthesis persists [51].

From our data, it may therefore be useful to focus on RNA interference of *Colla1* to prevent type I collagen synthesis in the future and also promote the use of the two chondrogenic factors to decrease HtrA1 expression, minimizing the off-target effects observed at high siRNA concentrations. Another issue raised by the use of siRNAs involves

transfection efficiency. A study looking at the prediction of the transfection efficiency of 398 siRNAs, already demonstrated to be effective, concluded that 91% of the tested siRNAs lead to an inhibition efficiency of the targeted mRNA higher than or equal to 50% [52]. Satisfactory transfection efficiency is generally difficult to achieve, and different siRNAs targeting different sequences of an mRNA species have different efficiencies, requiring numerous experiments to test siRNA efficiency [53]. Our results indicate that our siRNAs were functional on their target, with an optimal *Colla1* siRNA effect observed at concentrations ranging from 5 to 50 nM. In contrast, *Htra1* siRNA seems relatively functional at 100 nM. However, there was high inter-strain variability, and these effects, also detected at the protein level, were concentration-dependent for each strain. These results can be improved by attempting to enhance the transfection efficiency, including testing new, more effective *Colla1* siRNAs. Moreover, in the case of in vivo veterinary clinical trials, it will be necessary to verify the absence of functional siRNAs when the neocartilage substitute is implanted in situ in an articular site. siRNA transfection is used to create a more favorable microenvironment to promote optimal chondrocyte differentiation, to obtain a neocartilage substitute that fuses perfectly with the underlying in situ cartilage. In vivo injected siRNAs appear to be degraded and their half-life is significantly reduced to approximately 1 h, due to rapid degradation by nucleases [54]. Therefore, any siRNAs still present in the biomaterial should be then rapidly degraded.

Finally, our results demonstrate that the protocol originally developed in the human model can feasibly be transferred to the equine model. This model has very important consequences for equine tissue engineering approaches. The equine BM-MSCs show high potential to differentiate into chondrocytes, perhaps higher than that found with human BM-MSCs. Our protocol employing *Colla1* and/or *Htra1* siRNAs is effective. However, clinical trials in equine medicine require adoption of a more streamlined protocol including BMP-2 and TGF- β 1 treatment to enhance type II collagen and aggrecan production and a lower Htra1 expression, and a *Colla1* siRNA (50 nM) transfection to prevent type I collagen production.

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

This research was funded by the French National Research Agency (ANR) and by the Regional Council of Basse-Normandie through the ANR TecSan PROMOCART program to PG (917RB020 and 917RB072 respectively), by the French Ministry of Research and Technology to PG, by two ERDF (European Regional Development Funds) grants to PG and MD (HIPPOCART 1 no. 2897/33535, 917RB148; HIPPOCART 917CB174), by a Regional Council of Basse-Normandie program to PG and MD (HIPPOCART N° 2013-AGRI-236/13P07492, 917CB166), by Fonds Eperon to PG and MD (EQUISTEM, N80-2014, 917CB194), by 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).

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

RC was supported by a PhD scholarship co-financed by the Fonds Eperon and the Regional Council of Basse-Normandie.

MH and MD were recipients of a PhD fellowship from the Regional Council of Basse-Normandie.

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

Authors' Contributions TB was involved in study design, in data collection/assembly and analysis, performed experiments and wrote the manuscript. LB, RC, RR, TGL, MH, MDes, FL, and SJ performed experiments, collected and analysed the data. FL designed and supervised the experiments, provided materials and analysis tools. TB, LB, RC, MDes, SJ and FA were involved in collecting BM-MSCs. FA, JMD, MD and PG were involved in study conception and design, in supervision of the study, in data analysis and interpretation, in writing of the manuscript, and provide the financial support. All authors read and approved the final manuscript.

Compliance with Ethical Standards

Disclosure Statement The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Aigner, T., & Stöve, J. (2003). Collagens—major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *55*, 1569–1593.
2. Marinova Mutafchieva, L., Taylor, P., Funa, K., Maimi, R. N., & Zvaifler, N. J. (2000). Mesenchymal cells expressing bone morphogenetic protein receptors are present in the rheumatoid arthritis joint. *Arthritis and Rheumatism*, *43*, 2046–2055.
3. Nishimura, K., Solchaga, L. A., Caplan, A. I., Yoo, J. U., Goldberg, V. M., & Johnstone, B. (1999). Chondrogenitor cells of synovial tissue. *Arthritis and Rheumatism*, *42*, 2631–2637.
4. 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., & Galera, P. (2014). Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1840*, 2414–2440.
5. Chamberland, A., Wang, E., Jones, A. R., Collins-Racie, L. A., LaVallie, E. R., Huang, Y., Liu, L., Morris, E. A., Flannery, C. R., & Yang, Z. (2009). Identification of a novel Htra1-susceptible cleavage site in human aggrecan: Evidence for the involvement of Htra1 in aggrecan proteolysis in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, *284*, 27352–27359.
6. Oka, C., Tsujimoto, R., Kajikawa, M., Koshiba-Takeuchi, K., Ina, J., Yano, M., Tsuchiya, A., Ueta, Y., Soma, A., Kanda, H., Matsumoto, M., & Kawaichi, M. (2004). Htra1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins. *Development*, *131*, 1041–1053.
7. Benya, P. D., Padilla, S. R., & Nimmi, M. E. (1978). Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell*, *15*, 1313–1321.
8. Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*, 843–854.

9. Filardo, G., Kon, E., Longo, U. G., Madry, H., Marchettini, P., Marmotti, A., Van Assche, D., Zanon, G., & Peretti, G. M. (2016). Non-surgical treatments for the management of early osteoarthritis. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, *24*, 1775–1785.
10. Katz, J. N., Losina, E., & Lohmander, L. S. (2015). OARSI clinical trials recommendations: Design and conduct of clinical trials of surgical interventions for osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, *23*, 798–802.
11. Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., & Peterson, L. (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New England Journal of Medicine*, *331*, 889–895.
12. Brittberg, M. (1999). Autologous chondrocyte transplantation. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, *367*, S147–S155.
13. Danišovič, L., Boháč, M., Zamborský, R., Oravcová, L., Provazníková, Z., Csöbönyeiová, M., & Varga, I. (2016). Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from different tissue sources in respect to articular cartilage tissue engineering. *General Physiology and Biophysics*, *35*, 207–214.
14. Marlovits, S., Aldrian, S., Tichy, B., Albrecht, C., & Nürnberger, S. (2009). Biomaterial for autologous chondrocyte transplantation. *Orthopade*, *38*, 1045–1052.
15. Legendre, F., Ollitrault, D., Hervieu, M., Baugé, C., Maneix, L., Goux, D., Chajra, H., Mallein-Gerin, F., Boumediene, K., Galera, P., & 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 Engineering Part C: Methods*, *19*, 550–567.
16. Murphy, M. K., Huey, D. J., Hu, J. C., & Athanasiou, K. A. (2015). TGF- β 1, GDF-5, and BMP-2 stimulation induces chondrogenesis in expanded human articular chondrocytes and marrow-derived stromal cells. *Stem Cells*, *33*, 762–773.
17. Kafienah, W., Mistry, S., Dickinson, S. C., Sims, T. J., Learmonth, I., & Hollander, A. P. (2007). Three-dimensional cartilage tissue engineering using adult stem cells from osteoarthritis patients. *Arthritis & Rheumatology*, *56*, 177–187.
18. Liu, Y., He, L., & Tian, J. (2013). Effect of basic fibroblast growth factor and parathyroid hormone-related protein on early and late chondrogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells induced by transforming growth factor beta 1. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, *27*, 199–206.
19. Ronzière, M. C. M., Perrier, E. E., Mallein-Gerin, F. F., & Freyria, A.-M. A. (2010). Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells. *Bio-medical Materials and Engineering*, *20*, 145–158.
20. Duval, E., Leclercq, S., Elissalde, J.-M., Demoor, M., Galera, P., & Boumediene, K. (2009). Hypoxia-inducible factor 1 α 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 α -dependent redifferentiation of chondrocytes. *Arthritis & Rheumatology*, *60*, 3038–3048.
21. Ollitrault, D., Legendre, F., Drougard, C., Briand, M., Benateau, H., Goux, D., Chajra, H., Poulain, L., Hartmann, D., Vivien, D., Shridhar, V., Baldi, A., Mallein-Gerin, F., Boumediene, K., Demoor, M., & Galera, P. (2015). BMP-2, hypoxia, and COL1A1/HtrA1 siRNAs favor neo-cartilage hyaline matrix formation in chondrocytes. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, *21*, 133–147.
22. Tian, Y., Guo, R., Shi, B., Chen, L., Yang, L., & Fu, Q. (2016). MicroRNA-30a promotes chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells through inhibiting Delta-like 4 expression. *Life Sciences*, *148*, 220–228.
23. Gomez-Leduc, T., Hervieu, M., Legendre, F., Bouyoucef, M., Gruchy, N., Poulain, L., de Vienne, C., Herlicoviez, M., Demoor, M., & Galera, P. (2016). Chondrogenic commitment of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in collagen matrices for cartilage engineering. *Scientific Reports*, *6*, 32786.
24. Legendre F., Ollitrault D., Gomez-Leduc T., Bouyoucef M., Hervieu, M., Gruchy N., Mallein-Gerin F., Leclercq S., Demoor M., & Galera P. (2016) Enhanced chondrogenesis of bone marrow derived-stem cells by using a combinatory cell therapy strategy with BMP-2/TGF- β 1, hypoxia and COL1A1/HtrA1 siRNAs. Submitted.
25. Aigner, T., Cook, J. L., Gerwin, N., Glasson, S. S., Lavery, S., Little, C. B., McIlwraith, W., & Kraus, V. B. (2010). Histopathology atlas of animal model systems - overview of guiding principles. *Osteoarthritis and Cartilage*, *18*(Suppl 3), S2–S6.
26. Malda, J., Benders, K. E. M., Klein, T. J., de Grauw, J. C., Kik, M. J. L., Huttmacher, D. W., Saris, D. B. F., van Weeren, P. R., & Dhert, W. J. A. (2012). Comparative study of depth-dependent characteristics of equine and human osteochondral tissue from the medial and lateral femoral condyles. *Osteoarthritis and Cartilage*, *20*, 1147–1151.
27. Callender, G. R., & Kelsler, R. A. (1938). Degenerative arthritis: A comparison of the pathological changes in man and equines. *American Journal of Pathology*, *14*, 253–272.9.
28. Olive, J., D'Anjour, M. A., Girard, C., Lavery, S., & Theoret, C. L. (2009). Imaging and histological features of central subchondral osteophytes in racehorses with metacarpophalangeal joint osteoarthritis. *Equine Veterinary Journal*, *41*, 859–864.
29. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*, 315–317.
30. Castro-Malaspina, H., Gay, R. E., Resnick, G., Kapoor, N., Meyers, P., Chiarieri, D., McKenzie, S., Broxmeyer, H. E., & Moore, M. A. (1980). Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*, *56*, 289–301.
31. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, *24*, 1294–1301.
32. Campbell, T. M., Churchman, S. M., Gomez, A., McGonagle, D., Conaghan, P. G., Ponchel, F., & Jones, E. (2016). Mesenchymal stem cell alterations in bone marrow lesions with hip osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology*, *68*, 1648–1659.
33. Borchers, K., Wolfinger, U., Goltz, M., Broll, H., & Ludwig, H. (1997). Distribution and relevance of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) infections. *Archives of Virology*, *142*, 917–928.
34. Sensebé, L., Bourin, P., & Tarte, K. (2011). Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Human Gene Therapy*, *22*, 19–26.
35. Kim, J., Kang, J. W., Park, J. H., Choi, Y., Choi, K. S., Park, K. D., Baek, D. H., Seong, S. K., Min, H.-K., & Kim, H. S. (2009). Biological characterization of long-term cultured human mesenchymal stem cells. *Archives of Pharmacological Research*, *32*, 117–126.
36. Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., Benes, V., Blake, J., Pfister, S., Eckstein, V., & Ho, A. D. (2008). Replicative senescence of mesenchymal stem cells: A continuous and organized process. *PLoS One*, *3*, e2213.
37. Vidal, M. A., Walker, N. J., Napoli, E., & Borjesson, D. L. (2012). Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue. *Stem Cells and Development*, *21*, 273–283.
38. Stewart, A. A., Byron, C. R., Pondenis, H., & Stewart, M. C. (2007). Effect of fibroblast growth factor-2 on equine mesenchymal

- stem cell monolayer expansion and chondrogenesis. *American Journal of Veterinary Research*, 68, 941–945.
39. Bianchessi, M., Chen, Y., Durgam, S., Pondenis, H., & Stewart, M. (2016). Effect of fibroblast growth factor 2 on equine synovial fluid Chondroprogenitor expansion and Chondrogenesis. *Stem Cells International*, 2016, 9364974.
 40. Pascucci, L., Curina, G., Mercati, F., Marini, C., Dall'Aglio, C., Paternesi, B., & Ceccarelli, P. (2011). Flow cytometric characterization of culture expanded multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) from horse adipose tissue: Towards the definition of minimal stemness criteria. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144, 499–506.
 41. Hillmann, A., Ahrberg, A. B., Brehm, W., Heller, S., Josten, C., Paebst, F., & Burk, J. (2016). Comparative characterization of human and equine mesenchymal stromal cells: A basis for translational studies in the equine model. *Cell Transplantation*, 25, 109–124.
 42. Ranera, B., Lyahyai, J., Romero, A., Vázquez, F. J., Remacha, A. R., Bernal, M. L., Zaragoza, P., Rodellar, C., & Martín-Burriel, I. (2011). Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144, 147–154.
 43. Amhold, S. J., Goletz, I., Klein, H., Stumpf, G., Beluche, L. A., Rohde, C., Addicks, K., & Litzke, L. F. (2007). Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *American Journal of Veterinary Research*, 68, 1095–1105.
 44. Lai, C.-H., Chen, S.-C., Chiu, L.-H., Yang, C.-B., Tsai, Y.-H., Zuo, C. S., Chang, W. H.-S., & Lai, W.-F. (2010). Effects of low-intensity pulsed ultrasound, dexamethasone/TGF-beta1 and/or BMP-2 on the transcriptional expression of genes in human mesenchymal stem cells: Chondrogenic vs. osteogenic differentiation. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 36, 1022–1033.
 45. Galera, P., Rédini, F., Vivien, D., Bonaventure, J., Penfomis, H., Loyau, G., & Pujol, J.-P. (1992). Effect of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) on matrix synthesis by monolayer cultures of rabbit articular chondrocytes during the dedifferentiation process. *Experimental Cell Research*, 200, 379–392.
 46. Chen, G., Deng, C., & Li, Y.-P. (2012). TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International Journal of Biological Sciences*, 8, 272–288.
 47. Combe, C., Bornet, C., Adam, P., & Colomb, R. (2007). Le point sur l'utilisation des protéines ostéogéniques: 24 CHU interrogés. *Journal de Pharmacie Clinique*, 26, 203–207.
 48. Maneix, L., Servent, A., Porée, B., Ollitrault, D., Branly, T., Bigot, N., Boujrad, N., Flouriot, G., Demoor, M., Boumediene, K., Moslemi, S., & Galera, P. (2014). Up-regulation of type II collagen gene by 17 β -estradiol in articular chondrocytes involves Sp1/3, sox-9, and estrogen receptor α . *Journal of Molecular Medicine*, 92, 1179–1200.
 49. Snøve, O., & Holen, T. (2004). Many commonly used siRNAs risk off-target activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319, 256–263.
 50. Doench, J. G., Petersen, C. P., & Sharp, P. A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes & Development*, 17, 438–442.
 51. Mayer, N., Lopa, S., Talò, G., Lovati, A. B., Padeloup, M., Riboldi, S. A., Moretti, M., & 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.
 52. Chalk, A. M., Wahlestedt, C., & Sonnhammer, E. L. L. (2004). Improved and automated prediction of effective siRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319, 264–274.
 53. Naito, Y., & Ui-Tei, K. (2013). Designing functional siRNA with reduced off-target effects. *Methods in Molecular Biology*, 942, 57–68.
 54. Bartlett, D. W., & Davis, M. E. (2007). Effect of siRNA nuclease stability on the in vitro and in vivo kinetics of siRNA-mediated gene silencing. *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 909–921.

Supplementary figure legends

Figure S1: Summary of quality-control assays performed on different MSCs strains from equine BM, after isolation.

Figure S2: Effect of culture of MSCs from equine BM under hypoxia, within type I/III collagen sponge with BMP-2 and TGF β 1 on *Mmp1* and *Mmp3* mRNAs levels. Equine MSCs derived from bone marrow (BM) were amplified and seeded in collagen sponges at P4 (n = 5). They were then cultured under hypoxia (3% O₂) for 14 days in Incomplete Chondrogenic Medium (ICM) supplemented with or without BMP-2 (50 ng / ml) and TGF- β 1 (10 ng / ml) (B + T). The DO condition corresponds to stem cells cultured in monolayer in P4 in the amplification medium, whereas the equine articular chondrocyte (EAC) condition corresponds to the mRNAs extracted from EACs obtained after enzymatic digestion of healthy cartilage. mRNAs levels of *Mmp1* (A) and *Mmp3* (B) were estimated by RT-qPCR after normalization versus the *β -actin* reference gene. The significance of the values was evaluated using the Mann-Whitney test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Figure S3: Effect of *Col1a1* and/or *Htra1* siRNAs on the *Col2a1:Col1A1* ratio of BM-MSCs differentiated into chondrocytes. The differentiation of MSCs from equine bone marrow into chondrocytes was done by incubating the cells in collagen sponges, under hypoxia (3% O₂) in the presence of BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- β 1 (10 ng/ml) for 14 days. The MSCs were transfected with a control siRNA or with *Col1a1* and/or *Htra1* siRNAs, used alone or in combination, at various concentrations (5, 25, 50 and 100 nM). mRNA levels of

Col2a1 and *Col1a1* were estimated by RT-qPCR after normalization versus the β -actin reference gene, as described in Fig. 7.

Figure S4: Effect of *Col1a1* and/or *Htra1* siRNAs on the *Runx2* mRNA levels during the differentiation of MSCs into chondrocytes. The differentiation of MSCs from equine bone marrow into chondrocyte was analyzed by culturing the cells in collagen sponges, under hypoxia (3% O₂) with or without BMP-2 (50 ng / ml) and TGF- β 1 (10 ng / ml) (B + T and ICM respectively) for 14 days (n = 5). The MSCs were transfected with a control siRNA or with *Col1a1* and/or *Htra1* siRNAs, used alone or in combination, at various concentrations (5, 25, 50 and 100 nM). *Runx2* mRNA levels were estimated by RT-qPCR after normalization versus the β -actin reference gene. The significance of the values was evaluated using the Mann-Whitney test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Figure S5: Effect of *Col1a1* and/or *Htra1* siRNAs on cartilage ECM protein synthesis. The differentiation of MSCs from equine bone marrow into chondrocytes was induced in collagen sponges, under hypoxia (3% O₂) with or without BMP-2 (50 ng / ml) and TGF- β 1 (10 ng/ml) for 14 days (n = 3, representative experiments are shown). The MSCs were transfected with a control siRNA or *Col1a1* and/or *Htra1* siRNAs, used alone or in combination at 5 nM. The sponges were removed and crushed. The total protein extracts were separated by electrophoresis on a 10% acrylamide gel in denaturing conditions. The proteins were then transferred onto a PVDF membrane and then was incubated with the anti-collagen II primary antibody, anti-collagen I, anti-collagen X, anti-Htra1 or anti- β -tubulin. The molecular weight marker (MW, kDa) is indicated on the left side of the panels. Do: stem cells grown in amplification medium.

Figure S6: Kinetic study of the expression of cartilage matrix proteins during chondrogenic differentiation of MSCs. Equine MSCs derived from bone marrow were amplified and seeded in collagen sponges at P4 (n = 2). They were then grown in hypoxia (3% O₂) for 7, 14, 21 and 28 days (D7, D14, D21 and D28, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium (ICM) alone or enriched with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- β 1 (10 ng/ml) (BMP-2 + TGF- β 1). The sponges were harvested and crushed. The total protein extracts were separated by electrophoresis on a 10% acrylamide gel under denaturing conditions. The proteins were then transferred to a PVDF membrane which was incubated with the anti-collagen II, anti-collagen IIB, anti-collagen I, anti-collagen X, anti-HtrA1 or anti- β -tubulin primary antibody. The molecular weight marker (MW kDa) is indicated on the left. Two representative experiments from two strains of MSCs are shown in panels A and B.

Fig. S1

Quality Control	Stem cells tested	Positive Stem Cells
Aerobic bacteria	8	0
Aerobic and anaerobic bacteria	13	0
Yeasts, molds and aerobic bacteria	8	0
Type 1 equine adenovirus	10	0
Type 2 equine adenovirus	10	0
Equine viral arteritis	10	0
Equine coronavirus	10	0
Ehrlichiosis	7	0
Equine hepacivirus	5	0
Q fever (<i>Coxiella burnetti</i>)	5	0
Type 1 equine herpes virus	8	0
Type 2 equine herpes virus	8	4
Type 3 equine herpes virus	5	0
Type 4 equine herpes virus	8	0
Type 5 equine herpes virus	8	0
Lyme disease	7	0
Mycoplasma	29	0
Piroplasmosis (<i>Babesia caballe</i>)	7	0
Piroplasmosis (<i>Theileria equi</i>)	7	0
Type A equine rhinovirus	10	0
Type B equine rhinovirus	10	0
Equine influenza virus	8	0

Fig. S2

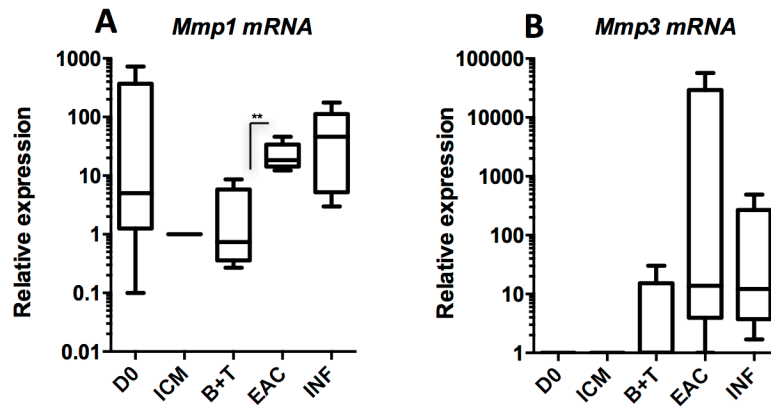


Fig. S3

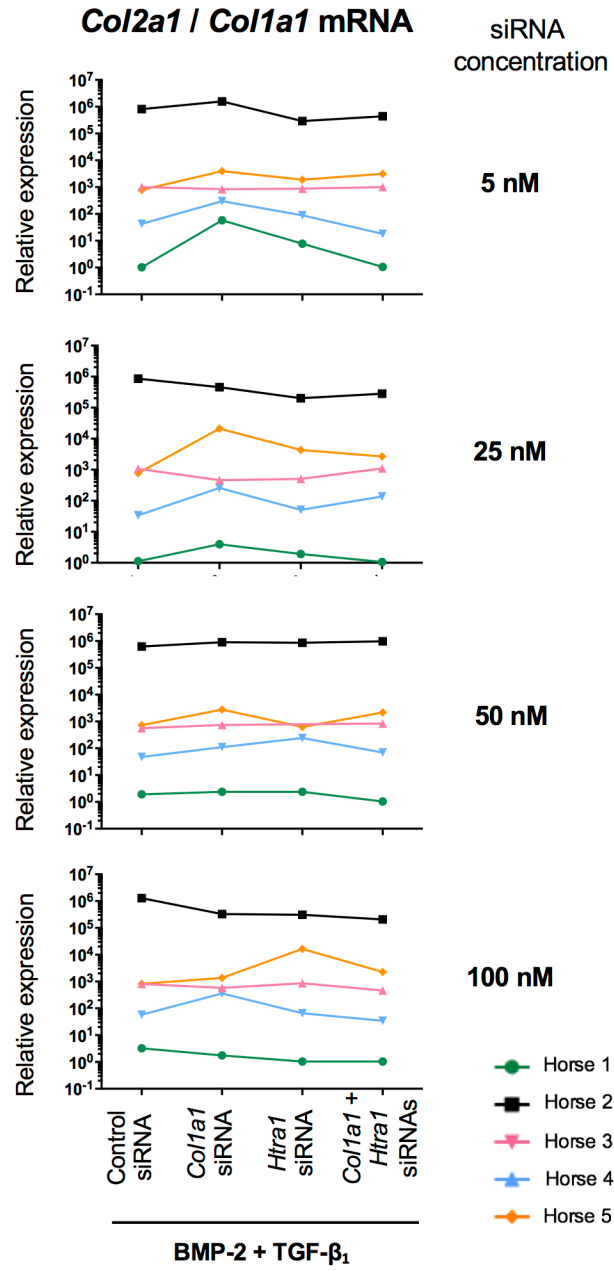


Fig. S4

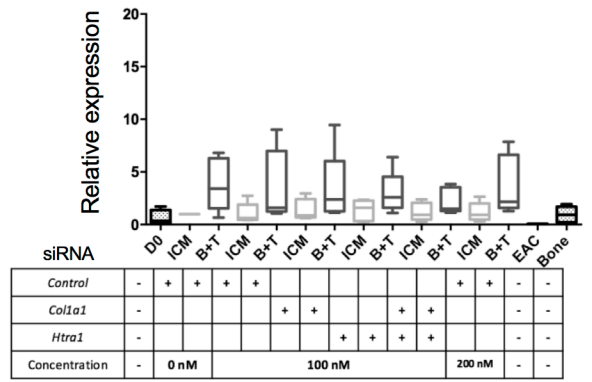
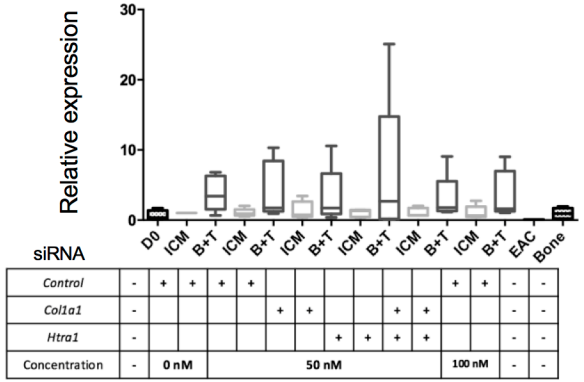
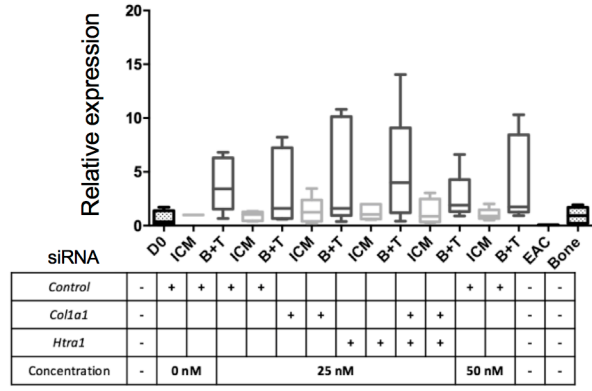
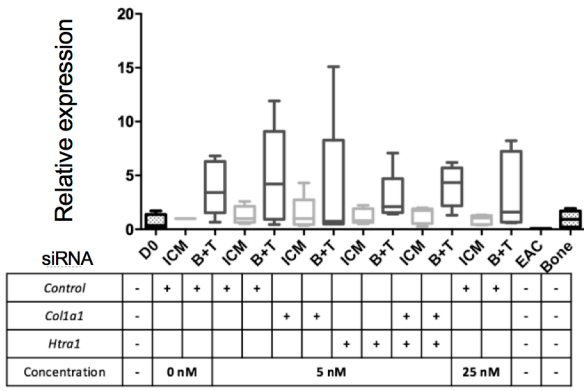
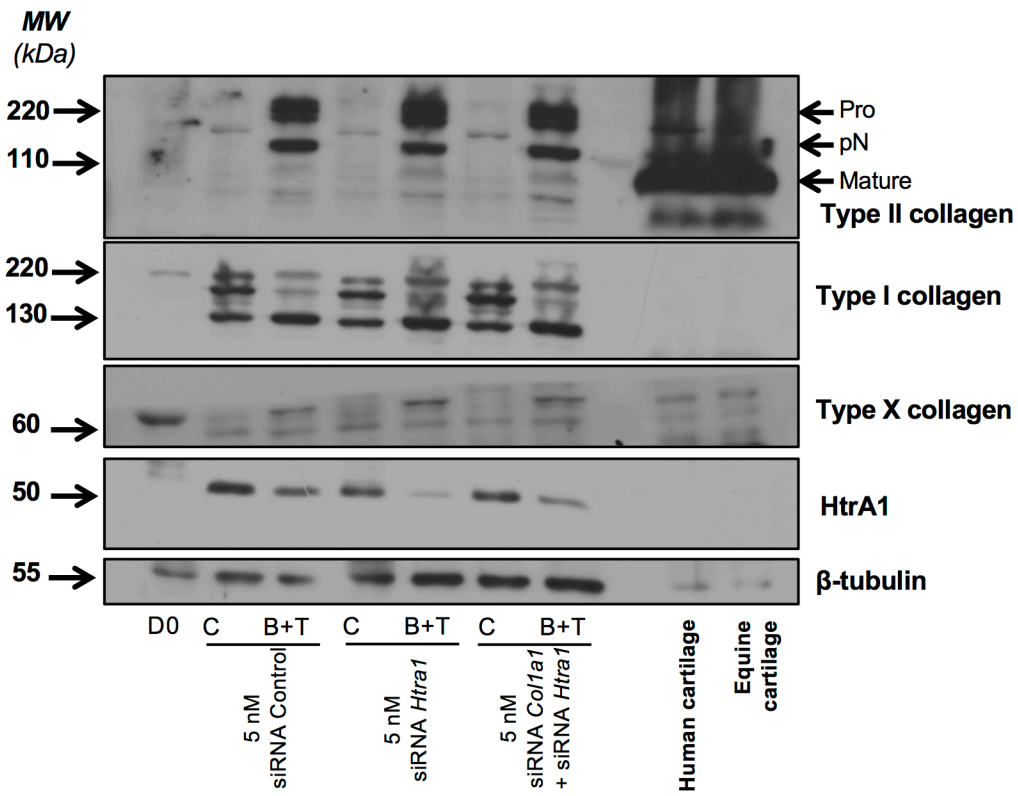
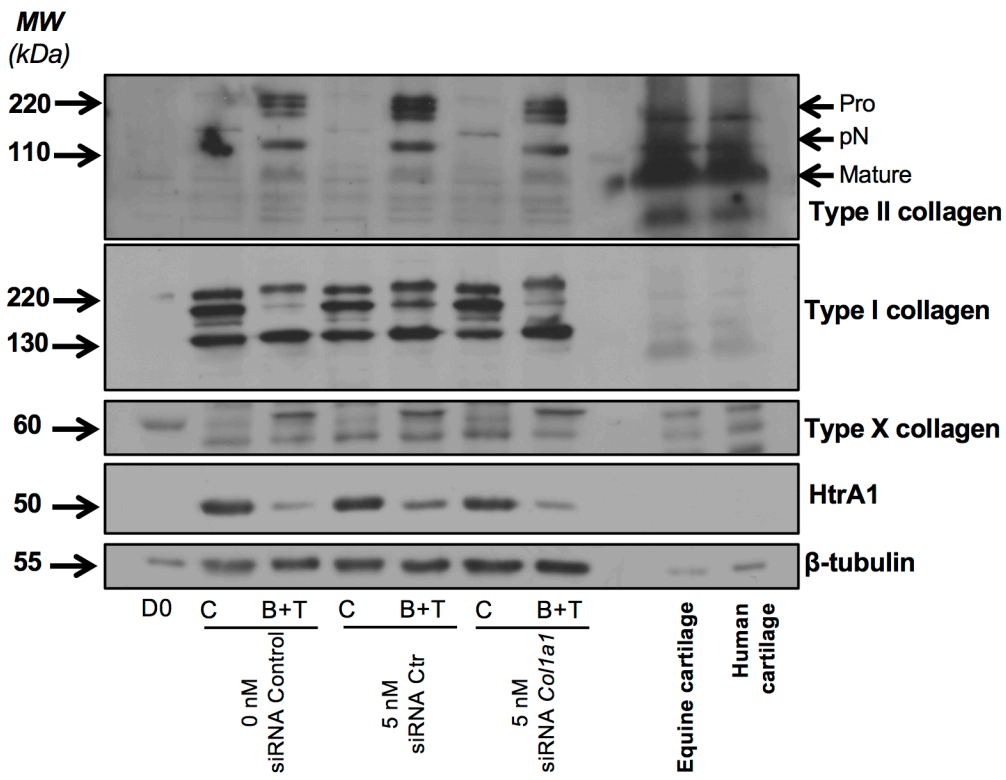


Fig. S5



C. Conclusions de l'article #1

Les travaux réalisés au cours de cette étude ont permis d'isoler et de caractériser des CSM à partir de MO équine. Cette étape était essentielle afin de disposer d'une banque cellulaire indispensable à la poursuite des travaux. Néanmoins, les CSM putatives ne présentaient pas systématiquement une expression du CD73 et n'exprimaient pas le CD105. L'expression hétérogène du CD73 pourrait être due à la présence de différentes sous-populations de CSM alors que l'absence de marquage du CD105 serait plutôt la conséquence de l'utilisation d'un anticorps qui ne reconnaît pas le CD105 équin. Il semblerait judicieux de mieux caractériser les sous-populations de CSM et d'augmenter le panel de marqueurs de surface étudiés. Cependant, le manque d'outils disponibles pour l'étude de cellules équines est un obstacle.

La transposition de la stratégie de différenciation chondrogénique de CSM humaines aux cellules équines a permis de produire un substitut cartilagineux de nature hyaline. Nonobstant, une forte synthèse du collagène de type I persiste. Les stratégies d'interférence par l'ARN visant à diminuer l'expression de ce collagène semblent donc être perfectibles. Afin d'améliorer les stratégies d'interférence par l'ARN, nous pourrions utiliser d'autres siRNA et/ou modifier les temps de transfection et de culture. Bien que le siRNA *HtrA1* soit efficace, son utilisation ne paraît pas judicieuse puisque l'expression de *HtrA1* diminue en présence de BMP-2 et TGF- β 1.

Finalement, allonger la durée du protocole de différenciation chondrogénique pourrait s'avérer utile dans la perspective de produire un substitut cartilagineux ayant des proportions cellulaires et matricielles proches d'une situation physiologique.

Le protocole de différenciation chondrogénique de CSM humaines a été transposé aux CSM de MO équines et semble effectif, même s'il demeure perfectible.

II. Article #2

A. Objectifs de l'article #2

Improvement of the specific phenotype of chondrocytes derived from equine bone marrow mesenchymal stem cells. Influence of culture time, transforming growth factor- β 1 and -3 associated to BMP-2 and *Col1a1* and *Col1a2* siRNAs on the cell differentiation index.

Thomas Branly*, **Romain Contentin***, Mélanie Desancé, Miranda Concari, Thibaud Jacquet, Rodolphe Rakic, Lélia Bertoni, Sandrine Jacquet, Frédéric Mallein-Gerin, Jean-Marie Denoix, Florence Legendre, Fabrice Audigié, Magali Demoor & Philippe Galéra.

*: Contribution équivalente

Cet article s'inscrit dans la continuité de l'article #1. En effet, ce dernier s'attache à proposer des pistes d'amélioration du protocole de différenciation chondrogénique transposé au modèle équin lors de l'article #1.

Le protocole de différenciation chondrogénique initial durait 14 jours. Ce temps de culture était optimal pour induire la différenciation de CSM humaines. Néanmoins, puisque les CSM de MO équine sont isolées à partir de sujets jeunes et sains, contrairement aux CSM humaines, et que le vieillissement altère les différentes propriétés des CSM, nous avons supposé que l'allongement du temps de culture de la stratégie de différenciation pourrait améliorer la différenciation des CSM et donc le substitut cartilagineux néo-formé. Nous avons donc testé des temps de culture allant de 7 à 28 jours, puis 42 jours en présence du protocole de différenciation des CSM équines déjà étudié.

De plus, certaines équipes s'intéressant à la chondrogenèse des CSM utilisent le TGF- β 3 en tant que facteur chondrogénique, à la place du TGF- β 1. Leurs travaux montrent que le TGF- β 3 possède un excellent pouvoir chondrogénique. C'est la raison pour laquelle, lors de cette étude, nous avons comparé le potentiel d'induction de la chondrogenèse de ces deux facteurs chondrogéniques dans le but de sélectionner le plus efficace.

Finalement, puisque la stratégie d'interférence par l'ARN, visant à diminuer l'expression du collagène de type I, utilisée lors des travaux menés dans l'article #1 demeure perfectible, nous avons tenté de l'améliorer. En effet, nous avons testé 3 nouveaux siRNA *Col1a1* ainsi que 3 ciblant *Col1a2* puisque nous pensions qu'il serait plus simple de diminuer davantage la synthèse du collagène de type I en ciblant ses deux chaînes alpha. Nous avons ensuite

sélectionné les siRNA les plus efficaces sur l'inhibition de leurs cibles respectives, et avons déterminé si la chondrogenèse était améliorée.

B. Article #2



Article

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

Thomas Branly ^{1,†}, Romain Contentin ^{1,†}, Mélanie Desancé ¹, Thibaud Jacquel ¹, Lélia Bertoni ², Sandrine Jacquet ², Frédéric Mallein-Gerin ³, Jean-Marie Denoix ², Fabrice Audigie ², Magali Demoor ¹ and Philippe Galéra ^{1,*} 

¹ Normandie Univ, UNICAEN, BIOTARGEN, 14000 Caen, France; tbranly@gmail.com (T.B.); romaincontentin@hotmail.fr (R.C.); melanie359@hotmail.fr (M.D.); jacquel.thibaud@gmail.com (T.J.); magali.demoor@unicaen.fr (M.D.)

² Center of Imaging and Research on Locomotor Affections in Equines, Ecole Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, 14430 Goustranville, France; lelia.bertoni@vet-alfort.fr (L.B.); sandrine.jacquet@vet-alfort.fr (S.J.); jmdenoix@vet-alfort.fr (J.-M.D.); fabrice.audigie@vet-alfort.fr (F.A.)

³ Institute for Biology and Chemistry of Proteins, CNRS, UMR 5305 Laboratory of Tissue Biology and Therapeutic Engineering, Université Claude Bernard-Lyon 1, Université de Lyon, 69367 Lyon CEDEX 07, France; f.mallein-gerin@ibcp.fr

* Correspondence: philippe.galera@unicaen.fr; Tel.: +33-2-3106-8218

† Those authors contributed equally to this work.

Received: 13 December 2017; Accepted: 30 January 2018; Published: 1 February 2018

Abstract: Articular cartilage is a tissue characterized by its poor intrinsic capacity for self-repair. This tissue is frequently altered upon trauma or in osteoarthritis (OA), a degenerative disease that is currently incurable. Similar musculoskeletal disorders also affect horses and OA incurs considerable economic loss for the equine sector. In the view to develop new therapies for humans and horses, significant progress in tissue engineering has led to the emergence of new generations of cartilage therapy. Matrix-associated autologous chondrocyte implantation is an advanced 3D cell-based therapy that holds promise for cartilage repair. This study aims to improve the autologous chondrocyte implantation technique by using equine mesenchymal stem cells (MSCs) from bone marrow differentiated into chondrocytes that can be implanted in the chondral lesion. The optimized protocol relies on culture under hypoxia within type I/III collagen sponges. Here, we explored three parameters that influence MSC differentiation: culture times, growth factors and RNA interference strategies. Our results suggest first that an increase in culture time from 14 to 28 or 42 days lead to a sharp increase in the expression of chondrocyte markers, notably type II collagen (especially the IIB isoform), along with a concomitant decrease in HtrA1 expression. Nevertheless, the expression of type I collagen also increased with longer culture times. Second, regarding the growth factor cocktail, TGF- β 3 alone showed promising result but the previously tested association of BMP-2 and TGF- β 1 better limits the expression of type I collagen. Third, RNA interference targeting *Col1a2* as well as *Col1a1* mRNA led to a more significant knockdown, compared with a conventional strategy targeting *Col1a1* alone. This chondrogenic differentiation strategy showed a strong increase in the *Col2a1:Col1a1* mRNA ratio in the chondrocytes derived from equine bone marrow MSCs, this ratio being considered as an index of the functionality of cartilage. These data provide evidence of a more stable chondrocyte phenotype when combining *Col1a1* and *Col1a2* siRNAs associated to a longer culture time in the presence of BMP-2 and TGF- β 1, opening new opportunities for preclinical trials in the horse. In addition, because the horse is an excellent model for human articular cartilage

disorders, the equine therapeutic approach developed here can also serve as a preclinical step for human medicine.

Keywords: horse; mesenchymal stem cells; chondrocytes; bone marrow; cartilage engineering; *Col1a1-Col1a2-HtrA1* siRNAs; osteoarthritis; chondral defects; chondrogenesis; extracellular matrix

1. Introduction

Healthy hyaline cartilage is composed in particular of type II, IX and XI collagens and aggrecans [1]. Type II collagen is the most quantitatively abundant collagen type in the cartilaginous extracellular matrix (ECM) and alternative splicing generates different isoforms. The longest type IIA isoform is expressed in early chondrogenesis and in mesenchymal stem cells (MSCs) undergoing chondrogenic differentiation, while the IIB isoform, devoid of amino acids encoded by exon II, is expressed in mature chondrocytes, the main cell type of healthy hyaline articular cartilage [2,3]. The switch from type IIA collagen to type IIB during chondrogenesis is a sign of differentiation into mature chondrocytes [4]. Furthermore, a transmembrane proteoglycan, Snorc (Small NOvel Rich in Cartilage), has been described as a marker of the chondrocyte phenotype [5]. Snorc is expressed during embryonic mouse limb chondrogenesis and appears to be a cartilage specific marker because it has not been detected in several mouse tissues such as brain, heart, liver or skin. Additionally, Snorc colocalizes with BMP-2 and type IIA procollagen in the growth plate of mice, suggesting a potential effect of BMP-2 on Snorc expression. BMP-2 increases Snorc mRNA expression in the same pattern of those of type II collagen, aggrecan and Sox9 in a mouse limb bud micromass culture model of chondrogenesis [5].

Osteoarthritis (OA) is the most common degenerative bone and joint disease in humans worldwide. It is characterized by the degradation of articular cartilage, leading to exposure of the bone and a loss of motor capacity due to the onset of pain. Chondrocytes synthesize a fibrocartilage composed mainly of type I collagen in OA. This fibrocartilage is rapidly degraded [6] and then cells enter apoptosis [7]. Type I collagen is a heterotrimer composed of two $\alpha 1(I)$ chains and one $\alpha 2(I)$ chain, encoded respectively by the *COL1A1* and *COL1A2* genes (for review, [8]). This collagen isotype is expressed in many tissues such as skin, tendon or bone but not in healthy hyaline articular cartilage. Moreover, the serine protease HtrA1, which is overexpressed in OA, causes proteolysis of aggrecan and the decrease in the accumulation of glycosaminoglycans [9]. In addition, HtrA1 appears to induce the degradation of the receptors of the TGF- β family members, which in turn cannot trigger chondrogenic signals necessary for the differentiation of chondrocytes and the maintenance of the chondrocyte phenotype [10] (for review [11]).

Due to its status as a domesticated animal and as a high-level athlete, the horse is an excellent model for studying human locomotor disorders. Both species share very close similarities such as the structure, biochemistry, thickness and cellularity of cartilage [12,13]. The incentives for developing articular cartilage therapies in the horse are especially high because locomotor disorders are the leading cause in the decline of the performance of sport horses, occurring in 80% of cases according to a New Zealand study [14]. However, therapeutic strategies for OA are currently very limited and are mainly limited to symptomatic treatments. Given these problems, new therapeutic strategies in human medicine have emerged, including autologous chondrocyte transplantation (ACT), consisting of the removal of healthy articular chondrocytes from a non-bearing area of the joint, for in vitro amplification and re-implantation under a periosteum membrane [15]. However, this methodological approach has many limitations, particularly due to the synthesis of fibrocartilage by the implanted chondrocytes and the tendency of the neoconstruct to detach [16].

Subsequent generations of ACT seek to improve this method with, in particular, the use of mesenchymal stem cells (MSCs) to obtain a sufficient number of cells for implantation [17]. MSCs have the ability to differentiate into chondrocytes [18] and do not pose any specific risks, especially because

they do not cause the formation of teratocarcinomas in vivo, unlike embryonic stem cells [19]. The use of a biomaterial as a 3D culture model provides a directly implantable cartilaginous substitute. The choice of the biomaterial proves to be one of the critical factors in ACT strategies, because they influence cell behaviour and the quality of the ECM newly synthesized by the cells [20] (for review, [11]). The growth factors used to induce chondrogenic differentiation of MSCs also represent a major parameter in the implementation of such strategies. Thus, treatment of MSCs with a cocktail consisting of bone morphogenetic protein (BMP)-2 and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) promotes MSC differentiation into chondrocytes [21]. However, the in vitro use of TGF- β (isoforms TGF- β 1 or TGF- β 3) induces the expression of type X collagen, a hypertrophy marker which is not found in mature articular chondrocytes [22]. This constraint can be overcome, however, by the culture of MSCs in hypoxia. Low oxygen tension, mimicking the physioxia of the chondrocytes, decreases the expression of *Col10a1* in MSCs from bone marrow (BM) undergoing chondrogenic differentiation [23]. A human chondrogenic MSC differentiation protocol was developed in the laboratory and includes all of these mediators of differentiation [24–26]. This protocol was subsequently transferred to the equine model and we showed that a culture of equine BM-MSCs cultured in type I/III collagen sponges in the presence of BMP-2 and TGF- β 1 for 14 days leads to the production of a hyaline-type neocartilaginous substitute [27]. Furthermore, an RNA interference strategy using siRNA targeting *Col1a1* and *Htra1* causes significant inhibition of the expression of their target transcripts and corresponding proteins. We also showed that the use of BMP-2 and TGF- β 1, even though it leads to an increase in the steady-state amounts of *Htra1* mRNAs, ultimately decreases the expression of the HtrA1 protein [27].

The aim of the present study was to explore three parameters that can help improve this culture procedure and thereby increase the functional index of chondrocytes derived from equine BM-SCs. First, to do so, we compared the effects of TGF- β 3 and TGF- β 3 + BMP-2 with those of the BMP-2 + TGF- β 1 cocktail. Second, we studied the effect of the extension of culture time from 14 to 42 days because some studies have suggested that a longer culture period may stabilize the chondrocyte phenotype by increasing the overall amount of ECM proteins and their maturation [28,29]. Third, we tested new siRNAs targeting *Col1a1* but also *Col1a2* mRNAs to optimize the inhibition of protein synthesis of type I collagen in our neocartilage substitute. Our rationale was that type I collagen is made up of two α 1(I) and one α 2(I) chains respectively encoded by the *COL1A1* and *COL1A2* genes which are co-ordinately regulated at the transcriptional level under physiopathological conditions. In most circumstances, the two protein chains of type I collagen are synthesized in a 2:1 stoichiometry and the same stoichiometry is also observed for the steady-state levels of the corresponding mRNAs in human, mouse and chick fibroblasts and for their rates of synthesis [30–33].

2. Result

2.1. Kinetic Study of the BMP-2 and TGF- β 1 Effect on the Phenotypic Status of Chondrocytes Derived from BM-MSCs

BM-MSCs were cultured in hypoxia in type I/III collagen sponges in a control medium (ICM) or in the presence of a BMP-2 + TGF- β 1 cocktail. MSCs were cultured for 7, 14, 21 and 28 days to evaluate the steady-state amounts of mRNAs that encode markers specific to the chondrocyte phenotype (Figure 1). The nonspecific markers of chondrocytes, as well as the markers of hypertrophy or of the terminal differentiation of endochondral ossification were also evaluated (Figure 2). Our data show that, already at 7 days and compared with the control, the use of BMP-2 + TGF- β 1 significantly increased the mRNA levels of *Col2a1* (Figure 1A), *Acan* (Figure 1B), *Col9a1* (Figure 1C), *Col11a1* (Figure 1D), *Snorc* (Figure 1E) and the *Col2a1:Col1a1* ratio (Figure 1F). Furthermore, between 14 and 28 days of culture, there was a relatively high increase in the mRNA levels of these specific markers, compared with the 7-day culture, except for *Col11a1* messengers which stabilized after 14 days of culture. These results demonstrate that culturing cells for 28 days leads to better chondrogenic differentiation of BM-MSCs, with *Col2a1*, *Acan* and *Snorc* mRNA amounts comparable to those found in equine articular cartilage (EAC). The amounts of *Col9a1* and *Col11a1* mRNAs were also found in greater quantities

than those found in EAC. However, the *Col2a1:Col1a1* ratio remained stable between 7 and 28 days of culture. This is attributed to the fact that *Col1a1* mRNAs levels increased at 14 days of culture and maintained up to 28 days (Figure 2A). The amounts of *Col1a1* transcripts were strongly enhanced after 14 days of culture compared with 7 days. Thereafter, the *Col1a1* mRNAs were stable between 14 and 28 days. A similar pattern was observed for *Col1a2* (Figure 2B) as well as *Htra1* (Figure 2C).

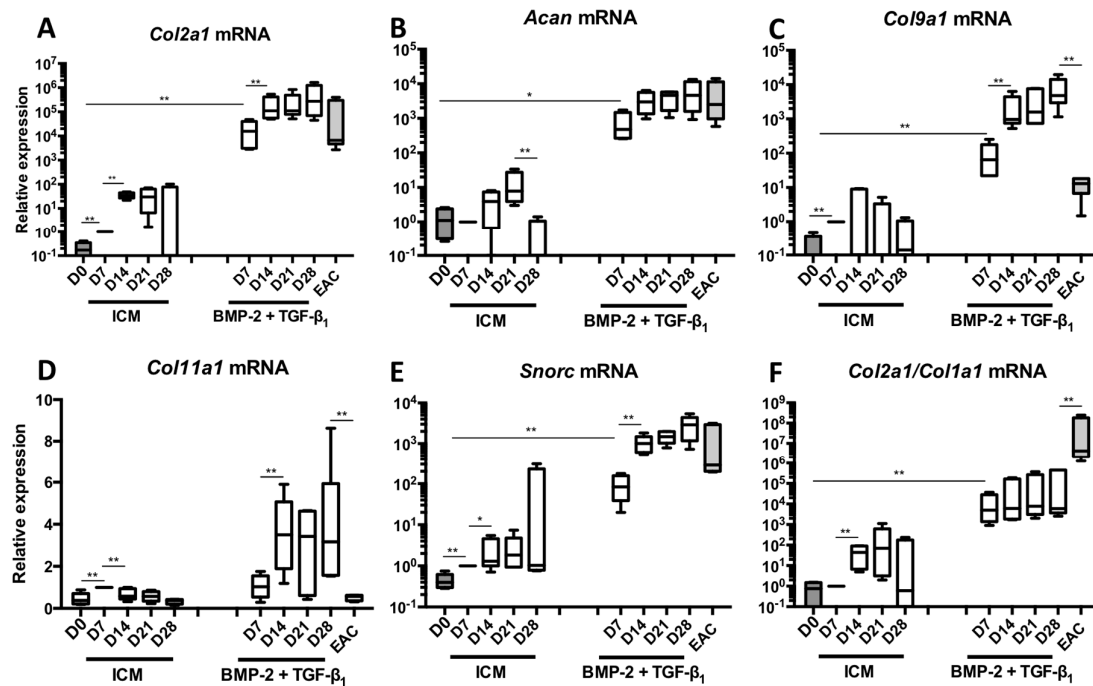


Figure 1. Kinetic study of mRNA expression encoding the markers specific to articular cartilage during chondrogenic differentiation of MSCs. Equine MSCs derived from bone marrow were amplified and seeded in collagen sponges at P4 ($n = 5$). They were then grown in hypoxia (3% O_2) for 7, 14, 21 and 28 days (D7, D14, D21 and D28, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium (ICM) alone or enriched with BMP-2 (50 ng/mL) and TGF- β_1 (10 ng/mL) (BMP-2 + TGF- β_1). The D0 condition corresponds to stem cells cultured in monolayer at P4 with the amplification medium and the equine articular chondrocyte (EAC) condition corresponds to the mRNAs extracted from EACs obtained after enzymatic digestion of healthy cartilage. mRNAs encoding *Col2a1* (A); *Acan* (B); *Col9a1* (C); *Col11a1* (D) and *Snorc* (E) were estimated by RT-qPCR after normalization relative to the β -actin reference gene. The *Col2a1:Col1a1* ratio (F) is shown. The results are represented as box plots (median, quartiles, extreme values) and the significance of the values was tested using the Mann-Whitney test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Regarding *Col1a2* mRNAs, the treatment of BM-MSCs with the chondrogenic factors did not seem to substantially induce its expression compared with the *Col1a1* and *Htra1* mRNAs compared with the ICM control. Regarding *Runx2*, an early marker of chondrocyte hypertrophy, its expression, initially induced in control conditions and even more when the cells were cultured in the presence of BMP-2 + TGF- β_1 , tended to decrease after 14 days of culture. Its expression remains stable between D14 and D28. However, *Runx2* expression still remained higher than that found in EACs (Figure 2D). The mRNA steady-state amounts of *Ostc* did not seem modulated in these culture conditions and remained at the same order of magnitude as what is found in EACs (Figure 2E).

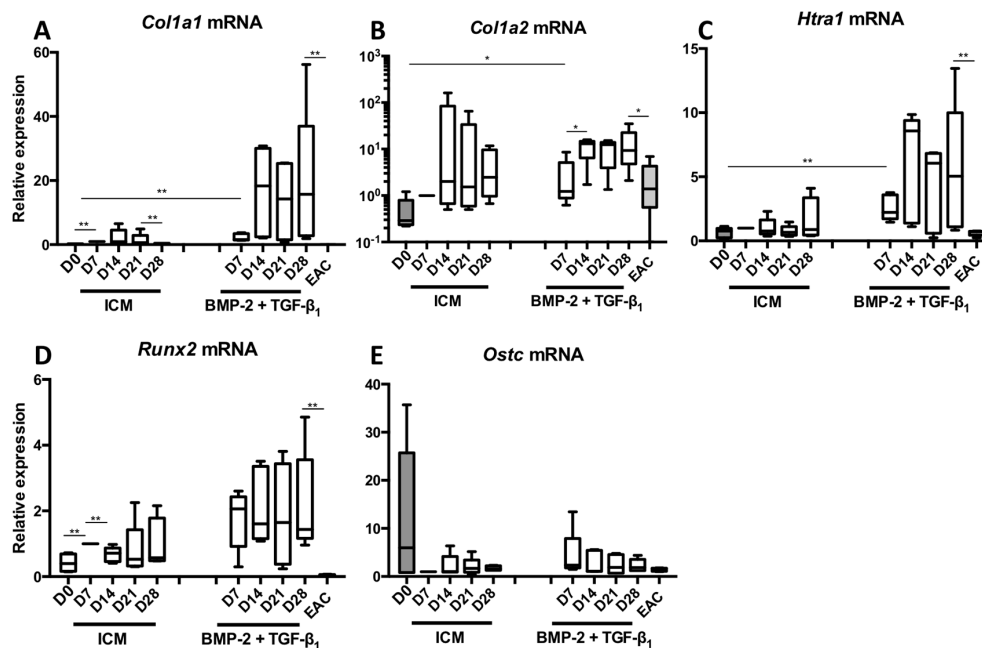


Figure 2. Kinetic study of mRNA expression encoding nonspecific markers of hyaline articular cartilage during chondrogenic differentiation of MSCs. Equine MSCs derived from bone marrow were amplified and seeded in collagen sponges at P4 ($n = 5$). They were then grown in hypoxia (3% O₂) for 7, 14, 21 and 28 days (D7, D14, D21 and D28, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium (ICM) alone or enriched with BMP-2 (50 ng/mL) and TGF-β1 (10 ng/mL) (BMP-2 + TGF-β1). The D0 condition corresponds to stem cells cultured in monolayer at P4 with the amplification medium and the equine articular chondrocyte (EAC) condition corresponds to the mRNAs extracted from EACs obtained after enzymatic digestion of healthy cartilage. mRNA levels of *Col1a1* (A), *Col1a2* (B), *Htra1* (C), *Runx2* (D) and *Ostc* (E) were estimated by RT-qPCR after normalization relative to the β -actin reference gene. The results are represented as box plots (median, quartiles, extreme values) and the significance of the values was tested using the Mann-Whitney test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Western blots were performed to confirm that the results obtained at the mRNA level are correlated with the amounts of the corresponding ECM proteins in our biological substitute (Figure 3 and Figure S1 for the quantitative of the membrane signals). Several strains were evaluated and two types of results were systematically observed as described for the two representative BM-MSCs strains presented. For the first strain (Figure 3A), the specific bands of type II collagen (immature and mature forms), absent in the ICM condition, increased in intensity for culture times between 7 and 28 days, when BMP-2 + TGF-β1 were added. Culturing for 28 days led to the expression of the highest amounts of all the maturation forms of type II collagen. Strictly identical patterns were observed for type IIB collagen, the specific phenotypic marker of mature chondrocytes. Nevertheless, the addition of BMP-2 + TGF-β1 also strongly induced type I collagen protein synthesis and the effect increased with culture time. At 28 days, the newly synthesized ECM appeared to contain a maximum of type I collagen, particularly the low-molecular-weight mature form.

Regarding HtrA1, culture of BM-MSCs in ICM induces its protein synthesis compared to MSCs at day 0 (D0) and the increase in culture time did not seem to modulate its expression in the neocartilage. In contrast, the treatment of the cells with BMP-2 + TGF-β1 decreased HtrA1 expression compared with ICM at each respective culture time and its expression was almost blocked at 28 days.

Type X collagen, one of the major phenotypic markers of chondrocyte hypertrophy, was not detected in our culture conditions in ICM nor in BMP-2 + TGF-β1 experimental conditions. This suggests that the chondrogenic factors do not induce hypertrophy of the chondrocytes derived from BM-MSCs.

The results obtained with the second BM-MSC strain studied differed slightly, although the final effects of the different growing conditions were similar (Figure 3B). Thus, in these culture conditions, although the addition of BMP-2 + TGF- β 1 led to the synthesis of type II collagen and more particularly of type IIB collagen, the protein levels were already maximal at 14 days and did not change significantly between 14 and 28 days of cell culture. Similarly, the protein levels of type I collagen induced by the addition of growth factors compared with ICM were maximal at 14 days and stabilized between 14 and 28 days of culture.

Regarding HtrA1, however, the same trends were observed in both strains and the cells cultured in the presence of BMP-2 + TGF- β 1 for 21 and 28 days showed traces of this serine protease compared with all other experimental conditions studied. Nevertheless, in this strain, HtrA1 expression increased with culture time in the ICM control conditions, unlike the first strain.

Similar to the first strain of BM-MSCs, type X collagen was not expressed in any of the experimental conditions studied here.

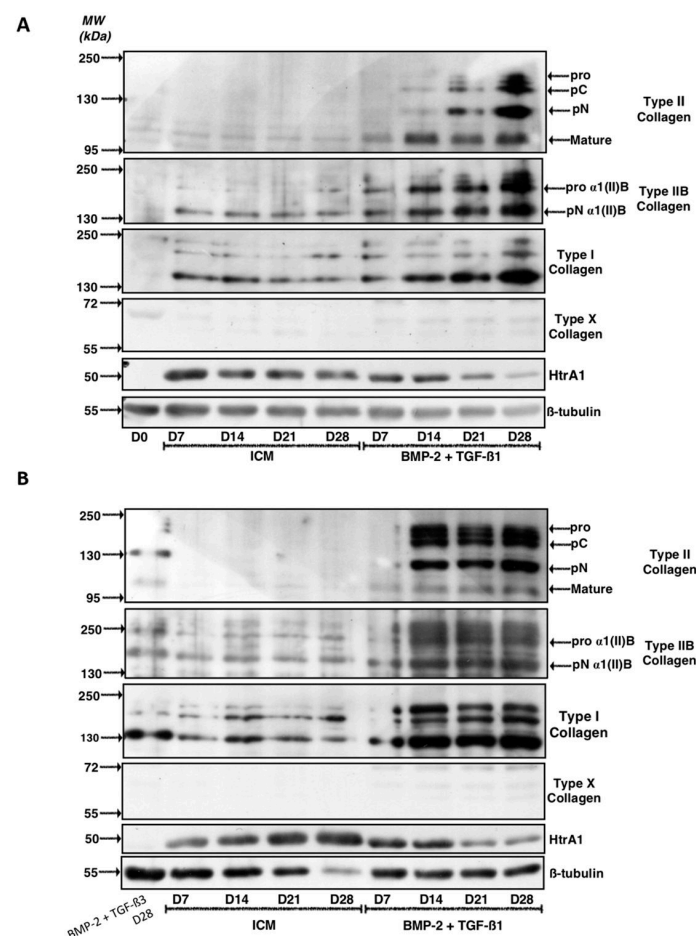


Figure 3. Kinetic study of the expression of cartilage matrix proteins during chondrogenic differentiation of MSCs. Equine MSCs derived from bone marrow were amplified and seeded in collagen sponges at P4 ($n = 3$). They were then grown in hypoxia (3% O_2) for 7, 14, 21 and 28 days (D7, D14, D21 and D28, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium (ICM) alone or enriched with BMP-2 (50 ng/mL) and TGF- β 1 (10 ng/mL) (BMP-2 + TGF- β 1). The sponges were harvested and crushed. The total protein extracts were separated by electrophoresis on a 10% acrylamide gel under denaturing conditions. The proteins were then transferred to a PVDF membrane which was incubated with the anti-collagen II, anti-collagen IIB, anti-collagen I, anti-collagen X, anti-HtrA1 or anti- β -tubulin primary antibody. The molecular weight marker (MW kDa) is indicated on the left. Two representative experiments from two strains of MSCs are shown in panels (A,B).

2.2. TGF- β 3 Effect on the Differentiation Status of the Chondrocytes Derived from BM-MSCs

To assess the influence of TGF- β 3 on the differentiation of BM-MSCs into chondrocytes, cells were grown in hypoxia for 7, 14, 21 and 28 days in the conditions described above, namely in ICM (control), in the presence of BMP-2 and TGF- β 1 (BMP-2 + TGF- β 1 cocktail) and in the presence of only TGF- β 3 or in combination with BMP-2 (BMP-2 + TGF- β 3 cocktail). The same phenotypic markers described above were evaluated by RT-qPCR (Figures 4 and 5) and by western blot (Figures 6 and 7). Thus, our results confirmed the trends previously established, namely that the use of BMP-2 + TGF- β 1 induced the synthesis of *Col2a1* (Figure 4A), *Acan* (Figure 4B), *Col9a1* (Figure 4C), *Snorc* (Figure 4E) and significantly increased the *Col2a1:Col1a1* ratio (Figure 4F) in a time-dependent manner. In ICM, the mRNAs encoding these markers were not expressed by the cells, or only very weakly. It should be noted that when no data is present on the logarithmic representation on graphics for ICM and D0 conditions, it means that the gene was not detected during the experiment (quantity equal to 0).

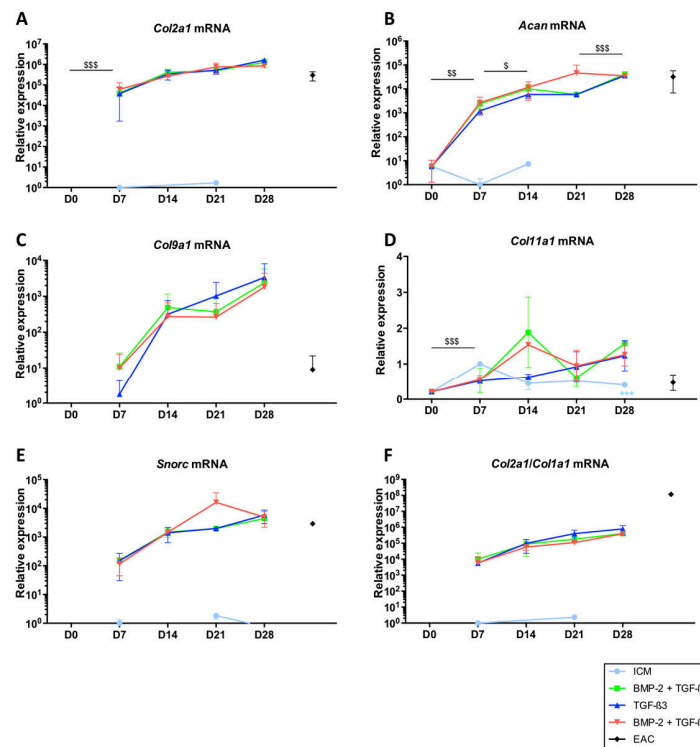


Figure 4. Expression of mRNAs of markers specific to articular cartilage during chondrogenic differentiation of MSCs cultured in the presence of BMP-2 + TGF- β 1 or TGF- β 3 alone or in combination with BMP-2. Equine MSCs derived from bone marrow were amplified and seeded in collagen sponges at P4 ($n = 3$). They were then grown in hypoxia (3% O_2) for 7, 14, 21 and 28 days (D7, D14, D21 and D28, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium (ICM) alone or enriched with BMP-2 (50 ng/mL) and TGF- β 1 (10 ng/mL) (BMP-2 + TGF- β 1), TGF- β 3 (10 ng/mL) or BMP-2 (50 ng/mL) and TGF- β 3 (10 ng/mL) (BMP-2 + TGF- β 3). The D0 condition corresponds to stem cells cultured in monolayer at P4 with the amplification medium and the equine articular chondrocyte (EAC) condition corresponds to the mRNAs extracted from EACs obtained after enzymatic digestion of healthy cartilage. mRNA amounts of *Col2a1* (A); *Acan* (B); *Col9a1* (C) *Col11a1* (D) and *Snorc* (E) were estimated by RT-qPCR after normalization relative to the β -actin reference gene. The *Col2a1:Col1a1* ratio is shown (F). A representative experiment is shown. The results present mean values \pm SD for the different experimental conditions studied and the significance of the values was tested using Student's t -test comparing different groups: firstly, a given culture condition (ICM, TGF- β 3, BMP-2 + TGF- β 3) compared with BMP-2 + TGF- β 1, at the same time of culture (** $p < 0.001$); secondly the TGF- β 3 condition at a given culture time, compared to the previous culture time (\$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.001$).

Regarding *Col11a1* (Figure 4D), the addition of growth factors modestly increased its mRNA amounts, to a lesser extent than the effect observed for mRNA encoding the other markers specific to the chondrocyte phenotype. No significant differences were observed when the cells were cultured in the presence of BMP-2 + TGF- β 1, TGF- β 3 alone or BMP-2 + TGF- β 3.

Regarding the *Col1a1* and *Col1a2* mRNAs (Figure 5A,B, respectively), the patterns were identical in the different growing conditions. Thus, culture in ICM led to the synthesis of smaller amounts of their respective messengers compared with culture conditions in the presence of growth factors and appeared to decrease with the duration of culture time. However, ICM did not lead to the protein synthesis of type II collagen and therefore is not favourable for the synthesis of a hyaline-like neocartilage substitute.

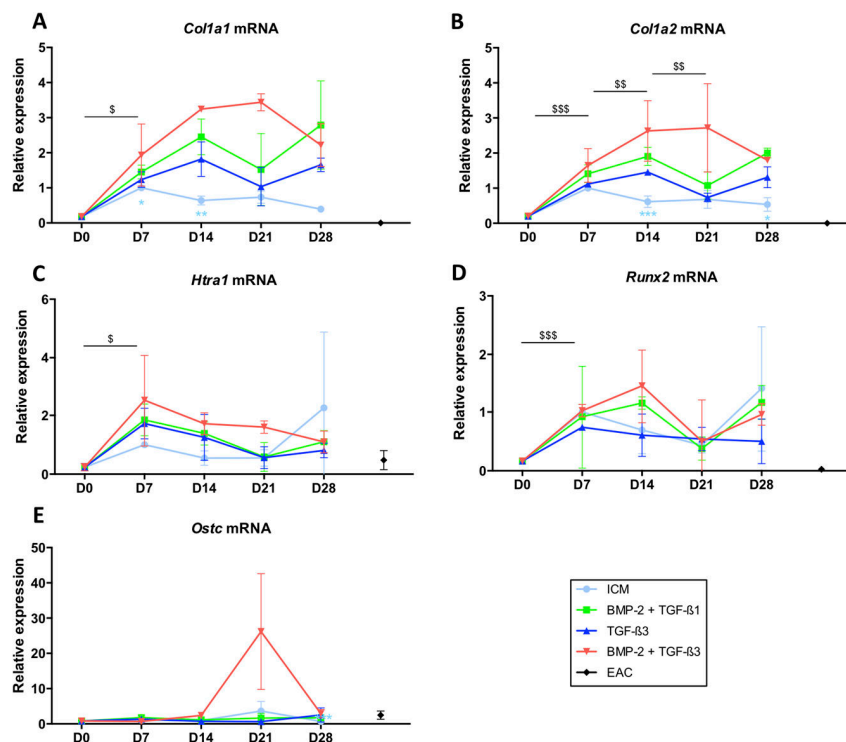


Figure 5. Expression of mRNAs encoding markers nonspecific to hyaline articular cartilage when MSCs were cultured in the presence of BMP-2 and TGF- β 1 or TGF- β 3 used alone or in combination with BMP-2. Equine MSCs derived from bone marrow were amplified and seeded in collagen sponges at P4 ($n = 3$). They were then grown in hypoxia (3% O_2) for 7, 14, 21 and 28 days (D7, D14, D21 and D28, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium (ICM) alone or supplemented with BMP-2 (50 ng/mL) and TGF- β 1 (10 ng/mL) (BMP-2 + TGF- β 1), TGF- β 3 (10 ng/mL) or BMP-2 (50 ng/mL) and TGF- β 3 (10 ng/mL) (BMP-2 + TGF- β 3). The D0 condition corresponds to stem cells cultured in monolayer at P4 with the amplification medium and the equine articular chondrocyte (EAC) condition corresponds to the mRNAs extracted from EACs obtained after enzymatic digestion of healthy cartilage. mRNA levels of *Col1a1* (A); *Col1a2* (B), *Htra1* (C), *Runx2* (D) and *Ostc* (E) were estimated by RT-qPCR after normalization relative to the β -actin reference gene. The results present mean values \pm SD for the different experimental conditions studied and the significance of the values was tested using Student's *t*-test comparing different groups: firstly, a given culture condition (ICM, TGF- β 3, BMP-2 + TGF- β 3) compared with BMP-2 + TGF- β 1, at the same time of culture (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); secondly the TGF- β 3 condition at a given culture time, compared to the previous culture time (\$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.001$).

The addition of TGF- β 3 showed the lowest mRNA synthesis of *Col1a1* and *Col1a2*, without a statistically significant effect. Conversely, the maximal expression of the *Col1a1* and *Col1a2* mRNAs was observed for the BMP-2 + TGF- β 3 cocktail at 14 and 21 days of culture but culturing them for

28 days decreased their expression, becoming comparable to those found in the other combinations of growth factors studied.

The expression of *Htra1* was not modulated according to the growth factors used during the culture and its levels of mRNAs tended to decrease with culture time, becoming minimal after 28 days of culture (Figure 5C). In addition, *Runx2* was not induced by the addition of growth factors and its expression did not vary with culture time (Figure 5D), as was case for the expression of *Ostc* (Figure 5E).

The western blot analyses, however, revealed differences that were not highlighted by the RT-qPCR experiments. Our results indicate that the use of TGF- β 3, alone or in combination with BMP-2 led to the protein synthesis of type II collagen and the effect was even greater with increasing culture time (Figure 6). The addition of TGF- β 3 alone, however, showed higher synthesis of type II collagen compared with the BMP-2 + TGF- β 3 or the BMP-2 + TGF- β 1 cocktail at 28 days. The trend was similar when considering the type IIB collagen. As described above, type X collagen was not detected in our experimental conditions. Regarding HtrA1, its synthesis decreased with culture time and protein expression was at its lowest in the BMP-2 + TGF- β 3 cocktail after 28 days of culture. Its protein levels were comparable to those found in the BMP-2 + TGF- β 1 culture conditions after D28. Finally, in regard to the protein levels of type I collagen, the band intensities again suggest an increase in protein levels as a function of culture time with a maximum expression after 28 days of culture. However, its expression was highest when the cells were cultured in the presence of TGF- β 3 alone, for mature and immature forms of this collagen. Type I collagen expression was more restricted when the cells were cultured in the presence of BMP-2 for 28 days, in association with TGF- β 1 or of TGF- β 3. However, the BMP-2 + TGF- β 1 cocktail and 28 days of culture appears to be the most favourable growing conditions to hinder the expression of type I collagen.

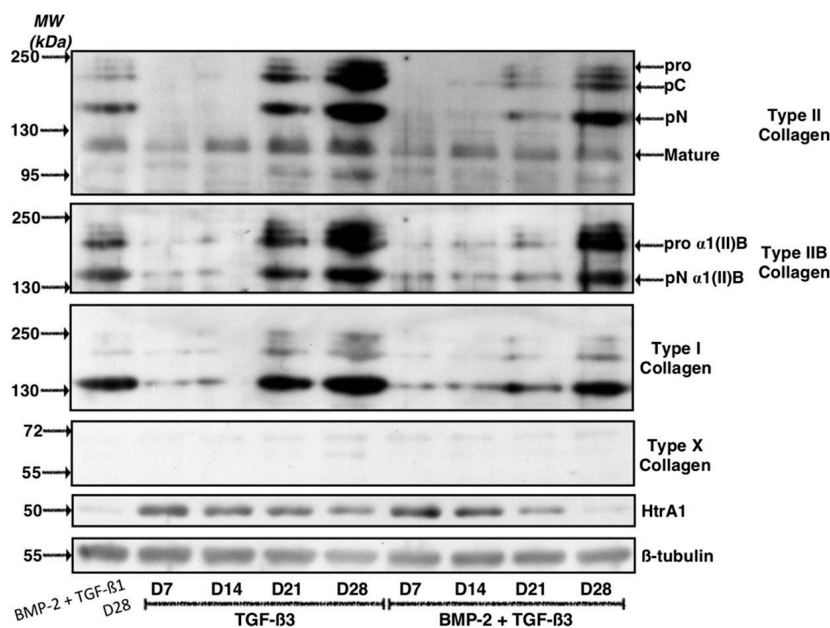


Figure 6. Kinetic study of the expression of cartilage matrix proteins after culture in the presence of BMP-2 and TGF- β 3. Equine MSCs derived from bone marrow were amplified and seeded in collagen sponges at P4 ($n = 4$). They were then cultured in hypoxia (3% O_2) for 7, 14, 21 and 28 days (D7, D14, D21 and D28, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium (ICM) supplemented with TGF- β 3 (10 ng/mL) alone or in combination with BMP-2 (50 ng/mL) (BMP-2 + TGF- β 3). The sponges were harvested and crushed. The total protein extracts were separated by electrophoresis on a 10% acrylamide gel under denaturing conditions. The proteins were then transferred to a PVDF membrane which was incubated with the anti-collagen II, anti-collagen IIB, anti-collagen I, anti-collagen X, anti-HtrA1 or anti- β -tubulin primary antibody. The molecular weight (MW kDa) is indicated on the left. A representative experiment from different strains of MSCs is shown.

A second western blot experiment was carried out on the same samples but focused particularly on protein expression of type IIB and type IX collagens (Figure 7). This experiment aimed to determine the most favourable growing conditions for maximal expression of these phenotypic markers of hyaline articular cartilage. Thus, the results indicate that for culture conditions in the presence of BMP-2 + TGF- β 1 or in the presence of TGF- β 3 alone leads to the highest synthesis of type IIB and IX collagens. The expression of these two proteins appeared to be compromised in the presence of BMP-2 + TGF- β 3 (Figure 7A). For the second strain studied, our results suggest that growth factors have quite similar effects on the protein expression of type IIB collagen, while the BMP-2 + TGF- β 1 cocktail appeared to lead to the synthesis of the highest amounts of type IX collagen, compared with the TGF- β 3 and BMP-2 + TGF- β 3 cocktail (Figure 7B).

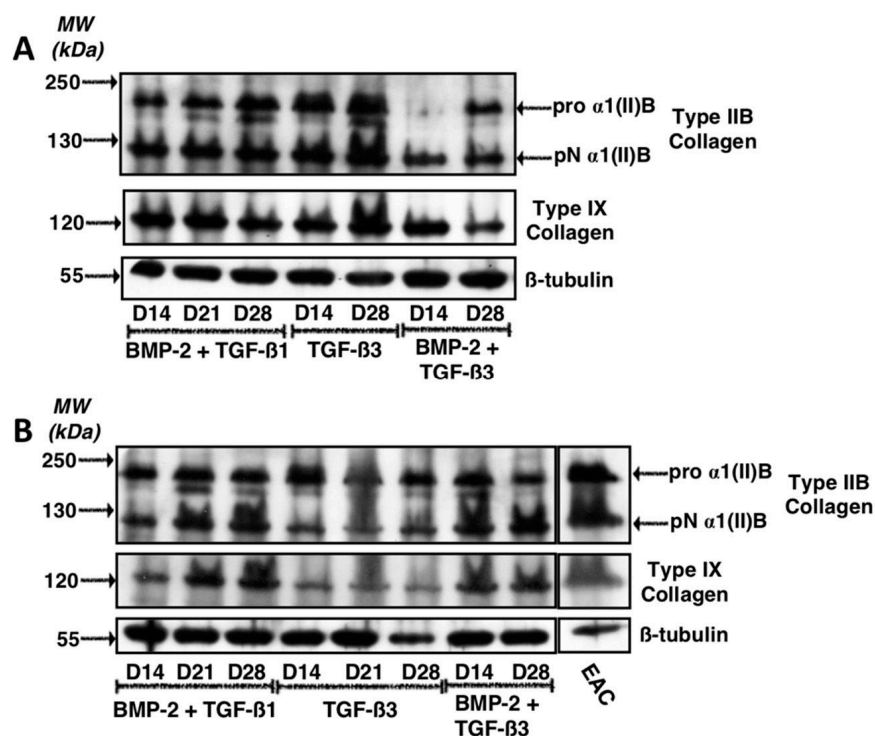


Figure 7. Expression of type IX and IIB collagens after culture in the presence of BMP-2 and TGF- β 1 or TGF- β 3 used alone or in combination with BMP-2. Equine MSCs derived from bone marrow were amplified and seeded in collagen sponges at P4 ($n = 2$). They were then cultured in hypoxia (3% O_2) for 14, 21 and 28 days (D14, D21 and D28, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium (ICM) supplemented with TGF- β 3 (10 ng/mL) alone or in combination with BMP-2 (50 ng/mL) (BMP-2 + TGF- β 3) or BMP-2 (50 ng/mL) and TGF- β 1 (10 ng/mL) (BMP-2 + TGF- β 1). The sponges were harvested and crushed. The total protein extracts were separated by electrophoresis on 10% acrylamide gel under denaturing conditions. The proteins were then transferred to a membrane which was incubated with the anti-collagen IIB, anti-collagen IX or anti- β -tubulin primary antibody. The molecular weight (MW kDa) is indicated on the left. Two representative experiments from two strains of MSCs are shown in panels (A,B). EAC: equine articular cartilage.

2.3. Effect of Long-Term Culture on the Phenotypic Status of the Chondrocytes Derived from BM-MSCs

Since TGF- β 3 alone or in combination with BMP-2 had no additive effect compared with the BMP-2 + TGF- β 1 cocktail, to try to improve the chondrocyte phenotype, we tested another hypothesis. Culture was extended in the presence ICM supplemented with or without BMP-2 + TGF- β 1 for 42 days to study the behaviour of the MSCs differentiated into chondrocytes in a longer-term culture and compare with a culture of 28 days. Thus, prolonging culture for an additional 14 days on three strains

led to a modest increase in the mRNA amounts of *Col2a1* (Figure 8A), *Acan* (Figure 8B) and on the *Col2a1:Col1a1* ratio (Figure 8D) compared with a culture time of 28 days. However, the expression of *Snorc* mRNAs dropped dramatically under these conditions (Figure 8C). Regarding the two messengers encoding type I collagen chains, increasing the culture time to 42 days compared with 28 days led to a moderate increase in the *Col1a1* mRNA levels (Figure 9A), whereas those of *Col1a2* remained stable (Figure 9B).

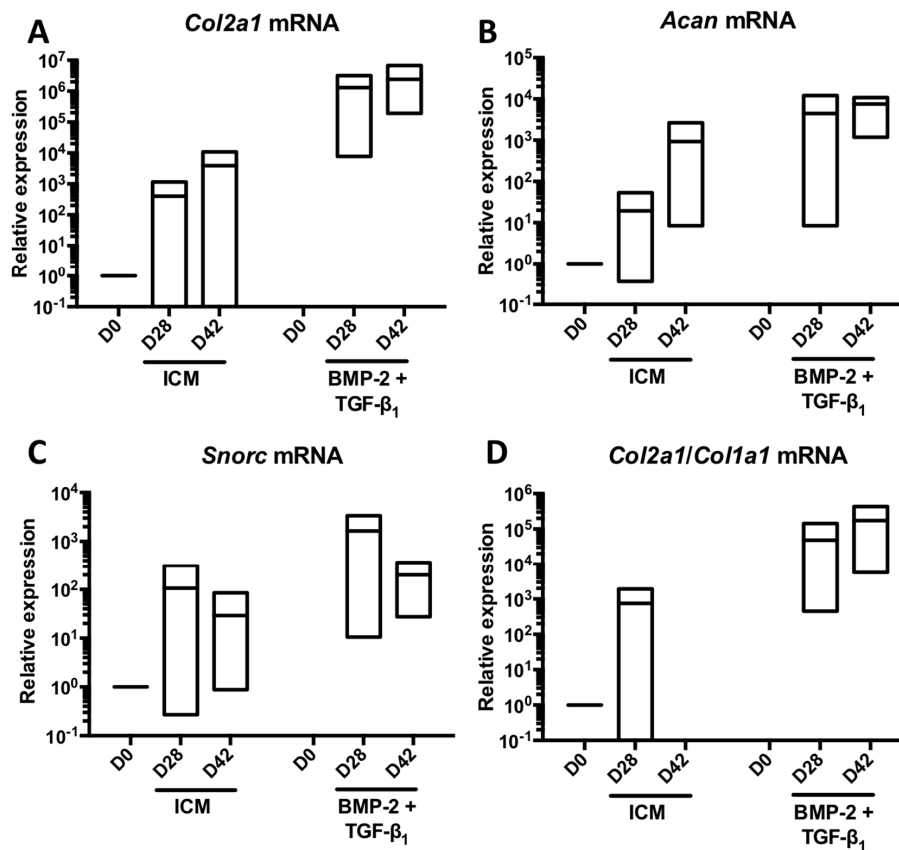


Figure 8. Increase in the culture time of MSCs in the presence of BMP-2 and TGF-β₁ to a total of 42 days and its influence on the expression of mRNAs encoding specific markers of hyaline articular cartilage. Equine MSCs derived from bone marrow were amplified and seeded in collagen sponges at P4 ($n = 3$). They were then cultured in hypoxia (3% O₂) for 28 and 42 days (D28 and D42, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium (ICM) alone or in association with BMP-2 (50 ng/mL) and TGF-β₁ (10 ng/mL) (BMP-2 + TGF-β₁). The D0 condition corresponds to the stem cells cultured in monolayer at P4 with the amplification medium. mRNA levels of *Col2a1* (A); *Acan* (B) and *Snorc* (C) were estimated by RT-qPCR after normalization relative to the *β-actin* reference gene. The *Col2a1:Col1a1* ratio is shown (D). The results are presented as floating bars (mean, extreme values) and the significance of the values was tested using Student's *t*-test.

The relative expression of *Htra1* appeared stabilized or slightly increased by extending the culture period in the presence of BMP-2 + TGF-β₁ (Figure 9C), while that of *Runx2* was decreased by 2-fold between 28 and 42 days in the presence of these chondrogenic factors (Figure 9D). *Ostc* mRNAs levels did not seem to be influenced by the duration of culture time (Figure 9E).

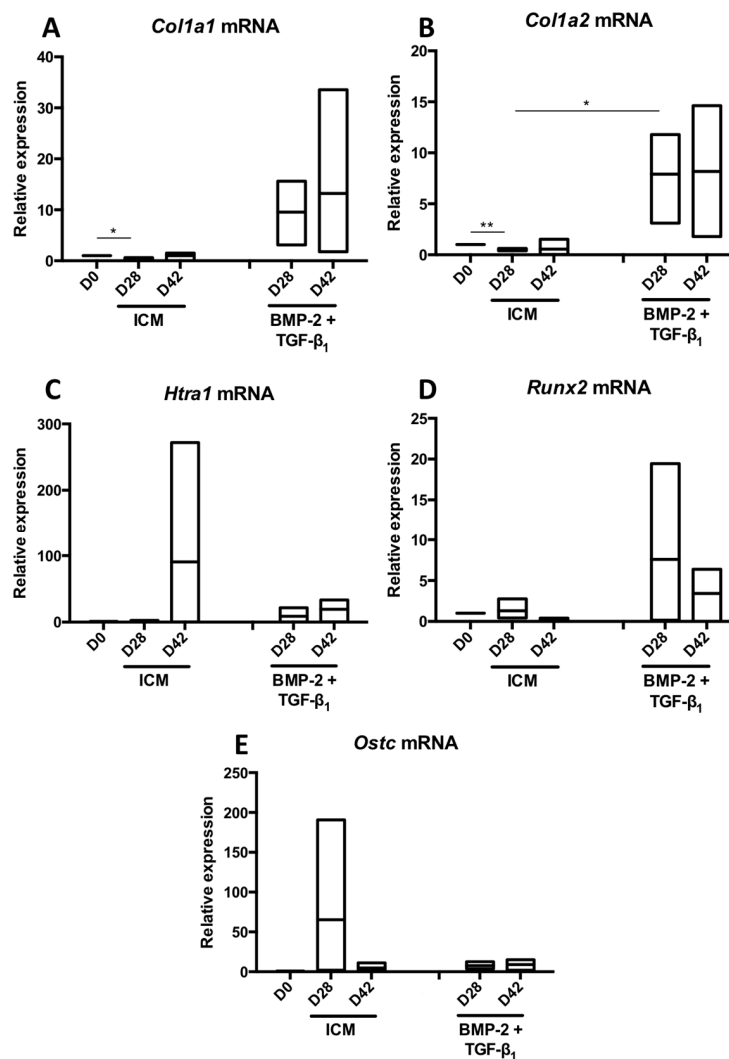


Figure 9. Increase in the culture time of MSCs in the presence of BMP-2 and TGF- β 1 to a total of 42 days and its influence on the expression of mRNAs encoding the nonspecific markers of hyaline articular cartilage. Equine MSCs derived from bone marrow were amplified and seeded in collagen sponges at P4 ($n = 3$). They were then cultured in hypoxia (3% O_2) for 28 and 42 days (D28 and D42, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium (ICM) alone or supplemented with BMP-2 (50 ng/mL) and TGF- β 1 (10 ng/mL) (BMP-2 + TGF- β 1). The D0 condition corresponds to the stem cells cultured in monolayer at P4 with the amplification medium. mRNA levels of *Col1a1* (A); *Col1a2* (B) *Htra1* (C); *Runx2* (D) and *Ostc* (E) were estimated by RT-qPCR after normalization relative to the β -actin reference gene. The results are presented as floating bars (mean, extreme values) and the significance of the values was tested using Student's *t*-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

The study of ECM protein synthesis in these experimental conditions indicated that a longer incubation period of 42 days led to a strong increase in total type II collagen, including pro α 1(II)B and pN α 1(II)B collagen, characterizing mature chondrocytes (Figure 10). However, the same pattern was observed for type I collagen, which showed high expression in the ECM in these culture conditions, compared with a culture of 14 or 28 days. In the control ICM condition, the expression of type I collagen, however, decreased with culture time, although the expression of β -tubulin was also lower at 14 and 42 days compared with the culture of 28 days. Type X collagen was still not detectable after 42 days of culture, whereas HtrA1 stabilized between 28 and 42 days of culture.

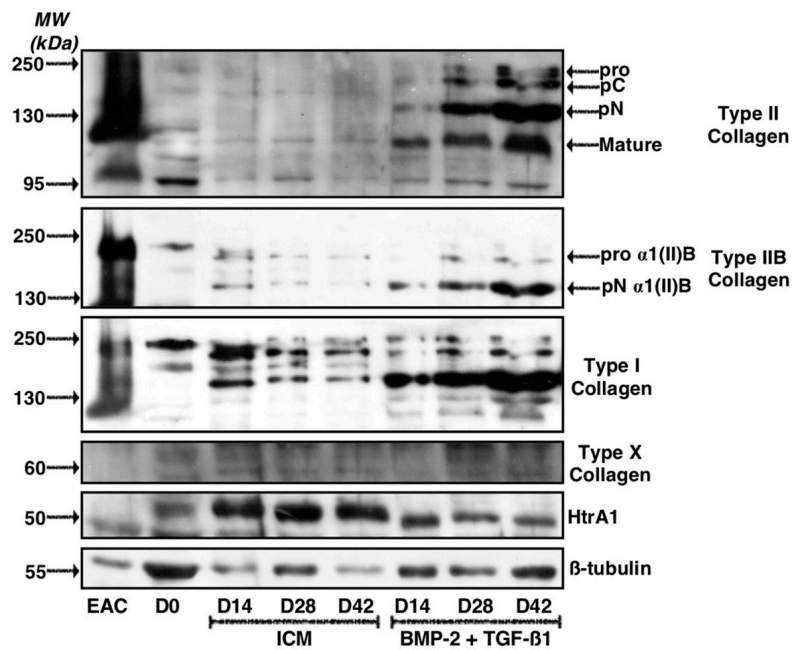


Figure 10. Kinetic study of cartilage matrix proteins expression when MSCs were cultured in the presence of BMP-2 and TGF- β 1 for 42 days. Equine MSCs derived from bone marrow were amplified and seeded in collagen sponges at P4. They were then cultured in hypoxia (3% O₂) for 14, 28 and 42 days (D14, D28 and D42, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium (ICM) alone or supplemented with BMP-2 (50 ng/mL) and TGF- β 1 (10 ng/mL) (BMP-2 + TGF- β 1). The sponges were harvested and crushed. The total protein extracts were separated by electrophoresis on a 10% acrylamide gel under denaturing conditions. The proteins were then transferred to a PVDF membrane which was incubated with the anti-collagen II, anti-collagen IIB, anti-collagen I, anti-collagen X, anti-HtrA1 or anti- β -tubulin primary antibody. The molecular weight (MW kDa) is indicated on the left. D0: stem cells cultured in amplification medium at P4; EAC: equine articular cartilage.

2.4. Effect of Knockdown with *Col1a1* and/or *Col1a2* siRNAs on the Quality of the ECM Synthesized by Chondrocytes Derived from MSCs

To attempt to improve the functional index of MSCs differentiated into chondrocytes, an RNA interference approach was implemented. First, the effect of three *Col1a2* siRNAs were tested at the mRNA level to verify their efficiency on the targeted mRNAs (Figure 11). The cells were incubated for 14 days. The results show that transfection with a control siRNA had no significant effect on the *Col1a2* mRNAs, except at a concentration of 75 nM where off-target action appeared, causing an increase in levels (Figure 11A). Regarding the effect of the tested *Col1a2* siRNAs, the *Col1a2* siRNA #1 did not cause any significant effect on the expression of *Col1a2* mRNAs, unlike the *Col1a2* siRNA #2 which led to a significant decrease of about 50% of the expression of *Col1a2* messengers compared with the control siRNA condition at the same concentration. Transfection of 75 nM of *Col1a2* siRNA #2 caused stronger inhibition of its target, although an off-target effect was observed upon transfection of a control siRNA at the same concentration. Regarding *Col1a2* siRNA #3, although there was a knockdown trend in the amounts of *Col1a2* mRNAs, the effects were very weak and *Col1a2* siRNA #2 remained the most effective on its target.

Col1a1 mRNA analysis indicated that transfection with *Col1a2* siRNA does not modulate its expression (Figure 11B). Furthermore, there was no significant effect when the cells were transfected with 25 and 50 nM of siRNAs, although off-target effects or an indirect effect via the production of other proteins caused by the silencing of *Col1a2* were observable with 75 nM of *Col1a2* #3 siRNAs. Concerning *Col2a1* mRNA (Figure 11C), although there was some inter-strain variability, transfection by different siRNAs led to no significant modulation of its expression. Finally, analysis of the *Col2a1:Col1a2* ratio

indicates that transfection with *Col1a2* siRNA #2 led to an increase in this ratio, regardless of the concentration (Figure 11D). This ratio was enhanced by 10-fold compared with the B + T condition, although it remained lower than that found in EACs, due to persistent expression of *Col1a2* mRNA in the MSC culture. There was no *Col1a2* expression in EACs (Figure 11A).

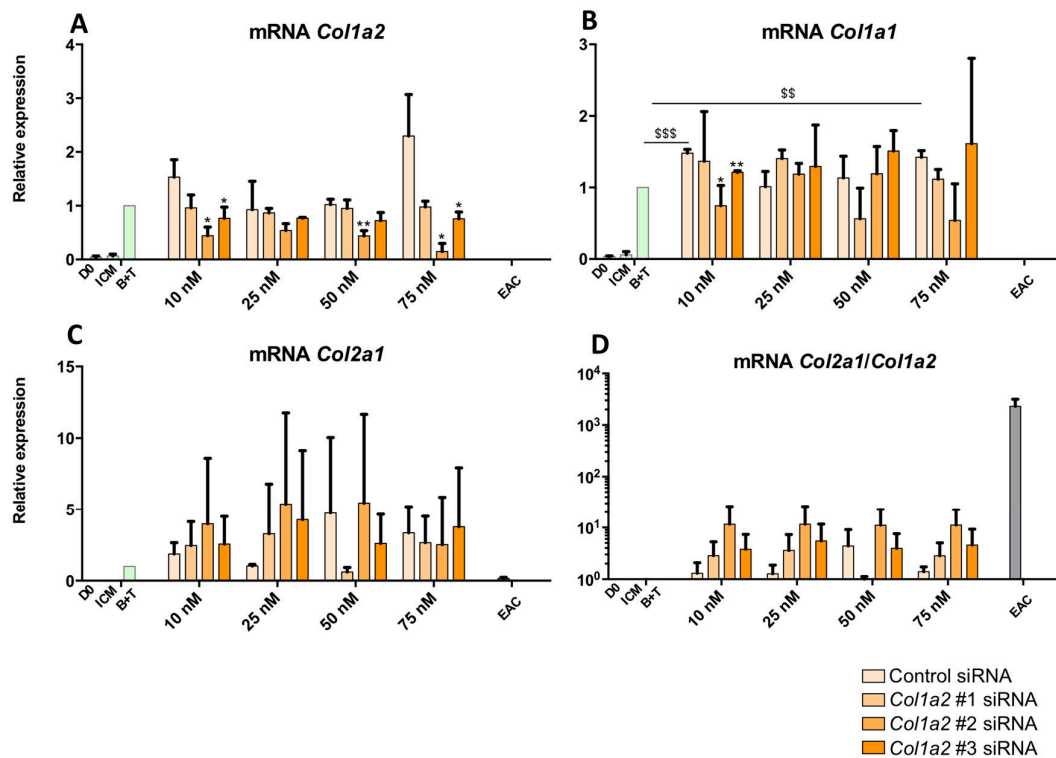


Figure 11. Effect of *Col1a2* siRNAs on the steady-state mRNA amounts of specific and nonspecific markers of chondrocytes derived from MSCs after 14 days of culture. Equine MSCs derived from BM were amplified and seeded in type I/III collagen sponges at P4 ($n = 2$). They were then cultured in hypoxia (3% O_2) for 14 days in incomplete chondrogenic medium (ICM) in the absence or presence of BMP-2 (50 ng/mL) and TGF- β 1 (10 ng/mL) (B + T). The MSCs were transfected with a control siRNA or one of the three *Col1a2* siRNAs tested (#1, #2 and #3, respectively) at various concentrations (10, 25, 50 and 75 nM) in the presence of B + T. The D0 condition corresponds to MSCs cultured in monolayer at P4 with the amplification medium, while the equine articular chondrocyte (EAC) condition corresponds to the mRNAs extracted from EACs obtained from enzymatic digestion of healthy cartilage. mRNA levels of *Col1a2* (A); *Col1a1* (B) and *Col2a1* (C) were estimated by RT-qPCR after normalization relative to the β -actin reference gene. The *Col2a1*:*Col1a2* ratio is shown (D). A representative experiment is shown. The results present mean values \pm SD for the different experimental conditions studied and the significance of the values was tested using Student's *t*-test to compare : treatment without siRNA (B + T) compared to treatment with a Control siRNA, at each concentration ($\$ p < 0.05$, $$$ p < 0.01$, $$$$ p < 0.001$) and treatment with a *Col1a2* siRNA compared to treatment with a Control siRNA, at the same concentration (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

As described above, increasing the culture time to 28 and 42 days led to a significant enhancement in the expression of the markers specific to hyaline articular cartilage. However, in parallel, the expression of type I collagen also increased markedly. To verify the validity of the approach of RNA interference to increase the functional index of MSCs differentiated into chondrocytes, we also tested the effect of our *Col1a2* siRNAs at 28 days (Figure 12A–D) and 42 days of culture (Figure 12E–G). A representative experiment of three replicates is presented. Our results indicate that the *Col1a2* mRNAs levels were systematically reduced by transfection of *Col1a2* siRNAs compared to

the control siRNA condition at the same concentration (Figure 12A). This effect is most pronounced at a concentration of 25 nM for all *Col1a2* siRNAs and 25 and 50 nM when considering the *Col1a2* siRNA #3. Inhibition with the *Col1a2* siRNA #3 transfected at a concentration of 25 and 50 nM was approximately 80% compared with the control siRNA condition at the same concentrations. Of interest, this transfection with *Col1a2* siRNAs seemed to lead to a moderate decrease in the expression of the *Col1a1* (Figure 12B). This inhibition was most pronounced for the *Col1a2* siRNA #3 at 25 and 50 nM (70% and 50% respectively) compared with the control siRNA condition at identical concentrations. These results suggest that the *Col1a2* siRNA #3 targets the mRNAs encoding the two chains of type I collagen. Regarding the *Col2a1* mRNAs, transfection with 25 nM of *Col1a2* siRNA #1 led to a decrease of 50% of its amount compared with the control siRNA condition at the same concentration (Figure 12C). Transfection with *Col1a2* siRNAs #2 or #3 did not influence its expression compared with the B + T condition, whereas at 50 nM, the *Col1a2* siRNA #3 caused an off-target effect leading to a significant decrease in *Col2a1* mRNA levels. Transfection at a molarity of 75 nM showed off-target effects, involving *Col1a2* siRNA #2 and #3 in particular, compared with control siRNA at the same concentration, or in the B + T cocktail. Finally, the *Col2a1:Col1a2* ratio remained unchanged when MSCs were transfected with a control siRNA, compared with the B + T condition (and no siRNA) and regardless of the transfection concentration (Figure 12D). The ratio increased 2-fold when cells were transfected with *Col1a2* siRNA #1 at 10 nM and 25 nM, while transfection of higher concentrations did not affect this ratio compared with the control siRNAs conditions. These same trends were slightly amplified upon transfection with the *Col1a2* siRNA #2, while the *Col1a2* siRNA #3 caused an increase in this ratio by a factor of 8.5 at 25 nM and 3 at 50 nM.

When the cells were cultured for 42 days, transfection with *Col1a2* siRNA #3 (10 and 50 nM) led to a highly significant inhibition of the expression of *Col1a2* mRNAs (Figure 12E). Moreover, 50 nM of *Col1a2* siRNAs #2 caused a 50% decrease in the expression of the target compared to the control siRNA condition. Furthermore, transfection with *Col1a2* siRNAs #3 invariably led to a very strong inhibition of the expression of *Col1a1* mRNAs (Figure 12F), whereas the *Col1a2* siRNA #1 did not appear to have a significant effect and *Col1a2* siRNA #2 caused a modest decrease in the expression of *Col1a1* compared with control siRNA and with the B + T cocktail alone (no siRNA). At 75 nM, *Col1a2* siRNA #2 caused off-target effects and led to increased expression of *Col1a1* mRNAs. Moreover, with regard to the expression of *Col2a1* mRNAs, *Col1a2* siRNA #3 caused a collapse in its expression, suggesting a strong off-target effect (Figure 12G), whereas none of the other conditions modulate the expression of *Col2a1*.

All these results obtained after 14, 28 and 42 days of culture indicate that *Col1a2* siRNA #2 is the best candidate for the RNA interference strategy. This siRNA species decreased *Col1a2* expression, albeit sometimes more modestly than *Col1a2* siRNA #3, with much less marked off-target effects.

Finally, to check whether simultaneous knockdown of both *Col1a1* and *Col1a2* siRNA is a more appropriate strategy to increase the quality of newly synthesized cartilage, simultaneous transfection of *Col1a1* siRNA (previously tested and validated) and *Col1a2* siRNA (*Col1a2* siRNA #2 of the present study) was carried out after incubation of the MSCs treated with the B + T cocktail for 42 days and then RT-qPCR (Figure 13A–E) and western blot were performed (Figure 14). These siRNAs were transfected individually or in combination (50 nM each).

Col1a1 siRNA caused a 30% decrease in the mRNA amounts of its target (Figure 13A) compared with the control siRNA condition, whereas the *Col1a2* siRNA caused a 50% knockdown of *Col1a1* mRNAs%. Simultaneous transfection of the two siRNAs induced the same 50% inhibition in *Col1a1* mRNA expression. Similarly, transfection with the *Col1a2* siRNA alone or in association with *Col1a1* siRNA induced a decrease of approximately 50% in the expression of *Col1a2* (Figure 13B). None of the experimental conditions studied here influenced the expression of *Col2a1* (Figure 13C). Finally, the *Col2a1:Col1a1* (Figure 13D) or the *Col2a1:Col1a2* ratios (Figure 13E) were highest when the cells were transfected with *Col1a2* siRNA alone or combination with *Col1a1* siRNA, even though this ratio was lower compared to that observed in EACs.

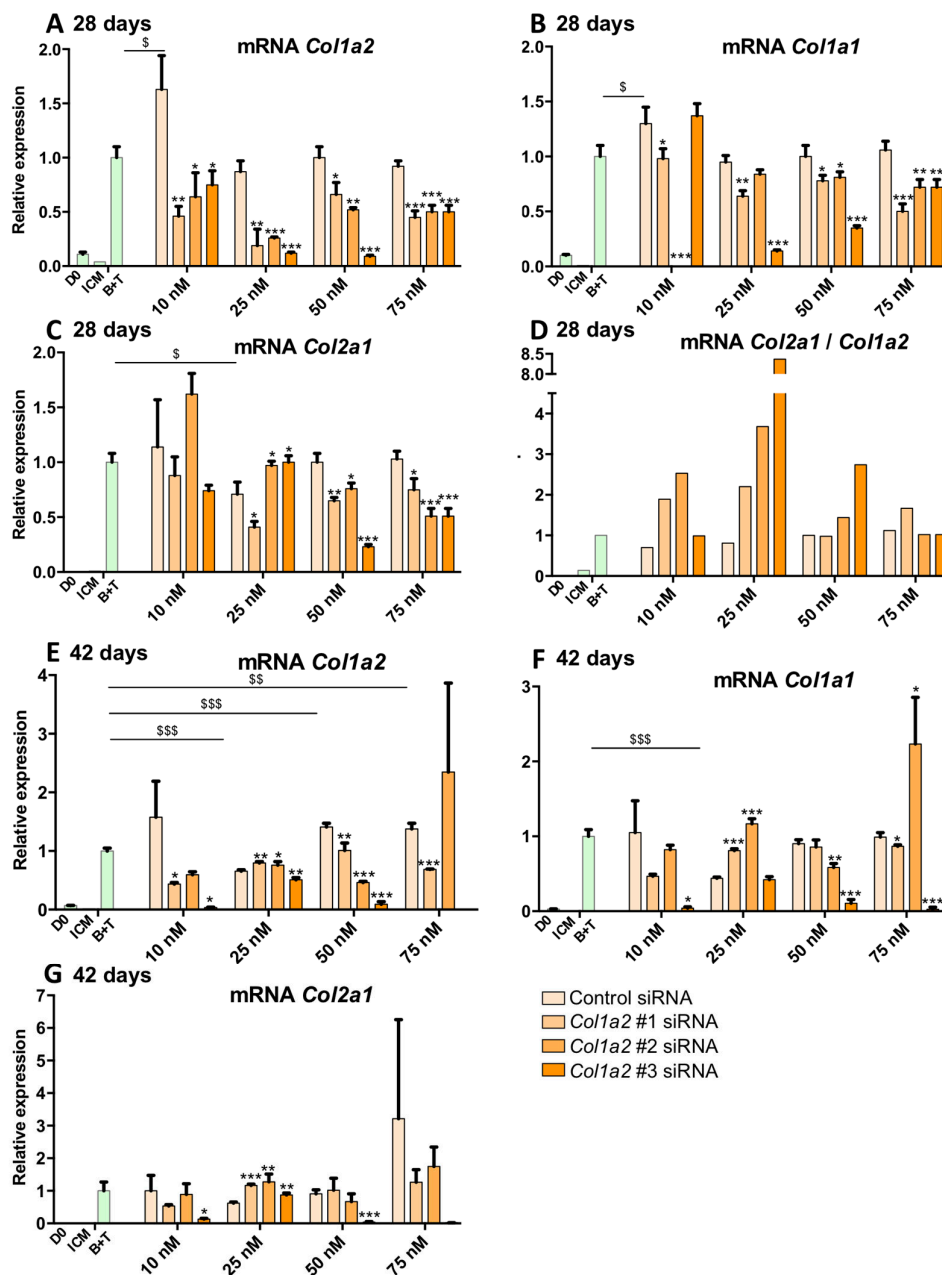


Figure 12. Effect of *Col1a2* siRNAs on the mRNA amounts of specific and nonspecific markers of chondrocytes derived from MSCs cultured for 28 and 42 days. Equine MSCs derived from BM are amplified and seeded in type I/III collagen sponges at P4 ($n = 3$, one of three representative experiments is shown). They were then cultured in hypoxia (3% O_2) for 28 days (A–D) or 42 days (E–G) in incomplete chondrogenic medium (ICM) in the absence or presence of BMP-2 (50 ng/mL) and TGF- β 1 (10 ng/mL) (B + T). The MSCs were transfected with a control siRNA or one of the three *Col1a2* siRNAs tested (#1, #2 and #3, respectively) at various concentrations (10, 25, 50 and 75 nM) in the presence of B + T. The D0 condition corresponds to MSCs cultured in monolayer at P4 with the amplification medium. mRNA levels of *Col1a2* (A,E), *Col1a1* (B,F) and *Col2a1* (C,G) were estimated by RT-qPCR after normalization relative to the β -actin reference gene. The *Col2a1:Col1a2* ratio is shown (D). The results present mean values \pm SD for the different experimental conditions studied and the significance of the values was tested using Student’s *t*-test to compare : treatment without siRNA (B + T) compared to treatment with a Control siRNA, at each concentration ($\$ p < 0.05$, $\$\$ p < 0.01$, $\$\$\$ p < 0.001$) and treatment with a *Col1a2* siRNA compared to treatment with a Control siRNA, at the same concentration ($* p < 0.05$, $** p < 0.01$, $*** p < 0.001$).

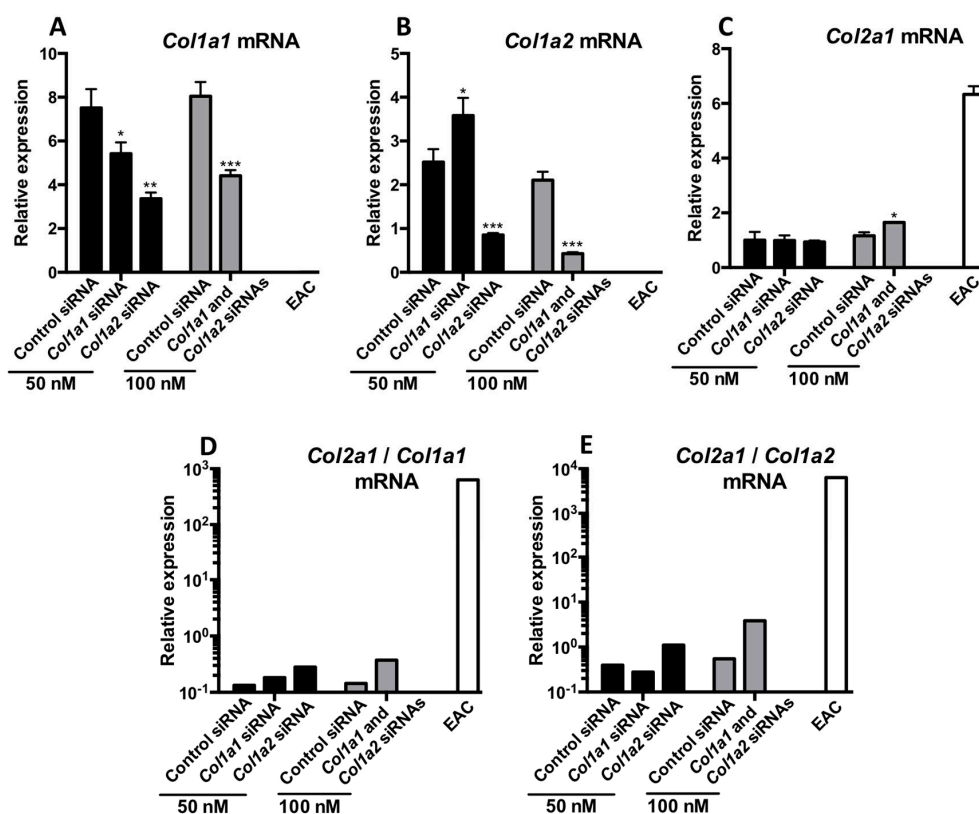


Figure 13. Effect of *Col1a1* and/or *Col1a2* siRNAs on the mRNA levels of specific and nonspecific markers of chondrocytes derived from MSCs cultured for 42 days. Equine MSCs derived from BM were amplified and seeded in type I/III collagen sponges at P4 ($n = 3$, one of three representative experiments is shown). They were then cultured in hypoxia (3% O₂) for 42 days (A–E,G) in incomplete chondrogenic medium (ICM) in the presence of BMP-2 (50 ng/mL) and TGF- β 1 (10 ng/mL). The MSCs were transfected with a control siRNA or *Col1a1* and/or *Col1a2* siRNAs (50 nM of each siRNA was transfected). After 42 days of culture, mRNA levels of *Col1a1* (A); *Col1a2* (B) and *Col2a1* (C) were estimated by RT-qPCR after normalization relative to the β -actin reference gene. The *Col2a1:Col1a1* and *Col2a1:Col1a2* ratios are shown (D,E respectively). The results present mean values \pm SD for the different experimental conditions studied and the significance of the values was tested using Student's *t*-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Regarding the ECM proteins secreted by MSCs differentiated into chondrocytes (Figure 14A), the results of RT-qPCR experiments confirmed the results of the 14-day cultures: the various maturation forms of type II collagen were not modulated by the siRNAs, with the possible exception of the *Col1a2* siRNA. Thus, type II collagen seems less quantitatively present in the ECM after 14 days in the *Col1a2* siRNA treated group.

Regarding type I collagen after 14 days of culture, transfection with the *Col1a1* and *Col1a2* siRNAs prevents its expression, especially the immature forms which were less detectable in neocartilage ECM, while the mature form of type I collagen appeared to be not down-regulated (Figure S2, for the quantitative analysis of the membranes). All these culture conditions with the siRNA treatment did not affect the expression of HtrA1 or type X collagen, the latter being undetectable under these conditions. Almost similar data upon transfection of *Col1a1* and/or *Col1a2* siRNAs are observed after 28 days of culture on types I, II and X collagens as well as HtrA1 (Figure 14B, the quantitative analysis of types II and I membranes are presented in Figure S3). The best combination to decrease all maturation forms of type I collagen is observed upon *Col1a1* and *Col1a2* siRNAs co-transfection, even though the *Col1a2* siRNA alone had a more pronounced interference effect compared to the *Col1a1* siRNA (Figure 14 B(ii)).

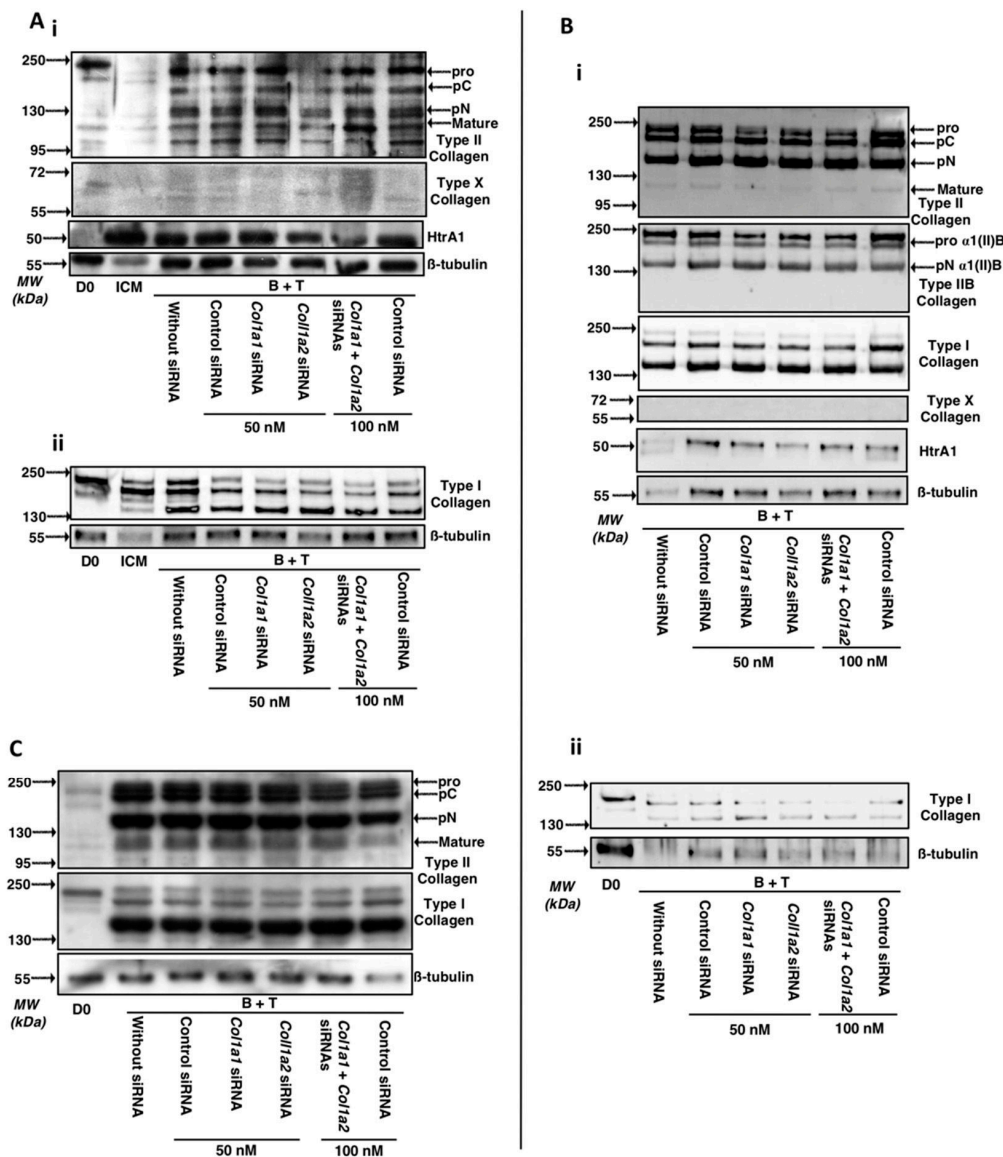


Figure 14. Effect of *Col1a1* and/or *Col1a2* siRNAs on the protein levels of specific and nonspecific markers of chondrocytes derived from MSCs cultured for 14, 28 and 42 days. Equine MSCs derived from BM were amplified and seeded in type I/III collagen sponges at P4 ($n = 3$, one of three representative experiments is shown). They were then cultured in hypoxia (3% O₂) for 14, 28 and 42 days (A–C respectively) in incomplete chondrogenic medium (ICM) in the presence of BMP-2 (50 ng/mL) and TGF-β1 (10 ng/mL). The MSCs were transfected with a control siRNA or *Col1a1* and/or *Col1a2* siRNAs (50 nM of each siRNA was transfected). After 14, 28 and 42 days of culture, the total protein extracted (15 μg for panels A and C; 5 μg (panel Bi) and 2.5 μg (Bii)) from type I/III collagen sponges were separated by electrophoresis on a 10% acrylamide gel under denaturing conditions. Panels Ai (type II and X collagens and HtrA1) and Aii (type I collagen) represent western-blots obtained from two strains. The proteins were then transferred to a PVDF membrane and the latter was incubated with the anti-collagen II, anti-collagen I, anti-collagen X, anti-HtrA1 or anti-β-tubulin primary antibody. The molecular weight marker (MW, kDa) is indicated on the left of the panels. D0: stem cells grown in amplification medium; ICM: MSCs cultured in ICM medium without growth factors.

Different results are obtained during the study of matrix proteins after 42 days of culture (Figure 14C). Indeed, in these culture conditions, the protein levels of type II collagen are not significantly modulated by transfection of siRNAs (regardless of the siRNA considered), compared to

a culture of 42 days with B + T without transfection of siRNAs. The protein levels of the mature form of type I collagen is not modulated by transfection of *Col1a1* and/or *Col1a2* siRNAs compared to the control siRNA condition (50 nM). In contrast, transfection with the *Col1a2* siRNA in combination with a *Col1a1* siRNA appears to modestly decrease the protein levels of immature forms of type I collagen (Figure S4, quantitative analysis of type I collagen membranes). *Col1a1* siRNA has no effect on the matrix expression of type I collagen, compared to the control siRNA condition.

3. Discussion

The aim of this study was to improve the protocol of chondrogenic differentiation of equine BM-MSCs. To date, the best protocol in our hands calls for culturing the cells in hypoxia in type I/III collagen sponges in the presence of BMP-2 and TGF- β 1 for 14 days. Here, we studied the effect of TGF- β 3 as a chondrogenic factor instead of the BMP-2 + TGF- β 1 combination and we increased culture time. Hypoxia has been proven time again beneficial for maintaining viability, proliferation and cell migration [34,35] and more specifically for promoting the differentiation of MSCs into chondrocytes [36]. Moreover, hypoxia blocks differentiation at the mature chondrocyte stage, avoiding chondrocyte hypertrophy [37,38]. Similarly, although there are other suitable biomaterials (e.g., type II collagen sponges) for cartilage engineering approaches, we chose type I/III collagen sponges since various studies have shown that chondrocytes and MSCs can be cultured in this scaffold [24,25]. Fibrin sealants are used to insert the neocartilage constructs in the joint and sutures can be added if needed. Furthermore, these sponges do not subsist in vivo since animal studies have shown that about 50% of the scaffold is degraded after 2 weeks [39].

Increasing the culture time to 28 days led to an increase in the markers specific to hyaline articular cartilage. However, type I collagen expression also increased but the level of expression of HtrA1 was lower than in the conventional 14 days culture. In addition, the increase in the specific markers of the chondrocyte phenotype with the BMP-2 and TGF- β 1 cocktail appears to be strain-dependent and in some strains, synthesis of type II collagen was maximal after only 14 days of culture. In these strains, protein synthesis of type IX collagen was also maximal after 14 days of culture and no longer varied with culture time. These results are in agreement with the literature data. In general, experts recommend maintaining a culture for at least 21 days to assay the chondrogenic differentiation potential of MSCs [40]. However, other studies suggest that a culture of 28 days increases the amount of glycosaminoglycans present in cartilage ECM but does not significantly influence type II collagen and aggrecan expression. Additionally, in vitro culture time extended to 28 days does not prevent endochondral ossification in vivo following subcutaneous implantation of the cartilaginous substitute [41]. We even extended culture time to 6 weeks to study the fate of the phenotypic markers of articular cartilage at a longer term and the same patterns as those observed after 28 days were observed. However, the expression of type I collagen also increased and it is difficult to determine the exact culture time required to obtain an optimal type II:type I collagen ratio at the protein level. Qualitative studies, i.e., immunohistochemical studies, are necessary to assess the quality of the neocartilage synthesized more accurately. Moreover, *Snorc* mRNA amounts collapsed after 42 days of culture. This transmembrane proteoglycan is co-expressed with *Col2a1*, *Acan* and *Sox9* [5] and the decrease in its expression may suggest an earlier regulation than other chondrocyte-specific markers when the optimal mature chondrocyte phenotype is acquired. In this case, longer in vitro culture times may be detrimental for the fate of the neocartilage after implantation. Therefore, a culture time of 14 to 28 days for chondrogenic differentiation prior to in vivo implantation is likely more appropriate. One study has shown that for longer culture times (up to 112 days; i.e., 16 weeks), protein expression of type II collagen is lower than in cultures of 56 days (8 weeks) and that of type I collagen is higher. Moreover, cell viability decreases dramatically after 56 days of culture compared with 28 days and literally collapses after 112 days of culture, with cell viability of less than 20% [42]. Taken together, our data suggest that culture times of 14 to 28 days for the neocartilage constructs intended for implantation appears to be the best compromise between ECM synthesis, ECM quality and cost-effectiveness.

Our study also attempted to determine whether a culture in the presence of TGF- β 3 is more beneficial than TGF- β 1, which is conventionally used in our protocol. Both isoforms are used to induce chondrogenesis of MSCs [28,43]. Our study shows that the use of TGF- β 3 in the differentiation of equine BM-MSCs led to higher synthesis of type II collagen protein compared with the BMP-2 + TGF- β 1 cocktail. However, type I collagen protein synthesis was once again amplified without a concomitant decrease in HtrA1 expression, which even increased relative to BMP-2 + TGF- β 1 or BMP-2 + TGF- β 3 cocktails. Regarding the mRNAs encoding the different markers studied, there was no advantage in the use of TGF- β 3 in terms of either specific or non-characteristic markers of hyaline articular cartilage (i.e., dedifferentiation markers, hypertrophy or terminal differentiation). Our results confirm our initial hypothesis, namely, that the BMP-2 + TGF- β 1 cocktail provides for the synthesis of a cartilage substitute the most similar to the hyaline articular cartilage of healthy horses.

Nonetheless, regardless of the culture conditions considered and regardless of the length of culture time, undesirable expression of type I collagen remains. Therefore, to try to improve the functional index of chondrocytes derived from equine MSCs, we further explored the benefits of using siRNAs targeting *Col1a1* and *Htra1* [27]. Our results have shown 50% inhibition of *Col1a1* mRNAs as well as for *Htra1*. Moreover, the use of BMP-2 + TGF- β 1 to differentiate equine MSCs led to a large decrease in HtrA1 protein expression, unlike for human chondrogenic MSCs differentiation [25,44], suggesting that RNA interference targeting HtrA1 is not necessary for equine cells. We conclude that the development and improvement of our strategy to reduce the high residual expression of type I collagen was justified but not for HtrA1.

RNA interference strategies using new siRNAs targeting other regions of *Col1a1* mRNA were tested. We also evaluated knocking down *Col1a2* instead of *Col1a1*, or both simultaneously. An imbalance in the stoichiometry of the presence of mRNAs encoding the two chains of type I collagen, which should theoretically be present at the ratio of two chains α 1(I) for one chain α 2(I) is expected to lead to degradation of the mRNA species present in excess as well as protein complexes [45–47]. The knockdown effect appeared more efficient when targeting *Col1a2* mRNA compared with an RNA interference strategy targeting *Col1a1* mRNAs. Type I collagen protein expression nevertheless persisted but practically met the same level of effectiveness found in the strategies developed in the human model, particularly when using in vitro amplified chondrocytes [26]. In addition, the development of this strategy in MSCs remains complex: it is difficult to obtain results perfectly equivalent to those obtained with dedifferentiated chondrocytes, because type I collagen is constitutively expressed and in very high amounts in MSCs [48]. However, it seems that our interference effect is weakly more pronounced when both *Col1a1* and *Col1a2* siRNAs were co-transfected. Nevertheless, it appears that the synthesis of type I collagen is weakly modulated by siRNAs after 42 days of culture. These results suggest that the synthesis of too high amounts of ECM no more allows siRNAs to block protein synthesis of type I collagen. This could be explained by the fact that dense ECM prevents the intracellular distribution of siRNAs or that transfection does not prevent the progressive accumulation of type I collagen during culture time. Therefore, this siRNA approach, which also shows better knockdown effects, seems more appropriate to limit the production of type I collagen at a shorter incubation time of the cultures, typically 14 and 28 days, before the emergence of too high amounts of ECM. Considering these results, it would be more appropriate to modify the intracellular distribution strategy of siRNAs. For example, nanocarriers have been tested for the delivery of siRNAs, particularly in the context of cancer research, to target multidrug-resistant cancers [49]. In addition, to reduce the potential toxicity of siRNA transfection, there are various types of nanocarriers (natural or artificial) and they can be developed to fit with the proposed strategy. For example, quantum dots combined with *RUNX2* siRNA by electrostatic interactions have been developed recently to reduce the hypertrophy of MSCs differentiated into chondrocytes [50]. This type of approach, although complex, opens up many opportunities to overcome the persistent expression of type I collagen.

All these data indicate that the original cocktail of BMP-2 + TGF- β 1 is the best solution for the chondrogenic differentiation of equine BM-MSCs, despite the higher expression of type II collagen matrix when TGF- β 3 is used. The cartilage ECM components also showed enhanced expression for culture times of up to 6 weeks. However, the increase in ECM production was moderate after 14 days of culture and the best compromise between high ECM synthesis and minimal production of type I collagen still needs to be identified. Thus, culture times between 14 and 28 days remains the best compromise.

Before considering in vivo trials in an equine clinical setting, the knockdown strategy should be improved. However, to date, our differentiation protocol may be applicable for pre-clinical trials in the horse to help to decide on the best in vitro culture conditions to produce hyaline-type articular cartilage in vivo.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Isolation and Cell Culture

All samples of bone marrow and cartilage were obtained at the Centre d'Imagerie et de Recherche sur les Affections Locomotrices Equines (CIRALE, Goustranville, France). Equine BM was collected from sternal puncture in a cohort of horses whose age ranged from 2 to 4 years. The volume of bone marrow collected was from 30 to 40 mL. The BM-MSCs samples were collected into sterile flasks containing 40 mL of citrate phosphate dextrose anticoagulant, stored at room temperature and processed within 1 to 2 h after collection. To isolate mononuclear cells (MNCs), each MSCs unit was diluted 1:1 with phosphate-buffered saline (PBS, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and carefully mixed with Ficoll-Paque PREMIUM (GE Healthcare Bio-Sciences, Chicago, IL, USA) medium. After density gradient centrifugation at $400 \times g$ for 30 min at room temperature, MNCs were washed once with PBS. MSCs-derived MNCs were seeded in culture flasks in low glucose-Dulbecco's modified Eagle Medium (LG-DMEM, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) containing 30% foetal calf serum (FCS, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 10^{-7} M dexamethasone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. A cocktail of antimicrobials composed of 100 IU/mL of penicillin, 100 μ g/mL of erythromycin and 0.25 mg/mL of fungizone was added to all the media used in this study. Non-adherent cells were removed 24 h after initial plating. The medium was changed twice weekly until adherent cells appeared, defined as passage zero (P0). After the appearance of several colonies in samples, cells were detached using trypsin/EDTA (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and then reseeded at 5000 cells/cm² (passage one, P1). Cell expansion was performed in the LG-DMEM media containing 20% FCS. The culture medium was changed three times per week and cells were passaged at 80% confluency until passage 3 (P3).

All the BM-MSCs strains used in the present study have been previously characterized. Thus, these BM-MSCs present a very high proliferation potential and these cells satisfy the criteria of stem cells definition established by the International Society for Cellular Therapy (ISCT) since they have the ability to adhere to a plastic culture support, they express a panel of characteristic surface proteins and possess multipotency capacity to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes [27].

Equine articular chondrocytes (EAC) were prepared from healthy metacarpal joint. Cartilage samples were cut into small slices, then chondrocytes were isolated by sequential digestion for 45 min at 37 °C with 2 mg/mL of type XIV protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and then overnight at 37 °C with 1 mg/mL of type I collagenase (from *Clostridium histolyticum*; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The cell suspension was filtered through a 70 μ m mesh nylon membrane and centrifuged at $200 \times g$ for 10 min. The pelleted cells were re-suspended in Trizol (Invitrogen) and RNA extraction was carried out according to the manufacturer's protocol. For western blot experiments, small cartilage slices were ground in liquid nitrogen and protein extraction was performed with RIPA

buffer. EAC extracts were used in real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blots as controls.

4.2. Chondrogenic Differentiation in 3D

The scaffold was manufactured by Symatèse Biomatériaux (Chaponost, France). These collagen sponges (100% of collagen, 2 mm thickness, 5 mm diameter, corresponding to a volume of 0.04 cm³, around 100 µm pore size) are composed of native type I (90–95%) and type III (5–10%) collagens from calf skin; they are crosslinked with glutaraldehyde to increase their stability. They are sterilized with β-radiation and they do not swell after rehydration.

MSCs were grown for 7, 14, 21, 28 and 42 days in a 3D scaffold to induce chondrogenesis according to the following protocol. Briefly, cells were subcultured as monolayers until P3, trypsinized and suspended in Incomplete Chondrogenic Medium (ICM, composed of high glucose-DMEM (HG-DMEM), dexamethasone 10⁻⁷ M, ascorbic acid-2-phosphate (50 µg/mL), proline (40 µg/mL, Merck, Darmstadt, Germany), sodium pyruvate (1 nM, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), Insulin Transferrin Selenium (ITS, diluted 1%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cell seeding onto the collagen sponges was performed by dropping 20 µL of the cell suspension on the sponge (5 × 10⁵ cells/sponge) in 96-well culture plates and incubating the plates at 37 °C under 5% CO₂. After 1 h, the cell constructs were transferred to 24-well plates in hypoxia (3% O₂), in ICM with BMP-2 (Inductos, 50 ng/mL, 12 mg dibotermine alpha, Medtronic BioPharma B.V., Dublin, Ireland) and TGF-β1 (10 ng/mL, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) or with TGF-β3 (10 ng/mL, Bio-Techne, Minneapolis, Minn, USA) or with BMP-2 (50 ng/mL) and TGF-β3 (10 ng/mL). This medium was changed twice a week until the end of the culture.

MSCs monolayers before induction were used as controls (day zero, D0).

4.3. RNA Interference-Knockdown of *Col1a1* and/or *Col1a2* mRNAs

When transfections were performed, MSCs were transfected with a mix of INTERFERin (6 µL/mL, Polyplus-transfection SA, Illkirch-Graffenstaden, France), OptiMEM (20% of the total volume of medium, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and siRNAs for 10 min at room temperature. siRNAs were used at 10, 25, 50, 75 and 100 nM. Then, the INTERFERin-siRNA complexes were added to the culture medium in which are present the collagen sponges seeded with the cells. When the culture performed for 14 days, the siRNAs are added to the medium at D0 and D7. When the culture was done for 28 days, the siRNAs were added to the medium after a chondrogenic differentiation phase without transfection, at D14, D17, D21 and D24. During a culture of 42 days, the same kinetics as for 28 days was adopted except that a final transfection was realized at D35.

siRNAs specifically targeted the *Col1a1* mRNA (siRNA sequence: 5'-GACAGUGAUCGAAUACAAA-3', Eurogentec, Liège, Belgium) and the *Col1a2* mRNA (siRNA sequence: n°1, 5'-GAUGG CUGCUCUAGAAAGA-3'; n°2, 5'-GCCAAGAACUGGUACAGAA-3'; n°3, 5'-GUUGACGCUACUCUGAAAU-3', Eurogentec, Liège, Belgium). A control siRNA was equally used (siRNA sequence: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3', Eurogentec, Liège, Belgium).

4.4. RNA Isolation and RT-qPCR

After treatment, sponges seeded with cells were rinsed once with ice-cold phosphate-buffered saline and total RNA was extracted using Trizol Reagent according to manufacturer's instructions. One microgram of RNA was reverse transcribed into cDNA using reverse transcriptase (MMLV, Invitrogen) and oligodT (Eurogentec). PCR was performed on a StepOnePlus Real-Time PCR Systems using Power SYBR Green PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequences of the primers used are listed in Table 1. Relative gene expression was calculated using the 2^{-ΔΔCT} method and expressed as the mean of triplicate samples. Each sample was normalized to β-actin.

Table 1. Primers used for RT-qPCR experiments.

Gene	Primer Sequence (5'-3') (F: Forward; R: Reverse)
<i>β-actin</i>	F: AGGCACCAGGGCGTGAT R: CTCTTGCTCTGGGCCTCGT
<i>Acan</i>	F: TGTCAACAACAATGCCCAAGAC R: CTTCTCCGCCCAAAGGTCC
<i>Col1a1</i>	F: TGCCGTGACCTCAAGATGTG R: CGTCTCCATGTTGCAGAAGA
<i>Col1a2</i>	F: CCAGAGTGGAGCAGCGGTTA R: GGGATGTTTTAGGTTGAGCC
<i>Col2a1</i>	F: GGCAATAGCAGGTTACGTACA R: CGATAACAGTCTTGCCCCACTT
<i>Col9a1</i>	F: CCAAGAGGCCCAATCGACAT R: GGGGAAGTCCGTTATCCTGG
<i>Col10a1</i>	F: GCACCCCAGTAATGTACACCTATG R: GAGCCACACCTGGTCATTTTC
<i>Col11a1</i>	F: TTGCTGATGGGAAGTGGCAT R: GCTGCTTTGGGGTACCTAT
<i>Htra1</i>	F: GGACTTCATGTTTCCCTCAA R: GTTCTGCTGAACAAGCAACA
<i>Ostc</i>	F: AGAGTCTGGCAGAGGTGCAG R: TCGTCACAGTCTGGGTTGAG
<i>Runx-2</i>	F: GCAGTTCCCAAGCATTTCAT R: CACTCTGGCTTTGGGAAGAG
<i>Snorc</i>	F: TTTACCAGCTCAGTCCTCGG R: CAGACAGAGAGCCATCCTGG

4.5. Western Blots

After treatment, sponge constructs containing cells were rinsed once with ice-cold PBS, crushed and total proteins were extracted using the RIPA-lysis buffer with a protease inhibitor cocktail. Protein concentration was assessed according to the Bradford colorimetric procedure (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Then, 15 µg of total proteins (if not specified) were separated in 10% polyacrylamide gels containing 0.1% SDS and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Unspecific binding sites of the membranes were blocked with 10% non-fat milk powder in Tris-buffered saline with 0.1% Tween (TBST) for 2 h. Then, membranes were incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-human type I collagen (Novotec, Bron, France), rabbit anti-human type II collagen (Novotec, Bron, France), rabbit anti-human type IIB collagen (Covalab, Villeurbanne, France), mouse anti-human type X collagen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), rabbit anti-human HtrA1 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) or rabbit anti-human β-tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Concerning the anti-human type IIB collagen, its generation was made by Covalab using exactly the same strategy as the one used by Aubert-Foucher et al. [51]. This antibody detects the pro α1(II)B and pN α1(II)B isoforms of type II collagen, according to the epitope targeted. The following day, membranes were washed three times, followed by an incubation with HRP-conjugated goat anti-rabbit or mouse IgG antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Signals were visualized with the chemiluminescence method (ECL plus western blotting detection reagent+, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) and developed on X-ray film.

4.6. Statistical Analysis

All experiments were repeated at least two times with cells from different horses. Values are reported as means \pm SD, floating bar graphs, or box plots. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney U-test or the Student's *t*-test to determine significant differences between two groups. Statistical analyses were done using Prism (Graphpad, San Diego, CA, USA) or Excel 2016 for Mac (Microsoft, Redmond, DC, USA). A *p*-value of ≤ 0.05 was considered to be significant.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at www.mdpi.com/2079-6382/19/2/435/s1.

Acknowledgments: We are grateful to Marie-Christine Enos for her administrative and technical support. This research was funded by the French National Research Agency (ANR) and by the Regional Council of Basse-Normandie through the ANR TecSan PROMOCART program to P.G. (917RB020 and 917RB072 respectively), by the French Ministry of Research and Technology to PG, by three ERDF (European Regional Development Funds) grants to P.G. and M.D. (HIPPOCART 1 no. 2897/33535, 917RB148; HIPPOCART 917CB174, EQUISTEM 917CB210), by a Regional Council of Basse-Normandie program to PG and MD (HIPPOCART N° 2013-AGRI-236/13P07492, 917CB166), by Fonds Eperon to PG and MD (EQUISTEM, N80-2014, 917CB194), by ERDF and Regional Council of Basse-Normandie grant to P.G. and M.D. in the CPER Centaure program (2015–2020, Centaure Biotechnologies 2015 N° 917CB213&Centaure PREACH 2016–17). T.B. was supported by a scholarship from the French Ministry of Research and Technology. R.C. was supported by a scholarship co-financed by the Fonds Eperon and the Regional Council of Basse-Normandie. M.Des. was from a fellowship from the Regional Council of Basse-Normandie.

Author Contributions: T.B. was involved in study design, in data collection/assembly and analysis, performed experiments and wrote the manuscript. R.C., M.Des., T.J., L.B. and S.J. performed experiments, collected and analysed the data. T.B., L.B., R.C., M.Des., S.J. and F.A. were involved in collecting BM-MSCs. F.A., J.-M.D., F.-M.G., M.Dem. and P.G. were involved in study conception and design, in supervision of the study, in data analysis and interpretation, in writing of the manuscript and provide the financial support. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Aigner, T.; Stöve, J. Collagens—Major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 1569–1593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Sandell, L.J.; Morris, N.; Robbins, J.R.; Goldring, M.B. Alternatively spliced type II procollagen mRNAs define distinct populations of cells during vertebral development: Differential expression of the amino-propeptide. *J. Cell Biol.* **1991**, *114*, 1307–1319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Sandell, L.J.; Nalin, A.M.; Reife, R.A. Alternative splice form of type II procollagen mRNA (IIA) is predominant in skeletal precursors and non-cartilaginous tissues during early mouse development. *Dev. Dyn.* **1994**, *199*, 129–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Perrier, E.; Ronzière, M.-C.; Bareille, R.; Pinzano, A.; Mallein-Gerin, F.; Freyria, A.M. Analysis of collagen expression during chondrogenic induction of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biotechnol. Lett.* **2011**, *33*, 2091–2101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Heinonen, J.; Taipaleenmäki, H.; Roering, P.; Takatalo, M.; Harkness, L.; Sandholm, J.; Uusitalo-Järvinen, H.; Kassem, M.; Kiviranta, I.; Laitala-Leinonen, T.; et al. Snorc is a novel cartilage specific small membrane proteoglycan expressed in differentiating and articular chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* **2011**, *19*, 1026–1035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. 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. [[CrossRef](#)]
7. Lee, D.A.; Bentley, G.; Archer, C.W. The control of cell division in articular chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* **1993**, *1*, 137–146. [[CrossRef](#)]
8. Gelse, K. Collagens—Structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 1531–1546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

9. Chamberland, A.; Wang, E.; Jones, A.R.; Collins-Racie, L.A.; LaVallie, E.R.; Huang, Y.; Liu, L.; Morris, E.A.; Flannery, C.R.; Yang, Z. Identification of a novel HtrA1-susceptible cleavage site in human aggrecan: Evidence for the involvement of HtrA1 in aggrecan proteolysis in vivo. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 27352–27359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Oka, C.; Tsujimoto, R.; Kajikawa, M.; Koshiba-Takeuchi, K.; Ina, J.; Yano, M.; Tsuchiya, A.; Ueta, Y.; Soma, A.; Kanda, H.; et al. HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins. *Development* **2004**, *131*, 1041–1053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. 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. Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840*, 2414–2440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Aigner, T.; Cook, J.L.; Gerwin, N.; Glasson, S.S.; Laverty, S.; Little, C.B.; McIlwraith, W.; Kraus, V.B. Histopathology atlas of animal model systems—Overview of guiding principles. *Osteoarthr. Cartil.* **2010**, *18*, S2–S6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. 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.; Dhert, W.J.A. Comparative study of depth-dependent characteristics of equine and human osteochondral tissue from the medial and lateral femoral condyles. *Osteoarthr. Cartil.* **2012**, *20*, 1147–1151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Perkins, N.R.; Reid, S.; Morris, R.S. Profiling the New Zealand thoroughbred racing industry. 2. Conditions interfering with training and racing. *N. Z. Vet. J.* **2005**, *53*, 69–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Brittberg, M.; Lindahl, A.; Nilsson, A.; Ohlsson, C.; Isaksson, O.; Peterson, L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* **1994**, *331*, 889–895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Brittberg, M. Autologous chondrocyte transplantation. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1999**, *367*, S147–S155. [[CrossRef](#)]
17. Danišovič, L.; Boháč, M.; Zamborský, R.; Oravcová, L.; Provazníková, Z.; Csöbonyeiová, M.; Varga, I. Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from different tissue sources in respect to articular cartilage tissue engineering. *Gen. Physiol. Biophys.* **2016**, *35*, 207–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Delorme, B.; Ringe, J.; Pontikoglou, C.; Gaillard, J.; Langonné, A.; Sensebé, L.; Noël, D.; Jorgensen, C.; Häupl, T.; Charbord, P. Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity. *Stem Cells* **2009**, *27*, 1142–1151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Chambers, I.; Smith, A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene* **2004**, *23*, 7150–7160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Marlovits, S.; Aldrian, S.; Tichy, B.; Albrecht, C.; Nürnberger, S. Biomaterial for autologous chondrocyte transplantation. *Orthopäde* **2009**, *38*, 1045–1052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Murphy, M.K.; Huey, D.J.; Hu, J.C.; Athanasiou, K.A. TGF- β 1, GDF-5, and BMP-2 stimulation induces chondrogenesis in expanded human articular chondrocytes and marrow-derived stromal cells. *Stem Cells* **2015**, *33*, 762–773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kafienah, W.; Mistry, S.; Dickinson, S.C.; Sims, T.J.; Learmonth, I.; Hollander, A.P. Three-dimensional cartilage tissue engineering using adult stem cells from osteoarthritis patients. *Arthritis Rheumatol.* **2007**, *56*, 177–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ronzière, M.C.M.; Perrier, E.E.; Mallein-Gerin, F.F.; Freyria, A.-M. Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells. *Biomed. Mater. Eng.* **2010**, *20*, 145–158. [[PubMed](#)]
24. Legendre, F.; Ollitrault, D.; Hervieu, M.; Baugé, C.; Maneix, L.; Goux, D.; Chajra, H.; Mallein-Gerin, F.; Boumediene, K.; Galera, P.; et al. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Legendre, F.; Ollitrault, D.; Gomez-Leduc, T.; Bouyoucef, M.; Hervieu, M.; Gruchy, N.; Mallein-Gerin, F.; Leclercq, S.; Demoor, M.; Galéra, P. Enhanced chondrogenesis of bone marrow derived-stem cells by using a combinatory cell therapy strategy with BMP-2/TGF- β 1, hypoxia and COL1A1/HtrA1 siRNAs. *Sci. Rep.* **2017**, *13*, 3406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Ollitrault, D.; Legendre, F.; Drougard, C.; Briand, M.; Benateau, H.; Goux, D.; Chajra, H.; Poulain, L.; Hartmann, D.; Vivien, D.; et al. BMP-2, Hypoxia, and COL1A1/HtrA1 siRNAs favor neo-cartilage hyaline matrix formation in chondrocytes. *Tissue Eng. Part C Methods* **2015**, *21*, 133–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Branly, T.; Bertoni, L.; Contentin, R.; Rakic, R.; Gomez-Leduc, T.; Desancé, M.; Hervieu, M.; Legendre, F.; Jacquet, S.; Audigié, F.; et al. 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- β 1. *Stem Cell Rev. Rep.* **2017**, *13*, 611–630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Dahlin, R.L.; Ni, M.; Meretoja, V.V.; Kasper, F.K.; Mikos, A.G. TGF- β 3-induced chondrogenesis in co-cultures of chondrocytes and mesenchymal stem cells on biodegradable scaffolds. *Biomaterials* **2014**, *35*, 123–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Abbott, R.D.; Kimmerling, E.P.; Cairns, D.M.; Kaplan, D.L. Silk as a biomaterial to support long-term three-dimensional tissue cultures. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 21861–21868. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Adamson, E.D.; Ayers, S.E. The localization and synthesis of some collagen types in developing mouse embryos. *Cell* **1979**, *16*, 953–965. [[CrossRef](#)]
31. Barsh, G.S.; Byers, P.H. Reduced secretion of structurally abnormal type I procollagen in a form of osteogenesis imperfecta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 5142–5146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. De Wet, W.J.; Chu, M.L.; Prockop, D.J. The mRNAs for the pro- α 1(I) and pro- α 2(I) chains of type I procollagen are translated at the same rate in normal human fibroblasts and in fibroblasts from two variants of osteogenesis imperfecta with altered steady state ratios of the two mRNAs. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 14385–14389. [[PubMed](#)]
33. Galéra, P.; Park, R.W.; Ducey, P.; Mattéi, M.G.; Karsenty, G. c-Krox binds to several sites in the promoter of both mouse type, I. Collagen genes. Structure/function study and developmental expression analysis. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 21331–21339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Rosová, I.; Dao, M.; Capoccia, B.; Link, D.; Nolta, J.A. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **2008**, *26*, 2173–2182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Grayson, W.L.; Zhao, F.; Bunnell, B.; Ma, T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *358*, 948–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kanichai, M.; Ferguson, D.; Prendergast, P.J.; Campbell, V.A. Hypoxia promotes chondrogenesis in rat mesenchymal stem cells: A role for AKT and hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α . *J. Cell. Physiol.* **2008**, *216*, 708–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Schipani, E.; Ryan, H.E.; Didrickson, S.; Kobayashi, T.; Knight, M.; Johnson, R.S. Hypoxia in cartilage: HIF-1 α is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev.* **2001**, *15*, 2865–2876. [[PubMed](#)]
38. Markway, B.D.; Cho, H.; Johnstone, B. Hypoxia promotes redifferentiation and suppresses markers of hypertrophy and degeneration in both healthy and osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* **2013**, *15*, R92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Brittberg, M. 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.* **2010**, *38*, 1259–1271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Ciuffreda, M.C.; Malpasso, G.; Musarò, P.; Turco, V.; Gnecci, M. Protocols for in vitro differentiation of human mesenchymal stem cells into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1416*, 149–158. [[PubMed](#)]
41. Yang, W.; Both, S.K.; van Osch, G.J.V.M.; Wang, Y.; Jansen, J.A.; Yang, F. Effects of in vitro chondrogenic priming time of bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells on in vivo endochondral bone formation. *Acta Biomater.* **2015**, *13*, 254–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Farrell, M.J.; Fisher, M.B.; Huang, A.H.; Shin, J.I.; Farrell, K.M.; Mauck, R.L. Functional properties of bone marrow-derived MSC-based engineered cartilage are unstable with very long-term in vitro culture. *J. Biomech.* **2014**, *47*, 2173–2182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kim, Y.I.; Ryu, J.-S.; Yeo, J.E.; Choi, Y.J.; Kim, Y.S.; Ko, K.; Koh, Y.-G. Overexpression of TGF- β 1 enhances chondrogenic differentiation and proliferation of human synovium-derived stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *450*, 1593–1599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Gomez-Leduc, T.; Hervieu, M.; Legendre, F.; Bouyoucef, M.; Gruchy, N.; Poulain, L.; de Vienne, C.; Herlicoviez, M.; Demoor, M.; Galera, P. Chondrogenic commitment of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in collagen matrices for cartilage engineering. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 32786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Barile, F.A.; Siddiqi, Z.E.; Ripley-Rouzier, C.; Bienkowski, R.S. Effects of puromycin and hydroxynorvaline on net production and intracellular degradation of collagen in human fetal lung fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *270*, 294–301. [[CrossRef](#)]
46. Gotkin, M.G.; Ripley, C.R.; Lamande, S.R.; Bateman, J.F.; Bienkowski, R.S. Intracellular trafficking and degradation of unassociated pro α 2 chains of collagen type I. *Exp. Cell Res.* **2004**, *296*, 307–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Veitia, R.A.; Bottani, S.; Birchler, J.A. Cellular reactions to gene dosage imbalance: Genomic, transcriptomic and proteomic effects. *Trends Genet.* **2008**, *24*, 390–397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Rodríguez, J.P.; Montecinos, L.; Ríos, S.; Reyes, P.; Martínez, J. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type, I. collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. *J. Cell. Biochem.* **2000**, *79*, 557–565. [[CrossRef](#)]
49. Essex, S.; Navarro, G.; Sabhachandani, P.; Chordia, A.; Trivedi, M.; Movassaghian, S.; Torchilin, V.P. Phospholipid-modified PEI-based nanocarriers for in vivo siRNA therapeutics against multidrug-resistant tumors. *Gene Ther.* **2015**, *22*, 257–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Xu, J.; Li, J.; Lin, S.; Wu, T.; Huang, H.; Zhang, K.; Sun, Y.; Yeung, K.W.K.; Li, G.; Bian, L. Nanocarrier-mediated codelivery of small molecular drugs and siRNA to enhance chondrogenic differentiation and suppress hypertrophy of human mesenchymal stem cells. *Adv. Funct. Mater.* **2016**, *26*, 2463–2472. [[CrossRef](#)]
51. Aubert-Foucher, E.; Mayer, N.; Padeloup, M.; Pagnon, A.; Hartmann, D.; Mallein-Gerin, F. A unique tool to selectively detect the chondrogenic IIB form of human type II procollagen protein. *Matrix Biol.* **2014**, *34*, 80–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

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

Thomas Branly^{1†}, Romain Contentin^{1†}, Mélanie Desancé¹, Thibaud Jacquel¹, Lélia Bertoni², Sandrine Jacquet², Frédéric Mallein-Gerin³, Jean-Marie Denoix², Fabrice Audigié², Magali Demoor¹, & Philippe Galéra^{1*}.

1. NORMANDIE UNIV, UNICAEN, BIOTARGEN, 14000 CAEN, FRANCE.

2. Center of Imaging and Research on Locomotor Affections in Equines, Ecole Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, 14430 Goustranville, France.

3. Institute for Biology and Chemistry of Proteins, CNRS, UMR 5305 Laboratory of Tissue Biology and Therapeutic Engineering, Université Claude Bernard-Lyon 1, Université de Lyon, 69367 Lyon cedex 07, France.

[†] Contributed equally

* Corresponding author: philippe.galera@unicaen.fr

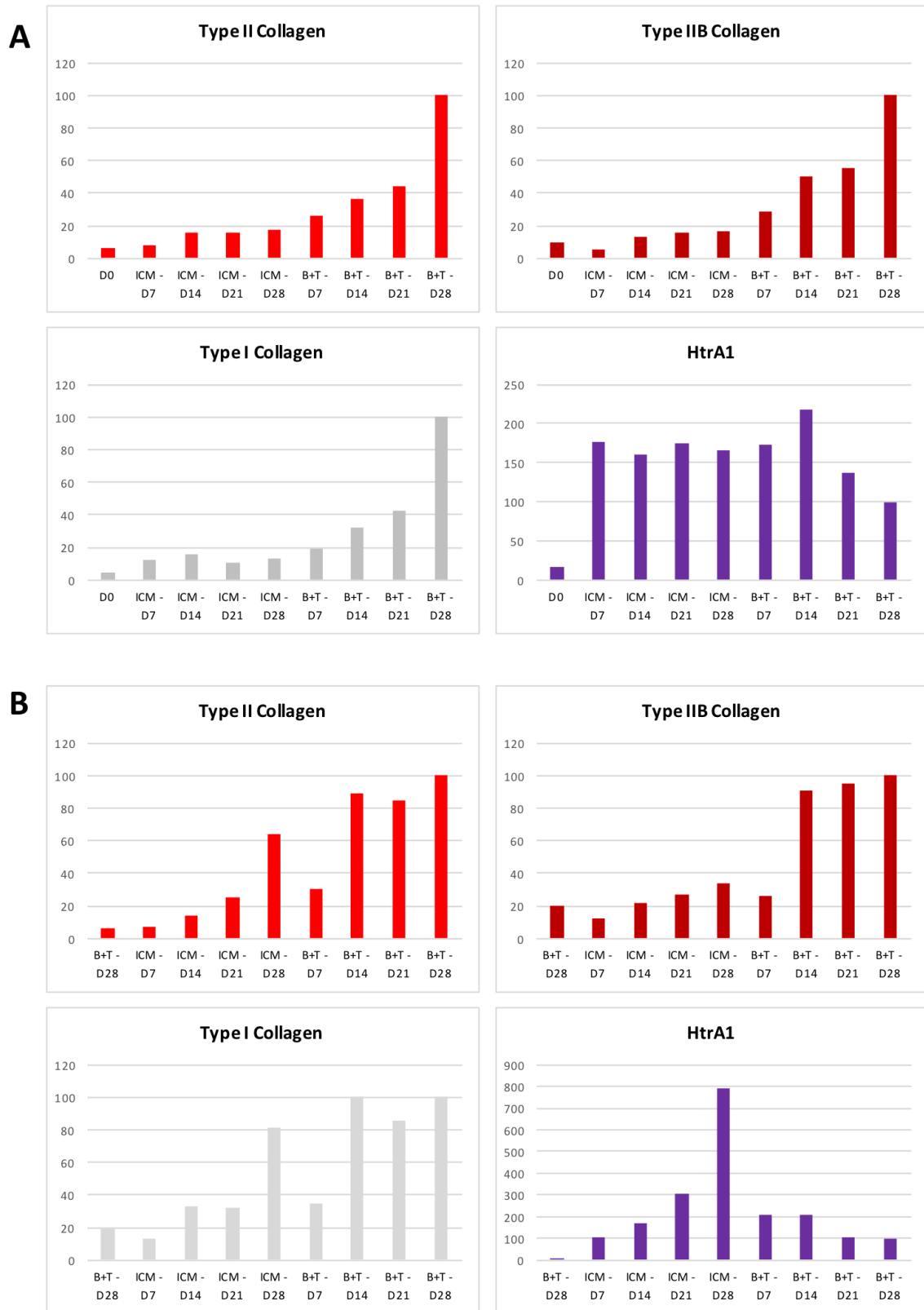


Figure S1: Quantifications of type II, IIB and I collagens and of Htra1 associated with Figure 3A and B. These results are normalized with respect to the amount of β -tubulin.

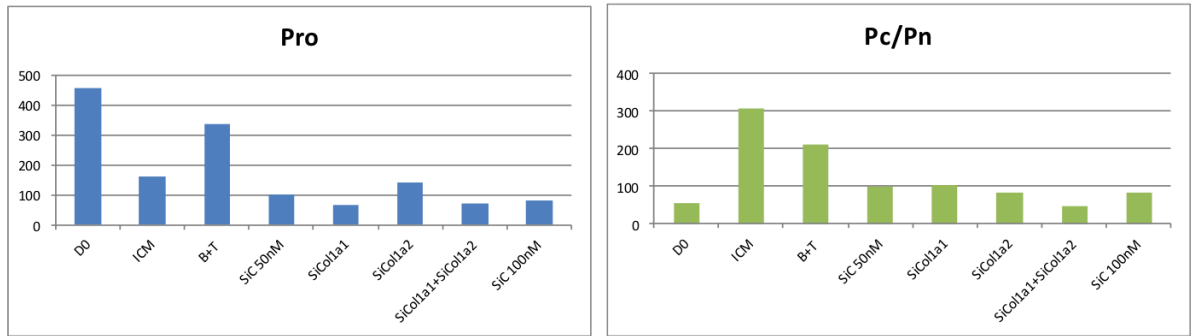


Figure S2: Quantifications of the immature forms of type I collagen associated with Figure 14Aii. The results are normalized with respect to the amount of β -tubulin.

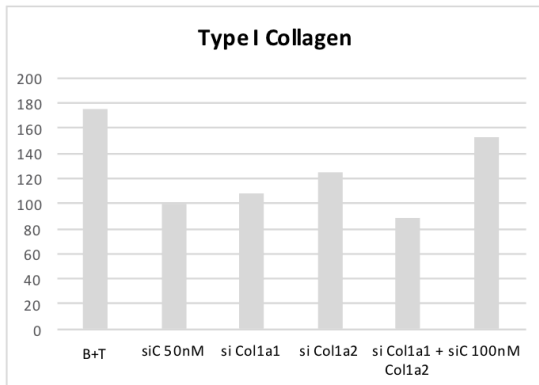
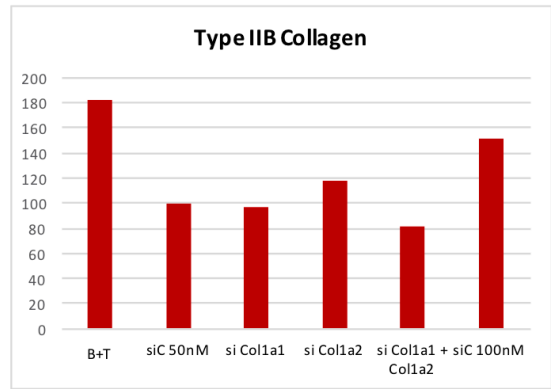
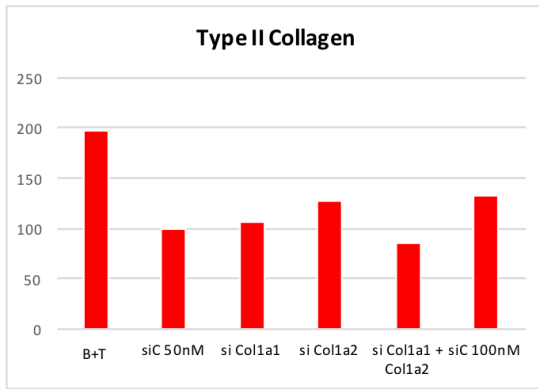
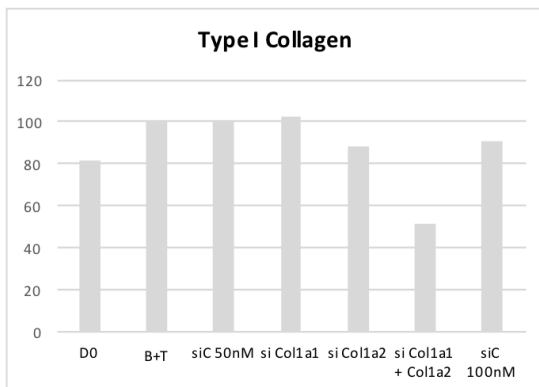
i**ii**

Figure S3: Quantifications of types II, IIB and I collagens associated with Figure 14B. These results are normalized with respect to the amount of β -tubulin.

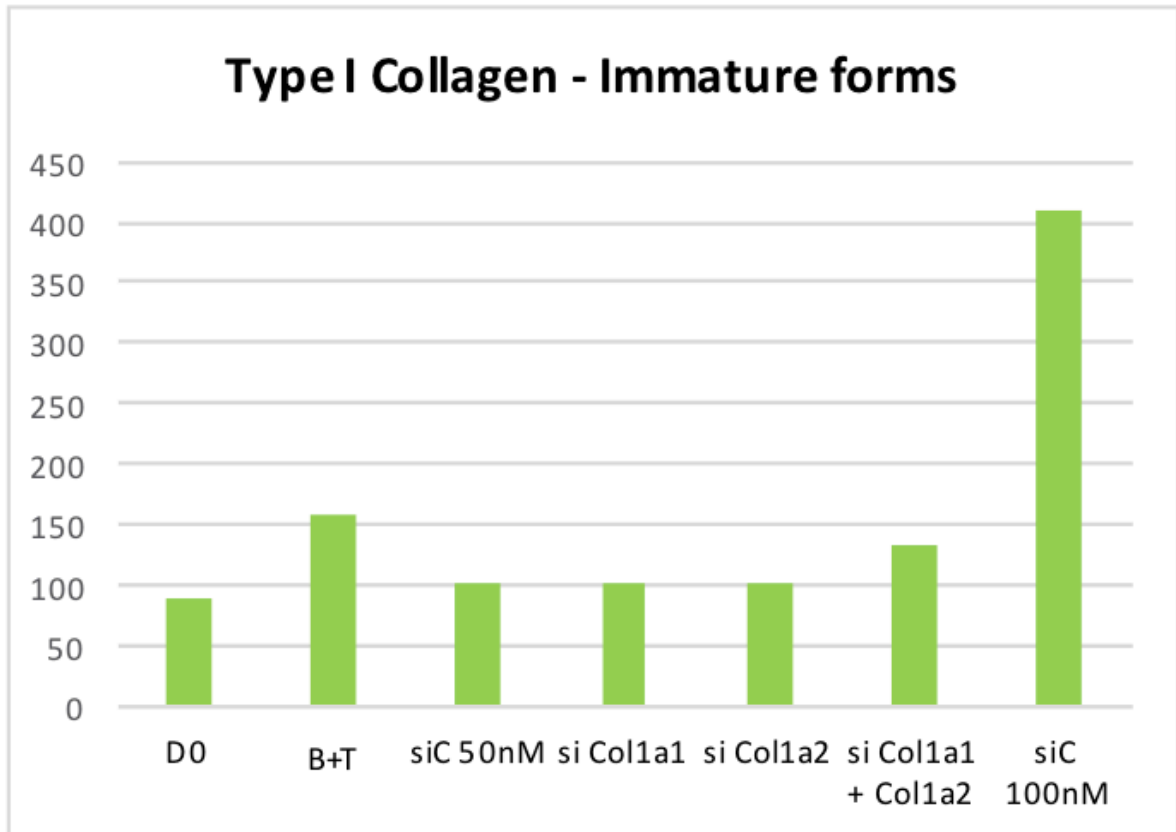


Figure S4: Quantifications of type I collagen isoforms associated with Figure 14C. These results are normalized with respect to the amount of β -tubulin.

C. Conclusions de l'article #2

Lors de cette étude, nous nous sommes attachés à améliorer le protocole de différenciation chondrogénique initialement employé sur des cellules humaines et l'avons transposé au modèle équin. Les pistes d'amélioration consistaient à tester un autre facteur de croissance potentiellement chondrogénique, le TGF- β 3, allonger la durée du protocole de différenciation et à rendre plus efficace la stratégie d'interférence par l'ARN.

L'effet du TGF- β 3 permet d'induire une expression plus importante du collagène de type II. Néanmoins, en parallèle, l'expression du collagène de type I est aussi fortement induite. C'est la raison pour laquelle l'utilisation initiale du TGF- β 1 pour produire un substitut cartilagineux de qualité semble être la plus adaptée.

Conformément à notre hypothèse initiale, l'allongement du temps de culture permet d'augmenter les synthèses des molécules matricielles. Le collagène de type I est aussi induit. Il nous faudra donc déterminer la durée de différenciation optimale afin d'obtenir le meilleur compromis entre synthèse de collagène de types I et II. De plus, l'allongement du temps de culture présente l'avantage de réduire l'expression de la protéase à sérine HtrA1.

Finalement, la stratégie d'interférence par l'ARN visant à diminuer la synthèse de collagène de type I demeure perfectible puisque son expression n'est, dans le meilleur des cas, que peu diminuée.

Ces travaux confirment la pertinence du protocole de différenciation chondrogénique initial. La principale amélioration du protocole passe par l'allongement du temps de culture. Néanmoins, l'obstacle de la synthèse persistante du collagène de type I pour que le substitut cartilagineux soit d'une qualité physiologique nécessitera de nouveaux travaux. L'utilisation d'une source de CSM alternative pourrait constituer une autre solution.

III. Article #3

Chondrogenic differentiation of defined equine mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood for use in cartilage repair therapy.

Mélanie Desancé, **Romain Contentin**, Lélia Bertoni, Tangni Gomez-Leduc, Thomas Branly, Sandrine Jacquet, Jean-Marc Betsch, Agnès Batho, Florence Legendre, Fabrice Audigié, Philippe Galéra* & Magali Demoor*.

*: Contribution équivalente

A. Objectifs de l'article #3

La possibilité d'isoler des CSM à partir de différents tissus nous a poussé à diversifier la source des CSM utilisées dans notre stratégie de thérapie tissulaire du cartilage. Les CSM de SCO possèdent plusieurs avantages, comparées au CSM de MO, comme nous l'avons décrit en introduction. Nous avons donc décidé de transposer la stratégie de différenciation chondrogénique employé chez l'Homme à cette source de CSM, à l'image des études menées avec les CSM de MO.

Nous avons donc d'abord isolé et caractérisé les CSM de SCO pour constituer une banque cellulaire de CSM indispensable à la poursuite de nos travaux de différenciation cellulaire. Puis, nous les avons différenciées en chondrocyte par le protocole de différenciation initialement utilisé chez l'Homme en essayant de lui apporter des améliorations en allongeant le temps de culture, en testant le TGF- β 3 à la place TGF- β 1, et en incrémentant la stratégie d'interférence par l'ARN.

B. Article #3



Article

Chondrogenic Differentiation of Defined Equine Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord Blood for Use in Cartilage Repair Therapy

Mélanie Desancé¹, Romain Contentin¹, Lélia Bertoni², Tangni Gomez-Leduc¹, Thomas Branly¹, Sandrine Jacquet², Jean-Marc Betsch³, Agnès Batho^{1,4}, Florence Legendre¹, Fabrice Audigie², Philippe Galéra^{1,*}  and Magali Demoor^{1,*} 

¹ Normandie University, UNICAEN, BIOTARGEN, 14000 Caen, France; melanie359@hotmail.fr (M.D.); romaincontentin@hotmail.fr (R.C.); tangnigl@free.fr (T.G.-L.); tbranly@gmail.com (T.B.); Agnes.BATHO@efs.sante.fr (A.B.); florence.legendre@unicaen.fr (F.L.)

² Center of Imaging and Research on Locomotor Affections in Equines, Ecole Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, 14430 Goustranville, France; lelia.bertoni@vet-alfort.fr (L.B.); sandrine.jacquet@vet-alfort.fr (S.J.); fabrice.audigie@vet-alfort.fr (F.A.)

³ Clinique Vétérinaire Equine de Méheudin, Méheudin, 61150 Ecouché, France; jmbetsch@cvem.fr

⁴ EFS Caen, 14000 Caen, France

* Correspondence: philippe.galera@unicaen.fr (P.G.); magali.demoor@unicaen.fr (M.D.)

Received: 19 January 2018; Accepted: 7 February 2018; Published: 10 February 2018

Abstract: Cartilage engineering is a new strategy for the treatment of cartilage damage due to osteoarthritis or trauma in humans. Racehorses are exposed to the same type of cartilage damage and the anatomical, cellular, and biochemical properties of their cartilage are comparable to those of human cartilage, making the horse an excellent model for the development of cartilage engineering. Human mesenchymal stem cells (MSCs) differentiated into chondrocytes with chondrogenic factors in a biomaterial appears to be a promising therapeutic approach for direct implantation and cartilage repair. Here, we characterized equine umbilical cord blood-derived MSCs (eUCB-MSCs) and evaluated their potential for chondrocyte differentiation for use in cartilage repair therapy. Our results show that isolated eUCB-MSCs had high proliferative capacity and differentiated easily into osteoblasts and chondrocytes, but not into adipocytes. A three-dimensional (3D) culture approach with the chondrogenic factors BMP-2 and TGF- β 1 potentiated chondrogenic differentiation with a significant increase in cartilage-specific markers at the mRNA level (*Col2a1*, *Acan*, *Snorc*) and the protein level (type II and IIB collagen) without an increase in hypertrophic chondrocyte markers (*Col10a1* and *Mmp13*) in normoxia and in hypoxia. However, these chondrogenic factors caused an increase in type I collagen, which can be reduced using small interfering RNA targeting *Col1a2*. This study provides robust data on MSCs characterization and demonstrates that eUCB-MSCs have a great potential for cartilage tissue engineering.

Keywords: mesenchymal stem cells; umbilical cord blood; horse; cartilage engineering; chondrogenesis; extracellular matrix; RNA interference

1. Introduction

Osteoarthritis is the most common musculoskeletal disease in horses and is characterized by varying degrees of lameness, the presence of joint effusion, the occurrence of osteophytes, an increase in bone density, and the reduction of joint space in more advanced cases [1]. In a mobile joint, articular cartilage is a highly specialized connective tissue, avascular and non-innervated [2]. This articular cartilage covers bone ends in joints to prevent friction and protect the bone from damage caused by abnormal mechanical loading. Articular cartilage is composed of chondrocytes that synthesize

an intricate extracellular matrix (ECM). The ECM consists of water linked to proteoglycans, such as aggrecans and type II collagen networks [3]. Due to the poor self-repair capacity of cartilage, cartilage engineering is a new therapeutic strategy to treat osteoarthritic or trauma cartilage defects in humans. In racehorses, locomotor disorders are the leading cause of reduced performance and the early termination of racehorse careers [4]. The anatomical, cellular, and biochemical properties of cartilage are similar between humans and horses [5], and cartilaginous defects associated with intense physical activity have recently been recognized as similar in both species. Therefore, the horse is an excellent model for the development of cartilage engineering [6].

Autologous chondrocyte implantation (ACI) was first described in 1994 [7] and was evaluated in the equine model in 2011 [8]. This technique involves harvesting cartilage tissue from the patient, isolating chondrocytes from the donor tissue, and expanding the cells in vitro to implant the cells directly in the cartilage lesion. However, ACI treatment leads to undesirable fibrocartilage formation mainly due to the dedifferentiation of chondrocytes during expansion [9]. A new approach involves the use of mesenchymal stem cells (MSCs), which have a high potential for chondrocyte differentiation and thus cell-based treatment of cartilage defects.

MSCs were first identified in bone marrow [10] and have since been isolated from a variety of other tissues in humans and horses, such as umbilical cord blood (UCB), umbilical cord matrix (Wharton's jelly), adipose tissue, dental pulp, peripheral blood, and synovial fluid [11–14]. The International Society for Cellular Therapy (ISCT) stipulates the minimal criteria for defining human MSCs: adherence to a plastic surface, expression of the CD105, CD73, and CD90, but not CD45, CD34, CD14, CD19, and HLA-DR surface molecules, and the ability to differentiate into osteoblasts, adipocytes, or chondrocytes in vitro [15]. However, in other species such as the horse, the presence of surface markers can differ from those in human MSCs. In equine umbilical cord blood-derived MSCs (eUCB-MSCs), CD29, CD44, CD90, and CD105 are expressed [16], but not CD73 [17]. However, CD105 expression is varying in eUCB-MSCs.

In horses and humans, MSCs derived from bone marrow are the most studied and are often considered the gold standard [10]. However, the sampling procedure is invasive and it has been shown that MSCs derived from human bone marrow taken from older patients have a limited lifespan and show an accelerated cell senescence [18]. Comparative analyses of proliferation and multilineage capacity have shown that human MSCs derived from UCB have greater potential than MSCs derived from bone marrow or adipose tissue [19,20]. Moreover, supplementation with fibroblast growth factor-2 (FGF-2) during MSCs expansion maintains the differentiation potential and increases proliferative capacity [21,22]. Owing to their abundance and the painless non-invasive harvesting procedure, UCB-derived MSCs (UCB-MSCs) are a promising alternative source to bone marrow.

Many studies have attempted to differentiate MSCs into a chondrogenic lineage in vitro. This chondrocyte differentiation is based, in part, on the use of chondrogenic factors. The growth factors of the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily induce chondrogenesis in MSCs in vitro [23,24]. The three TGF- β (TGF- β 1, - β 2, and - β 3) can induce chondrogenesis [25]. In equine MSCs derived from bone marrow and adipose tissue, chondrogenesis is predominantly induced with TGF- β 1. However, only cells derived from bone marrow appear to synthesize type II collagen [26].

Chondrogenesis is enhanced when the bone morphogenetic proteins (BMPs) are added along with TGF- β s [27,28]. In human MSCs, chondrogenesis induced by TGF- β 1 and BMP-2 leads to high expression of chondrogenic genes (*COL2A1*, *SOX9*, *ACAN*) [29]. The effect of BMP-2 has not yet been assessed in equine MSCs chondrogenesis experiments.

The use of biomaterials is a key component in the success of cartilage engineering, because their chemical and physical properties influence the quality of the neo-synthesized tissue. Among the various biomaterials available, type I/III collagen sponges show efficient chondrogenic differentiation of human UCB-MSCs when used with BMP-2 and TGF- β 1, leading to a strong increase in mature chondrocyte-specific markers (*COL2A1*, *COL2A*, *ACAN*) and cellular phenotype stability in the neo-tissue [30].

In addition to the specific markers of cartilage, TGF- β also induces the in vitro expression of type X collagen, a hypertrophic chondrocyte and osteoarthritis marker [31]. The challenge in the use of MSCs as a source of cells for cartilage engineering is to prevent hypertrophic outcomes [32,33]. Hypoxia plays a key role in this process and promotes the stabilization of a chondrocyte phenotype, whereas cells cultured in normoxia produce a hypertrophic phenotype [28].

Today, research is mainly based on the use of undifferentiated MSCs for the treatment of the equine locomotor disorders related to inflammation. Clinical application of eUCB-MSCs has shown that cell transplantation can reduce the core lesion in cases of inflammation of the superficial digital flexor tendon [34]. For cartilage damage, research with MSCs in an equine model has consisted in the study of the effects of intra-articular injection of MSCs [35]. Allogeneic and autologous injections of equine bone marrow-derived-MSCs in fetlock joints do not cause immune responses [36]. Injections of eUCB-MSCs, following lipopolysaccharide injection, reduce joint inflammation [37]. Evaluation of cartilage repair with injection of equine MSCs in polymerizing autogenous fibrin vehicle was performed in horses with 15-mm cartilage lesions in femoropatellar joints [38]. After 30 days, biopsy shows that MSC-implanted defects contain an increase of fibrous tissue predominantly composed of type II collagen. However, after eight months, no significant differences were observed between stem cell-treated joints and non-treated joints.

The promising results obtained with equine MSCs for tendon and joint disease in the equine model offer a glimpse of a possible transposition of these therapeutic strategies to human preclinical studies [39]. However, knowledge is lacking regarding the level of analogy between equine MSCs and their human counterparts. Therefore, a more thorough phenotypic characterization of equine MSCs is required to assess their therapeutic potential and guide the development of new therapeutic strategies for locomotor disorders in horses.

In this study, we characterized equine UCB-MSCs and determined their potential for cartilage tissue engineering using type I/III collagen sponges as the three-dimensional (3D) scaffold and chondrogenic factors under two oxygen conditions (normoxia and hypoxia). MSCs characterization was performed by evaluating proliferation, multilineage capacity, and immunophenotype and by investigating the expression of different genes involved in cellular senescence, stemness, and proliferation. The quality of the newly synthesized matrix in vitro was assessed by studying cartilage-specific and non-specific markers as well as markers of hypertrophy. Finally, to stabilize the phenotype of differentiated UCB-MSCs, the use of small interfering RNA (siRNA) targeting *Col1a2* mRNA was tested.

2. Results

2.1. Equine Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells (eUCB-MSCs) Isolation

UCB samples were collected from 24 mares with normal parturition. Equine MSCs were successfully isolated in 22 UCB samples; the two other UCB samples had been processed more than 40 h after collection, hindering the emergence of colonies. The time between foaling and sample processing was on average 29.82 h with a volume of blood ranging from 25 to 365 mL (median, 110 mL) (Figure 1A). Spindle-shaped fibroblast-like adherent cells were observed in all 22 samples (Figure 1B), representing an isolation success rate of 100% with the first appearance of cell colonies after nine days of culture (Figure 1C). These results suggest that isolation success does not depend on UCB volume, but on processing time, which must not exceed 40 h. Cryopreservation was performed at each passage, until the fifth passage (P5) (Supplementary Table S1). To ensure the safety of isolated cells, bacteriological and virological analyses were also carried out (nine viral genera, eight bacterial genera, and two protozoa were targeted) and showed positive samples only for Herpesvirus (71%) (Figure 1D).

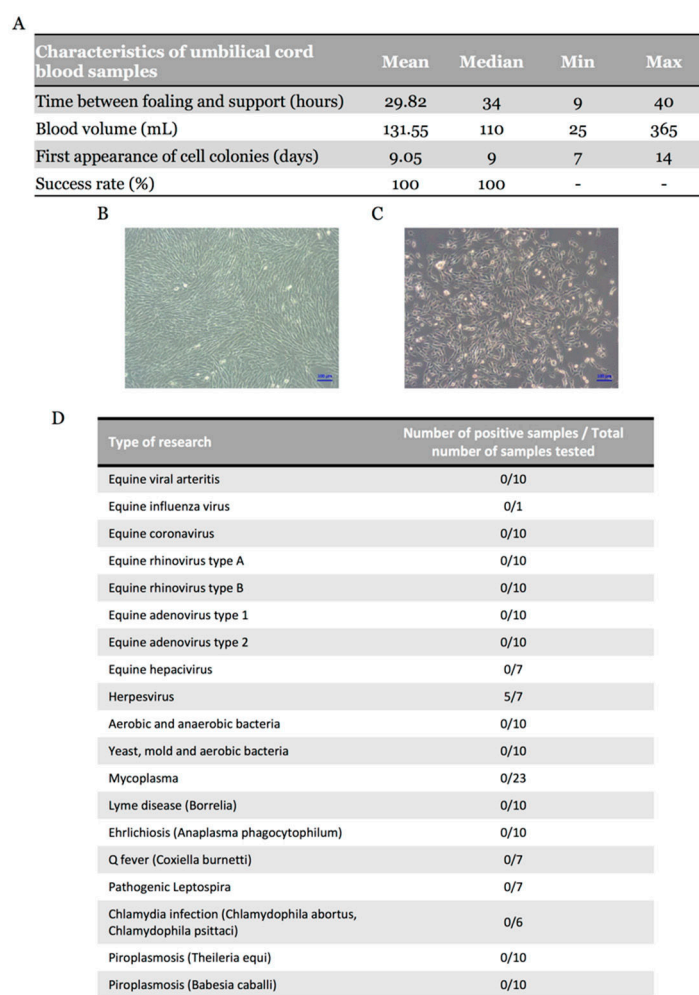


Figure 1. Morphology of mesenchymal stem cells (MSCs) and characteristics of equine umbilical cord blood (eUCB) samples. (A) Characteristics of equine umbilical cord blood samples ($n = 22$); (B) Phase-contrast microscopy of adherent UCB-MSCs in culture (magnification $\times 10$) at passage two and at passage zero (C); (D) Validation of safety of equine UCB-MSCs. The different analyses were performed on a sample of trypsinized cells resuspended in the culture medium which was in contact with the cells for at least two days.

2.2. Growth Profiling and Cellular Senescence

Figure 2 summarizes calculated cumulative population doubling (PD) versus passage number without the FGF-2 growth factor and with FGF-2 (up to 18 passages). An increase in cumulative PD was observed in both expansion conditions with an average of 37.79 ± 5.36 at P18 with FGF-2 and an average of 27.82 ± 6.02 at P18 without FGF-2 (Figure 2A). The PD was higher in the presence of FGF-2 than in the absence of FGF-2 (Figure 2B). However, differences between conditions were not significant for a given passage, except at P9. With and without FGF-2, cumulative PD is slowed down after P15 (Figure 2A,B and Figure S1). Cellular senescence was assessed by analyzing *p21* and *p53* mRNA levels at each passage on eUCB-MSCs expanded with or without FGF-2. There were no significant differences between the two expansion conditions, although *p21* appeared to increase in both conditions after P15 (Figure 3). This result can be attributed to the slowing cumulative PD described above. Regarding proliferation markers (*Ki67*, *Pcna*, *Fgf1*, and *Fgf2*), the stemness marker (*Oct4*), or the MSCs lineage marker (*Col1a1*), no significant differences were observed between the two culture conditions or between passages (Figure 3).

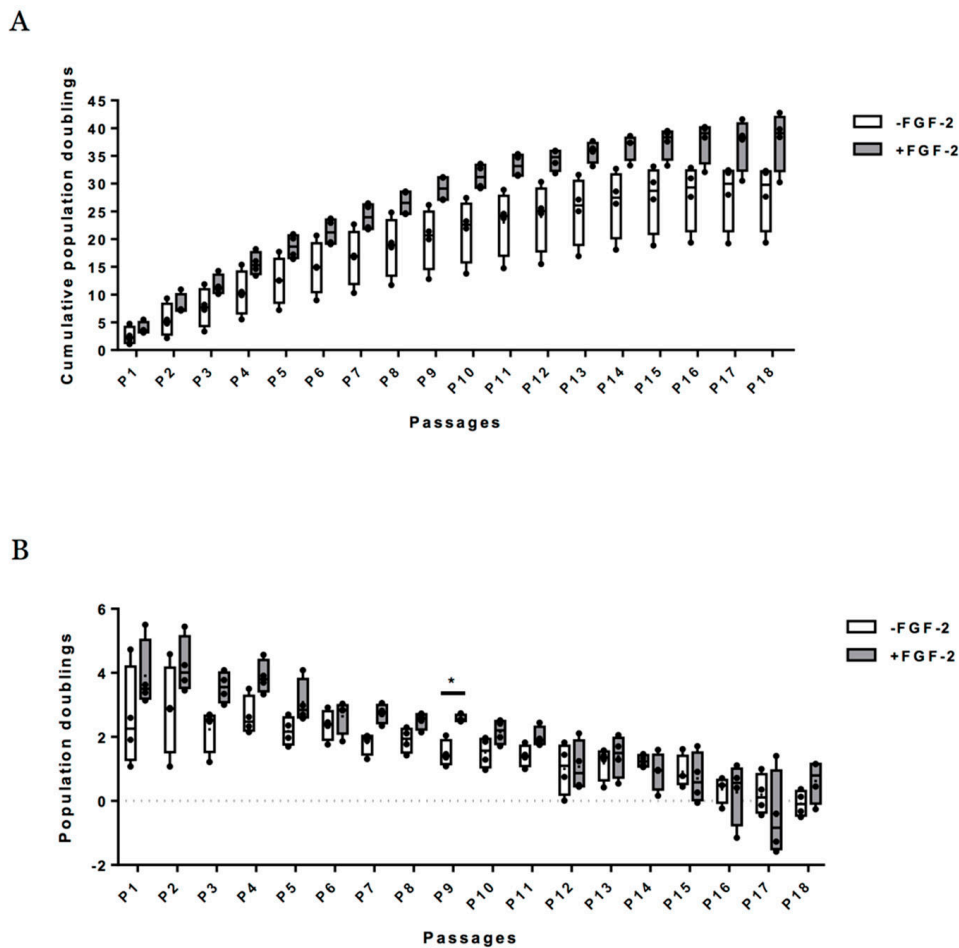


Figure 2. Effect of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) on proliferation capacity of equine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (eUCB-MSCs). **(A)** Mean value of cumulative population doublings and **(B)** mean value of population doublings. Population doublings were determined at each passage of the adherent eUCB-MSCs cultured with (+FGF-2) or without FGF-2 (–FGF-2). Graph represents the mean \pm standard deviation ($n = 4$). Statistically significant differences among eUCB-MSCs between the two culture media at each passage were determined using multiple t -test (* $p < 0.05$).

2.3. MSCs Multipotential Capacity

To investigate the multilineage potential of eUCB-MSCs, osteogenic, adipogenic, and chondrogenic induction assays were performed in vitro with and without FGF-2 during the expansion phase on 10 eUCB-MSC samples. All eUCB-MSCs included in the study successfully differentiated after P4 into an osteogenic lineage and 90% of them into a chondrogenic lineage, regardless of the presence or absence of FGF-2. After 21 days in osteogenic induction medium, Alizarin Red S staining revealed mineralization via calcium deposition (Figure 4A,B). Chondrogenesis was induced in monolayer and Alcian blue staining indicated the presence of acidic polysaccharides such as glycosaminoglycans. The staining was stronger for eUCB-MSCs expanded in the presence of FGF-2 (Figure 4B). Regarding adipogenic differentiation, no lipid droplets were detected in the cytoplasm by Oil Red O staining. Thus, eUCB-MSCs have a partial mesenchymal lineage differentiation ability (Figure 4C).

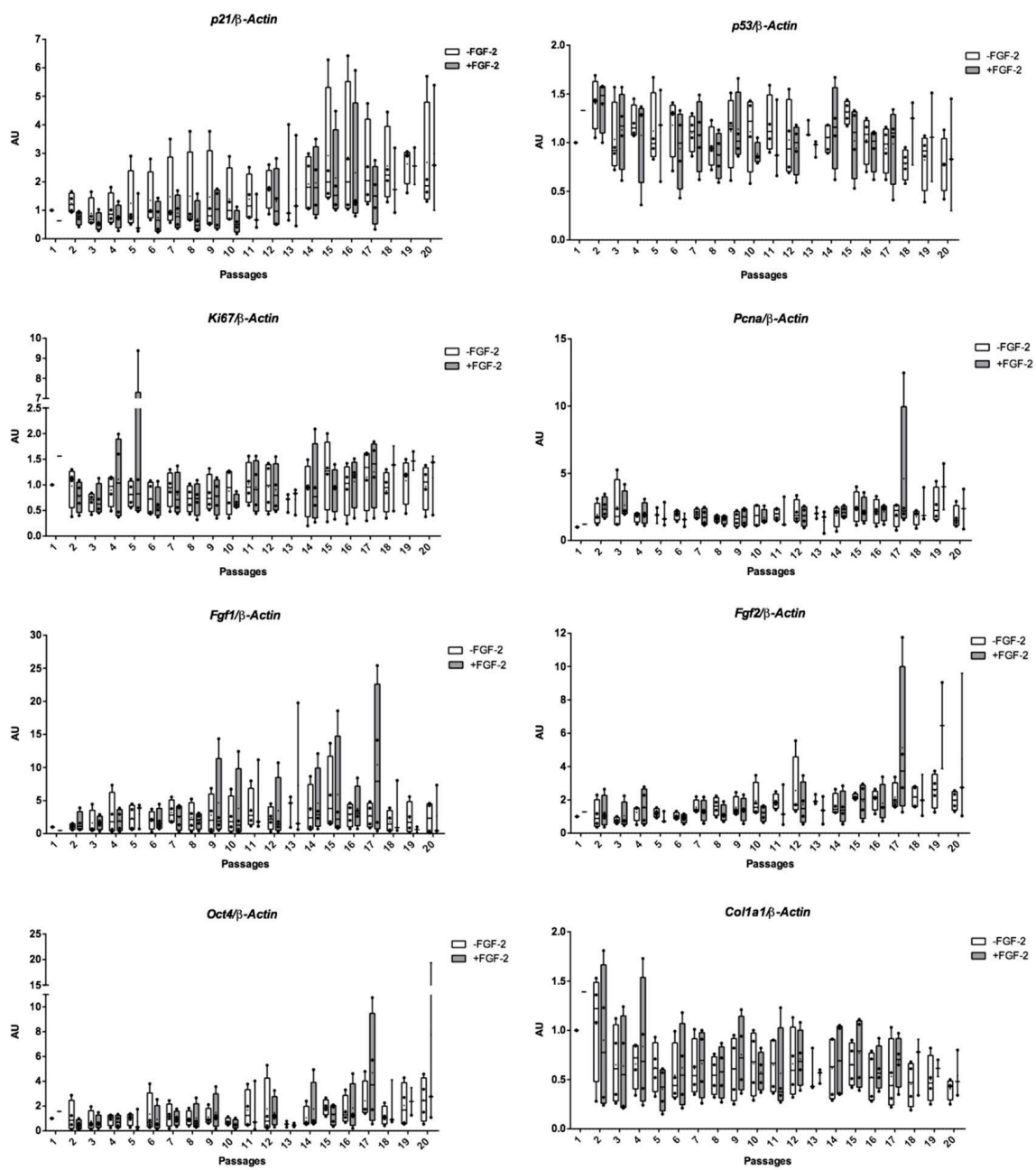


Figure 3. Expression of senescence (*p21*), cell cycle (*p53*), proliferation (*Pcna*, *Ki67*, *Fgf1*, *Fgf2*), and stemness markers (*Oct4*, *Col1a1*) in equine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (eUCB-MSCs) following long-term culture with fibroblast growth factor-2 (FGF-2). eUCB-MSCs were cultured in monolayer in the absence (–FGF-2) or presence of 5 ng/mL of FGF-2 (+FGF-2). All results were normalized to β -Actin mRNA expression, compared with eUCB-MSCs cultured in monolayer at the first passage in the absence of FGF-2. The results are presented as the relative expression of each gene. Box plot represent four independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences between the two culture media at each passage were determined using multiple *t*-test. Statistically significant differences between each passage were determined using the Kruskal-Wallis test. AU: arbitrary units.

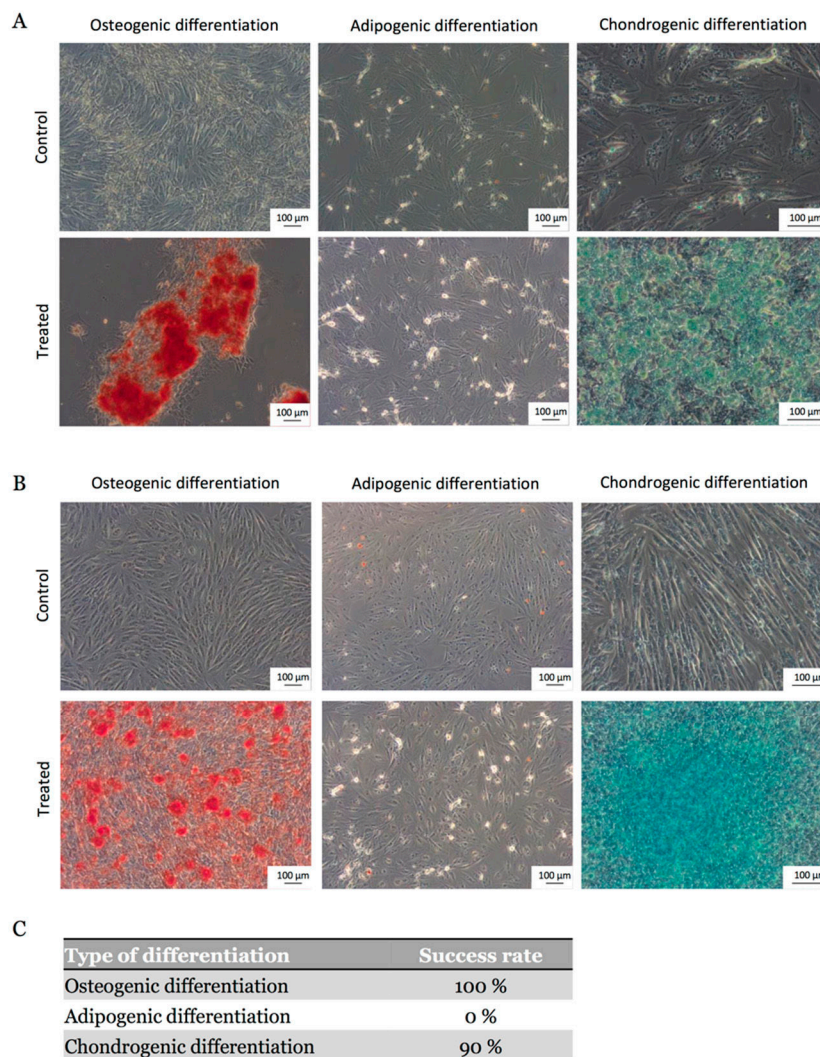


Figure 4. Osteogenic, adipogenic, and chondrogenic differentiations of equine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (eUCB-MSCs). **(A)** Differentiations were performed at passage four after amplification without FGF-2; **(B)** Differentiations were performed at passage four after amplification with FGF-2; **(C)** Success rate for the differentiation of eUCB-MSCs into osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes ($n = 10$). After culture in osteoblastic induction medium, calcium mineralization was demonstrated by Alizarin Red S staining (magnification $\times 10$). After adipogenic induction and incubation in the maintenance medium, no lipid droplets in the cytoplasm were observed with Oil Red O staining (magnification $\times 10$). After chondrogenic induction, sulfated proteoglycans of the neo-synthesized matrix were demonstrated by Alcian blue staining (magnification $\times 20$).

2.4. eUCB-MSCs Surface Phenotype Expression

The characterization of cell-surface markers on isolated eUCB-MSCs was performed using flow cytometry at P4. The results showed that cells were negative for the expression of the hematopoietic marker CD45 and lacked major histocompatibility complex (MHC) Class II. eUCB-MSCs were positive for several MSCs markers including CD29, CD44, and CD90 (Figure 5A). CD73 expression was donor-dependent with an expression ranging from 6.52 to 71.2% (Figure 5B), and it was expressed by only a part of the cell population (Figure 5C). eUCB-MSCs lacked CD105, a surface marker related to a major glycoprotein of the vascular endothelium and component of the TGF- β receptor complex.

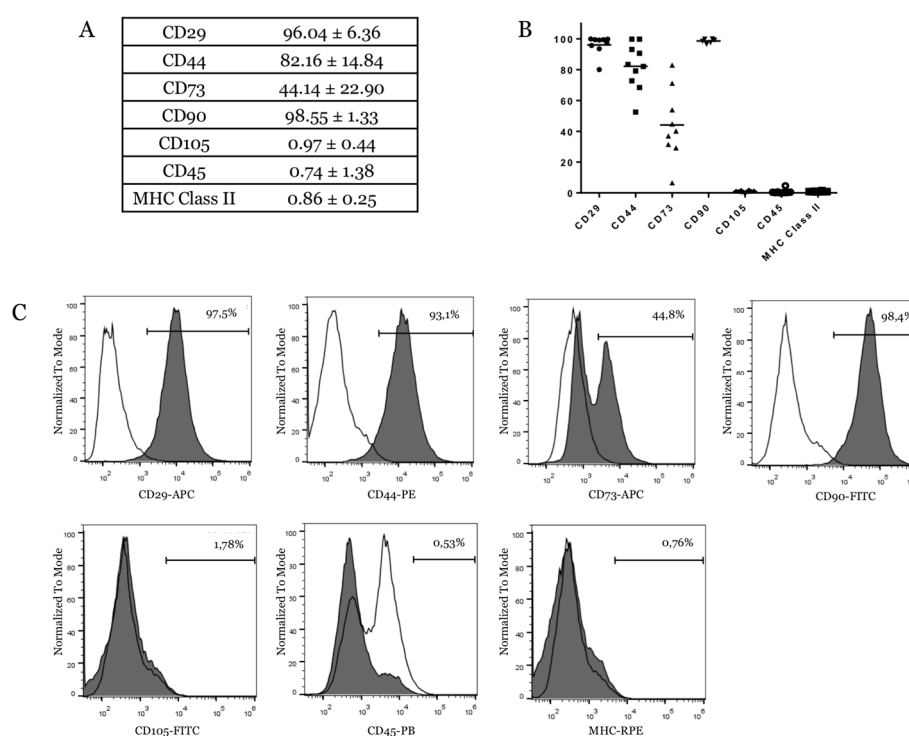


Figure 5. Immunophenotype of equine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (eUCB-MSCs). (A,B) Expression of surface markers of eUCB-MSCs at passage four. The table and the graph show the mean values of the percentage of positive cells \pm standard deviation for the total number of cells analyzed ($n = 10$ for CD44, CD105, CD45, and major histocompatibility complex (MHC) Class II. $n = 9$ for CD29 and CD73. $n = 6$ for CD90). In panel B, each sample for the different CDs studied is represented by a symbol (black dot or arrowhead or square; (C) Immunophenotype of eUCB-MSCs at passage four. Each histogram is a representative result of at least six eUCB-MSCs samples. Lines with empty surface show the IgG (or IgM for CD90) isotype control response and lines with grey surface are for the samples.

2.5. Expression Analysis of Chondrogenic Markers and Cartilage Non-Specific Genes in eUCB-MSCs in 3D Scaffolds

Chondrogenic differentiation was induced in eUCB-MSCs seeded in collagen sponge scaffolds and cultured in the presence or absence of BMP-2 and TGF- β 1 for seven, 14, 21, and 28 days in normoxia or in hypoxia. The evaluation of the chondrogenic differentiation was assessed by RT-qPCR for genes that encode proteins characteristic of native hyaline cartilage: *Col2a1*, *Acan*, and *Snorc*. *Col1a1* and *HtrA1* encode respectively a non-specific protein and a protease induced in osteoarthritis (OA) cartilage. *Col10a1* and *Runx2* encode markers of hypertrophic cartilage, and *Osteocalcin* (*Ostc*) of osteoblastic maturation. *Mmp1*, *Mmp3*, and *Mmp13* encode enzymes of cartilage degradation.

In the absence of growth factors, at the mRNA level, eUCB-MSCs seeded in a 3D scaffold exhibited a slight increase in *Col2a1*, *Acan*, and *Snorc* mRNA levels during culture in hypoxia but not in normoxia. However, no statistical differences were observed compared with undifferentiated cells (Control) (Figure 6). It should also be noted that in the absence of growth factors, some cell cultures did not go to their term, which explains the absence of data, particularly at D28 in hypoxia. When BMP-2 and TGF- β 1 treatments were applied, there was a strong increase in *Col2a1*, *Acan*, and *Snorc* mRNA levels compared with the control as early as seven days of culture. These genes were then rapidly induced and their transcription levels continuously increased with culture time. No differences were observed between normoxia and hypoxia for the same time point and same culture medium. When eUCB-MSCs were incubated with BMP-2 and TGF- β 1, the mRNA expression of the specific-cartilage

markers was similar to those observed in equine articular cartilage (EACs) from 14 days of culture. Therefore, eUCB-MSCs showed a very high potential for stage-specific chondrogenesis when cultured in 3D scaffolds with BMP-2 and TGF- β 1 and expressed cartilage markers found in EACs.

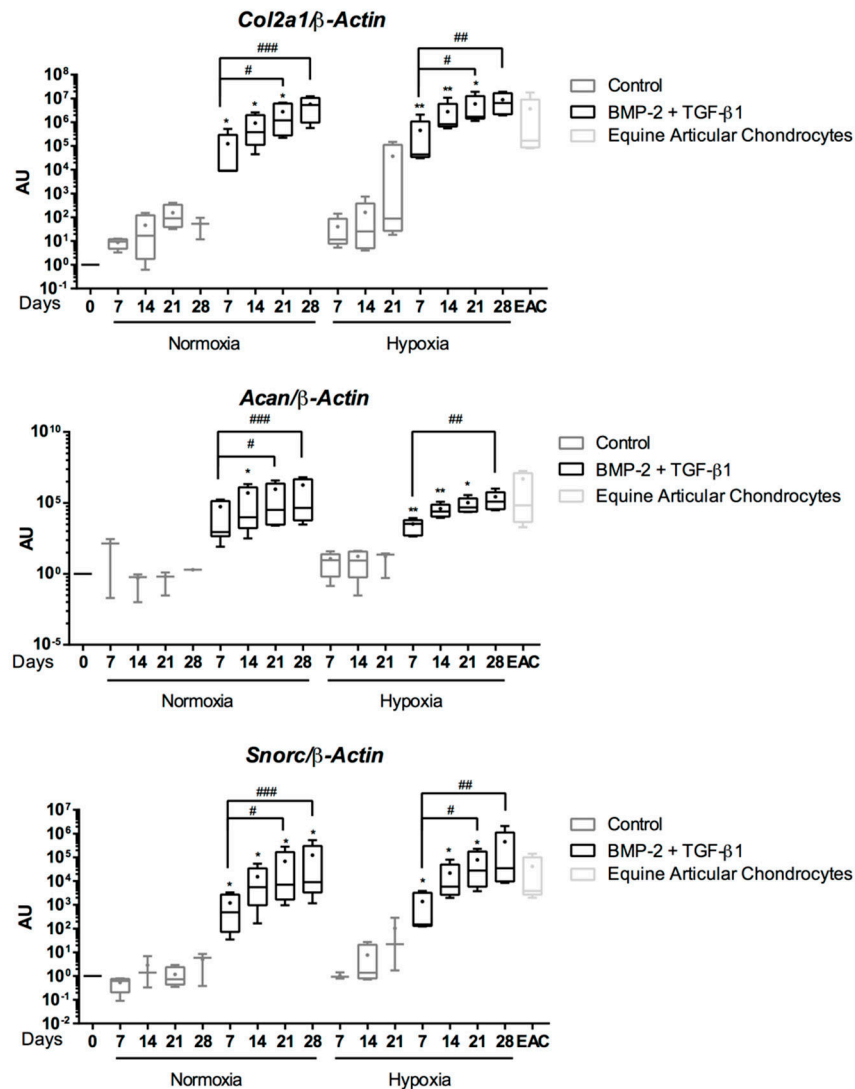


Figure 6. Effect of chondrogenic factors and oxygen tension on the gene expression of cartilage-specific markers during the chondrogenic differentiation of equine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (eUCB-MSCs). eUCB-MSCs were cultured in type I/III collagen sponges for seven, 14, 21, and 28 days in normoxia or in hypoxia, in the absence (control), or in the presence of 50 ng/mL of BMP-2 and 10 ng/mL of TGF- β 1 (BMP-2 + TGF- β 1). Real-time RT-PCR analysis of relative mRNA expression of the indicated genes (*Col2a1*, *Acan*, and *Snorc*) is shown. Gene expression was normalized to the β -Actin mRNA expression, compared with eUCB-MSCs cultured in monolayer at the fourth passage (Day 0). Equine articular chondrocyte (EAC) mRNAs were used as a positive control. Box plots represent five independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences between time points with the same culture medium were determined using the Friedman test (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$). Statistically significant differences between the culture medium at the same time point were determined using the two-tailed Mann–Whitney test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Comparison of the differences between normoxia and hypoxia was performed using the two-tailed Mann–Whitney test, and no statistical significant differences were observed. AU: arbitrary units.

Type I collagen, considered as a fibrocartilage/differentiated chondrocyte marker, is constitutively expressed in undifferentiated eUCB-MSCs. In the absence of growth factors, the mRNA level of *Col1a1* and *HtrA1* did not vary during the culture period compared with undifferentiated eUCB-MSCs, and they were similar to those of EACs (Figure 7). During the induction of chondrogenesis with BMP-2 and TGF- β 1, mRNA levels of *Col1a1* and *HtrA1* increased compared with the control medium. After 28 days, mRNA levels of *Col1a1* were higher than those after seven days of induction of chondrogenesis for both oxygen conditions. To determine if culture conditions induce eUCB-MSCs hypertrophy or bone maturation, *Col10a1*, *Runx2*, and *Ostc* mRNA levels were assessed. The mRNA level of these genes did not vary in the absence of BMP-2 and TGF- β 1 or in normoxia or hypoxia. In the presence of both growth factors, an increase in mRNA levels was observed between seven and 28 days, but there were no significant differences at individual time points between the absence and presence of the growth factors. The mRNA levels remained lower than those of EACs for *Col10A1* or than those of equine osteoblasts for *Ostc*. These results suggested that the growth factor combination does not induce hypertrophy or bone calcification.

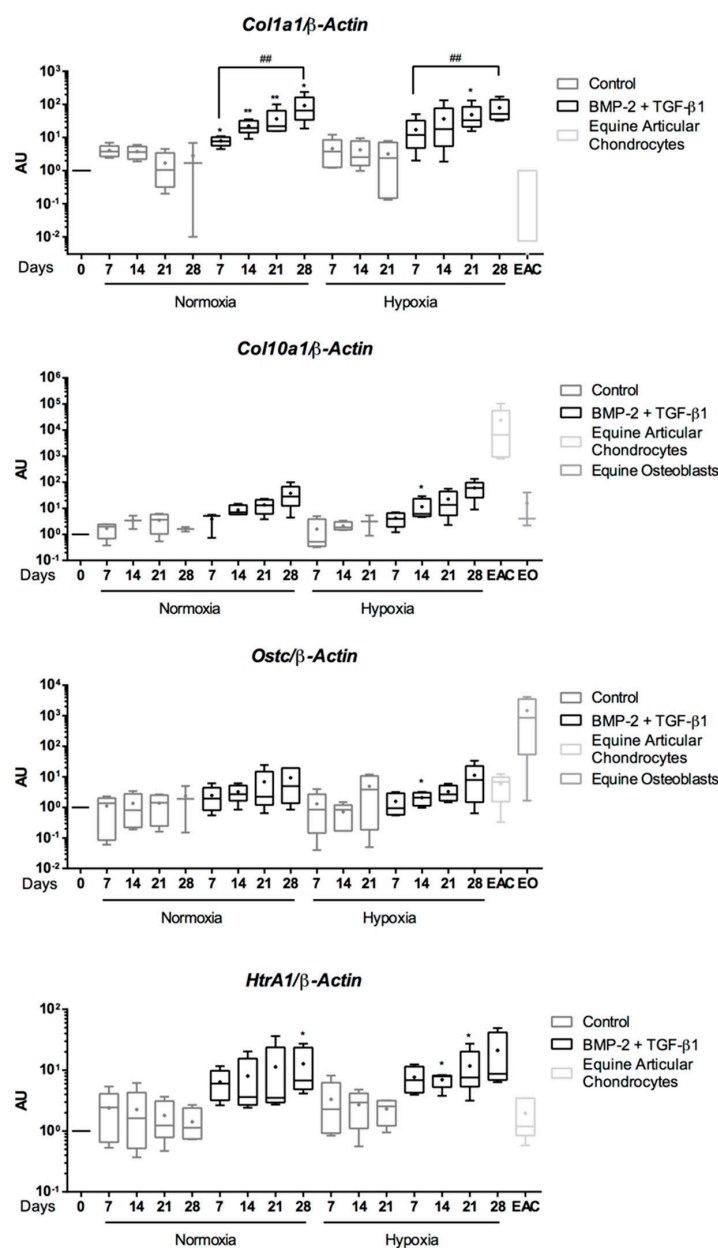


Figure 7. Cont.

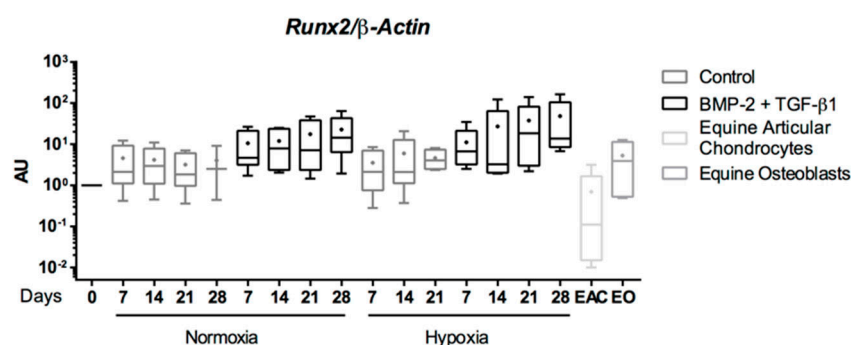


Figure 7. Effect of growth factors and oxygen tension on the gene expression of nonspecific-cartilage markers during the chondrogenic differentiation of equine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (eUCB-MSCs). eUCB-MSCs were cultured in type I/III collagen sponges for seven, 14, 21, and 28 days in normoxia or in hypoxia, in the absence (control), or in the presence of 50 ng/mL of BMP-2 and 10 ng/mL of TGF- β 1 (BMP-2 + TGF- β 1). RT-qPCR analysis of relative mRNA expression of the nonspecific-cartilage gene (*Col1a1*), of hypertrophic-cartilage markers (*Col10a1* and *Runx2*), of *HtrA1*, and of a specific-bone gene (*Ostc*) are shown. Gene expression was normalized to the β -Actin mRNA expression, compared with eUCB-MSCs cultured in monolayer at the fourth passage (Day 0). Equine articular chondrocyte (EAC) and equine osteoblast (EO) mRNAs were used as a positive control. Box plots represent five independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences between time points with the same culture medium were determined using the Friedman test ($^{###} p < 0.01$). Statistically significant differences between the culture medium at the same time point were determined using the two-tailed Mann–Whitney test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Comparison of the differences between normoxia and hypoxia was performed using the two-tailed Mann–Whitney test, and no statistical significant differences were observed. AU: arbitrary units.

When eUCB-MSCs were cultured in the presence of BMP-2 and TGF- β 1, the mRNA levels of enzymes involved in cartilage degradation such as *Mmp1*, *Mmp3* were similar to those of undifferentiated cells (D0) in both hypoxia and normoxia, and lower than those of cells cultured without BMP-2 and TGF- β 1 (Control) (Figure 8). Regarding *Mmp13*, another protease also considered as an indicator of late hypertrophy, its expression appeared to be broadly equivalent in the different culture conditions but higher than the control. In all cases, mRNA levels of these genes were lower than levels observed in EAC and equine tenocytes, used as a second control.

The induction of chondrogenesis in eUCB-MSCs, cultured in collagen scaffolds with BMP-2 and TGF- β 1, was associated with an upregulation of cartilage-specific genes at the mRNA level without hypertrophy or increase in the expression of matrix remodeling proteases (excepted for *HtrA1*). However, an increase in type I collagen levels was observed when the chondrogenic factors were used.

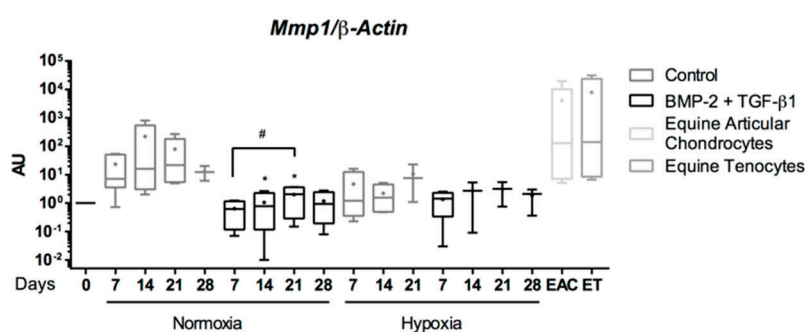


Figure 8. Cont.

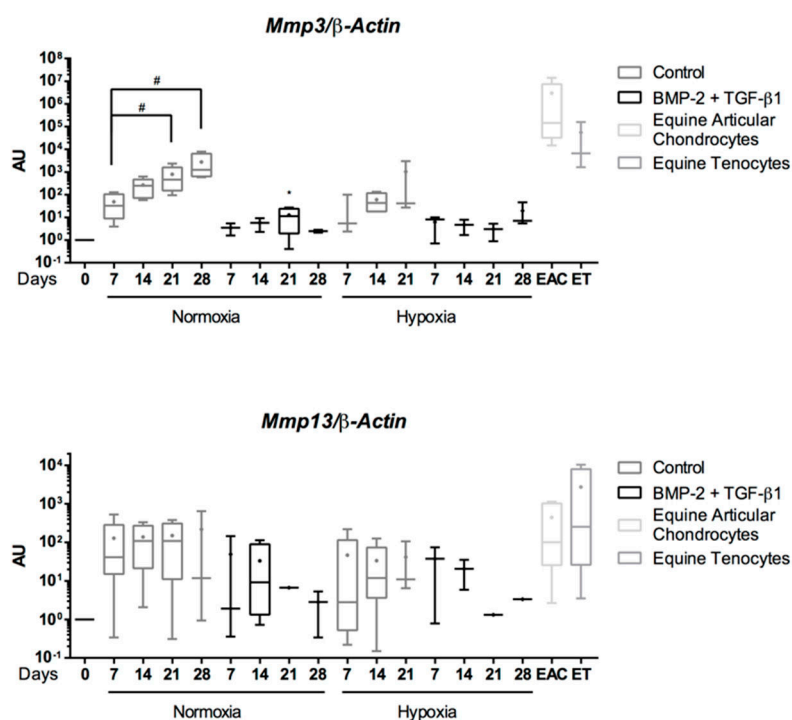


Figure 8. Effect of chondrogenic factors and oxygen tension on the gene expression of catabolic-cartilage markers during the chondrogenic differentiation of equine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (eUCB-MSCs). eUCB-MSCs were cultured in type I/III collagen sponges for seven, 14, 21, and 28 days in normoxia or in hypoxia, in the absence (control), or in the presence of 50 ng/mL of BMP-2 and 10 ng/mL of TGF- β 1 (BMP-2 + TGF- β 1). RT-qPCR analysis of relative mRNA expression of the indicated genes (*Mmp1*, *Mmp3*, and *Mmp13*) are shown. Gene expression was normalized to the β -Actin mRNA expression, compared with eUCB-MSCs cultured in monolayer at the fourth passage (Day 0). Equine articular chondrocyte (EAC) and equine tenocyte (ET, harvested from tendon) mRNAs were used as a positive control. Box plots represent five independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences between time points with the same culture medium were determined using the Friedman test ($\# p < 0.05$). Statistically significant differences between the culture medium at the same time point were determined using the two-tailed Mann–Whitney test ($* p < 0.05$). Comparison of the differences between normoxia and hypoxia was performed using the two-tailed Mann–Whitney test, and no statistical significant differences were observed. AU: arbitrary units.

2.6. Effect of TGF- β 3 in eUCB-MSCs Chondrogenesis

The effect of TGF- β 3 alone or in combination with BMP-2 on eUCB-MSCs commitment in chondrocytes was assessed and compared with the BMP-2 + TGF- β 1 treatment. Chondrogenic differentiation was then induced in a 3D collagen scaffold as previously described for seven to 28 days of culture under two oxygen tensions.

The mRNA levels of cartilage-specific genes (*Col2a1*, *Col9a1*, *Acan*, and *Snorc*) increased only when growth factors (BMP-2 +/- TGF- β 1 or β 3) were added to the culture medium, regardless of oxygen conditions (Figure 9). The gene upregulation was always higher at the end of culture, reaching mRNA levels similar to those detected in EACs when cells were cultured with BMP-2 and TGF- β 1 or β 3. In addition, the same profiles were observed for normoxic and hypoxic conditions for the same culture medium. Compared with the control, higher levels of *Col2a1*, *Col9a1*, and *Acan* were obtained after 28 days of induction in normoxia with BMP-2 and TGF- β 1. The chondrogenic commitment of eUCB-MSCs was also associated with the upregulation of the *Col11a1* gene, although the difference between conditions was not significant. This result suggests that the synthesis of cartilage

matrix components was further enhanced with the combination BMP-2 + TGF- β 1 or β 3 compared to TGF- β 3 alone.

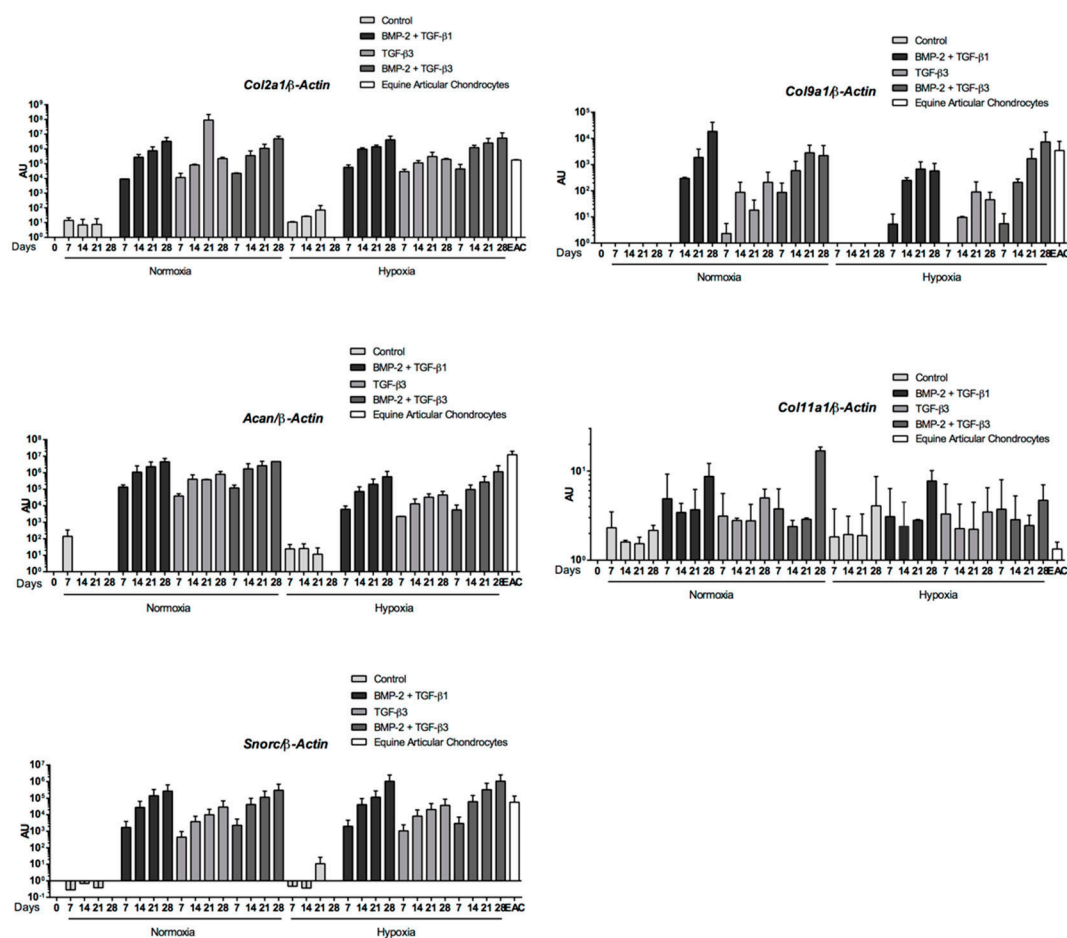


Figure 9. Chondrogenic gene expression during equine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (eUCB-MSCs) chondrogenesis induced by TGF- β 3 \pm BMP-2 compared to TGF- β 1 + BMP-2. eUCB-MSCs were cultured in type I/III collagen sponges for seven, 14, 21, and 28 days in normoxia or in hypoxia, in the absence (control), or in the presence of 50 ng/mL of BMP-2 and 10 ng/mL of TGF- β 1 (BMP-2 + TGF- β 1) or in the presence of 10 ng/mL of TGF- β 3 alone or with BMP-2 (BMP-2 + TGF- β 3). RT-qPCR analysis of relative mRNA expression of the indicated genes (*Col2a1*, *Acan*, *Col9a1*, *Col11a1*, and *Snorc*) is shown. Gene expression was normalized to the β -Actin mRNA expression, compared with eUCB-MSCs cultured in monolayer at the fourth passage (Day 0). Equine articular chondrocyte (EAC) mRNAs were used as positive control. Histograms represent two independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences between time points with the same culture medium were determined using the Friedman test. Statistically significant differences between the culture medium at the same time point were determined using the Kruskal–Wallis test. Comparison of the differences between normoxia and hypoxia was performed using the two-tailed Mann–Whitney test. In each case, no statistical significant differences were observed. AU: arbitrary units.

As with BMP-2 + TGF- β 1, the BMP-2 + TGF- β 3 combination compared with the control showed increased levels of *Col1a1* and *Htra1* mRNA as well as hypertrophic (*Col10a1*) and osteoblastic markers (*Runx2*, *Ostc*), whatever the oxygen conditions (Figure 10). However, steady-state amounts of hypertrophic or osteoblastic markers remained below that of EACs, for BMP-2 + TGF- β 1 (Figure 7). Furthermore, the expression profiles of the three matrix metalloproteinases (MMPs) studied were similar for the BMP-2 + TGF- β 1 and BMP-2 + TGF- β 3 conditions with lower steady-state amounts

than in EACs (Figure 11). TGF- β 1 or TGF- β 3 in combination with BMP2 enhanced chondrogenesis without appreciable matrix remodeling, hypertrophy, or osteoblastic maturation.

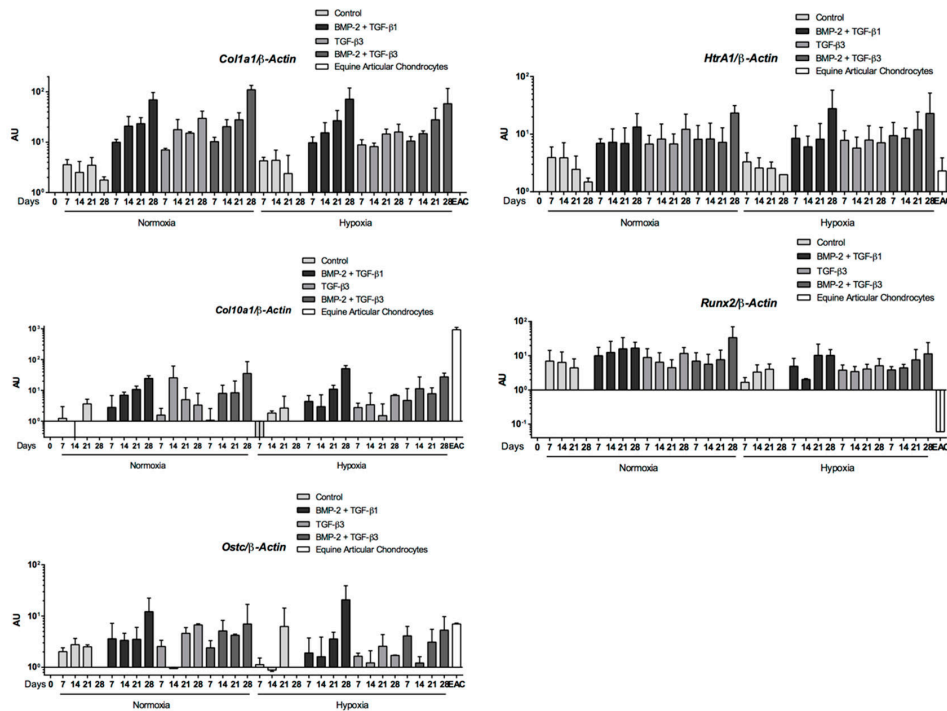


Figure 10. Nonspecific-cartilage gene expression during equine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (eUCB-MSCs) chondrogenesis induced by TGF- β 3 \pm BMP-2 compared to TGF- β 1 + BMP-2. eUCB-MSCs were cultured in type I/III collagen sponges for seven, 14, 21, and 28 days in normoxia or in hypoxia, in the absence (control), or in the presence of 50 ng/mL of BMP-2 and 10 ng/mL of TGF- β 1 (BMP-2 + TGF- β 1), or in the presence of 10 ng/mL of TGF- β 3 alone or with BMP-2 (BMP-2 + TGF- β 3). Real-time RT-PCR analysis of relative mRNA expression of the noncharacteristic-cartilage genes (*Col1a1* and *HtrA1*), of hypertrophic-cartilage markers (*Col10a1*, *Runx2*, and *Alpl*), and of a specific-bone gene (*Oste*) is shown. Gene expression was normalized to the β -Actin mRNA expression, compared with eUCB-MSCs cultured in monolayer at the fourth passage (Day 0). Equine articular chondrocyte (EAC) mRNAs were used as a positive control. Histograms represent two independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences between time points with the same culture medium were determined using the Friedman test. Statistically significant differences between the culture medium at the same time point were determined using the Kruskal–Wallis test. Comparison of the differences between normoxia and hypoxia was performed using the two-tailed Mann–Whitney test. In all cases, no statistical significant differences were detected. AU: arbitrary units.

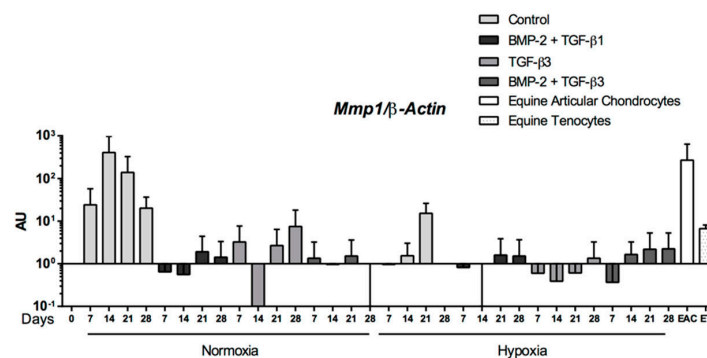


Figure 11. Cont.

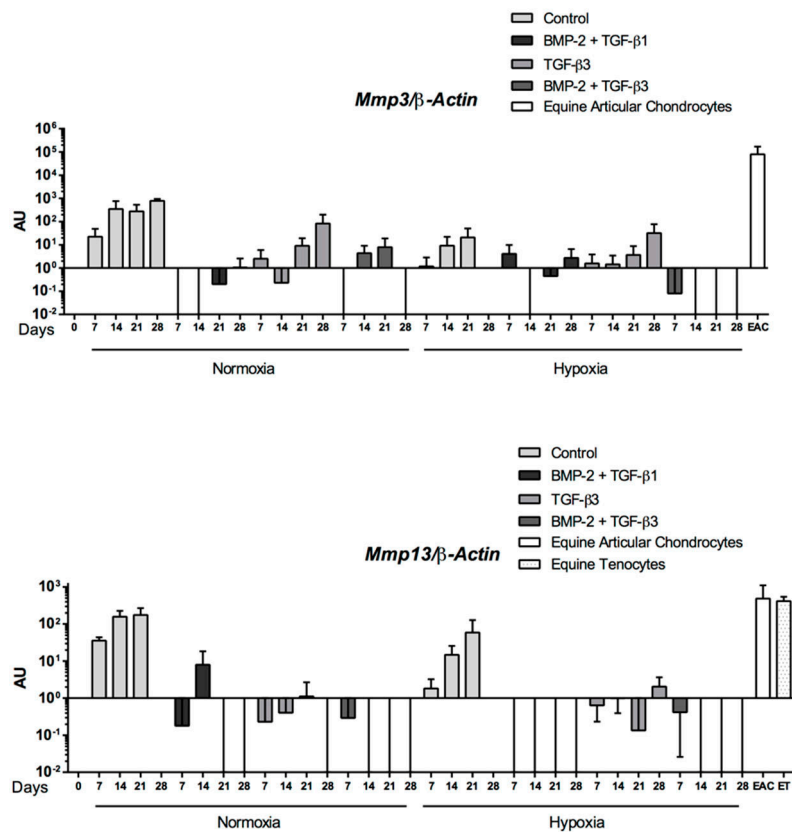


Figure 11. Catabolic gene expression during equine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (eUCB-MSCs) chondrogenesis induced by TGF- β 3 \pm BMP-2 compared to TGF- β 1 + BMP-2. eUCB-MSCs were cultured in type I/III collagen sponges for seven, 14, 21, and 28 days in normoxia or in hypoxia, in the absence (control), or in the presence of 50 ng/mL of BMP-2 and 10 ng/mL of TGF- β 1 (BMP-2 + TGF- β 1), or in the presence of 10 ng/mL of TGF- β 3 alone or with BMP-2 (BMP-2 + TGF- β 3). RT-qPCR analysis of relative mRNA expression of the indicated genes (*Mmp1*, *Mmp3*, and *Mmp13*) is shown. Gene expression was normalized to the β -Actin mRNA expression, compared with eUCB-MSCs cultured in monolayer at the fourth passage (Day 0). Equine articular chondrocyte (EAC) and equine tenocyte (ET, harvested from tendon) mRNAs were used as a positive control. Histograms represent two independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences between time points with the same culture medium were determined using the Friedman test. Statistically significant differences between the culture medium at the same time point were determined using the Kruskal–Wallis test. Comparison of the differences between normoxia and hypoxia was performed using the two-tailed Mann–Whitney test. In all cases, no statistical significant differences were detected. AU: arbitrary units.

2.7. Protein Expression Analysis during eUCB-MSCs Commitment into Chondrocytes

During the eUCB-MSCs chondrogenesis induced by growth factor combinations (BMP-2 + TGF- β 1 or BMP-2 + TGF- β 3), the expression of type II collagen was revealed in normoxia and in hypoxia (Figure 12). Type II collagen shows different forms of maturation such as type II procollagen (pro) with C- and N-terminal propeptides, procollagen with only C- or N-terminal propeptides (pC/pN), or the doubly cleaved form corresponding to the mature form. After seven days of culture in the presence of BMP-2 + TGF- β 1 or TGF- β 3 alone or in combination with BMP-2, the bands of type II collagen showed weak intensity which increased with time of culture, in normoxia and in hypoxia. However, in the presence of TGF- β 3, the intensity was weaker compared with both combinations. The same pattern was observed with type IIB collagen, a marker of mature chondrocytes. However, the treatment with growth factors led to the overexpression of type I collagen compared with the condition without growth

factors. Type X collagen expression was weakly perceptible in the presence or absence of growth factors. However, it does not seem that the eUCB-MSCs in the different experimental conditions express the 59 kDa form of type X collagen expected in denatured-reduced conditions. HtrA1 expression tended to decrease over time when BMP-2 and TGF- β 1 or TGF- β 3 were used.

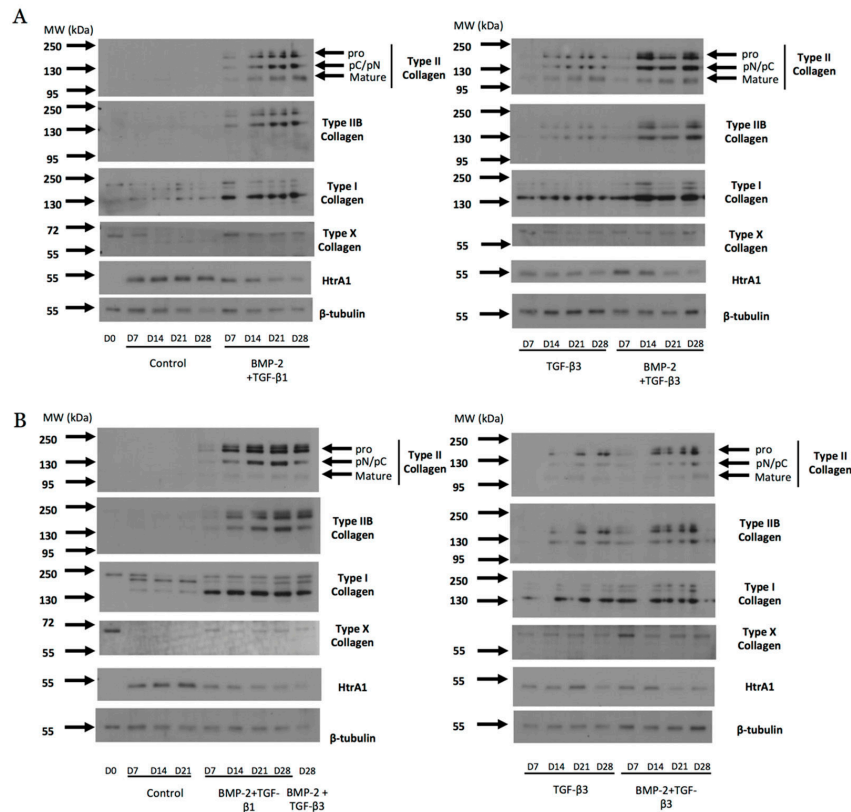


Figure 12. Effect of different combinations of chondrogenic factors during chondrocytes differentiation of equine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (eUCB-MSCs). eUCB-MSCs at passage four were cultured in type I/III collagen sponges for seven, 14, 21, and 28 days in normoxia (A) or in hypoxia (B), in the absence (control), or in the presence of 50 ng/mL of BMP-2 and 10 ng/mL of TGF- β 1 (BMP-2 + TGF- β 1), or in the presence of 10 ng/mL of TGF- β 3 alone or with BMP-2 (BMP-2 + TGF- β 3). Undifferentiated eUCB-MSCs were also cultured as monolayers and used as a control before differentiation (Day 0, D0). Protein extracts were analyzed in Western blots for type II, type IIB, types I and X collagens, and HtrA1 versus β -tubulin. Representative blots are shown ($n = 5$ and $n = 2$ for the culture conditions with TGF- β 3 \pm BMP-2 in normoxia and hypoxia, respectively). Type II collagen shows different levels of maturation forms such as type II procollagen (pro), with only C- or N-terminal propeptides (pC/pN) and the doubly cleaved form (mature form). MW: Molecular Weight, kDa: kilodaltons.

The protein expression analysis between the two oxygen tensions showed that the total type II collagen (all forms) showed higher expression in normoxia after 28 days of culture with BMP-2 and TGF- β 1 than with BMP-2 and TGF- β 3 (Figure 13). Furthermore, the band of the mature form of type II collagen observed at 110–120 kDa was more intense in normoxia compared with hypoxia, and with BMP-2 + TGF- β 1 compared with BMP-2 + TGF- β 3 in hypoxia. The same pattern was observed with type IIB collagen, although in normoxia the BMP-2 + TGF- β 1 combination appeared to be more efficient for the synthesis of this marker of mature chondrocytes. Although bands of type I collagen were weak in the control, the use of chondrogenic factors led to the overexpression of this protein regardless of the conditions, with lower amounts in hypoxia compared with normoxia.

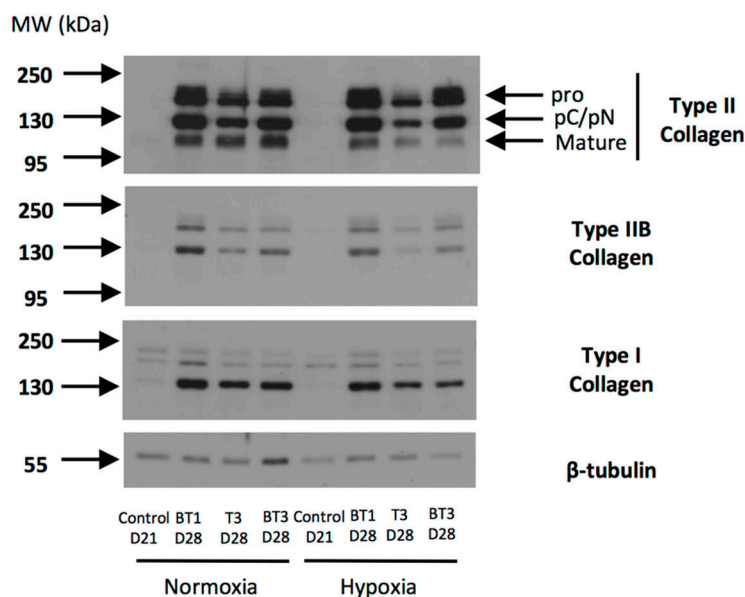


Figure 13. Comparison between oxygen tension and TGF- β 1 or TGF- β 3 in addition to BMP-2 on the protein expression of equine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (eUCB-MSCs) differentiated into chondrocytes. eUCB-MSCs at passage four were cultured in type I/III collagen sponges for 21 (D21) and 28 days (D28) in normoxia or in hypoxia, in the absence (control), or in the presence of 50 ng/mL of BMP-2 and 10 ng/mL of TGF- β 1 (BT1), or 10 ng/mL of TGF- β 3 (T3), or BMP-2 and TGF- β 3 (BT3). Protein extracts were analyzed in Western blots for type II, type IIB, and type I versus β -tubulin. Representative blots are shown of two independent experiments. Type II collagen shows different levels of maturation forms such as type II procollagen (pro), with only C- or N-terminal propeptides (pC/pN) and the doubly cleaved form (mature form). MW: Molecular Weight, kDa: kilodaltons.

In conclusion, protein analyses confirmed that chondrogenic differentiation was induced in the presence of chondrogenic factors with a higher type II collagen content in cultures containing BMP-2 and TGF- β 1 in normoxia after 28 days of culture with a more advanced maturation. However, an undesirable expression of type I collagen reduces the suitability of the newly synthesized matrix and indicates a non-stabilized phenotype of the committed cells.

2.8. Gene Silencing Experiments to Overcome Type I Collagen Synthesis

The above results showed sub-optimal chondrogenic differentiation of eUCB-MSCs cultured for 28 days with BMP-2 and TGF- β 1. Extending the culture period from 28 days to 42 days, we assessed the behavior of the cells committed to chondrogenic maturation and tested an RNA interference strategy.

The gene expression of cartilage-specific markers such as *Col2a1* and *Snorc* was similar for 28 and 42 days of culture with BMP-2 and TGF- β 1 (Figure 14). The *Col1a1* mRNA level increased until 28 days of culture and then stabilized.

To overcome the expression of type I collagen, gene silencing experiments targeting *Col1a2*, encoding the α 2 chain of type I collagen, were performed with successive transfections of two siRNAs (No. 1 and No. 2) (at 14, 17, 21, 24, and 35 days) during a culture period of 28 and 42 days. During the first 28 days of chondrogenic differentiation, the two siRNAs targeting *Col1a2* mRNA used at 200 nM led to a decrease in *Col1a2* gene expression compared with the control siRNA (Figure 15A). An average decrease of 31.5% and 55% of *Col1a2* mRNA level was observed with siRNA No. 1 and with siRNA No. 2, respectively, compared with the control siRNA. Targeting *Col1a2* mRNA did not seem to modify *Col1a1* expression, although siRNA No. 1 at 200 nM and siRNA No. 2 at 100 nM induced a slight increase in *Col1a1* mRNA levels (Figure 15B). Regarding the expression of the cartilage-specific genes

Col2a1 and *Snorc*, the two siRNAs did not show deleterious effects on their expression level except siRNA No. 2 at 200 nM on the *Col2a1* (but not *Snorc*) mRNA level, for which a slight decrease was observed (Figure 15C,D).

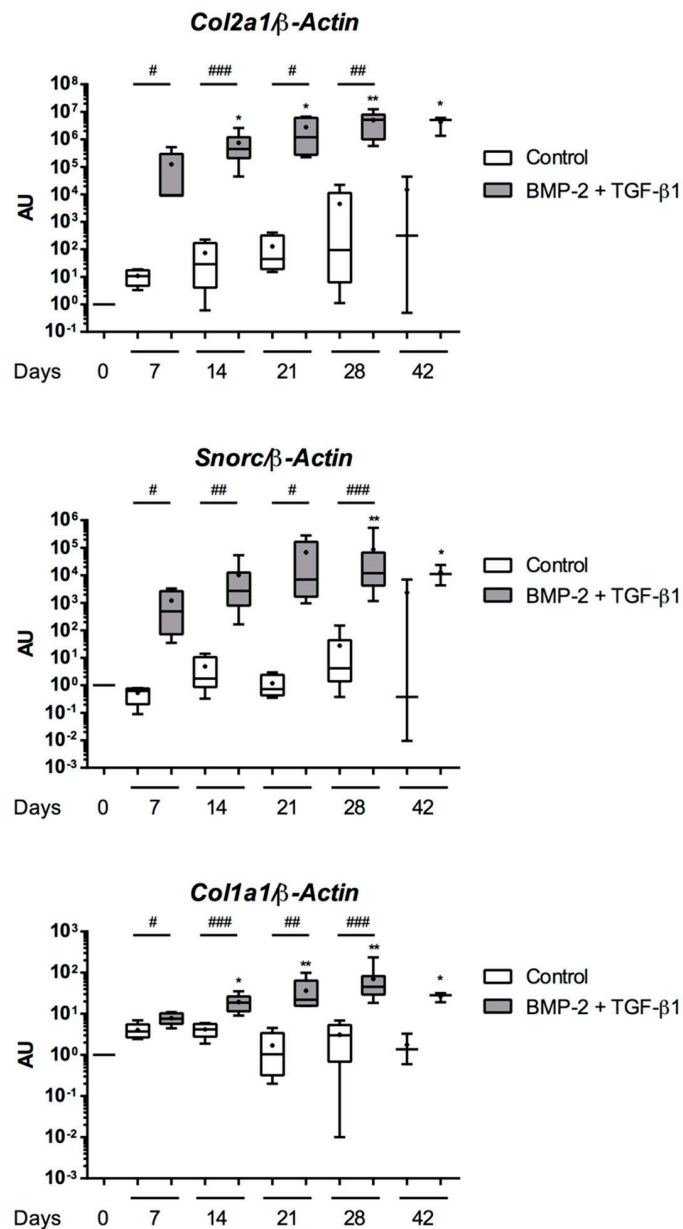


Figure 14. Long time culture leads to a phenotypic stabilization of equine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (eUCB-MSCs) differentiated into chondrocytes. The eUCB-MSCs were cultured in type I/III collagen sponges for seven, 14, 21, 28, or 42 days in normoxia, in the absence (control), or in the presence of 50 ng/mL of BMP-2 and 10 ng/mL of TGF- β 1 (BMP-2 + TGF- β 1). RT-qPCR analysis of relative mRNA expression of two cartilage-specific genes (*Col2a1* and *Snorc*) and an unusual marker of hyaline cartilage (*Col1a1*) is shown. Gene expression was normalized to the β -Actin mRNA expression, compared with undifferentiated eUCB-MSCs cultured in monolayer at the fourth passage (Day 0). Box plots represent at least five (and up to eight) independent experiments performed in triplicate ($n = 3$ for 42 days of culture). Statistically significant differences were determined using the two-tailed Mann–Whitney test (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$). Statistically significant differences between time points with the same culture medium were determined using the Friedman test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). AU: arbitrary units.

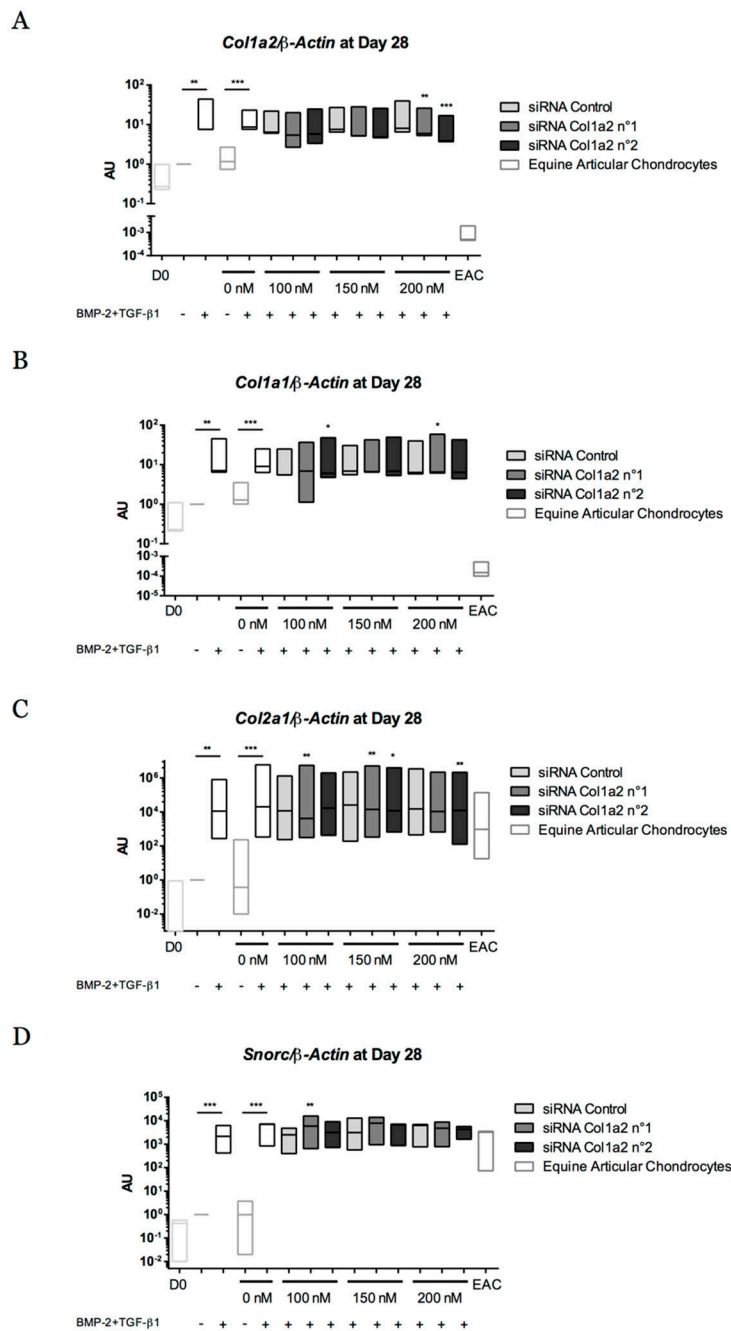


Figure 15. Effect of successive transfections of *Col1a2* siRNA at the transcriptional level after 28 days of chondrogenic differentiation of equine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (eUCB-MSCs). At passage four, eUCB-MSCs were cultured in type I/III collagen sponges for 28 days in normoxia, in the absence or in the presence of 50 ng/mL of BMP-2 and 10 ng/mL of TGF- β 1 (BMP-2 + TGF- β 1). Four transfections of two different sequences of siRNA targeting *Col1a2* at 100, 150, or 200 nM were performed between 14 and 24 days of culture. RT-qPCR analysis of relative mRNA expression of *Col1a2* (A), *Col1a1* (B), *Col2a1* (C), and *Snorc* (D) is shown. Gene expression was normalized to the β -Actin mRNA expression, compared with eUCB-MSCs cultured in sponges for 28 days without BMP-2 + TGF- β 1. Undifferentiated eUCB-MSCs at the fourth passage were used as a control before differentiation (Day 0, D0). mRNA extracts obtained from equine articular chondrocytes (EAC) released from cartilage after overnight enzymatic digestion were used as a control. Floating bars represent three independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences with the case transfected with a control siRNA at the related concentration were determined using the Student's *t*-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). AU: arbitrary units.

When the culture period was extended to 42 days, a decrease of 42.2% and 39.8% in *Col1a2* mRNA levels compared with the control siRNA was observed for siRNA No. 1 and siRNA No. 2 (200 nM), respectively (Figure 16A). This concentration of 200 nM did not induce variation in *Col1a1* and *Col2a1* mRNA levels (Figure 16B,C). siRNA No. 1 was associated with a slight decrease in the transcriptional expression of *Snorc* (Figure 16D).

To better understand the phenotype obtained after chondrogenic differentiation of eUCB-MSCs, the functional differentiation index was calculated (Figure 17). It corresponds to the ratio of *Col2a1* mRNA to *Col1a1* or *Col1a2* mRNA levels after 28 and 42 days. The chondrogenic factors increased (i) the *Col2a1:Col1a1* ratios by 41,000 (after 28 days) and 66,000 (after 42 days) fold, and (ii) the *Col2a1:Col1a2* ratios by 35,000 (after 28 days) and 55,000 (after 42 days) compared with the control. Moreover, they approached—but did not attain—levels observed in EACs. Gene silencing targeting *Col1a2* mRNA did not improve the ratio, regardless of the conditions.

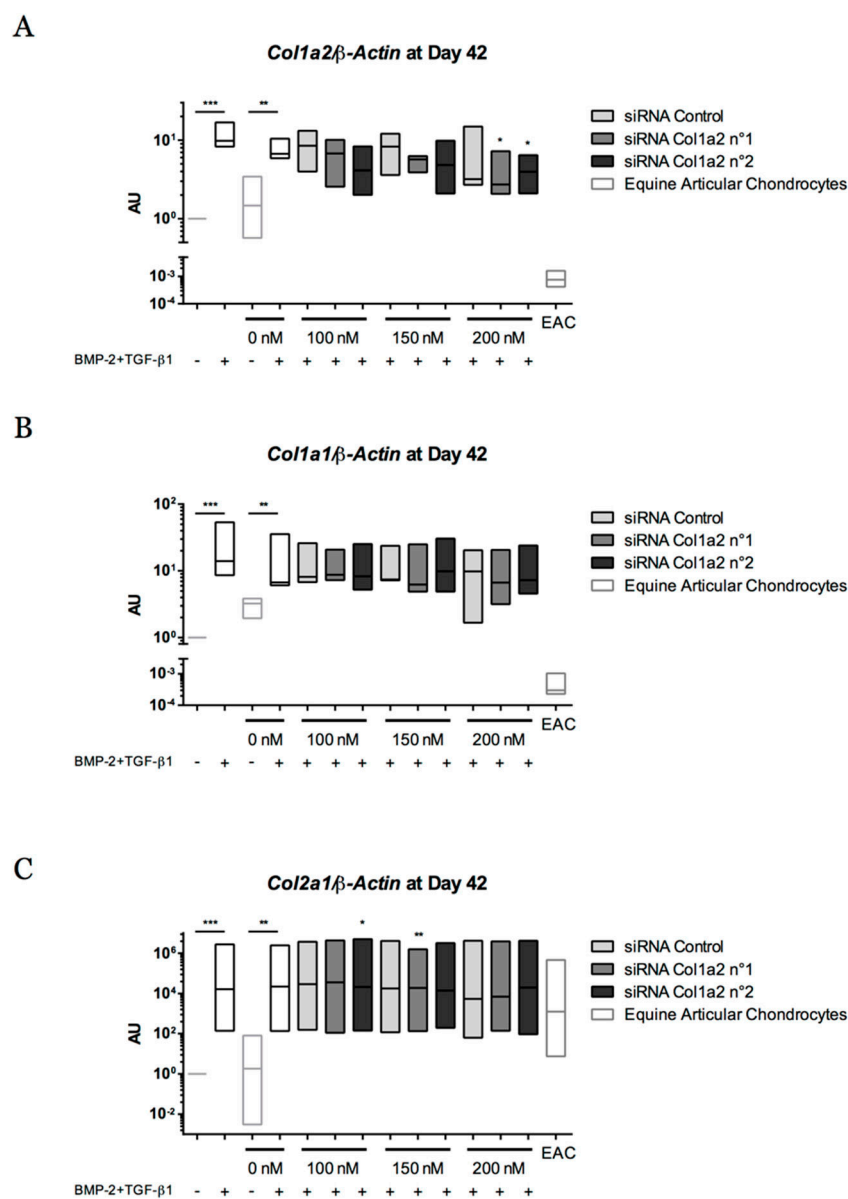


Figure 16. Cont.

D

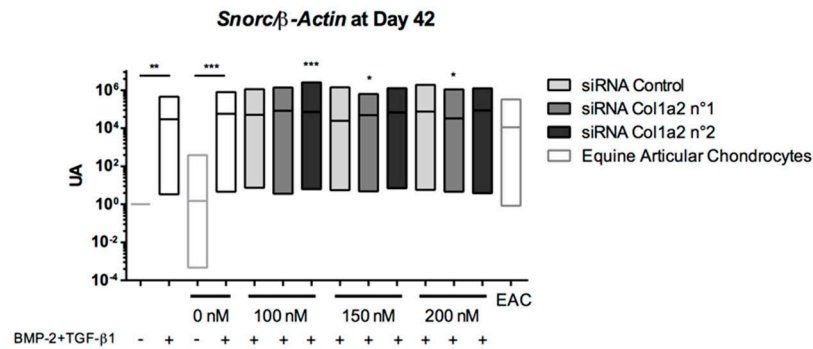
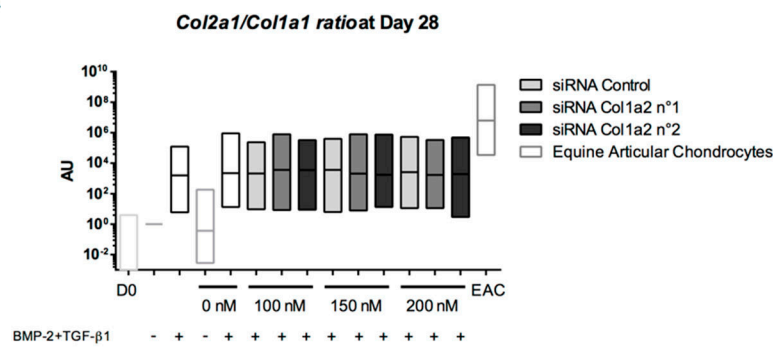


Figure 16. Effect of successive transfections of *Col1a2* siRNA at the transcriptional level after 42 days of chondrogenic differentiation of equine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (eUCB-MSCs). At passage four, eUCB-MSCs were cultured in type I/III collagen sponges for 42 days in normoxia, in the absence or in the presence of 50 ng/mL of BMP-2 and 10 ng/mL of TGF-β1 (BMP-2 + TGF-β1). Five transfections of two different sequences of siRNA targeting *Col1a2* at 100, 150, or 200 nM were performed between 14 and 24 days and at 35 days of culture. Real-time RT-PCR analysis of relative mRNA expression of *Col1a2* (A), *Col1a1* (B), *Col2a1* (C), and *Snorc* (D) is shown. Gene expression was normalized to the β -Actin mRNA expression, compared with eUCB-MSCs cultured in sponges for 42 days without BMP-2 + TGF-β1. The mRNA extracts obtained from equine articular chondrocytes (EAC) released from cartilage after overnight enzymatic digestion were used as a control. Floating bars represent three independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences with the case transfected with a control siRNA at the related concentration were determined using the Student’s *t*-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). AU: arbitrary units.

A



B

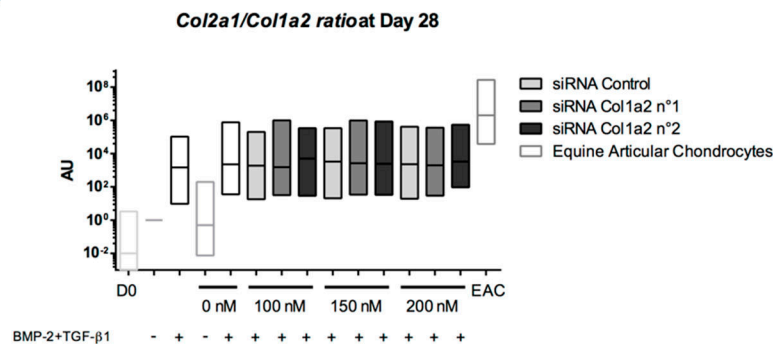


Figure 17. Cont.

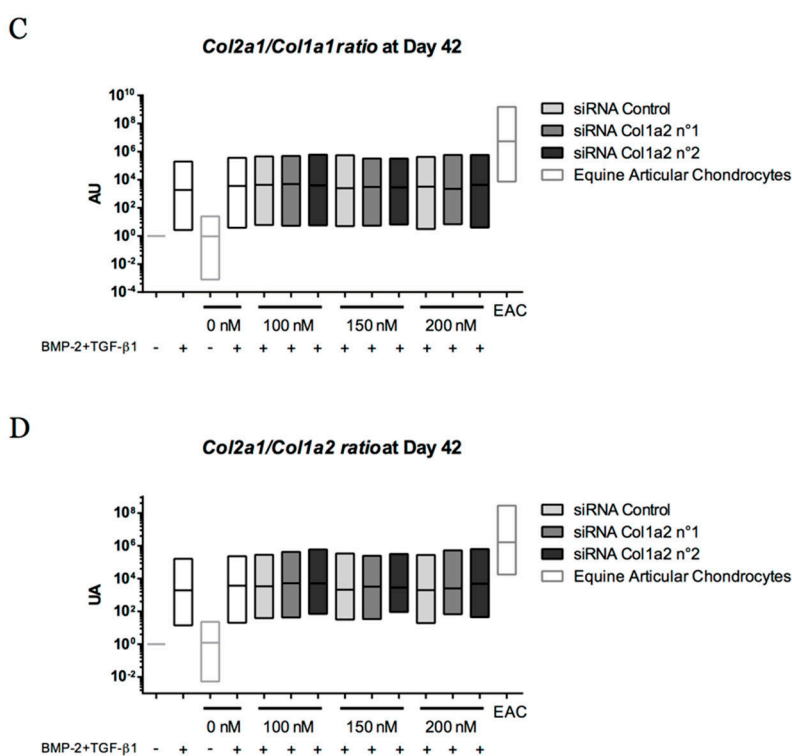


Figure 17. Effect of successive transfections of *Col1a2* siRNA on the *Col2a1* mRNA/*Col1a1* mRNA and *Col2a1* mRNA/*Col1a2* mRNA ratios during 28 and 42 days of chondrogenic differentiation of equine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (eUCB-MSCs). At passage four, eUCB-MSCs were incubated in the same experimental conditions as those described in the legends of Figures 15 and 16, and gene expression analysis was performed in an identical manner. The functional index of the eUCB-MSCs differentiated into chondrocytes was determined with the ratio of *Col2a1* mRNA:*Col1a1* mRNA after 28 days of culture (A), *Col2a1* mRNA:*Col1a2* mRNA after 28 days of culture (B), *Col2a1* mRNA:*Col1a1* mRNA after 42 days of culture (C), and *Col2a1* mRNA:*Col1a2* mRNA after 42 days of culture (D). Undifferentiated eUCB-MSCs at the fourth passage were used as a control before differentiation (Day 0, D0). mRNA extracts obtained from equine articular chondrocytes (EAC) released from cartilage after overnight enzymatic digestion were used as a control. Floating bars represent three independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences with the case transfected with a control siRNA at the related concentration were determined using the Student's *t*-test. No statistical significant differences were observed. AU: arbitrary units.

3. Discussion

MSCs are increasingly studied for their potential in tissue engineering. The horse is an ideal animal model for the study of the musculoskeletal system, but extensive knowledge of equine MSCs is required for future clinical applications in veterinary medicine. In this study, we isolated and characterized equine UCB-MSCs. We determined their potential for cartilage tissue engineering using type I/III collagen sponges and chondrogenic factors under two oxygen conditions to assess the optimal conditions for chondrogenic differentiation.

Equine UCB is a source of MSCs with a painless and non-invasive harvesting procedure. The success rate in MSCs isolation was 100% when eUCB samples were treated within 40 h after foaling. Lower success rates (57%) are reported in the scientific literature, despite faster treatment times (a mean of 15 h) [40]. Improved culture methods that separate red and white blood cells have a success rate of 100% [41]. In humans, successful derivation of MSCs from UCB ranges from 29 to 90% [42,43]. The difference observed between horses and humans may be due to sample volume, collection methods, or intrinsic cellular properties.

Regenerative medicine based on MSCs require high cell numbers. The first eUCB-MSCs appear nine days after seeding (P0), as described previously [17]. These cells multiplied rapidly and proliferative activity remained high until P15. When FGF-2 was added to the culture medium during the eUCB-MSCs expansion stage, there was an increase in population doublings. A comparative study of expansion in human adult bone marrow-derived MSCs with or without FGF-2 showed that FGF-2 extends the level of expansion, reaching target cell numbers more rapidly [44]. However, our results show that supplementation with FGF-2 does not prevent replicative senescence after P15.

Previous studies have shown that MSCs have a limited life span after several cell divisions associated with replicative senescence [45]. However, assessing mRNA expression changes indicative of in vitro senescence of MSCs revealed no variation at the mRNA level, except for p21, involved in cell cycle arrest, which increased after P15. Our results suggest that cells must be used before P15 to avoid the risk of cell senescence.

The multipotency of MSCs is based on their ability to differentiate into cells of the mesodermal lineage [46]. Studies have reported a difference in MSCs differentiation capacity according to their provenance. In humans, UCB-MSCs show no adipocyte differentiation in contrast to cells derived from bone marrow and adipose tissue [19]. Although the time required for chondrocyte differentiation is identical for these three sources of MSCs in the horse, differentiation into osteoblasts and adipocytes takes longer for eUCB-MSCs compared to other sources [47]. In this study, the eUCB-MSCs differentiated easily into osteoblasts and chondrocytes, but they failed to differentiate into adipocytes. Reports have demonstrated adipogenic differentiation of eUCB-MSCs only when 15% rabbit serum was used in the differentiation medium [17,40]; therefore, the protocol may probably need to be modified to demonstrate the tripotency of eUCB-MSCs.

The eUCB-MSCs were characterized by immunophenotyping focusing on ISCT-recommended markers (CD73, CD90, and CD105) [15] and other MSCs markers well-described in the literature (CD29 and CD44) [16]. Our results show that CD29, CD44, and CD90 are expressed by eUCB-MSCs at P4. However, for eUCB-MSCs, only a part of the cell population expressed CD73, as described by De Schauwer et al. [48]. eUCB-MSCs were negative for CD105 in our study. Recently, canine MSCs isolated from adipose tissue were also reported to be CD105⁻ negative [49]. For equine MSCs derived from adipose tissue, CD105 flow cytometry analysis using the same clone as the one used in this study showed a strong positive signal [50]. This variation in CD105 expression may be due to cell origins or to the enzymes used for subculturing cells, as it was demonstrated for CD14 in equine MSCs [51].

This study aimed to determine eUCB-MSCs potential for cartilage tissue engineering using type I/III collagen sponges as scaffolds. All of our results showed that these cells have the capacity to synthesize a specific protein representative of hyaline articular cartilage in collagen sponges in the presence of chondrogenic factors. The comparison with other studies is not straightforward because other protocols perform chondrocyte differentiation in monolayer cultures [52], in pellet cultures [50], or in hydrogels [53] in the presence of only one growth factor. Equine MSCs derived from adipose tissue cultured in a micromass system at P4 showed only a non-significant induction of type II collagen and aggrecan [50] and at P2, Alcian blue staining was more intense at the periphery of cell pellets, giving evidence of an incomplete and heterogenous differentiation. Although pellet cultures promote cell-cell interactions and close contacts with the matrix which are essential for chondrogenic commitment at the condensation stage of endochondral ossification, this 3D model limits oxygen and nutrient diffusion. Collagen sponge scaffolds, in contrast to micromass cultures, are porous, allowing seeded cells to migrate and providing efficient nutrient and gas diffusion. Moreover, this culture model limits the cell-cell interactions which are not observed in the resting superficial zone of articular cartilage. The 3D scaffolds have already been used for chondrocyte differentiation with equine MSCs and lead to the synthesis of a neocartilage more similar to hyaline cartilage compared than that produced in pellet cultures [54]. However, there are no differences in *Col2a1* mRNA levels between the culture models and the authors did not carry out comparisons with undifferentiated MSCs or with equine cartilage as a gold standard as in the present study.

Previous chondrogenic differentiation experiments carried out on equine MSCs employed a unique member of the TGF- β family. For example, in bone marrow-derived MSCs, *Acan* and *Col2a1* upregulation was demonstrated in hypoxia after 14 and 21 days of culture with TGF- β 3 [55]. This growth factor was the main one used in various protocols, for which culture time generally does not exceed 21 days [45,54,56]. In some studies, TGF- β 1 was also used and showed increased expression of type II collagen and aggrecan in eUCB-MSCs [23]. In our study and for the first time, the effect of culturing eUCB-MSCs in the absence or presence of BMP-2 (50 ng/mL) combining with TGF- β 1 or TGF- β 3 (10 ng/mL) in type I/III collagen sponges was evaluated based on the expression of several markers, specific to or non-specific to hyaline cartilage during culture for up to 42 days. The expression of *Col2a1*, *Acan*, and *Snorc* occurred only in the presence of chondrogenic factors and increased gradually with time, in normoxia and in hypoxia. After 28 days of chondrogenic differentiation, the combination of BMP-2 and TGF- β 1 showed higher expression of type II collagen at the protein level than the BMP-2 + TGF- β 3 combination. Furthermore, mRNA levels of *Col9a1* were higher when BMP-2 and TGF- β 1 were used.

As studies on 3D cartilage tissue engineering using human MSCs have highlighted the risk of cell hypertrophy in newly synthesized tissue [31], several markers of hypertrophic chondrocytes, non-specific to cartilage or osteoblasts, were assessed. However, in our equine MSC model, at the mRNA and the protein level, type X collagen, the main marker of hypertrophy and osteoarthritis, was not expressed or only weakly expressed, as was *Mmp13*, the main protease involved in cartilage degradation upregulated in late hypertrophic chondrocytes. Furthermore, *HtrA1*, a serine protease that can degrade a variety of extracellular matrix (collagens and aggrecans) as well as TGF- β /BMPs receptors, was detected at the protein level in the absence of growth factors, whereas in the presence of BMP-2 and TGF- β 1, *HtrA1* was downregulated gradually over time. Overall, our results suggest that our culture model mainly promotes the differentiation of equine MSCs into chondrocytes without hypertrophy.

Previous studies have demonstrated the importance of reduced oxygen tension to enhance cartilage matrix formation in equine MSCs [54] and to inhibit the type I collagen expression of dedifferentiated chondrocytes [57]. Culturing MSCs under 5% oxygen tension results in higher glycosaminoglycan and type II collagen levels than cultures performed under 21% oxygen normoxia. Moreover, an upregulation of chondrogenesis-related genes is observed with equine bone marrow-derived MSCs expanded in hypoxia [55]. The influence of hypoxia (2% O₂) for chondrogenesis with human adipose tissue-derived MSCs has been studied in pellet cultures in the presence of BMP-2 and TGF- β 3. The results suggest that hypoxia promotes the maintenance of a chondrocyte phenotype at the mRNA level, whereas MSCs cultured in normoxia (21% O₂) had a hypertrophic phenotype with an upregulation in the gene expression of *COL10A1* and *MMP13* [28]. In this study, no evidence of a hypertrophic phenotype was observed when the chondrogenic differentiation was performed in normoxia. Furthermore, although hypoxia promotes the high expression of all forms of type II collagen, the mature alpha1(II) chain was more expressed in normoxia. However, the expression level of type I collagen is higher in normoxia compared to hypoxia. A strategy consisting in alternating the oxic condition (normoxia first and hypoxia for the culture ending) could improve the phenotype of committed MSCs into chondrocytes.

Although TGF- β 1 treatment acts to stimulate all types of collagen synthesis [58], previous reports on cartilage engineering with MSCs on the equine model did not explore type I collagen expression. Type I collagen is a basal marker of undifferentiated MSCs, but our results showed that the use of growth factors to promote chondrogenesis led to an upregulation of this marker. Even though our results with long culture times suggested that the transcriptional expression of type I collagen stabilized between 28 and 42 days of culture, we performed a gene silencing experiment to attempt to reduce type I collagen gene expression. Preliminary experiments using siRNA targeting *Col1a1* mRNA were performed and the concentrations tested ranged between 5 and 200 nM (data not shown). Only concentrations above 100 nM appeared to induce a decrease of *Col1a1* mRNA, but the results

varied with the MSC strain. Because type I collagen is composed of two times more $\alpha 1$ than $\alpha 2$ chains, we targeted a decrease in the synthesis of the $\alpha 2$ chains to provoke better intracellular degradation. Thus, two sequences of siRNA targeting *Col1a2* mRNA were assessed with encouraging results at the transcriptional level. A maximum decrease of 55% on the targeting gene was observed after 28 days of culture with siRNA No. 2 at 200 nM. This siRNA sequence led to a decrease of only 39.8% after 42 days of culture. As it seems that this interference strategy is not successful at all in our conditions for eUCB-MSCs, alternative strategies to counteract collagen type I expression could be tested, such as the use of miRNAs or anti-miRNAs, or even culture of the cells in bioreactors. In mouse MSCs, overexpression of miRNA 145 decreases Sox9 expression, and culture without growth factors with anti-miR-145 induces the expression of chondrogenic markers (*Col2a1*, *Acan*, *Comp*, *Col9a2*, and *Col11a1*) [59].

Here we characterized equine UCB-MSCs; they showed great potential for cartilage tissue engineering when seeded in type I/III collagen sponges in the presence of BMP-2 and TGF- β 1 for 28 and 42 days of culture. However, further extensive studies are needed to determine if oxygen tension improves the quality of neo-synthesized cartilage by reducing type I collagen expression. Nonetheless, these MSCs possess properties of expansion allow banking and can be a reliable source for cartilage repair/regeneration. This study provides new insights for the development of future strategies in veterinary medicine.

4. Material and Methods

4.1. eUCB-MSCs Isolation and Culture

The eUCB was collected from 24 foals immediately after foaling by venipuncture of the umbilical veins performed with a 16G hypodermic needle attached to a 250-mL blood transfusion collection bag (MSE3500Q, Macopharma, Mouvaux, France) containing 35 mL of citrate phosphate-dextrose-adenine as the anticoagulant solution. Twenty-four eUCB samples were collected from *Ecuries Lebourgeois* (La Louverie, Semallé, France) and *Haras de Sou* (Bursard, France). The eUCB samples were processed within 9 to 62 h after collection. To isolate mononuclear cells (MNCs), each UCB sample was diluted 1:1 with phosphate-buffered saline (PBS) and carefully mixed with Ficoll-Paque PREMIUM (GE Healthcare Bio-Sciences, Chicago, IL, USA). After density gradient centrifugation at 400 g for 30 min at room temperature (RT), MNCs were washed with PBS by centrifugation at 400 g for 10 min at RT. Pellets were suspended in isolation medium consisting of low glucose-Dulbecco's Modified Eagle Medium (LG-DMEM, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) containing 30% Fetal Calf Serum (FCS, Life Technologies) and 10^{-7} M dexamethasone (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Cells were seeded in culture flasks and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. A mix of antimicrobials composed of 100 IU/mL of penicillin (Pan Pharma, Luitré, France), 100 μ g/mL of erythromycin (Amdipharm, London, UK), and 0.25 mg/mL of fungizone (Bristol-Myers Squibb, New York City, NY, USA) was added to all of the culture media used in this study. Non-adherent cells were removed 24 h after initial plating. The medium was changed twice weekly until adherent cells appeared, defined as passage zero (P0). After the appearance of several colonies in 22 samples, cells were detached using trypsin/EDTA (Life Technologies) and then re-seeded at 5000 cells/cm² (passage one, P1), and so on until confluence reached 80% at passage 20 (P20). Cell expansion was performed in LG-DMEM containing 20% FCS. Digital images were obtained to document cell morphology at passage zero and two using a phase contrast microscopy and Zen software (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Equine articular chondrocytes (EAC) were prepared from macroscopically healthy zones of cartilage in metacarpophalangeal joint in horses undergoing euthanasia at the Centre d'Imagerie et de Recherche sur les Affections Locomotrices Equines (CIRALE, Goustranville, France). Cartilage samples were cut into small slices, then chondrocytes were isolated by sequential digestion for 45 min at 37 °C with 2 mg/mL of type XIV protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and then overnight at 37 °C with 1 mg/mL of type I collagenase (from *Clostridium histolyticum*, Invitrogen Life Technologies,

Carlsbad, CA, USA), as previously described in a human model [60]. The cell suspension was filtered through a 70- μ m mesh nylon membrane and centrifuged at 200 g for 10 min. The pellets were resuspended in Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and RNA extraction was carried out according to the manufacturer's protocol. For Western blot analysis, cartilage slices were ground in liquid nitrogen and protein extraction was performed with RIPA-lysis buffer. EAC extracts were used in real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot as controls. mRNA extracts from equine tenocytes harvested from tendon were used in RT-PCR as controls.

4.2. Proliferation Capacity and Senescence Analysis

eUCB-MSCs were cultured in expansion medium with LG-DMEM, 20% FCS \pm 5 ng/mL FGF-2 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Every seven days, the population doubling level was calculated for each passage (from P1 to P20) as follows: population doublings (PDs) = $(\log_{10}(\text{NH}) - \log_{10}(\text{NI})) / \log_{10}(2)$, where NI is the number of seeded cells and NH is the number of harvested cells. For the cumulative population doubling, the PD was added to all PDs of previous passages. For each passage and medium condition, cells were harvested for RNA analysis.

4.3. Immunophenotyping

At passage four, eUCB-MSCs were analyzed by flow cytometry using a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) with a panel of antibodies (Table 1). Flow-check Pro Fluorospheres (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) were used to verify instrument optical alignment and fluidics. Flow-Set Pro Fluorospheres (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) were used to verify instrument sensibility. eUCB-MSCs were harvested, washed, and resuspended in PBS at a density of 10^6 cells/mL. Cell suspensions were incubated with monoclonal antibodies for 30 min at 4 °C in the dark, followed by a wash and, for CD73 and CD90, a secondary antibody incubation at 4 °C for 30 min in the dark. Subsequently, the cells were washed and resuspended in 500 μ L of PBS. All primary and secondary antibodies are listed in Table 1. The respective mouse isotype antibodies served as controls. A minimum of 20,000 events were acquired for each antibody using Gallios software (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and analyzed with FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Table 1. Antibody panel for flow cytometric analysis.

Antibodies	Isotype	Clone	Fluochrome	Source
Anti-CD29	IgG1, κ	TS2/16	APC (Allophycocyanin)	BioLegend (San Diego, CA, USA)
Anti-CD44	IgG1, κ	J.173	PE (Phycoerythrin)	IOTest (Brea, CA, USA)
Anti-CD45	IgG2a	F10-89-4	Pacific Blue [®]	AbD Serotec (Kidlington, UK)
Anti-CD73	IgG1	10f1	APC	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-CD90	IgM	DH24A	FITC (Fluorescein isothiocyanate)	InvestCare (London, UK)
Anti-CD105	IgG1	SN6	FITC	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-type II MHC	IgG1	CVS20	RPE	AbD Serotec (Kidlington, UK)
Goat anti-mouse IgG1	IgG	Polyclonal	APC	Abcam (Cambridge, UK)
Goat anti-mouse IgM	IgG	Polyclonal	FITC	AbD Serotec (Kidlington, UK)

4.4. Multilineage Capacity

The capacity of eUCB-MSCs to differentiate in osteogenic, adipogenic, and chondrogenic lineages was performed at P4. Cells were seeded in six-well plates and grown until 50% confluency. To induce

osteogenesis, cells were cultured for 21 days in osteogenic medium containing LG-DMEM, 10% FCS, 10^{-7} M dexamethasone, 100 μ M ascorbic acid-2-phosphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 10 mM β -glycerophosphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and the culture medium was changed once a week. After fixation with 10% formalin solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 10 min at RT, osteogenic differentiation was assessed by Alizarin Red S staining for calcium deposition.

To induce adipogenesis, cells were cultured with three cycles of adipogenic medium (for 72 h) and maintenance medium (24 h). The adipogenic medium consisted of LG-DMEM, 10% FCS, 10^{-6} M dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0.2 nM indomethacin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 10 μ g/mL recombinant human insulin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). The maintenance medium consisted of LG-DMEM, 10% FCS, and 10 μ g/mL recombinant human insulin. After these three cycles of culture, cells were incubated for seven days in maintenance medium and fixed as previously described. Evaluation of positive adipogenesis was done by Oil Red O staining to observe lipid droplets.

To induce chondrogenesis, cells were cultured with incomplete chondrogenic medium (ICM) for 14 days and changed twice a week. ICM is composed of high glucose-DMEM (HG-DMEM, 4.5 g/L) supplemented with 50 μ g/mL ascorbic acid-2-phosphate, 100 μ g/mL sodium pyruvate (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 40 μ g/mL proline (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1:100 dilution of insulin transferrin selenium (TermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), and 10^{-7} M dexamethasone. Two growth factors were added; 50 ng/mL of bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2, inductOs to Wyeth Europa Ltd., Maidenhead, UK) and 10 ng/mL of rhTGF- β 1 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). After the fixation of cells as previously described, chondrogenesis was evaluated using Alcian Blue staining to observe acidic polysaccharides such as glycosaminoglycans.

In parallel of each differentiation assay, an equal number of cells were maintained in the MSC expansion medium as a control.

4.5. Chondrogenic Differentiation in 3D Scaffolds

The scaffold was manufactured by Symatèse Biomatériaux (Chaponost, France). These collagen sponges are 2 mm in thickness, 5 mm in diameter, with a 100 μ m pore size. They are composed of native type I (90 to 95%) and type III (5 to 10%) collagens from calf skin. Collagens are crosslinked with glutaraldehyde to increase their stability. They are sterilized with β -radiation.

eUCB-MSCs were subcultured as monolayers until passage three, trypsinized, and suspended in ICM. Cells were seeded onto the sponges (5×10^5 cells/sponges) in a 96-well culture plates which were then incubated at 37 °C under 5% CO₂. After 1 h, sponges were transferred to 24-well plates with ICM in the presence or absence of 50 ng/mL rhBMP-2 and 10 ng/mL rhTGF- β 1 or 10 ng/mL rhTGF- β 3 (Bio-Techne, Minneapolis, Minn, USA) \pm 50 ng/mL rhBMP-2. Culture times were seven, 14, 14, 21, 28, or 42 days at 37 °C under 5% CO₂ in normoxia (21% O₂) or in hypoxia (<3% O₂), and the medium was changed twice a week. Sponges were harvested for RNA and proteins were analyzed at each time point and for each culture medium condition. eUCB-MSCs monolayers cultured with expansion medium were used as a control (day zero, D0).

4.6. Gene Silencing Experiments

After three passages, eUCB-MSCs were harvested by trypsinization and seeded onto collagen sponges as previously described. Seeded sponges were cultured with ICM in the presence of 50 ng/mL rhBMP-2 and 10 ng/mL rhTGF- β 1 for 28 or 42 days under 5% CO₂ in normoxia. The medium was changed twice a week. At day 14, 17, 21, 24, and 35, eUCB-MSCs were transfected with a mix of INTERFERin™ (Polyplus Transfection SA, Illkirch-Graffenstaden, France), OptiMEM (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and small interfering RNA (siRNA) at 200 nM according to the manufacturer's instructions. siRNAs specifically targeted the *Col1a2* mRNA (sequence of siRNA n°1:

5'-GAUGGCUGCUCUAGAAAGA-3', sequence of siRNA n°2: 5'-GCCAAGAACUGGUACAGAA-3', Eurogentec, Liège, Belgium) or a negative control (5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3', Eurogentec, Liège, Belgium). Sponges were harvested for mRNA and proteins were analyzed after 28 or 42 days of culture. eUCB-MSCs monolayers cultured with expansion medium were used as a control (day zero, D0).

4.7. RNA Isolation and RT-qPCR

After culture, the total RNA of cells seeded in flasks for senescence analysis and of sponges seeded with cells were extracted using Trizol Reagent according to the manufacturer's instructions. One microgram of total RNA was reverse transcribed into cDNA using reverse transcriptase (MMLV, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and oligodT (Eurogentec, Liège, Belgium). Quantitative PCR was performed on a StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using Power SYBR Green PCR (Applied Biosystems). Sequences of the primers and probe used are listed in Table 2. Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method expressed as the mean of triplicate samples. Each sample was normalized to β -Actin and each group was normalized to the expression of undifferentiated eUCB-MSCs at passage one cultured without FGF-2 for the senescence analysis or to the expression levels of undifferentiated eUCB-MSCs at passage four for the induction of chondrogenesis in the 3D scaffold and to the expression levels of eUCB-MSCs cultured in sponges with ICM for 28 or 42 days for experiments of gene silencing.

Table 2. Primers used for RT-qPCR.

Genes	Primer Sequence (5'-3')
β -Actin	Foward: AGGCACCAGGGCGTGAT Reverse: CTCTTGCTCTGGGCCTCGT
Col2a1	Foward: GGCAATAGCAGGTTACGTACA Reverse: CGATAACAGTCTTGCCCCACTT
Col1a1	Foward: TGCCGTGACCTCAAGATGTG Reverse: CGTCTCCATGTTGCAGAAGA
Col9a1	Foward: CCAAGAGGCCCAATCGACAT Reverse: GGGGAAGTCCGTTATCCTGG
HtrA1	Foward: GGACTTCATGTTTCCCTCAA Reverse: GTTCTGCTGAACAAGCAACA
Acan	Foward: TGTCACAACAATGCCCAAGAC Reverse: CTTCTCCGCCCAAAGGTCC
Snorc	Foward: TTTACCAGCTCAGTCCTCGG Reverse: CAGACAGAGAGCCATCCTGG
Col10a1	Foward: GCACCCCAGTAATGTACACCTATG Reverse: GAGCCACACCTGGTCATTTTC
Osteocalcin (<i>Ostc</i> or <i>BGLAP</i> gene)	Foward: AGAGTCTGGCAGAGGTGCAG Reverse: TCGTCACAGTCTGGGTTGAG
Mmp3	Foward: GAGGAAATGAGGAACAAGCGG Reverse : GAGGAAACCCAGAGTGTGGA
Mmp1	Foward: CGAAGGGAACCCTCGGTGGGA Reverse: TGGCCTGGTCCACATCTGCTC
Mmp13	Foward: TGAAGACCCGAACCCTAAACAT Reverse: GAAGACTGGTGTGGCATCAAG
Col11a1	Foward: TTGCTGATGGGAAGTGGCAT Reverse: GCTGCTTTGGGGTCACCTAT

Table 2. Cont.

Genes	Primer Sequence (5'-3')
<i>Runx2</i>	Foward: GCAGTTCCTCAAGCATTTCAT Reverse : CACTCTGGCTTTGGGAAGAG
<i>Col1a2</i>	Foward: CCAGAGTGGAGCAGCGGTTA Reverse: GGGATGTTTTTCAGGTTGAGCC
<i>p53</i>	Foward: CACCTGAGGTTGGCTCTGAC Reverse: GCACAAACACGCACCTCAAA
<i>p21</i>	Foward: CTTGAAGTGGGCACAGCCTA Reverse: AAGTGCAGAGGAAGCCAACA
<i>Ki67</i>	Foward: AAGCTGCACGTTTCATGGAGA Reverse: ACCCACAGTTCCTCCTCCGA
<i>Pcna</i>	Foward: GCGTGAACCTCACCAGTATGT Reverse: GCAAATTCGCCAGAAGGCAT
<i>Oct4</i>	Foward: AGTGAGAGGCAACCTGGAGA Reverse: ATACCGGTCCCCCTGAGAAA
<i>Fgf1</i>	Foward: TTGTACGGCTCACAGACACC Reverse: TTAGTCAGAGGAGACGGGCA
<i>Fgf2</i>	Foward: CAAACTACAACCTTCAAGCAGAAGAGAGA Reverse: CCAGTAACCTTCCATCTTCCTTCAT

4.8. Western Blots

After culture, seeded sponges and cells cultured in monolayers as controls were rinsed with PBS, crushed, and total proteins were extracted using the RIPA-lysis buffer with a protease inhibitor cocktail. The protein concentration was assessed according to the Bradford colorimetric procedure (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Then, 10 µg of total proteins were separated in 8% polyacrylamide gels containing 0.1% SDS and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, Millipore, Billerica, MA, USA). Unspecific binding sites of the membrane were blocked with 10% non-fat milk powder in Tris-buffered saline with 0.1% Tween (TBST) for 1 h. Then, membranes were incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-human type I collagen (Novotec, Bron, France), rabbit anti-human type II collagen (Novotec, Bron, France), rabbit anti-human type II B collagen (Covalab, Villeurbanne, France), rabbit anti-human type X collagen (Abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-human HtrA1 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA), or rabbit anti-human β-Tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Concerning the anti-human type IIB collagen, its generation was made by Covalab using exactly the same strategy as the one used by Aubert-Foucher et al. [61,62]. This antibody detects the pro α1(II)B and pN α1(II)B isoforms of type II collagen, according to the epitope targeted. The following day, membranes were washed three times, followed by incubation with HRP (HorseRadish Peroxidase)-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA). Signals were visualized with the chemiluminescence method (Western Lightning® Plus-ECL, PerkinElmer, Waltham, Mass, USA) and developed on X-ray film (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA).

4.9. Statistical Analysis

All experiments were repeated at least three or four times with cells from different foals. Values are reported as box plots, floating bars with median or means ± SD. Statistical analyses were performed using the paired or multiple *t*-test for proliferation capacity and senescence analysis. Statistically significant differences between time points with the same culture medium were determined using the Friedman test. Statistically significant differences between the culture medium at the same time point were determined using the two-tailed Mann–Whitney test or Kruskal–Wallis test if more than

two culture media were compared. Comparison of the differences between normoxia and hypoxia was performed using the two-tailed Mann–Whitney test. For gene silencing experiments, statistical analyses were performed using the Student's *t*-test. All statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). A *p*-value of ≤ 0.05 was considered to be significant.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at www.mdpi.com/xxx/s1.

Acknowledgments: We thank Ecuries Lebourgeois, the veterinary clinics CAP'VET (Saint-Julien sur Sarthe, France) and Méheudin (Méheudin, Ecouché, France) for collecting equine umbilical cord blood. We are grateful to Marylin Guillamin for her help with flow cytometry analyses and to Marie-Christine Enos for her administrative and technical support. This research was funded by the French National Research Agency (ANR) and by the Regional Council of Basse-Normandie through the ANR TecSan PROMOCART program to Philippe Galéra (917RB020 and 917RB072 respectively), by the French Ministry of Research and Technology to Philippe Galéra, by two ERDF (European Regional Development Funds) grants to Philippe Galéra and Magali Demoor (HIPPOCART 1 no. 2897/33535, 917RB148; HIPPOCART 917CB174), by a Regional Council of Basse-Normandie program to Philippe Galéra and Magali Demoor (HIPPOCART N° 2013-AGRI-236/13P07492, 917CB166), by Fonds Eperon to Philippe Galéra and Magali Demoor (EQUISTEM, N80-2014, 917CB194), by ERDF and Regional Council of Basse-Normandie grant to Philippe Galéra and Magali Demoor in the CPER Centaure program (2015–2020, Centaure Biotechnologies 2015 N° 917CB213 and Centaure PREACH 2016-17). Mélanie Desancé was recipient of a PhD fellowship from the Regional Council of Basse-Normandie. Thomas Branly and Tangni Gomez-Leduc were supported by a PhD scholarship from the French Ministry of Research and Technology, and Romain Contentin by a PhD scholarship co-financed by the Fonds Eperon and the Regional Council of Basse-Normandie.

Author Contributions: Mélanie Desancé was involved in study design, in data collection/assembly and analysis, performed experiments, and wrote the manuscript. Romain Contentin, Thomas Branly, Tangni Gomez-Leduc, Lélia Bertoni, and Sandrine Jacquet performed experiments, collected and analyzed the data. Florence Legendre, Agnès Batho, and Jean-Marc Betsch designed and supervised the experiments, provided materials and analysis tools. Thomas Branly, Lélia Bertoni, Romain Contentin, Mélanie Desancé, Sandrine Jacquet, Jean-Marc Betsch, and Fabrice Audigié were involved in collecting eUCB-MSCs. Fabrice Audigié, Magali Demoor, and Philippe Galéra were involved in study conception and design, in the supervision of the study, in data analysis and interpretation, in writing the manuscript, and in providing financial support. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. McIlwraith, C.W.; Frisbie, D.D.; Kawcak, C.E. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Jt. Res.* **2012**, *1*, 297–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Hardingham, T.E. Fell-Muir lecture: Cartilage 2010—The known unknowns. *Int. J. Exp. Pathol.* **2010**, *91*, 203–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Aigner, T.; Stöve, J. Collagens—Major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 1569–1593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Perkins, N.; Reid, S.; Morris, R. Profiling the New Zealand Thoroughbred racing industry. 2. Conditions interfering with training and racing. *N. Z. Vet. J.* **2005**, *53*, 59–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Aigner, T.; Cook, J.; Gerwin, N.; Glasson, S.; Laverty, S.; Little, C.; McIlwraith, W.; Kraus, V. Histopathology atlas of animal model systems—Overview of guiding principles. *Osteoarthr. Cartil.* **2010**, *18*, S2–S6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. McIlwraith, C.W.; Fortier, L.A.; Frisbie, D.D.; Nixon, A.J. Equine models of articular cartilage repair. *Cartilage* **2011**, *2*, 317–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Brittberg, M.; Lindahl, A.; Nilsson, A.; Ohlsson, C.; Isaksson, O.; Peterson, L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* **1994**, *331*, 889–895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Nixon, A.J.; Begum, L.; Mohammed, H.O.; Huibregtse, B.; O'callaghan, M.M.; Matthews, G.L. Autologous chondrocyte implantation drives early chondrogenesis and organized repair in extensive full- and partial-thickness cartilage defects in an equine model. *J. Orthop. Res.* **2011**, *29*, 1121–1130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. 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. [[CrossRef](#)]

10. Friedenstein, A.J.; Gorskaja, J.F.; Kulagina, N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* **1976**, *4*, 267–274. [[PubMed](#)]
11. Kobolak, J.; Dinnyes, A.; Memic, A.; Khademhosseini, A.; Mobasheri, A. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro engineering of their niche. *Methods* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zhou, C.; Yang, B.; Tian, Y.; Jiao, H.; Zheng, W.; Wang, J.; Guan, F. Immunomodulatory effect of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on lymphocytes. *Cell. Immunol.* **2011**, *272*, 33–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Murata, D.; Miyakoshi, D.; Hatazoe, T.; Miura, N.; Tokunaga, S.; Fujiki, M.; Nakayama, K.; Misumi, K. Multipotency of equine mesenchymal stem cells derived from synovial fluid. *Vet. J.* **2014**, *202*, 53–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ortved, K.F.; Nixon, A.J. Cell-based cartilage repair strategies in the horse. *Vet. J.* **2016**, *208*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Tessier, L.; Bienzle, D.; Williams, L.B.; Koch, T.G. Phenotypic and Immunomodulatory Properties of Equine Cord Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0122954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. De Schauwer, C.; Goossens, K.; Piepers, S.; Hoogewijs, M.K.; Govaere, J.L.J.; Smits, K.; Meyer, E.; Van Soom, A.; Van de Walle, G.R. Characterization and profiling of immunomodulatory genes of equine mesenchymal stromal cells from non-invasive sources. *Stem Cell Res. Ther.* **2014**, *5*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Stenderup, K.; Justesen, J.; Clausen, C.; Kassem, M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* **2003**, *33*, 919–926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Kern, S.; Eichler, H.; Stoeve, J.; Klüter, H.; Bieback, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* **2006**, *24*, 1294–1301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Jin, H.J.; Bae, Y.K.; Kim, M.; Kwon, S.-J.; Jeon, H.B.; Choi, S.J.; Kim, S.W.; Yang, Y.S.; Oh, W.; Chang, J.W. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 17986–18001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Perrier, E.; Ronzière, M.-C.; Bareille, R.; Pinzano, A.; Mallein-Gerin, F.; Freyria, A.-M. Analysis of collagen expression during chondrogenic induction of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biotechnol. Lett.* **2011**, *33*, 2091–2101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Handorf, A.M.; Li, W.-J. Fibroblast growth factor-2 primes human mesenchymal stem cells for enhanced chondrogenesis. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Chen, X.; Zhang, F.; He, X.; Xu, Y.; Yang, Z.; Chen, L.; Zhou, S.; Yang, Y.; Zhou, Z.; Sheng, W. Chondrogenic differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in type I collagen-hydrogel for cartilage engineering. *Injury* **2013**, *44*, 540–549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Mauck, R.L.; Yuan, X.; Tuan, R.S. Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture. *Osteoarthr. Cartil.* **2006**, *14*, 179–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Freyria, A.-M.; Mallein-Gerin, F. Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: The indisputable role of growth factors. *Injury* **2012**, *43*, 259–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kisiday, J.D.; Kopesky, P.W.; Evans, C.H.; Grodzinsky, A.J.; McIlwraith, C.W.; Frisbie, D.D. Evaluation of adult equine bone marrow- and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. *J. Orthop. Res.* **2008**, *26*, 322–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Indrawattana, N.; Chen, G.; Tadokoro, M.; Shann, L.H.; Ohgushi, H.; Tateishi, T.; Tanaka, J.; Bunyaratvej, A. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *320*, 914–919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Ronzière, M.C.; Perrier, E.; Mallein-Gerin, F.; Freyria, A.-M. Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells. *Biomed. Mater. Eng.* **2010**, *20*, 145–158. [[PubMed](#)]
29. Murphy, M.K.; Huey, D.J.; Hu, J.C.; Athanasiou, K.A. TGF- β 1, GDF-5, and BMP-2 stimulation induces chondrogenesis in expanded human articular chondrocytes and marrow-derived stromal cells. *Stem Cells* **2014**, *33*, 762–773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Gomez-Leduc, T.; Hervieu, M.; Legendre, F.; Bouyoucef, M.; Gruchy, N.; Poulain, L.; de Vienne, C.; Herlicoviez, M.; Demoor, M.; Galera, P. Chondrogenic commitment of human umbilical cord-blood derived

- mesenchymal stem cells in collagen matrices for cartilage engineering. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 32786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Kafienah, W.; Mistry, S.; Dickinson, S.C.; Sims, T.J.; Learmonth, I.; Hollander, A.P. Three-dimensional cartilage tissue engineering using adult stem cells from osteoarthritis patients. *Arthritis Rheumatol.* **2007**, *56*, 177–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 32. Gardner, O.F.W.; Archer, C.W.; Alini, M.; Stoddart, M.J. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering. *Histol. Histopathol.* **2013**, *28*, 23–42. [[PubMed](#)]
 33. Cooke, M.E.; Allon, A.A.; Cheng, T.; Kuo, A.C.; Kim, H.T.; Vail, T.P.; Marcucio, R.S.; Schneider, R.A.; Lotz, J.C.; Alliston, T. Structured three-dimensional co-culture of mesenchymal stem cells with chondrocytes promotes chondrogenic differentiation without hypertrophy. *Osteoarthr. Cartil.* **2011**, *19*, 1210–1218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 34. Kang, J.-G.; Park, S.-B.; Seo, M.-S.; Kim, H.-S.; Chae, J.-S.; Kang, K.-S. Characterization and clinical application of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *J. Vet. Sci.* **2013**, *14*, 367–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 35. McIlwraith, C.W.; Frisbie, D.D.; Rodkey, W.G.; Kisiday, J.D.; Werpy, N.M.; Kawcak, C.E.; Steadman, J.R. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg.* **2011**, *27*, 1552–1561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 36. Pigott, J.H.; Ishihara, A.; Wellman, M.L.; Russell, D.S.; Bertone, A.L. Investigation of the immune response to autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2013**, *156*, 99–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 37. Williams, L.B.; Koenig, J.B.; Black, B.; Gibson, T.W.G.; Sharif, S.; Koch, T.G. Equine allogeneic umbilical cord blood derived mesenchymal stromal cells reduce synovial fluid nucleated cell count and induce mild self-limiting inflammation when evaluated in an LPS induced synovitis model. *Equine Vet. J.* **2016**, *48*, 619–625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 38. Wilke, M.M.; Nydam, D.V.; Nixon, A.J. Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *J. Orthop. Res.* **2007**, *25*, 913–925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 39. Hillmann, A.; Ahrberg, A.B.; Brehm, W.; Heller, S.; Josten, C.; Paebst, F.; Burk, J. Comparative characterization of human and equine mesenchymal stromal cells: A basis for translational studies in the equine model. *Cell Transplant.* **2016**, *25*, 109–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 40. Koch, T.G.; Heerkens, T.; Thomsen, P.D.; Betts, D.H. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnol.* **2007**, *7*, 26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 41. Koch, T.G.; Thomsen, P.D.; Betts, D.H. Improved isolation protocol for equine cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* **2009**, *11*, 443–447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 42. Bieback, K.; Kern, S.; Klüter, H.; Eichler, H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* **2004**, *22*, 625–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 43. Zhang, X.; Hirai, M.; Cantero, S.; Ciubotariu, R.; Dobrila, L.; Hirsh, A.; Igura, K.; Satoh, H.; Yokomi, I.; Nishimura, T.; et al. 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.* **2011**, *112*, 1206–1218. [[PubMed](#)]
 44. Solchaga, L.A.; Penick, K.; Goldberg, V.M.; Caplan, A.I.; Welter, J.F. Fibroblast growth factor-2 enhances proliferation and delays loss of chondrogenic potential in human adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part A* **2010**, *16*, 1009–1019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 45. Wagner, W.; Horn, P.; Castoldi, M.; Diehlmann, A.; Bork, S.; Saffrich, R.; Benes, V.; Blake, J.; Pfister, S.; Eckstein, V.; et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: A continuous and organized process. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 46. 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.; Marshak, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **1999**, *284*, 143–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 47. Barberini, D.J.; Freitas, N.P.P.; Magnoni, M.S.; Maia, L.; Listoni, A.J.; Heckler, M.C.; Sudano, M.J.; Golim, M.A.; da Cruz Landim-Alvarenga, F.; Amorim, R.M. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: Immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Res. Ther.* **2014**, *5*, 25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

48. De Schauwer, C.; Piepers, S.; Van de Walle, G.R.; Demeyere, K.; Hoogewijs, M.K.; Govaere, J.L.J.; Braeckmans, K.; Van Soom, A.; Meyer, E. In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. *Cytom. Part A* **2012**, *81*, 312–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Vieira, N.M.; Brandalise, V.; Zucconi, E.; Secco, M.; Strauss, B.E.; Zatz, M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant.* **2010**, *19*, 279–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Braun, J.; Hack, A.; Weis-Klemm, M.; Conrad, S.; Treml, S.; Kohler, K.; Walliser, U.; Skutella, T.; Aicher, W.K. Evaluation of the osteogenic and chondrogenic differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* **2010**, *71*, 1228–1236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Hackett, C.H.; Flaminio, M.J.B.F.; Fortier, L.A. Analysis of CD14 Expression levels in putative mesenchymal progenitor cells isolated from equine bone marrow. *Stem Cells Dev.* **2011**, *20*, 721–735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Iacono, E.; Merlo, B.; Romagnoli, N.; Rossi, B.; Ricci, F.; Spadari, A. Equine bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: cytofluorimetric characterization, in vitro differentiation, and clinical application. *J. Equine Vet. Sci.* **2015**, *35*, 130–140. [[CrossRef](#)]
53. Kopesky, P.W.; Lee, H.Y.; Vanderploeg, E.J.; Kisiday, J.D.; Frisbie, D.D.; Plaas, A.H.K.; Ortiz, C.; Grodzinsky, A.J. Adult equine bone-marrow stromal cells produce a cartilage-like ECM mechanically superior to animal-matched adult chondrocytes. *Matrix Biol.* **2010**, *29*, 427–438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Co, C.; Vickaryous, M.K.; Koch, T.G. Membrane culture and reduced oxygen tension enhances cartilage matrix formation from equine cord blood mesenchymal stromal cells in vitro. *Osteoarthr. Cartil.* **2014**, *22*, 472–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Ranera, B.; Remacha, A.R.; Álvarez-Arguedas, S.; Castiella, T.; Vázquez, F.J.; Romero, A.; Zaragoza, P.; Martín-Burriel, I.; Rodellar, C. Expansion under hypoxic conditions enhances the chondrogenic potential of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Vet. J.* **2013**, *195*, 248–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Kisiday, J.D.; Goodrich, L.R.; McIlwraith, C.W.; Frisbie, D.D. Effects of equine bone marrow aspirate volume on isolation, proliferation, and differentiation potential of mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* **2013**, *74*, 801–807. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Duval, E.; Leclercq, S.; Elissalde, J.-M.; Demoor, M.; Galera, P.; Boumediene, K. Hypoxia-inducible factor 1 α inhibits the fibroblast-like markers type I and type III collagen during hypoxia-induced chondrocyte redifferentiation. *Arthritis Rheumatol.* **2009**, *60*, 3038–3048. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Galera, P.; Rédini, F.; Vivien, D.; Bonaventure, J.; Penfornis, H.; Loyau, G.; Pujol, J.-P. Effect of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) on matrix synthesis by monolayer cultures of rabbit articular chondrocytes during the dedifferentiation process. *Exp. Cell Res.* **1992**, *200*, 379–392. [[CrossRef](#)]
59. Yang, B.; Guo, H.; Zhang, Y.; Chen, L.; Ying, D.; Dong, S. MicroRNA-145 regulates chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells by targeting SOX9. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Legendre, F.; Ollitrault, D.; Hervieu, M.; Baugé, C.; Maneix, L.; Goux, D.; Chajra, H.; Mallein-Gerin, F.; Boumediene, K.; Galera, P.; et al. 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*, 550–557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Aubert-Foucher, E.; Mayer, N.; Padeloup, M.; Pagnon, A.; Hartmann, D.; Mallein-Gerin, F. A unique tool to selectively detect the chondrogenic IIB form of human type II procollagen protein. *Matrix Biol.* **2014**, *34*, 80–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Branly, T.; Contentin, R.; Desancé, M.; Jacquet, T.; Bertoni, L.; Jacquet, T.; Mallein-Gerin, F.; Denoix, J.-M.; Audigié, F.; Demoor, M.; et al. 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. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Chondrogenic differentiation of defined equine mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood for use in cartilage repair therapy.

Mélanie Desancé¹, Romain Contentin¹, Lélia Bertoni², Tangni Gomez-Leduc¹, Thomas Branly¹, Sandrine Jacquet², Jean-Marc Betsch³, Agnès Batho^{1,4}, Florence Legendre¹, Fabrice Audigié², Philippe Galéra^{1*†} & Magali Demoor^{1*}.

* Contributed equally

† Corresponding author: philippe.galera@unicaen.fr, magali.demoor@unicaen.fr

1. NORMANDIE UNIV, UNICAEN, BIOTARGEN, 14000 CAEN, FRANCE.

2. Center of Imaging and Research on Locomotor Affections in Equines, Ecole Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, 14430 Goustranville, France.

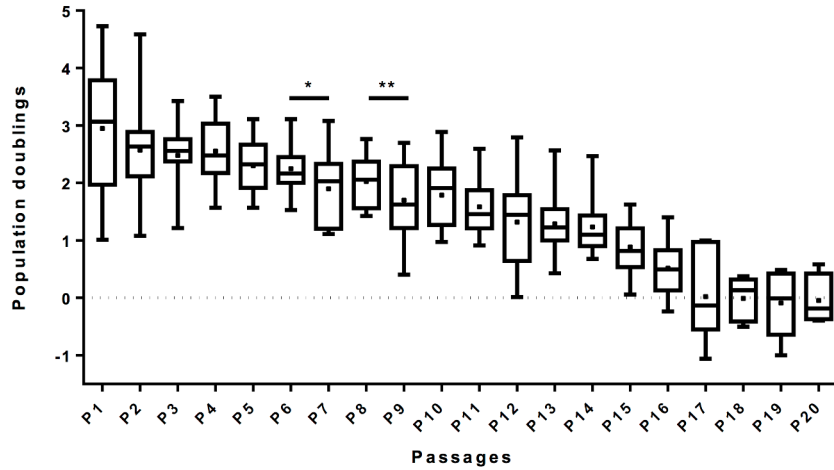
3. Clinique Vétérinaire Equine de Méheudin, Méheudin, 61150 Ecouché, France.

4. EFS Caen, 14000 Caen, France.

	P2	P3	P4	P5
Number of different samples	20	16	7	4
Total of cells (millions)	239.6	234.88	93.64	43.7

Table S1. Cryopreservation of mesenchymal stem cells. Equine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells banking at different passages.

A



B

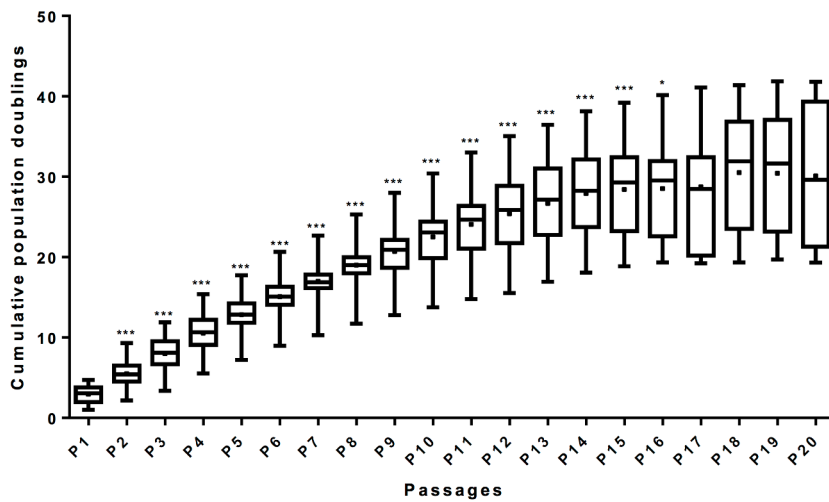


Figure S1. Analysis of proliferation capacity of equine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (eUCB-MSCs). (A) Mean value of population doublings and (B) mean value of cumulative population doublings. Population doublings were determined at each passage of the adherent eUCB-MSCs cultured in the absence of FGF-2. Graph represents mean \pm standard deviation (n=12 between P1 and P14, n=10 for P15, n=9 for P16, n=7 for P17, n=5 for P18 and P19, n=4 for P20). Statistically significant differences among eUCB-MSCs for two successive passages were determined using paired t test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

C. Conclusions de l'article #3

Lors de l'isolement et de la caractérisation des CSM de SCO, nous avons rencontré les mêmes contraintes que celles que nous avons eues lors de la caractérisation des CSM de MO. En effet, les CSM putatives n'exprimaient pas toutes le CD73, et, nous n'avons pu détecter le CD105 sur aucune des souches étudiées. Tout comme pour les CSM de MO, il semblerait judicieux de mieux caractériser les sous-populations de CSM et d'augmenter le panel de marqueurs de surface étudiés. Cependant, le manque d'outils disponibles pour l'étude de cellules équines demeure toujours un obstacle.

La stratégie de différenciation employée a permis la synthèse d'un substitut cartilagineux possédant une abondante MEC riche en collagène de type II, une diminution de l'expression d'HtrA1, mais aussi une forte expression du collagène de type I. Le siRNA *Col1a2* semble être effectif mais ne se révèle pas assez efficace pour contrecarrer l'expression du collagène de type I.

L'utilisation de CSM de SCO et MO pour produire un substitut cartilagineux paraît être pertinente puisque la MEC du substitut cartilagineux contient notamment une importante quantité de collagène de type II. Néanmoins, quel que soit le type cellulaire utilisé, la synthèse de collagène de type I persiste à des niveaux qui demeurent importants. Une étude comparative du potentiel de différenciation de ces deux types de CSM est nécessaire pour déterminer le type de CSM le plus approprié pour former un substitut cartilagineux d'une qualité optimale.

IV. Article #4

Comparison of the chondrogenic potential of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and umbilical cord blood intended for cartilage tissue engineering.

Romain Contentin, Magali Demoor, Miranda Concari, Mélanie Desancé, Fabrice Audigié, Thomas Branly & Philippe Galéra.

Soumis.

A. Objectifs de l'article #4

Bien qu'elles fussent initialement décrites dans la MO, les CSM sont présentes dans la plupart des tissus. Ces cellules sont localisées au sein de niches, et exposées à différents signaux microenvironnementaux leur permettant de maintenir leur état indifférencié. Cependant, le microenvironnement des CSM peut influencer sur la capacité des CSM à se différencier. De plus, même si les CSM sont multipotentes, elles se différencient plus aisément en cellules spécialisées de leur tissu d'origine. Finalement, leurs propriétés sont modulées avec l'âge des CSM. Ainsi, des CSM plus âgées ont une capacité de différenciation diminuée et une sénescence répliquative plus précoce.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons cherché à différencier des CSM de MO et de SCO en chondrocytes. Les CSM de MO sont localisées dans un microenvironnement proche de celui des cellules souches lors de la formation du cartilage, mais ont l'âge du donneur. Au contraire, les CSM de SCO sont jeunes, puisqu'elles sont isolées à partir du SCO, et ont donc des capacités d'autorenouvellement et de différenciation optimales. Lors de leur différenciation respective, nous avons remarqué que ces deux types de CSM pouvaient produire un cartilage de type hyalin, mais des molécules atypiques du cartilage persistaient. Nous n'avons pas observé d'avantages ou de limites évidents à l'utilisation d'une source de CSM plutôt que l'autre.

C'est pourquoi, lors de ces travaux, nous avons tenté de comparer et de déterminer quelle source de CSM serait la plus appropriée pour la synthèse d'un substitut cartilagineux. Nous avons utilisé comme stratégie de différenciation une culture de 28 jours en hypoxie ou normoxie, en 3D (éponges de collagène de types I/III) et en présence de BMP-2 et TGF- β 1. Nous avons déterminé cette stratégie à partir des travaux précédents. En effet, pour les deux sources de CSM, cette stratégie de différenciation semblait pratiquement optimale.

sources de CSM, cette stratégie de différenciation semblait pratiquement optimale. L'utilisation de siRNA n'était pas suffisamment efficace. Par ailleurs, comme la condition oxygène optimale pour les CSM de SCO n'était pas clairement établie, nous avons réalisé la différenciation chondrogénique en hypoxie et normoxie.

B. Article #4

Comparison of the chondrogenic potential of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and umbilical cord blood intended for cartilage tissue engineering

Romain Contentin¹, Magali Demoor¹, Miranda Concari¹, Mélanie Desancé¹, Fabrice Audigié², Thomas Branly¹ & Philippe Galéra^{1*}.

1. Normandie Univ, UNICAEN, BIOTARGEN, 14000 Caen, France. 2. Center of Imaging and Research on Locomotor Affections in Equines, Ecole Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est, 14430 Goustranville, France.

*Corresponding author: philippe.galera@unicaen.fr

Romain Contentin¹

E-mail: romaincontentin@hotmail.fr

Thomas Branly¹

E-mail: tbranly@gmail.com

Miranda Concari¹

E-mail: miranda.concari@yahoo.com

Mélanie Desancé¹

E-mail: melanie359@hotmail.fr

Fabrice Audigié²

E-mail: fabrice.audigie@vet-alfort.fr

Magali Demoor¹

E-mail: magali.demoor@unicaen.fr

Philippe Galéra¹

E-mail: philippe.galera@unicaen.fr

Abstract

Affecting horses and humans, osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease leading to cartilage degradation and concomitant pain. No treatment is available for humans or horses and OA is the first cause of decreased performance in sport horses. Cartilage tissue engineering and/or cell therapy offer new insights to cure this articular disorder. Mesenchymal stem cells (MSCs) represent an attractive solution for producing a hyaline cartilage substitute. However, the best source of MSCs still needs to be identified. This study compared the chondrogenic potential of MSCs derived from equine bone marrow (BM) and umbilical cord blood (UCB).

BM- and UCB-MSCs were characterized by assessing their proliferative capacity and tripotency as well as the presence of cluster of differentiation characteristics according to MSC standards. Then, we compared MSCs at their undifferentiated basal status and after chondrogenic-induced differentiation. Chondrogenesis was induced by culturing the cells in a type I/III collagen scaffold with chondrogenic factors BMP-2 and TGF- β 1 and, to determine the best oxygen condition, differentiation was performed either in hypoxia and normoxia. MSC chondrogenic potential was evaluated using the mRNA steady-state amounts and corresponding protein levels for several osteogenic (osteocalcin/Runx2), hypertrophic (type X collagen), fibrocartilage (type I collagen) and chondrogenic markers (type II collagen). Furthermore, the extracellular matrix (ECM) quality was analysed using immunohistochemistry (IHC).

MSC characterization demonstrated that BM- and UCB-MSCs have different proliferative capacities and tripotencies. At their undifferentiated basal status, BM- and UCB-MSCs also showed differences in their expression of osteogenic, chondrogenic and hypertrophic markers. Upon culture of the cells in a chondrogenic induction medium, both types of MSC showed increased chondrogenic marker expression and appeared to produce an ECM of better quality in hypoxia, although type I collagen remained expressed. UCB-MSCs produced higher amounts of type II collagen, and particularly in its IIB mature isoform, than BM-MSCs, but also type I collagen and Htra1, regardless of the oxygen condition. Finally, IHC experiments revealed that the ECM synthesized by BM-MSCs contains higher amounts of type IIB collagen.

Considering that type I collagen is the major undesirable component in the neo-synthesis of *in vitro* cartilage, we recommend using BM-MSCs for horse cartilage tissue engineering.

Keywords: Horse; mesenchymal stem cells; chondrocytes; bone marrow; umbilical cord blood; cartilage engineering; osteoarthritis; chondral defects; chondrogenesis; extracellular matrix.

Running head: Comparison of chondrogenic potential between equine UCB-MSCs and BM-MSCs.

Introduction

Osteoarthritis (OA) is a common joint disease characterized by the degradation of articular cartilage ((1) Brandt *et al.*, 2008). Cartilage has a poor intrinsic capacity for self-repair, which renders any degradation almost irreversible ((2) Mobasheri *et al.*, 2014). Studying the role and the physiology of articular cartilage can help understand the severity of OA and the pain it causes. Articular cartilage is avascular, non-innervated tissue that covers bone extremities to ensure joint mobility. When cartilage degradation occurs, the bone extremities come into direct contact with each other, causing great pain due to the innervation of bone tissue. OA is a multifactorial age-related disease. In light of the expected growth of the elderly population in the near future, finding a cure for OA is a significant goal and a therapeutic challenge ((3) Brooks *et al.*, 2006).

Current pharmacological treatments can attenuate OA-associated pain, inflammation or decelerate OA outcomes, but do not cure OA. Surgical options, with prosthetic joint replacement, is the definitive solution for the most severe OA cases, but does not provide a long-term solution because the prosthetic implants deteriorate over time. Discovered nearly 25 years ago, autologous chondrocyte implantation (ACI) appears to be a very promising solution to treat cartilage defects ((4) Brittberg *et al.*, 1994). Nevertheless, one step in the strategy involves chondrocyte expansion as a monolayer culture to induce chondrocyte dedifferentiation ((5) Benya *et al.*, 1978). Since the beginning of cartilage tissue engineering with the Brittberg procedure, cartilage-cell-based therapies have been developed ((6) Demoor *et al.*, 2014; (7) Dewan *et al.*, 2014). New ACI generations have emerged with the use of 3D cultures, chondrogenic growth factors, hypoxic microenvironments and also new cell types, such as mesenchymal stem cells (MSCs). MSCs have increased in their appeal for cartilage therapy because they have high proliferative potential and, above all, are able to differentiate into mesoderm-derived cell types, including chondrocytes ((8) Pittenger *et al.*, 1999). There are different types of MSCs according to their tissue source, either neonatal tissue or adult tissue. The MSC properties and differentiation abilities vary with their source ((9) Hass *et al.*, 2011). Today, bone marrow (BM) is the most common source of MSC used for cartilage repair, but has some limitations, namely the synthesis of a fibrocartilage subject to degradation ((10) McCarthy *et al.*, 2012), a differentiation ability that decreases with age ((11) Kanawa *et al.*, 2013) and a painful harvesting procedure (in humans). On the contrary, harvesting MSCs from umbilical cord blood (UCB) is painless and non-invasive. According

to the literature, UCB-MSCs seem to have several advantages over BM-MSCs, and thus, may be a better cell type for cartilage tissue engineering ((12)Kern *et al.*, 2006; (13)Lo *et al.*, 2013).

In this study we compared the chondrogenic differentiation abilities of equine BM-MSCs and equine UCB-MSCs. The equine model provides access to samples from young animals in a non-invasive manner. The chondrogenic differentiation protocol has already been developed and optimized for each MSC type ((14)Branly *et al.*, 2017; (15)Desancé *et al.*, 2018). Moreover, UCB-MSCs were chosen because they differentiated into chondrocytes and express an abundant, dense and a hyaline-like cartilage matrix. By contrast, we demonstrated that despite their expression of cartilage markers, umbilical cord matrix MSCs failed to express a relevant cartilage matrix after chondrogenic induction ((16)Rakic *et al.*, 2018). Our chondrogenic differentiation protocol employed hypoxic or normoxic 3D cultures, using type I/III collagen sponges as biomaterials, and chondrogenic factors (BMP-2, TGF- β 1) for 28 days.

Results

MSC characterization

To characterize BM- and UCB-MSCs, we performed immuno-phenotyping to assess their multilineage capacity and population doubling level (Figure 1). BM- and UCB-MSCs were able to differentiate into chondrocytes, osteoblasts and adipocytes, nevertheless they showed differences in their multilineage capacity (Figure 1A). Both types of MSC showed similar coloration after their differentiation into chondrocytes and osteoblasts. However, although adipogenic treatment led to a modification of UCB-MSCs morphology, these MSCs showed no Oil Red O staining. Both types of MSC had strong proliferative capacities: their respective cumulative population doubling levels increased from passage 1 (P1) to P15 (Figure 1B). The proliferation rate was high during the first eight passages and then slowed down. At each passage, the cumulative population doubling level of BM-MSCs tended to be higher than its UCB-MSCs counterpart. Finally, both BM- and UCB-MSCs possessed most MSC cluster of differentiation (CD) characteristics and neither expressed type II MHC or CD45 (Figure 1C). Surprisingly, our results indicate that both types of MSC were negative for CD105. CD73 was expressed in one MSC sub-population, but this sub-population was significantly larger in UCB-MSCs than in BM-MSCs.

Comparison of BM- and UCB-MSCs at their basal undifferentiated state

Because MSCs may exhibit differences involved in their chondrogenic abilities, we compared both types of MSC at their basal state. Interestingly, both types of MSC expressed chondrogenic markers, such as type II procollagen, *Acan*, *Sox9* at the mRNA (Figure 2A, B, C) and corresponding protein levels, but showed differences at the protein level (Figure 3A, C). Although there was inter-strain variability, BM-MSCs seemed to synthesize a higher amount of type II procollagen, but a lower amount of Sox9 (Figure 3A, C, E) than UCB-MSCs. The expression of type II procollagen in undifferentiated MSCs is characteristic as it is not synthesized in bone (Figure 3E). Moreover, there was a lack of expression of the mature type II collagen as only immature forms of this collagen isotype are significantly expressed by both types of MSC, procollagen and pC/pN alpha1(II) (Figure 3A, E). These data suggest a reduced or delayed type II procollagen processing. The mRNA level and protein amounts of type I collagen (undesirable for cartilage regeneration) was also significantly higher in BM-MSCs than in UCB-MSCs (Figure 2D, E; Figure 3A), an indicator of active synthesis, with

also a decreased or delayed procollagen processing. Thus, the mRNA *Col2a1:Coll* ratios tended to be higher in UCB-MSCs (Figure 2G, H) than in BM-MSCs. BM- and UCB-MSCs also differed in osteogenic and hypertrophic marker expression. The expression of *Coll10a1* and *Alpl* were higher in UCB-MSCs and the expression of *Bglap* and *Runx2* were lower than in BM-MSCs (Figure 2I, J, K, L). The same patterns were observed at the protein level regarding osteocalcin (*Bglap*) but not *Runx2*, which was expressed variably across strains (Figure 3D). The serine protease overexpressed in OA pathogenesis, *Htra1*, was expressed similarly in both MSC types at the mRNA level, but expression was higher in UCB-MSCs at the protein level (Figure 2F; Figure 3A). Finally, we also studied the proliferative markers *Ki67* and *Pcna* (Figure 2M, N; Figure 3B). We did not observe any differences at the mRNA level, however, *Pcna* seemed to show lower protein expression in UCB-MSCs, which correlates with the population doubling levels (Figure 1B).

Comparison of the chondrogenic potential of MSCs

To determine the best source of MSCs for cartilage tissue engineering, we analysed their chondrogenic differentiation in normoxia and hypoxia. We first studied the normoxic condition (Figures 4, 5) and assessed the levels of mRNAs and proteins typical and atypical of cartilage every week from the beginning to the end of the differentiation protocol. Typical hyaline cartilage-associated molecules were quickly upregulated upon chondrogenic treatment: we observed an increase in their mRNA levels (*Col2a1*, *Acan*, *Coll1a1*, *Prg4*, *Snorc*) and protein amounts (type II and IIB collagens) from D7 for both MSC types (Figure 4A, B, C). Nevertheless, the expression of these molecules was even higher at D28. Although we did not observe any significant differences in the mRNA levels between BM- and UCB-MSCs, UCB-MSCs expressed a higher amount of type II collagen protein from D7 to D28 (Figure 4A, B, C). The proliferation marker *Pcna* was still expressed at D7 in both MSC types, but then decreased until D28 in UCB-MSCs, whereas its expression was no longer observed after D14 in BM-MSCs (Figure 4C).

In both MSC types, the cartilage-atypical type I collagen increased from D7 to D21 – to a greater extent in UCB-MSCs at the protein level – but then decreased until D28 only for UCB-MSCs (Figure 5B). These observations correlate with *Col2a1:Coll* mRNA ratios which tended to be higher in BM-MSCs, although it significantly increased in both MSC types, compared with their respective D0 controls (Figure 5A). For BM- and UCB-MSCs, *Htra1* had the highest protein expression at D14 and then decreased (Figure 5B). However, the

protein expression of HtrA1 remained higher in UCB-MSCs from D0 to D28. Although the expression of *Mmp13* remained unchanged during chondrogenic differentiation from D0 in both MSC types, the mRNA expression of *Runx2* and *AlpI* increased for both MSC types as of D7 and, regarding *AlpI*, tended to be higher in BM-MSCs (Figure 5A). Additionally, type X collagen increased at the mRNA and protein levels from D14 to D28 in UCB-MSCs only (Figure 5A, B). The mRNA amounts of the osteogenic marker *Bglap* were similar in BM- and UCB-MSCs and remained unchanged compared with their D0 respective controls (Figure 5A).

In hypoxia, when chondrogenic differentiation was performed both MSC sources showed – as in normoxia – a rapid increase in *Col2a1*, *Acan*, *Coll1a1*, *Prg4*, *Snorc* and *Col9a1* (Figure 6A). Differences between BM- and UCB-MSCs were also observed: UCB-MSCs produced higher amounts of type II collagen and *Pcna* (Figure 6B) and, in contrast to normoxia, *Pcna* increased until D28.

Over all, regarding type I collagen in hypoxia, we observed patterns similar to those in normoxia. Type I collagen increased from D7 to D21, although to greater degree in UCB-MSCs, and thus the *Col2a1:Colla* and *Col2a1:Colla2* ratios tended to be higher in BM-MSCs, but only until D21 (Figure 7A, B). However, after D21, type I collagen protein amounts decreased only in UCB-MSCs (Figure 7B). *Htra1* also increased in its mRNA steady-state amounts in both MSC types and its protein expression was higher in UCB-MSCs, although it decreased from D14 to D28 (Figure 7A, B). Induction of *AlpI* mRNA tended to be higher in BM-MSCs, whereas the expression of *Runx2* was similar in BM- and UCB-MSCs (Figure 7A). Type X collagen was expressed at higher protein amounts at D14 in UCB-MSCs, decreasing thereafter (Figure 7B), whereas no effect was observed at the mRNA level (Figure 7A). In contrast, type X collagen was not observed at the protein level in BM-MSCs. The induction of *Bglap* mRNA was similar in BM- and UCB-MSCs and remained unchanged compared with their respective D0 controls (Figure 7A).

Previous data has demonstrated that the optimal chondrogenic differentiation lasts 28 days, for both MSC types (Figure 4 to Figure 7). Nevertheless, the two different oxygen conditions led to slight differences in the MSC phenotype. Therefore, we aimed to determine the best oxidic conditions for each MSC type to compare their chondrogenic differentiation when they were cultured in their respective optimal oxidic conditions.

Analysis of mRNA levels, typical or atypical of the chondrocyte phenotype, did not allow to determine which oxia condition was the best, because the analysed markers did not vary for either MSC type (Figures 8A and 9A). On the other hand, the analysis of protein expression showed differences (Figures 8B and 9B). Although the total amount of type II collagen seemed to be the same regardless of the oxia condition, the proportion of the different maturation forms varied (in a similar fashion) for both MSC types. We observed more pC and procollagen forms of type II collagen in hypoxia, whereas the pN form was more abundant in normoxia. Type IIB collagen followed a similar pattern, with pN forms disappearing in hypoxia in favour of pro forms (Figure 8B). These findings indicate that both types of MSC are actively producing type II collagen since the precursor isoforms are expressed at a high level. Similar to type II collagen, maturation of type I collagen varied with oxygen concentration. pN forms disappeared in hypoxia for both MSC sources (Figure 9B).

Finally, we performed IHC analyses to visualize the ECM. The collagen sponges were homogeneously filled with neo-synthesized ECM for both MSC types (Figure 10-13). However, especially for BM-MSCs, cells did not have a uniform distribution throughout the sponge, with a larger number of cells localised at the periphery.

Regardless of the MSC type or the oxygen condition, at D14 and D28, type I collagen was distributed along a gradient decreasing from the periphery to the inner areas of the neo-synthesized cartilaginous substitute (Figures 10 and 13). In the centre of the biological substitute, labelling was not observed in the vicinity of the nucleus of the cells, which may indicate a cessation of type I collagen synthesis in these cells. Type I collagen fibres of the biomaterial were also stained. For the BM-MSCs, staining intensity increased from D14 to D28, unlike the neo-synthesized cartilaginous substitute obtained with UCB-MSCs, which appeared to have the same staining intensity over time.

Just like type I collagen, type IIB collagen was distributed according to a gradient which steepened at D28 for both types and to a greater extent for UCB-MSCs (Figures 11 and 13). The staining appeared to increase in hypoxia only for BM-MSC, particularly at the periphery of the neocartilage substitute. Regardless of the oxygen condition and in contrast to type I collagen, a strong staining signal was observed near the nucleus for both MSC types, but this staining was stronger for UCB-MSCs. For BM-MSCs, this observation was not as intense at D28.

Aggrecan is also distributed according to a gradient (Figures 12 and 13). At D14, a stronger staining is observed in close vicinity of the cells, whatever the MSC source or the oxia

condition. Furthermore, the staining seems to be accentuated from D14 to D28 for BM-
MSCs, whereas the staining remains unchanged for UCB-MSCs, whatever the oxic condition.

Discussion

MSCs are multipotent stem cells that can differentiate into mesodermal cells. These cells thus offer new perspectives for cartilage cell and/or tissue engineering. Nevertheless, the differentiation capacities of MSCs are correlated with their age and tissue source. Previous studies have demonstrated the usefulness of BM-MSCs and UCB-MSCs for producing hyaline-like cartilage ((14)Branly *et al.*, 2017; (15)Desancé *et al.*, 2018). In this study, we compared BM- and UCB-MSCs to determine the best source of MSCs for generating neo-cartilage *in vitro*. Because equine BM-MSCs can be isolated from young horses, we used the equine model to avoid potential differentiation differences between BM- and UCB-MSCs due to their age. In addition, using equine cells helps meet the challenge to develop effective therapies to treat horse chondral lesions; furthermore, the studies performed in the horse are transferable to humans.

Following isolation, we characterized putative MSCs according to international CD criteria (Dominici *et al.*, 2006). The isolated cells, regardless of their source, showed typical MSC features. Nevertheless, BM-MSCs seemed to grow more slowly, in terms of the population doubling level and the PcnA protein amounts. The higher proliferative capacity of BM-MSCs is in favour of their use for cartilage tissue engineering, primarily because a large number of cells is required. Similarly, BM- and UCB-MSCs displayed different differentiation potentials: adipogenic treatments were not able to induce the formation of lipid droplets in UCB-MSCs. Several studies have demonstrated that MSCs should be considered as the sum of sub-populations sharing common features and there may be some variation, particularly in the expression of their CDs ((18)Pérez-Silos *et al.*, 2016; (19)McLeod & Mauck, 2017). Differences in CD expression can be associated with different differentiation capacities ((20)Li *et al.*, 2016). The study of CDs revealed a higher proportion of CD73+ cells in UCB-MSCs, which may suggest a different distribution of the sub-populations between BM- and UCB-MSCs. The higher proportion of CD73+ cells seems to suggest that UCB-MSCs have a strong potential to mimic native cartilage ECM ((21)Arufe *et al.*, 2010). In contrast to expected results and to international criteria used to characterize MSCs, our cells were CD105-negative. Previous immuno-phenotyping analyses performed on equine MSCs corroborate our results ((22)de Schauwer *et al.* 2012). The absence of CD105 can be attributed to the use of trypsin to detach the cells during the procedure. Trypsin can damage some cell surface proteins, thus hampering their detection by flow cytometry, whereas other proteins are unaffected ((23)Hackett *et al.*, 2011). This assumption is supported by the study of Braun *et al.* that showed a positive CD105 signal in equine MSCs derived from adipose tissue, using accutase instead of trypsin/EDTA ((24)Braun *et al.*, 2010).

At their basal undifferentiated state, UCB-MSCs synthesized a lower amount of all the immature forms of collagens studied, but a higher amount of Sox9, which may suggest a higher chondrogenic potential, especially because the mRNA *Col2a1:Col1* ratio tended to be higher, too.

Based on our previous studies ((25)Branly *et al.*, 2018; (15)Desancé *et al.*, 2018), we used normoxic and hypoxic 3D cultures in the presence of chondrogenic factors (BMP-2, TGF- β 1) to induce the chondrogenesis of MSCs. In normoxia and hypoxia, UCB-MSCs synthesized higher levels of type II and IIB collagens than BM-MSCs, but also type X and I collagens. Thus, UCB-MSCs showed a stronger response to the differentiation protocol, because their collagen protein amounts were lower at Do. However, in UCB-MSCs, regardless of the oxygen level, the amounts of type I collagen protein decreased after 21 days. Furthermore, the hypoxic condition led to a decrease in type X collagen and HtrA1 after 14 days, but still remained higher than in BM-MSCs. Nonetheless, in both types of MSCs, type II and IIB collagen increased until D28. If we consider cell differentiation as a dynamic and ever-evolving process, the decrease in molecules atypical of hyaline cartilage indicates that a switch in cell behaviour occurred. Thus, the UCB-MSCs phenotype had not stabilized by the end of our chondrogenic differentiation protocol, and seemed to still be in chondrogenic differentiation, owing to the continuing expression of undesirable, atypical cartilage molecules and PcnA. Furthermore, chondrocytes from hyaline articular cartilage are not proliferative when skeletal maturity is reached ((26)Archer & Francis-West, 2003). Another indication that the chondrocyte phenotype had not yet stabilized in UCB-MSCs is the stronger presence of type II collagen near their nuclei, revealing strong anabolic activity even after 28 days; stabilized hyaline articular chondrocytes should have low anabolic activity. Alternatively, the decrease in the expression of atypical hyaline cartilage molecules may be due to the selection of specific sub-populations. This difference between BM- and UCB-MSCs can be linked to the potential different sub-populations found in each MSC source, as attested by CD73 expression.

Beyond the phenotype of differentiated cells, the quality of the neo-cartilage ECM produced is crucial. The ECM must be abundant to fill a cartilage defect *in situ*. For both MSC types, the newly synthesized ECM was homogeneously distributed throughout the construct. UCB-MSCs produced significantly higher amounts of ECM. The fact that type I collagen staining was not stronger at D28 for BM-MSCs correlates with the results of western blots (Figures 5B and 7B). Nevertheless, when considering type IIB collagen, the neosynthesized cartilaginous substitute with UCB-MSCs showed a sharper gradient than BM-MSCs at D28. This difference in the organization of the ECM may be due to the different state of cell differentiation from the periphery to the center that could lead to weaker mechanical properties. Furthermore, the

ECM produced in UCB-MSCs also contained atypical molecules that BM-MSCs had not synthesized, such as type X collagen and HtrA1. These latter results are the major reason for the choice of BM-MSCs as a better cell type for cartilage tissue engineering. UCB-MSCs may likely be a good candidate, but they need to undergo a complete chondrogenic differentiation programme with an optimised protocol to decrease the synthesis of molecules atypical to hyaline cartilage. Furthermore, although the neo-synthesized cartilaginous substitute is composed of a uniform ECM, the IHC study revealed that various important proteins had a gradient distribution from the periphery to the centre of the neo-cartilage. Applying the chondrogenic differentiation protocol in standardized and dynamic cultures grown in perfusion bioreactors may help avoid the heterogenous distribution of nutrients and oxygen, as demonstrated by Mayer *et al.* ((27)Mayer *et al.*, 2016).

Various studies have compared the chondrogenic potential of MSCs in various species. Nevertheless, the differentiation efficiency of a cell type can be modulated by the differentiation protocol, which can be optimal for one MSC source but not for another, and the assessment itself may also influence how differentiation is gauged. Thus, a study comparing the mechanical properties of equine BM- and UCB-MSCs determined that UCB-MSCs were the best cell type for cartilage tissue engineering ((28)White *et al.*, 2018). The study of mechanical properties of neo-synthesized cartilage is a useful strategy for assessing the quality of neo-cartilage, because the major function of hyaline cartilage is to absorb shocks. Nevertheless, mechanical studies should not be restricted to compressive forces because cartilage undergoes other types of forces, such as frictional forces, and additionally, this tissue must be constituted of a suitable matrix for nutrient diffusion. Moreover, cartilage features depend on matrix composition, distribution and arrangement. Therefore, biomechanical and histological approaches should be combined to assess neo-cartilage quality.

Finally, the cartilage matrix is the result of the mRNA and protein synthesis in the resident cell type of the tissue, the chondrocytes. In cartilage tissue engineering, particularly when using MSCs, ECM composition is the cumulation of mRNA and protein synthesis processes that occur in the cells, which go through various differentiation stages and thus adapt their mRNA and protein levels throughout differentiation.

Ultimately, at this point of our study and according to our protocol, BM-MSCs appear to be the most attractive cell type for producing a hyaline-like cartilage *in vitro*. Nevertheless, we have to be careful about a possible use *in vivo*. Indeed, the atypical type I collagen synthesis throughout the differentiation protocol remained but could be prevented by culturing MSCs

in perfusion bioreactors in dynamic conditions that may help to produce a neo-cartilage substitute *in vitro* with higher hyaline quality and superior function.

Material and methods

Cell isolation and culture

UCB and BM were collected, MSC were isolated and characterized as previously described ((14)Branly *et al.*, 2017; (15)Desancé *et al.*, 2018). Briefly, equine UCB was collected by venipuncture of the umbilical veins and equine BM was collected from sternal puncture in a cohort of horses with ages ranging from 2 to 4 years. Then, MSC were isolated by density gradient centrifugation with Ficoll-Paque PREMIUM (GE healthcare Bio-sciences; Chicago, ILL, USA) followed with a seed of the interphase in a plastic flask filled with an isolation medium (low glucose-Dulbecco's modified Eagle Medium (LG-DMEM; Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) containing 30% fetal calf serum (FCS, Invitrogen Life Technologies; Carlsbad, CA, USA), 10^{-7} M dexamethasone (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, USA)) to select cells which were able to adhere and form colonies, the MSC. After the appearance of several colonies, cells were detached using trypsin/EDTA (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) and then reseeded at 5000 cells/cm² (passage one, P1). Cell expansion was performed in LG-DMEM medium containing 20% FCS. The culture medium was changed three times per week and cells were passaged at 80% confluency. A cocktail of antimicrobials composed of 100 IU/ml of penicillin, 100 µg/ml of erythromycin, and 0.25 mg/ml of fungizone was added to all the media used in this study. The absence of bacterial or viral contamination in isolated MSC was carried out by an external laboratory according to their internal protocols (Labéo Frank Duncombe, Saint Contest, France). Characterization of MSC was carried out by assessing their proliferative capacities, differentiation in adipocytes, chondrocytes and osteoblasts and the presence of cluster of differentiation (CD) characteristics of MSC.

Equine articular chondrocytes (eAC) were prepared from healthy metacarpal joints. Cartilage samples were cut into small slices, then chondrocytes were isolated by sequential digestion for 45 min at 37°C with 2 mg/ml of type XIV protease (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, USA) and then overnight at 37°C with 1 mg/ml of type I collagenase (from *Clostridium histolyticum*; Invitrogen; Carlsbad, CA, USA). The cell suspension was filtered through a 70 µm mesh nylon membrane and centrifuged at 200 g for 10 min. The pelleted cells were re-suspended in Trizol (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) and RNA extraction was carried out according to the manufacturer's protocol. For western-blot experiments, small cartilage slices were ground in liquid nitrogen and protein extraction was performed with RIPA buffer. eAC

extracts were used in real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) and western-blot as positive controls.

MSC characterization

Population doubling level

To determine the population-doubling level, MSC were seeded at a concentration of 5 000 cells/cm² and trypsinized once a week in order to count them. The population-doubling level was calculated for each passage (from P1 to P15) according to the following equation: population doublings = $[\log_{10}(\text{NH}) - \log_{10}(\text{NI})]/\log_{10}(2)$, where NI is the number of seeded cells and NH the number of harvested cells.

Immunophenotyping

MSC (from P3 to P4) were harvested, washed, and resuspended in PBS at a density of 10⁶ cells/ml. Cell suspensions were incubated with monoclonal antibodies for 25 min at 4 °C in a dark room. The following mouse monoclonal anti-human antibodies were used : CD29-Allophycocyanin (APC) (BioLegend; San Diego, CA, USA), CD44-Phycoerythrin (PE) (IOtest; Brea, CA, USA), CD45-Pacific Blue (PB) (AbD Serotec; Kidlington, UK), CD73-APC (Abcam; Cambridge, UK), CD90-Fluorescein isothiocyanate (FITC) (InvestCare; London, UK), CD105-FITC (Abcam; Cambridge, UK) and type II MHC-RPE (AbD Serotec; Kidlington, UK). The respective mouse isotype antibodies served as controls. These monoclonal antibodies cross with the horse cells, and specificity was verified by passing a blood sample in the cytometer, after isolation of MSC. Subsequently, the cells were washed and resuspended in 500 µl of PBS. Data acquisition was performed in a Beckman Coulter Gallios flow cytometer (Beckman Coulter; Brea, CA, USA) (Federative Research Structure ICORE platform, University of Caen Normandy, France) and analyzed with FlowJo Software (TreeStar; Ashland, OR, USA).

Multilineage capacity

The capacity of equine BM-MSCs to differentiate in osteogenic and adipogenic lineages was determined at P4. For this purpose, cells were seeded in 6-well plates. All the reagents used in the osteogenic and adipogenic differentiation experiments were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Osteogenic differentiation was initiated when cells reached

50% of confluence in LG-DMEM supplemented with 10% FCS, 10^{-7} M dexamethasone, 100 μ M ascorbic acid-2-phosphate, and 10 mM β -glycerophosphate. The culture medium was changed once a week and the cells were incubated for 3 weeks. Osteogenic differentiation was assessed by Alizarin red S staining. Briefly, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature, washed once with PBS (pH 4.1) and stained for 20 min with Alizarin red S at room temperature.

Adipogenic differentiation was induced when cells reached 80% of confluence. Induction was obtained by using induction medium, which consisted of LG-DMEM supplemented with 10% FCS, 10 μ M dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine, 0.2 mM indomethacin, and 10 μ g/ml recombinant human (rh) insulin. Cells were incubated for 3 weeks. Adipocytes were revealed by intracellular accumulation of lipid droplets using Oil red O staining and identified by their bright red colors. Briefly, cells were fixed, washed and stained with 0.3% Oil red O in isopropanol and incubated for 10 min at room temperature.

Chondrogenic differentiation was induced when cells were at 90% of confluence, the culture medium was substituted with a chondrocyte differentiation medium composed of: Incomplete Chondrogenic Medium (ICM, containing high glucose-DMEM (HG-DMEM), dexamethasone 10^{-7} M, ascorbic acid-2-phosphate (50 μ g/ml), proline (40 μ g/ml, Merck; Darmstadt, Germany), sodium pyruvate (1 nM, Invitrogen Life Technologies; Carlsbad, CA, USA), Insulin Transferrin Selenium (ITS, diluted 1%, Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, USA) with BMP-2 (Inductos, 50 ng/ml, 12 mg dibotermine alpha, Medtronic BioPharma B.V.) and TGF- β 1 (10 ng/ml, Miltenyi Biotec; Bergish Gladbach, Germany). This medium was changed twice a week for 14 days. Chondrocytes were revealed with a Alcian blue solution 1% in chloridric acid 1 M (pH 1) for 30 min. The sulfated proteoglycans stained blue.

As negative controls for chondrogenic, osteogenic and adipogenic differentiations, cells were cultured in LG-DMEM supplemented only with 10% FCS.

Chondrogenic differentiation in 3D

The scaffold was manufactured by Symatèse Biomatériaux (Chaponost, France). These collagen sponges (100% of collagen, 2 mm thickness, 5 mm diameter, corresponding to a volume of 0.04 cm³, around 100 μ m pore size) are composed of native type I (90–95%) and type III (5–10%) collagens from calf skin; they are crosslinked with glutaraldehyde to

increase their stability. They are sterilized with β -radiation and they do not swell after rehydratation.

MSC were grown for 28 days in this 3D scaffold to induce chondrogenesis according to the following protocol. Briefly, cells were subcultured as monolayers until P3, trypsinized, and suspended in ICM with BMP-2 and TGF- β 1. Cell seeding onto the collagen sponges was performed by dropping 20 μ l of the cell suspension on the sponge (5×10^5 cells/sponge) in 96-well culture plates and incubating the plates at 37°C under 5% CO₂. After 1 h, the cell constructs were transferred to 24-well plates with ICM in the presence or absence of 50 ng/ml BMP-2 and 10 ng/ml TGF- β 1. Constructs were then cultured in hypoxia (3% O₂) or normoxia (21% O₂) and the medium was changed on days 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25. Sponges were harvested for RNA and protein analyses on days 7, 14, 21 and 28. MSC monolayers before induction were used as controls (day zero, D0).

RNA isolation and RT-qPCR

Cells were extracted with the Trizol Reagent according to manufacturer's instruction. Then, one μ g of RNA was reverse transcribed into cDNA using reverse transcriptase (MMLV, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) and oligo dT (Eurogentec; Liège, Belgium). RT-qPCR was performed on a CFX96 touch Real Time PCR Detection System (Bio-Rad; Hercules, CA, USA) using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). Sequences of the primers used are listed in table I. Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method and expressed as the mean of triplicate samples. Each sample was normalized to β -actin.

Protein extraction and western-blot

After treatment, sponges containing cells or cells in monolayers (D0) were rinsed once with ice-cold PBS, crushed and total proteins were extracted using the RIPA-lysis buffer with a protease inhibitor cocktail. Protein concentration was assessed according to the Bradford colorimetric procedure (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). Then, 10 μ g of total proteins were separated in 7.5% polyacrylamide gels (TGX Stain Free Fast Cast Acrylamide Kit 7.5%, Bio-Rad) and transferred to a PolyVinylidene Difluoride Membrane (Trans-Blot Turbo RTA Midi PVDF Transfer Kit, Bio-Rad). Unspecific binding sites of the membranes were blocked with 10% non-fat milk powder in Tris-buffered saline with 0.1 % Tween (TBST, Sigma Aldrich;

Saint Louis, MO, USA) for 1 h. Then, membranes were incubated overnight at 4°C with rabbit anti-human type I collagen (Novotec; Bron, France), rabbit anti-human type II collagen (Novotec; Bron, France), mouse anti-human type X collagen (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, USA), rabbit anti-human GAPDH (Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX, USA), mouse anti-human Runx2 (Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX, USA), mouse anti-human PCNA (Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX, USA), mouse anti-human Sox9 (Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX, USA), rabbit anti-human HtrA1 (Merck Millipore; Billerica, MA, USA) or rabbit anti-human β -tubulin (Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX, USA). Concerning the anti-human type IIB collagen, its generation was made by Covalab using exactly the same strategy as the one used by Aubert-Foucher *et al.* ((29)Aubert-Foucher *et al.*, 2014) This antibody detects the pro α 1(II)B and pN α 1(II)B isoforms of type II collagen, according to the epitope targeted. The following day, membranes were washed with TBST before an hour incubation with HRP-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG antibody (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA, USA). Signals were visualized with the chemiluminescence method (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad) on the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad; Hercules, CA, USA).

Immunohistochemistry

Biological substitutes were fixed with 4% paraformaldehyde for 16 h, dehydrated using successive baths of graded ethanol, embedded in paraffin, and sectioned in 4 μ m-thick slices. Then immunostaining was performed. Sections were deparaffinized using toluene and rehydrated in ethanol. Immunostaining was initiated by unmasking the antigenic sites with 0.5% hyaluronidase in PBS-BSA buffer (3%), washing with PBS and permeabilization. Following several washes with PBS, sections were then treated with a peroxidase blocking solution (Dako Real, Agilent; Santa Clara, CA, USA) and subsequently with PBS-BSA (5%) for 30 minutes. Then, the sections were treated with specific antibodies against type I (1:1 000 dilution) and type IIB (1:500 dilution) collagens and aggrecan (1:500 dilution). The antibodies used are the ones used in western-blots. Section were rinsed, then incubated with a HRP-conjugated secondary antibody (undiluted, Agilent; Santa Clara, CA, USA), and signals were detected using the DAB substrate (Dako, Agilent; Santa Clara, CA, USA). Hematoxylin (Dako, Agilent; Santa Clara, CA, USA) was used as the counter-stain. An Aperio ScanScope slide scanner was used to digitalize histological slides (Leica Biosystems; Wetzlar, Germany).

Statistical analyses

All experiments were repeated at least three or four times with cells derived from different horses. Values are reported as means \pm SD. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney U-test to determine significant differences between two groups. Statistical analyses were done using Graphpad Prism 6 (Graphpad Software Inc; San Diego, CA, USA). A P-value of ≤ 0.05 was considered to be significant.

References

- (1) Brandt D, Dieppe P, Radin EL (2008) Etiopathogenesis of Osteoarthritis Kenneth. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* **34** : 5531-559.
- (2) Mobasher A, Kalamegame G, Musumecif G, Battb ME (2014) Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. *Maturitas* **78** : 188-198.
- (3) Brooks PM (2006) The burden of musculoskeletal disease-a global perspective. *Clin. Rheumatol.* **25** : 778-781.
- (4) Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* **331** : 889-895.
- (5) Benya PD, Padilla SR, Nimni ME (1978) Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell* **15** : 1313-1321.
- (6) 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, Galera P (2014) Cartilage tissue engineering : Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim. Biophys. Acta* **1840** : 2414-2440.
- (7) Dewan AK, Gibson MA, Elisseff JH, Trice ME (2014) Evolution of autologous chondrocyte repair and comparison to other cartilage repair techniques. *Biomed. Res. Int.* **2014** : 1-11.
- (8) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284** : 143-147.
- (9) Hass R, Kasper C, Böhm S, 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.
- (10) McCarthy HE, Bara JJ, Brakspear K, Singhrao SK, Archer CW (2012) The comparison of equine articular cartilage progenitor cells and bone marrow-derived stromal cells as potential cell sources for cartilage repair in the horse. *Vet. J.* **192** : 345-351.
- (11) Kanawa M, Igarashi A, Ronald VS, Higashi Y, Kurihara H, Sugiyama M (2013) Age-dependent decrease in the chondrogenic potential of human bone marrow mesenchymal stromal cells expanded with fibroblast growth factor-2. *Cytotherapy* **15** : 1062-1072.

- (12) Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K (2006) Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells* **24** : 1294-1301.
- (13) Lo WC, Chen WH, Lin TC, Hwang SM, Zeng R, Hsu WC, Chiang YM, Liu MC, Williams DF, Deng WP (2013) Preferential therapy for osteoarthritis by cord blood MSCs through regulation of chondrogenic cytokines. *Biomaterials* **34** : 4739-4748.
- (14) Branly T, Bertoni L, Contentin R, Rakic R, Gomez-Leduc T, Desancé M, Hervieu M, Legendre F, Jacquet S, Audigié F, Denoix JM, Demoor M, 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- β 1. *Stem Cell Rev. and Rep.* **5** : 611-630.
- (15) Desancé M, Contentin R, Bertoni L, Gomez-Leduc T, Branly T, Jacquet S, Betsch JM, Batho A, Legendre F, Audigié F, Galéra P, Demoor M (2018) Chondrogenic Differentiation of Defined Equine Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord Blood for Use in Cartilage Repair Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **19** : 537.
- (16) Rakic R, Bourdon B, Demoor M, Maddens S, Saulnier N, Galéra P(2018) Differences in the intrinsic chondrogenic potential of equine umbilical cord matrix and cord blood mesenchymal stromal/stem cells for cartilage regeneration. *Sci. Rep.*
- (17) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8** : 315-317.
- (18) Pérez-Silos V, Camacho-Morales A, Fuentes-Mera L (2016) Mesenchymal Stem Cells Subpopulations: Application for Orthopedic Regenerative Medicine. *Stem Cells Int.* **2016** : 318749.
- (19) McLeod CM & Mauck RL (2017) On the origin and impact of mesenchymal stem cell heterogeneity: new insights and emerging tools for single cell analysis. *Eur. Cell. Mater.* **34** : 217-231.
- (20) Li H, Ghazanfari R, Zacharaki D, Ching Lim H, Scheduling S (2016) Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1370** : 109-118.

- (21) Arufe MC, De la Fuente A, Fuentes I, de Toro FJ, Blanco FJ (2010) Chondrogenic Potential of Subpopulations of Cells Expressing Mesenchymal Stem Cell Markers Derived From Human Synovial Membranes. *J. Cell. Biochem.* **111** : 834-845.
- (22) De Schauwer C, Piepers S, Van de Walle GR, Demeyere K, Hoogewijs MK, Govaere JLJ, Braeckmans K, Van Soom A, Meyer E (2012) In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. *Cytometry. A* **81** : 312-323.
- (23) Hackett CH, Flaminio MJBF, Fortier LA (2011) Analysis of CD14 expression levels in putative mesenchymal progenitor cells isolated from equine bone marrow. *Stem Cells Dev.* **20** : 721-735.
- (24) Braun J, Hack A, Weis-Klemm M, Conrad S, Treml S, Kohler K, Walliser U, Skutella T, Aicher WK (2010) Evaluation of the osteogenic and chondrogenic differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Am J. Vet. Res.* **71** : 1228-1236.
- (25) Branly T, Contentin R, Desancé M, Jacquet T, Bertoni L, Jacquet S, Mallein-Gerin F, Denoix JM, Audigié F, Demoor M, Galéra P (2018) 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. *Int. J. Mol. Sci.* **19**
- (26) Archer CW & Francis-West P (2003) The chondrocyte. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35** : 401-404.
- (27) Mayer N, Lopa S, Talò G, Lovati AB, Padeloup M, Riboldi SA, Moretti M, 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. doi: 10.1371/journal.pone.0161479. eCollection 2016.
- (28) White JL, Walker NJ, Hu JC, Borjesson DL, Athanasiou KA (2018) A comparison of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells for cartilage self-assembly. *Tissue Eng. Part A* sous presse.
- (29) Aubert-Foucher E, Mayer N, Padeloup M, Pagnon A, Hartmann D, 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.

Acknowledgements

We are grateful to Marylin Guillamin for her help for flow cytometry analyses and 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) and by the Regional Council of Basse-Normandie through the ANR TecSan PROMOCART program to P.G. (917RB020 and 917RB072 respectively), by the French Ministry of Research and Technology to PG, by three ERDF (European Regional Development Funds) grants to P.G. and M.D. (HIPPOCART 1 no. 2897/33535, 917RB148; HIPPOCART 917CB174, EQUISTEM 917CB210), by a Regional Council of Basse-Normandie program to PG and MD (HIPPOCART N° 2013-AGRI-236/13P07492, 917CB166), by Fonds Eperon to PG and MD (EQUISTEM, N80-2014, 917CB194), by ERDF and Regional Council of Basse-Normandie grant to P.G. and M.D. in the CPER Centaure program (2015–2020, Centaure Biotechnologies 2015 N° 917CB213&Centaure PREACH 2016–17). CENTAURE is an European project co-funded by the Normandy County Council, European Union in the framework of the ERDF-ESF operational program 2014-2020. 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.

RC was supported by a PhD scholarship co-financed by the Fonds Eperon and the Regional Council of Basse-Normandie, and TB by a PhD fellowship from the French Ministry of Research and Technology. MDes was recipient from a PhD fellowship from the Regional Council of Basse-Normandie. MC was supported by an ERASMUS program (ERASMUS center of Parma University, Italy).

Author contributions

RC and TB were involved in study design, in data collection/assembly and analysis, and performed experiments. TB, RC, MD, MDes and FA were involved in collecting BM- and UCB-MSCs. MC and MDes performed experiments, collected and analysed the data. FA analysed the data. PG and MD were involved in study conception and design, in supervision of the study, in data analysis and interpretation, and provide the financial support. RC wrote the original draft. PG and TB were involved in writing-reviewing, realized the critical revision of the article and the final approval. All authors read and approved the final manuscript.

Disclosure statement

No conflict of interests is declared by all the authors.

Figure legends

Figure 1: Characterization of MSCs

Ability of bone marrow (BM)- and umbilical cord blood (UCB)- mesenchymal stem cells (MSCs) to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes (A). The cells were amplified at P4 and cultured to 50% confluence with media specific to osteoblastic (n = 4), adipocyte (n = 4) or chondrogenic (n = 4) differentiation (treated panels) or amplification medium (control panels) for 14 days. After fixing with paraformaldehyde, cells were stained with Alizarin red, Oil Red O and Alcian blue to reveal the presence of calcium deposits, lipid droplets and sulfated proteoglycans, respectively.

Proliferative capacity of equine MSCs isolated from BM and UCB (B). The MSCs derived from BM and UCB were isolated and seeded at 5000 cells/cm². A passage with trypsin/EDTA was performed every 7 days, followed by counting and re-seeding at the same cell density (n = 4). The significance of the results between BM- and UCB-MSCs was evaluated using a Mann-Whitney test (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

Immuno-phenotyping of the isolated and amplified MSCs (C). In passage 4 (P4), the cells were detached and suspended at 10 million cells per ml in PBS. They were incubated with the indicated specific monoclonal antibodies, or relevant anti-IgG isotype controls for 30 min at 4 °C in a dark room. The cells were then washed and resuspended in PBS. The acquisitions involved a minimum of 10,000 events collected for each analysis. The results are expressed as the mean of the values obtained for each run. The results are presented as the mean of four experiments.

CD: cluster of differentiation; MHC: major histocompatibility complex; BM: bone marrow; UCB: umbilical cord blood

Figure 2: Comparison of mRNA expression in BM- and UCB-MSCs at their basal level

MSCs were cultured in monolayer until P4 in amplification medium and their mRNA was extracted as described in the Materials and Methods. The mRNAs were estimated using RT-qPCR after normalization relative to the *β-actin* reference gene. The *Col2a1:Col1a1* ratio is shown. The results are represented as box plots (median, quartiles, extreme values) and the significance of the values between BM- and UCB-MSCs was tested using a Mann-Whitney test (* p < 0.05); n= 4.

Figure 3: Comparison of protein expression in BM and UCB-MSCs at their basal level

MSC were cultured in monolayer until P4 in amplification medium and proteins were extracted as described in Materials and Methods. The total protein extracts, from 4 different strains of both types of MSC, were separated by electrophoresis on a 7.5% acrylamide gel under denaturing conditions. The proteins were then transferred to a PVDF membrane, which was incubated with the antibodies indicated on the right. The molecular weight marker (MW kDa) is indicated on the left. Ostc: osteocalcin.

Figure 4: Kinetic study of specific mRNA and protein markers of articular hyaline cartilage during chondrogenic differentiation of BM- and UCB-MSCs in normoxia

Equine MSCs derived from BM or UCB were amplified and seeded in collagen sponges at P4 (n = 5). They were then grown in normoxia (21% O₂) for 7, 14, 21 and 28 days (D7, D14, D21 and D28, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium enriched with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF-β1 (10 ng/ml) (B+T). The D0 condition corresponds to stem cells cultured in monolayer at P4 with the amplification medium and the equine articular cartilage (eAC) condition corresponds to the protein extracted from healthy cartilage. mRNA levels were estimated by RT-qPCR after normalization relative to the *β-actin* reference gene (A). The results are represented as box plots (median, quartiles, extreme values) and the significance of the values, compared to the D0 condition, was tested using a Mann-Whitney test (* p < 0.05). The total protein extracts were separated by electrophoresis on a 7.5% acrylamide gel under denaturing conditions (B, C). The proteins were then transferred to a PVDF membrane which was incubated with the antibodies indicated on the right. The molecular weight marker (MW kDa) is indicated on the left.

Figure 5: Kinetic study of atypical mRNA and protein of hyaline articular cartilage during chondrogenic differentiation of BM- and UCB-MSCs in normoxia

Equine MSCs derived from BM or UCB were amplified and seeded in collagen sponges at P4 (n = 5). They were then grown in normoxia (21% O₂) for 7, 14, 21 and 28 days (D7, D14, D21 and D28, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium enriched with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF-β1 (10 ng/ml) (B+T). The D0 condition corresponds to stem cells cultured in monolayer at P4 in amplification medium and the equine articular cartilage (eAC) condition corresponds to the protein extracted from healthy cartilage. mRNA levels were estimated using RT-qPCR after normalization relative to the *β-actin* reference gene (A). The results are represented as box plots (median, quartiles, extreme values) and the

significance of the values, compared to the D0 condition, was tested using a Mann-Whitney test (* $p < 0.05$). The total protein extracts were separated by electrophoresis on a 7.5% acrylamide gel under denaturing conditions (B). The proteins were then transferred to a PVDF membrane which was incubated with the antibodies indicated on the right. The molecular weight marker (MW kDa) is indicated on the left.

Figure 6: Kinetic study of specific mRNA and protein markers of hyaline articular cartilage during chondrogenic differentiation of BM- and UCB-MSCs in hypoxia

Equine MSC derived from BM or UCB were amplified and seeded in collagen sponges at P4 ($n = 5$). They were then grown in hypoxia (3% O₂) for 7, 14, 21 and 28 days (D7, D14, D21 and D28, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium enriched with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- β 1 (10 ng/ml) (B+T). The D0 condition corresponds to stem cells cultured in monolayer at P4 with the amplification medium and the equine articular cartilage (eAC) condition corresponds to the protein extracted from healthy cartilage. mRNA levels were estimated by RT-qPCR after normalization relative to the β -actin reference gene (A). The results are represented as box plots (median, quartiles, extreme values) and the significance of the values, compared to the D0 condition, was tested using a Mann-Whitney test (* $p < 0.05$). The total protein extracts were separated by electrophoresis on a 7.5% acrylamide gel under denaturing conditions (B). The proteins were then transferred to a PVDF membrane which was incubated with the antibodies indicated on the right. The molecular weight marker (MW kDa) is indicated on the left.

Figure 7: Kinetic study of atypical mRNA and protein of hyaline articular cartilage during chondrogenic differentiation of BM- and UCB-MSCs in hypoxia

Equine MSCs derived from BM or UCB were amplified and seeded in collagen sponges at P4 ($n = 5$). They were then grown in hypoxia (3% O₂) for 7, 14, 21 and 28 days (D7, D14, D21 and D28, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium enriched with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- β 1 (10 ng/ml) (B+T). The D0 condition corresponds to stem cells cultured in monolayer at P4 with the amplification medium and the equine articular cartilage (eAC) condition corresponds to the protein extracted from healthy cartilage. mRNA levels were estimated using RT-qPCR after normalization relative to the β -actin reference gene (A). The results are represented as box plots (median, quartiles, extreme values) and the significance of the values, compared to the D0 condition, was tested using a Mann-Whitney test (* $p < 0.05$). The total protein extracts were separated by electrophoresis on a 7.5%

acrylamide gel under denaturing conditions (B). The proteins were then transferred to a PVDF membrane which was incubated with the antibodies indicated on the right. The molecular weight marker (MW kDa) is indicated on the left.

Figure 8: Effect of the oxygen condition on the chondrogenic differentiation of BM- and UCB-MSCs on specific mRNA and protein markers of hyaline articular cartilage

Equine MSC derived from BM or UCB were amplified and seeded in collagen sponges at P4 (n = 5). They were then grown in hypoxia (3% O₂) or normoxia (21% O₂) for 14 and 28 days (D14 and D28, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium enriched with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF-β1 (10 ng/ml) (B+T). The D0 condition corresponds to stem cells cultured in monolayer at P4 with the amplification medium and the equine articular cartilage (eAC) condition corresponds to the protein extracted from healthy cartilage. mRNA levels were estimated using RT-qPCR after normalization relative to the *β-actin* reference gene (A). The results are represented as box plots (median, quartiles, extreme values) and the significance of the values between BM- and UCB-MSCs was tested using a Mann-Whitney test (* p < 0.05). The total protein extracts were separated by electrophoresis on a 7.5% acrylamide gel under denaturing conditions (B). The proteins were then transferred to a PVDF membrane which was incubated with the antibodies indicated on the right. The molecular weight marker (MW kDa) is indicated on the left.

Figure 9: Effect of the oxygen condition in the chondrogenic differentiation of BM- and UCB-MSCs on atypical mRNA and protein of hyaline articular cartilage.

Equine MSC derived from BM or UCB were amplified and seeded in collagen sponges at P4 (n = 5). They were then grown in hypoxia (3% O₂) or normoxia (21% O₂) for 14 and 28 days (D14 and D28, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium enriched with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF-β1 (10 ng/ml) (B+T). The D0 condition corresponds to stem cells cultured in monolayer at P4 with the amplification medium and the equine articular cartilage (eAC) condition corresponds to the protein extracted from healthy cartilage. mRNA levels were estimated using RT-qPCR after normalization relative to the *β-actin* reference gene (A). The results are represented as box plots (median, quartiles, extreme values) and the significance of the values between BM- and UCB-MSCs was tested using a Mann-Whitney test (* p < 0.05). The total protein extracts were separated by electrophoresis on a 7.5% acrylamide gel under denaturing conditions (B). The proteins were then transferred to a PVDF

membrane which was incubated with the antibodies indicated on the right. The molecular weight marker (MW kDa) is indicated on the left.

Figure 10: IHC analysis of type I collagen expression in the neosynthesized cartilaginous substitute.

Equine MSCs derived from BM or UCB were amplified and seeded in collagen sponges at P4 (n= 5). They were then grown in hypoxia (3% O₂) or normoxia (21% O₂) for 14 and 28 days (D14 and D28, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium enriched with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF-β1 (10 ng/ml) (B+T). Serial paraffin sections (4 μm) of the sponges at D14 and D28 were analysed by IHC to evaluate type I collagen distribution. 1 cm = 150 μm. Magnification (x 2.5) are displayed in the top left corner box. Blue arrow: type I collagen fibres of the biomaterial.

Figure 11: IHC analysis of type IIB collagen expression in the neosynthesized cartilaginous substitute.

Equine MSCs derived from BM or UCB were amplified and seeded in collagen sponges at P4 (n= 5). They were then grown in hypoxia (3% O₂) or normoxia (21% O₂) for 14 and 28 days (D14 and D28, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium enriched with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF-β1 (10 ng/ml) (B+T). Serial paraffin sections (4 μm) of the sponges at D14 and D28 were analysed by IHC to evaluate type IIB collagen expression. 1 cm = 150 μm. Magnification (x 2.5) are displayed in the top left corner box.

Figure 12: Evaluation of aggrecan expression by IHC in the neosynthesized cartilaginous substitute.

Equine MSCs derived from BM or UCB were amplified and seeded in collagen sponges at P4 (n= 5). They were then grown in hypoxia (3% O₂) or normoxia (21% O₂) for 14 and 28 days (D14 and D28, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium enriched with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF-β1 (10 ng/ml) (B+T). Serial paraffin sections (4 μm) of the sponges at D14 and D28 were analysed by IHC to investigate aggrecan synthesis. 1 cm = 150 μm. Magnification (x 2.5) are displayed in the top left corner box.

Figure 13: Global distribution of type I and IIB collagens and aggrecan in the neosynthesized cartilaginous substitute.

Equine MSCs derived from BM or UCB were amplified and seeded in collagen sponges at P4 (n = 5). They were then grown in hypoxia (3% O₂) or normoxia (21% O₂) for 14 and 28 days (D14 and D28, respectively) in the presence of incomplete chondrogenic medium enriched with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF-β1 (10 ng/ml) (B+T). Serial paraffin sections (4 μm) of the sponges at D14 and D28 were analysed by IHC to evaluate type I and IIB collagens and aggrecan syntheses. 1 cm = 150 μm.

<i>Acan</i>	Forward	TGTCAACAACAATGCCCAAGAC
	Reverse	CTTCTTCCGCCCAAAGGTCC
<i>Actin</i>	Forward	GATGATGATATCGCCGCGCTC
	Reverse	TGCCCCACGTATGAGTCCTT
<i>AlpI</i>	Forward	GACATGACCTCCCAGGAAGA
	Reverse	GCAGTGAAGGGCTTCTTGTC
<i>Bglap</i>	Forward	TCCTTTGGGGTTTGGCCTAC
	Reverse	GCCTGTGAGACAAAGGAGGG
<i>Col11a1</i>	Forward	TTGCTGATGGGAAGTGGCAT
	Reverse	GCTGCTTTGGGGTCACTAT
<i>Col10a1</i>	Forward	GCACCCAGTAATGTACACCTATG
	Reverse	GAGCCACACCTGGTCATTTTC
<i>Col9a1</i>	Forward	CCAAGAGGCCCAATCGACAT
	Reverse	GGGGAAGTCCGTTATCCTGG
<i>Col2a1</i>	Forward	GGCAATAGCAGTTTACGTACA
	Reverse	CGATAACAGTCTTGCCCCACTT
<i>Col1a2</i>	Forward	CCAGAGTGGAGCAGCGGTTA
	Reverse	GGGATGTTTTTCAGGTTGAGCC
<i>Col1a1</i>	Forward	TGCCGTGACCTCAAGATGTG
	Reverse	CGTCTCCATGTTGCAGAAGA
<i>Htra1</i>	Forward	GGA CTTCATGTTCCCTCAA
	Reverse	GTTCTGCTGAACAAGCAACA
<i>Ki67</i>	Forward	AAGCTGCACGTTTCATGGAGA
	Reverse	ACCCACAGTTCTTCCTCCGA
<i>Mmp13</i>	Forward	TGAAGACCCGAACCCTAAACAT
	Reverse	GAAGACTGGTGATGGCATCAAG
<i>Pcna</i>	Forward	GCGTGAACCTCACCAGTATGT
	Reverse	GCAAATTGCCCAGAAGGCAT
<i>Prg4</i>	Forward	CTACCACCCAACGCAACAAA
	Reverse	ACTGTTGTCTCCTTATTGGGTGT
<i>Runx2</i>	Forward	GCAGTTCCCAAGCATTTTCAT
	Reverse	CACTCTGGCTTTGGGAAGAG
<i>Snorc</i>	Forward	TTTACCAGCTCAGTCCTCGG
	Reverse	CAGACAGAGAGCCATCCTGG
<i>Sox9</i>	Forward	CAAGAAGGACCACCCGGACTA
	Reverse	GGAGATGTGTGTCTGCTCCGT

Table 1

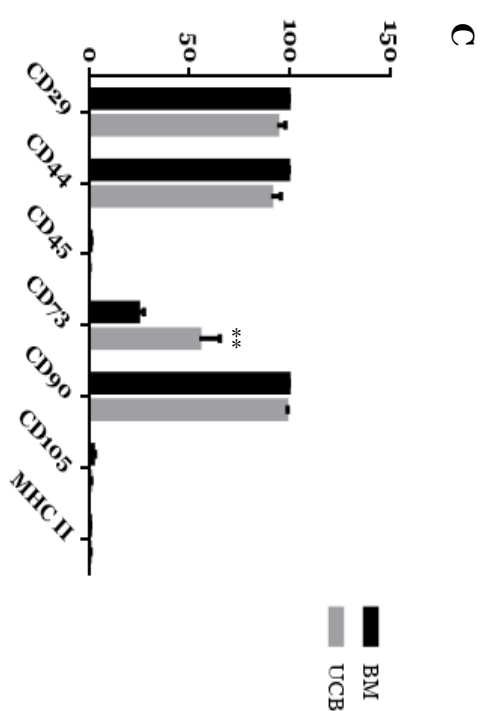
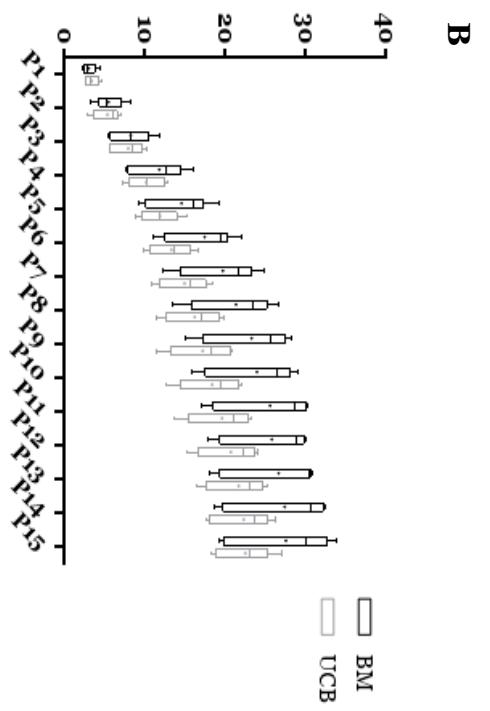
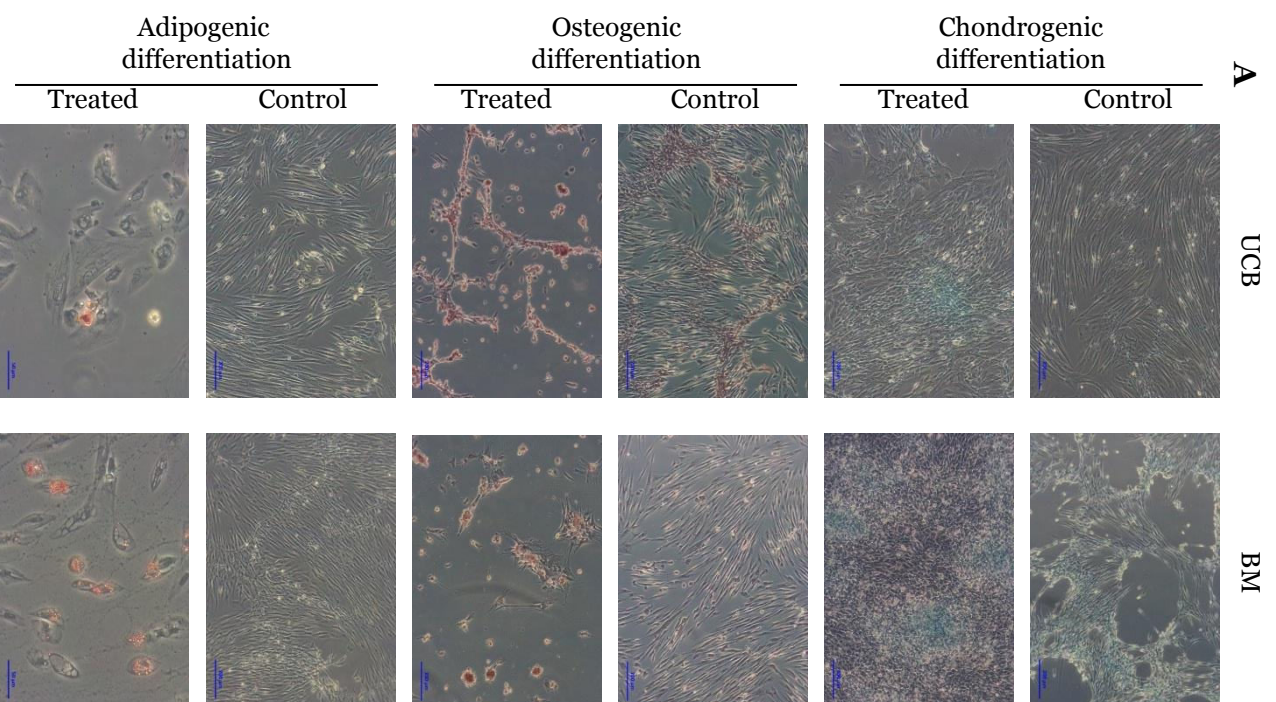


Figure 1

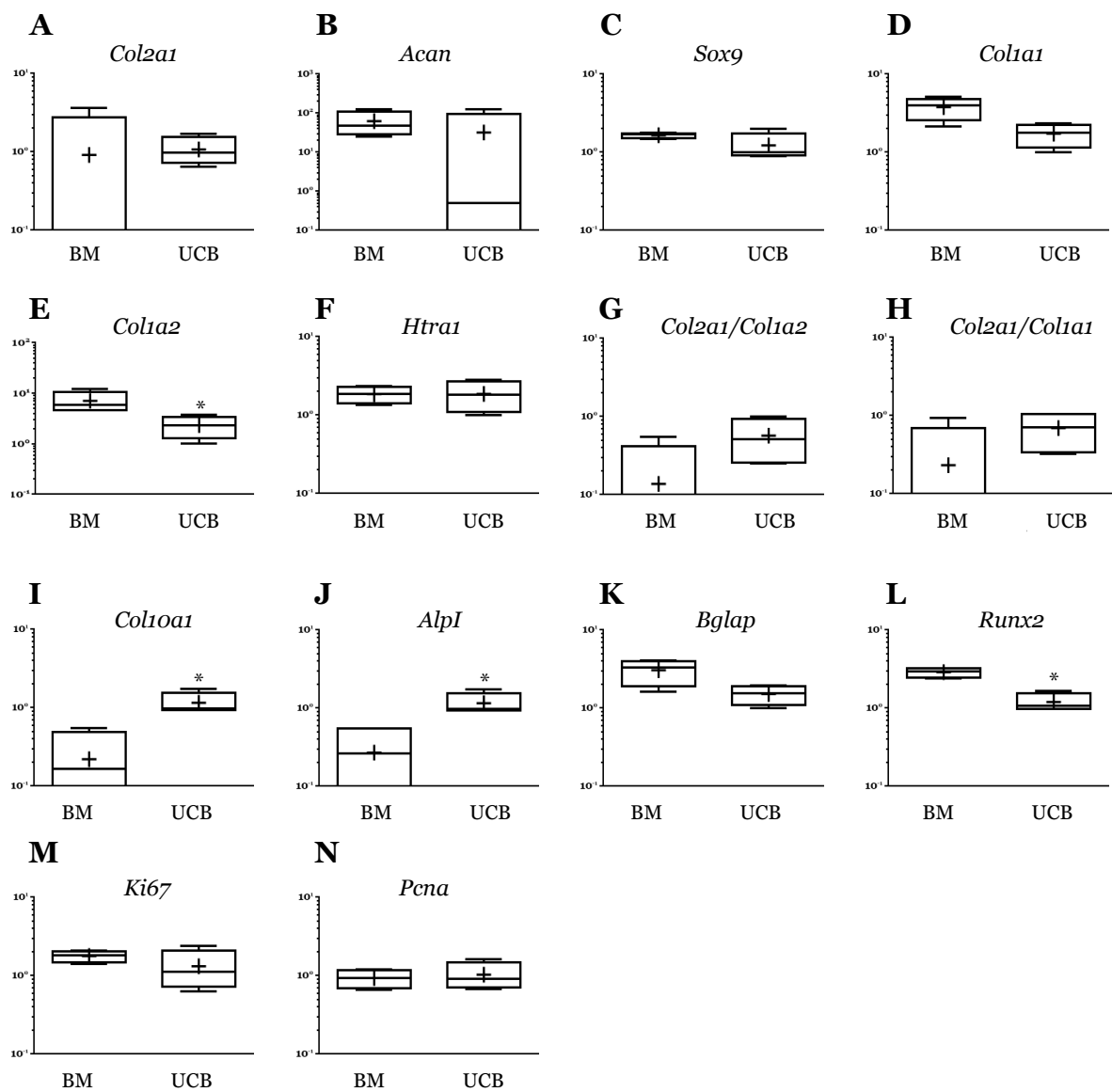


Figure 2

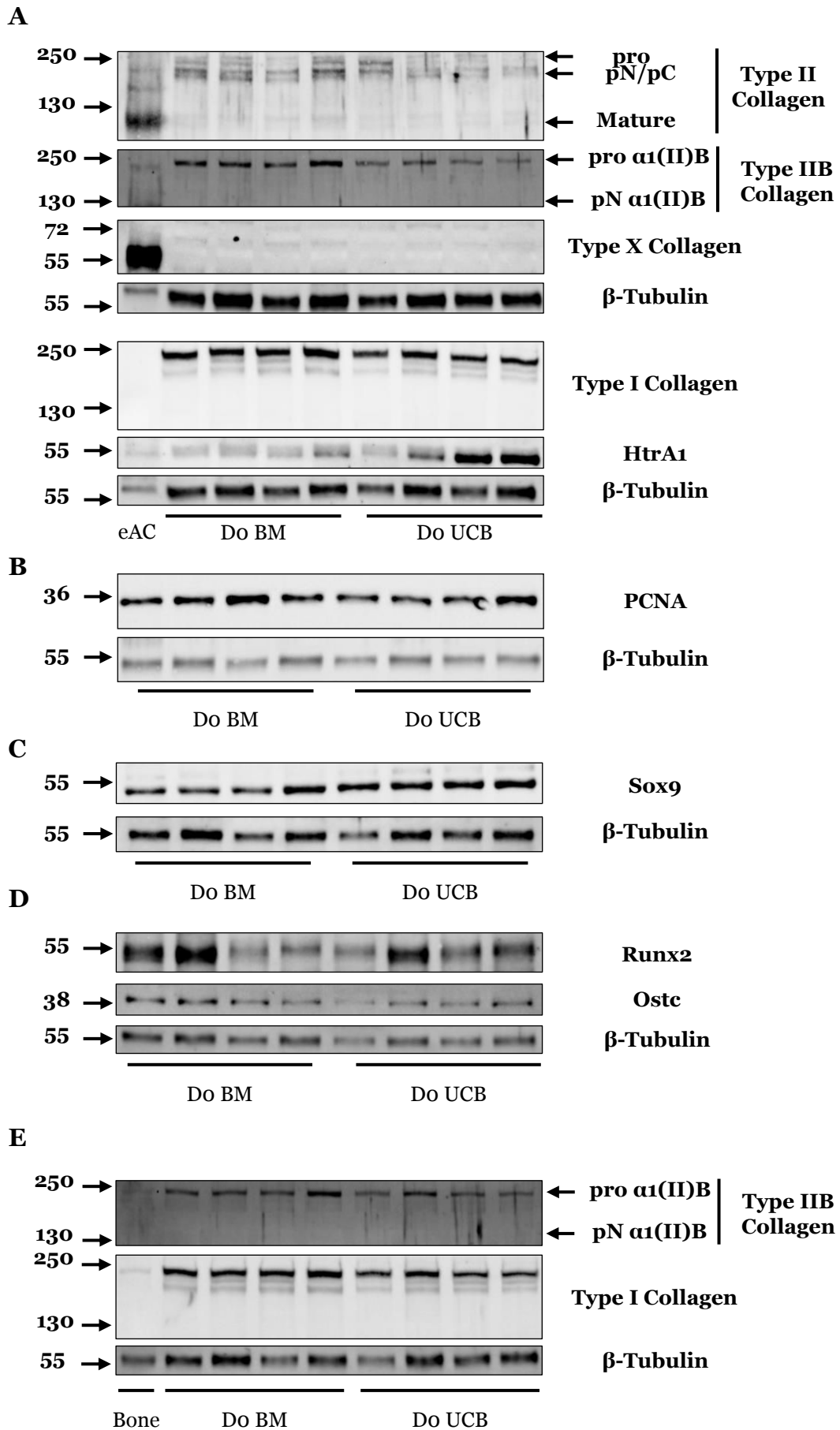


Figure 3

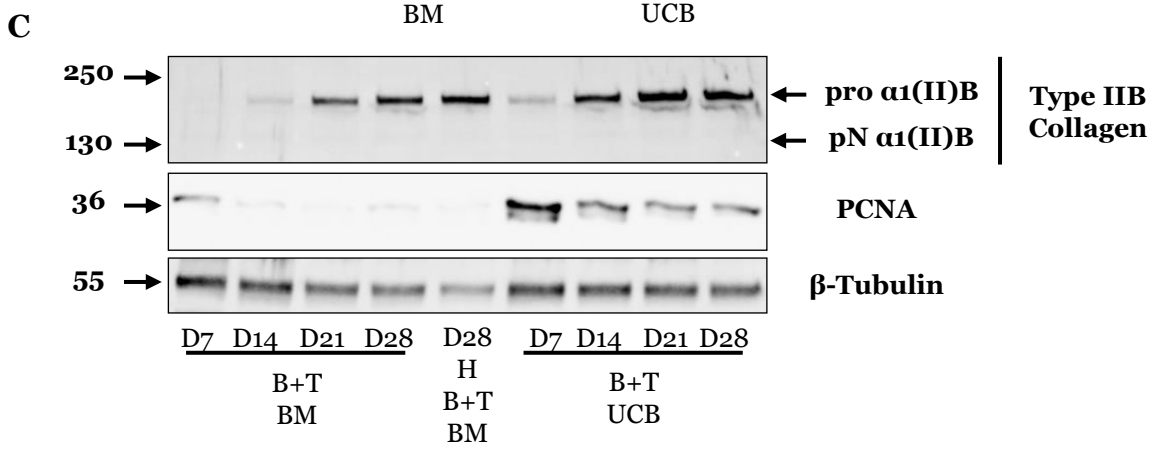
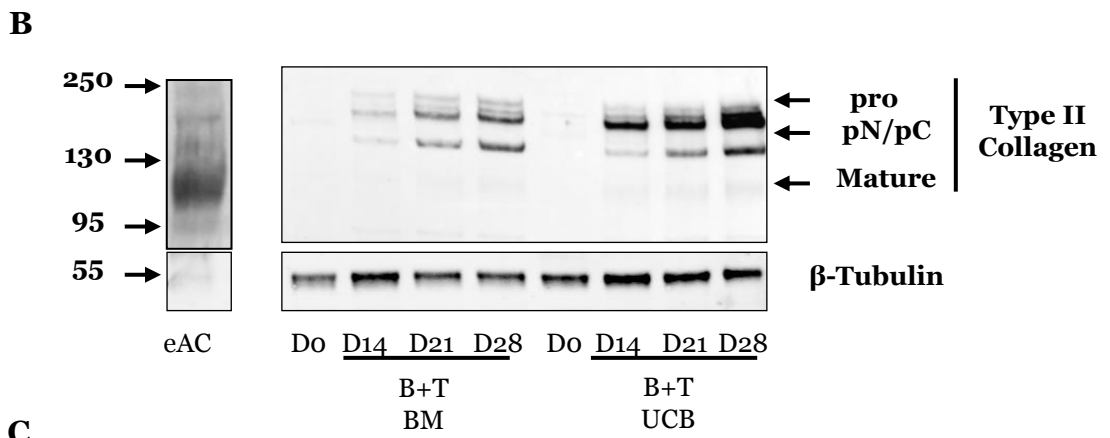
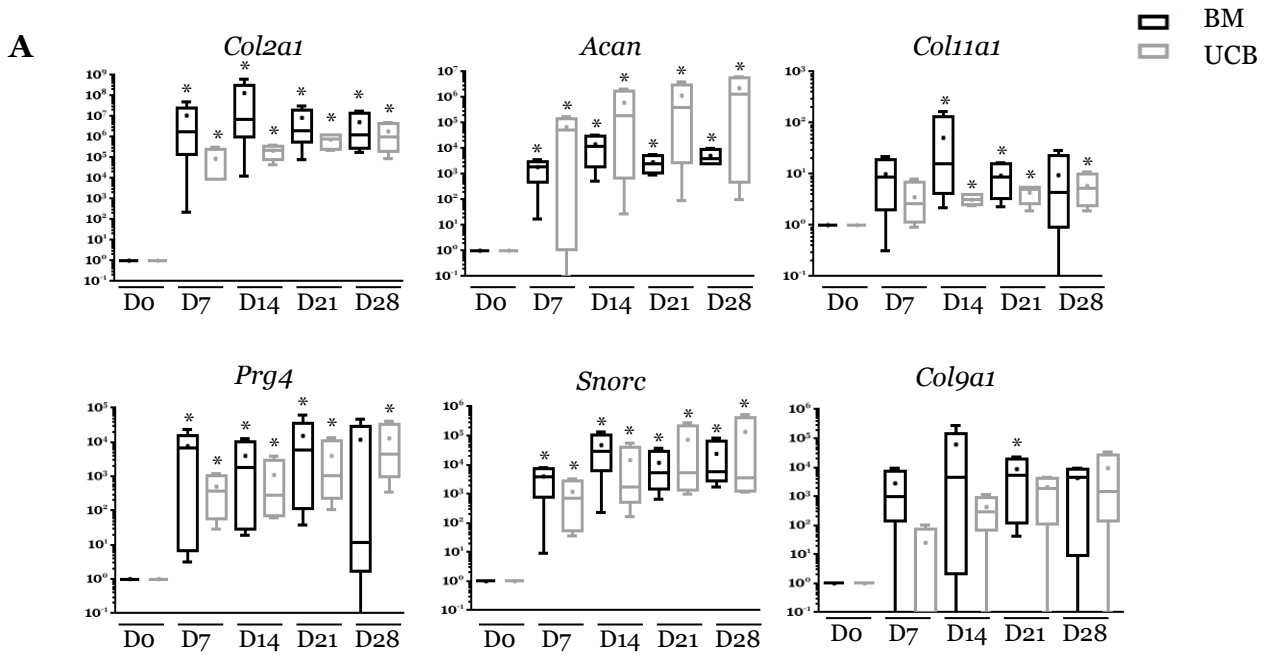


Figure 4

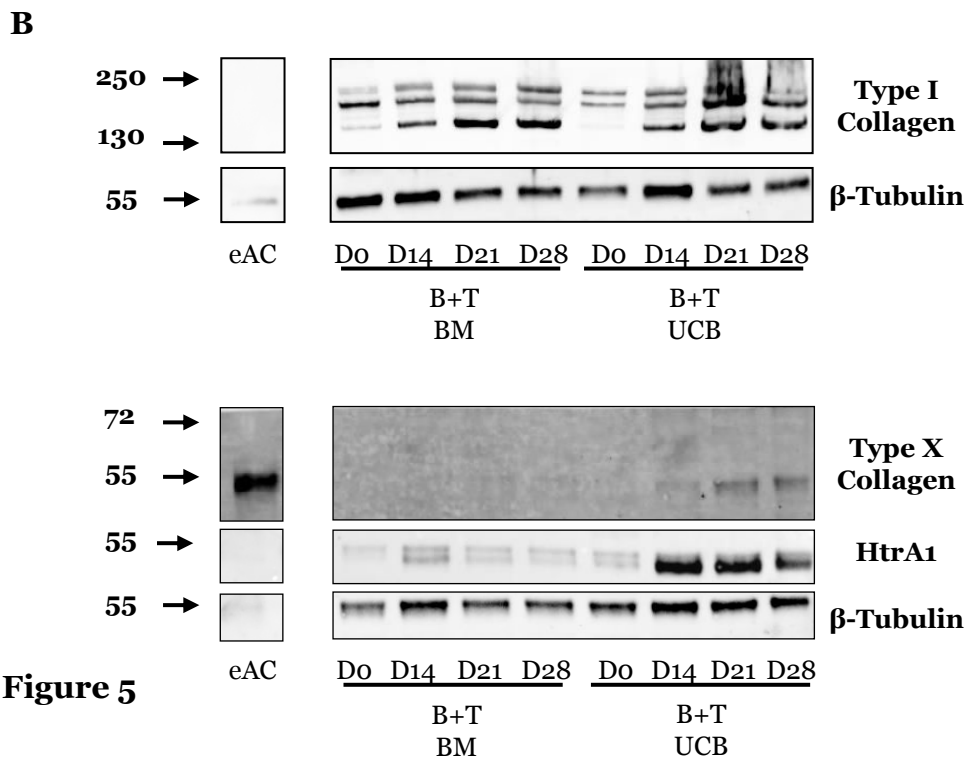
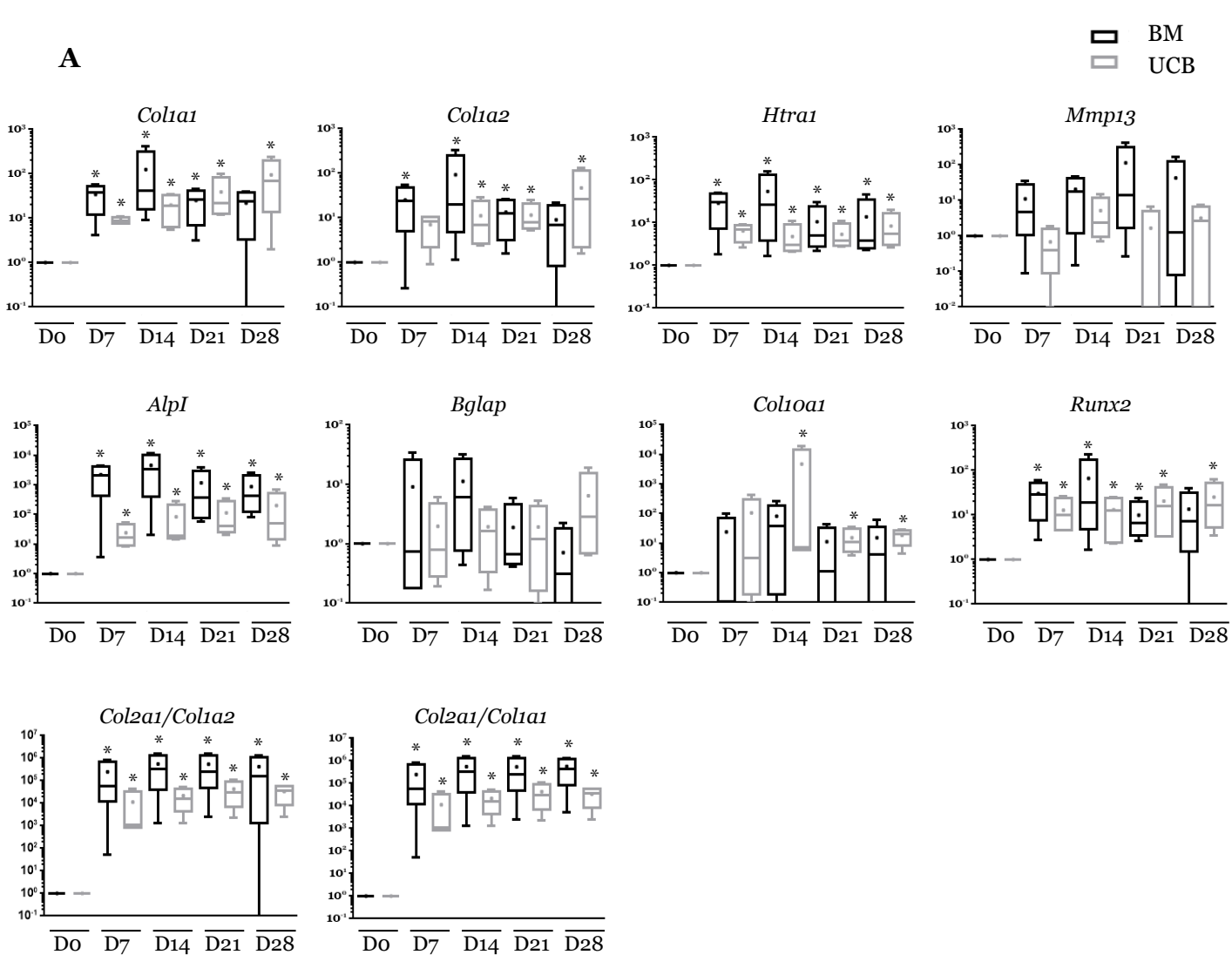


Figure 5

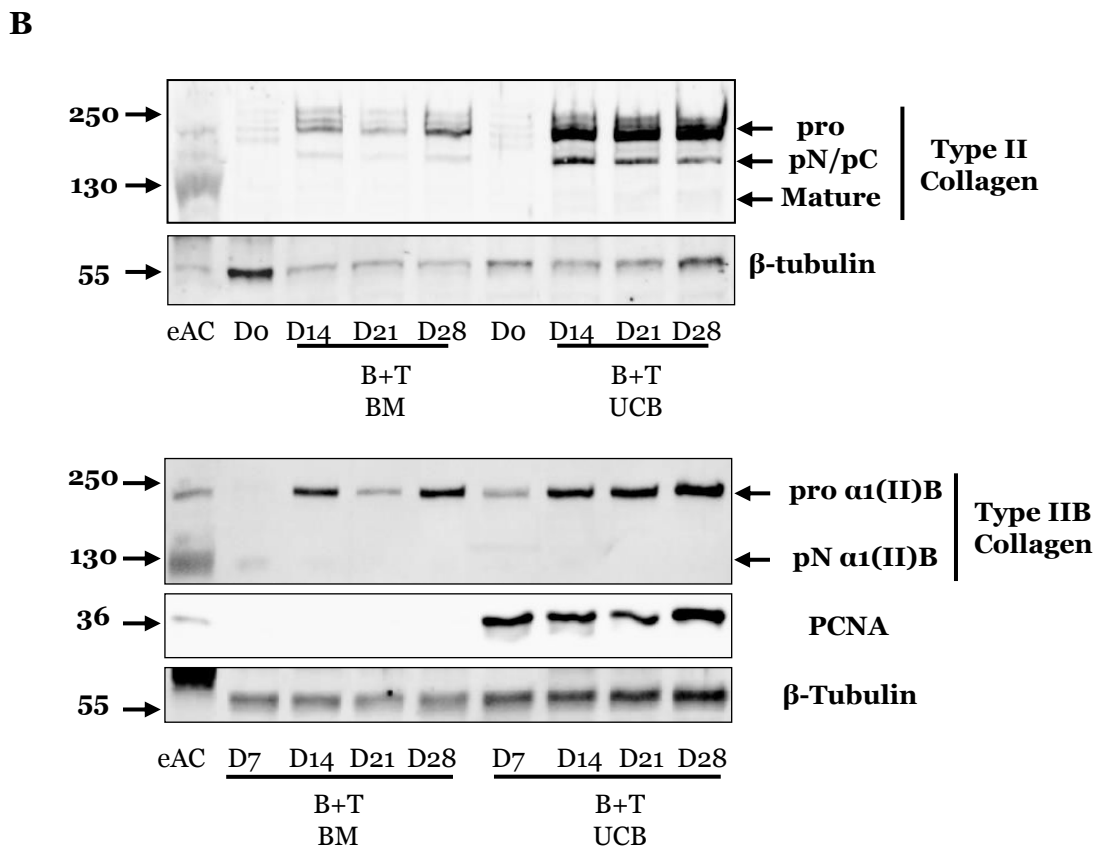
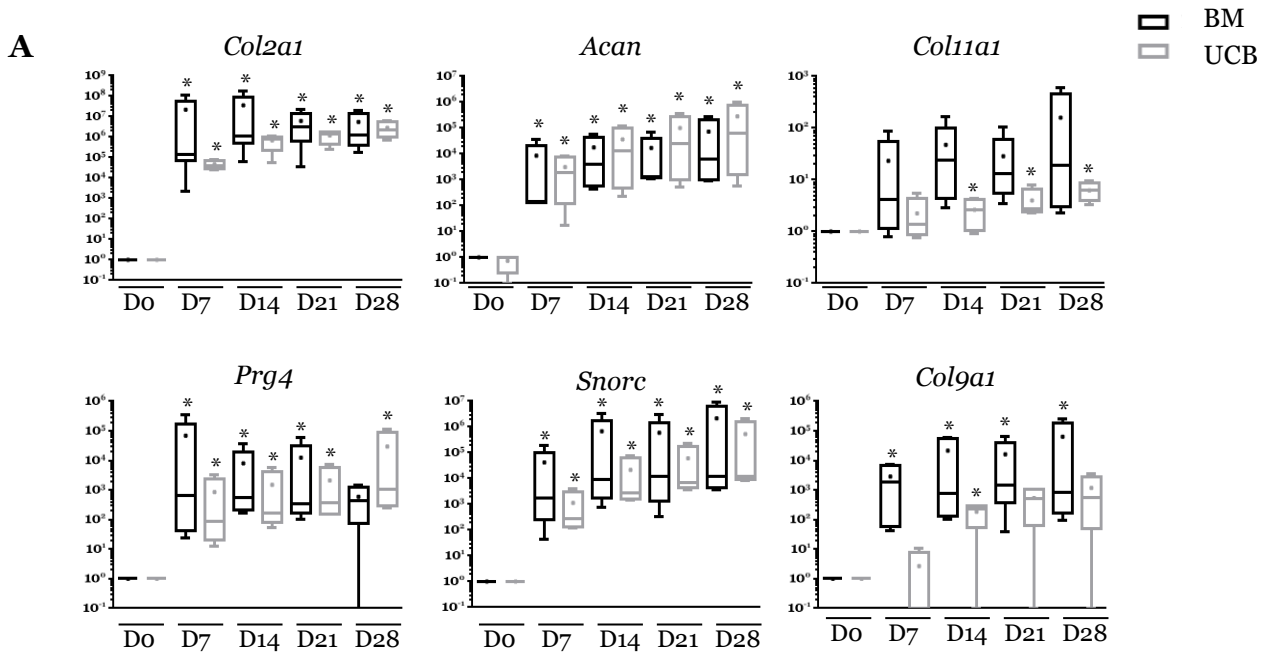


Figure 6

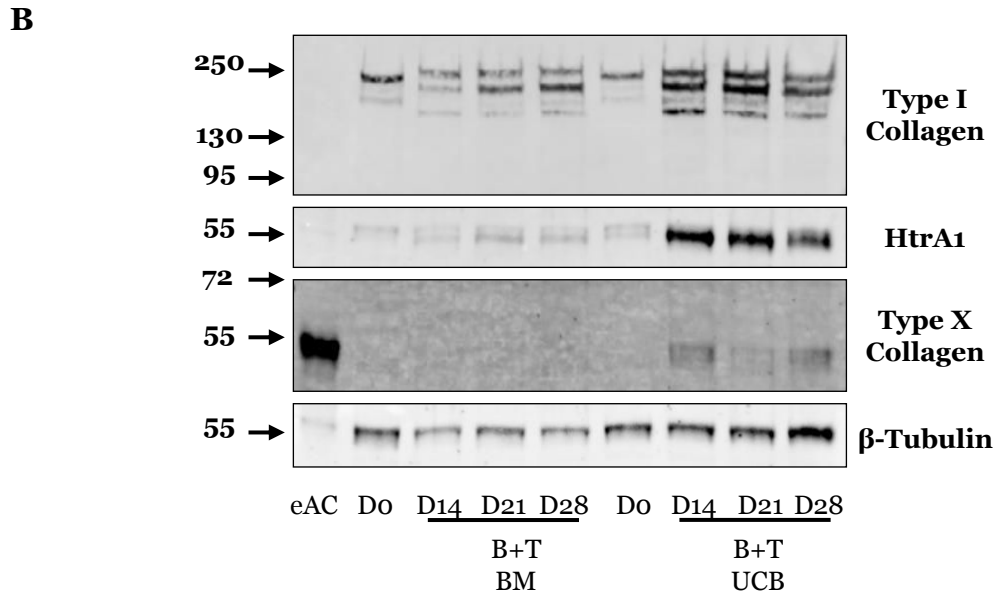
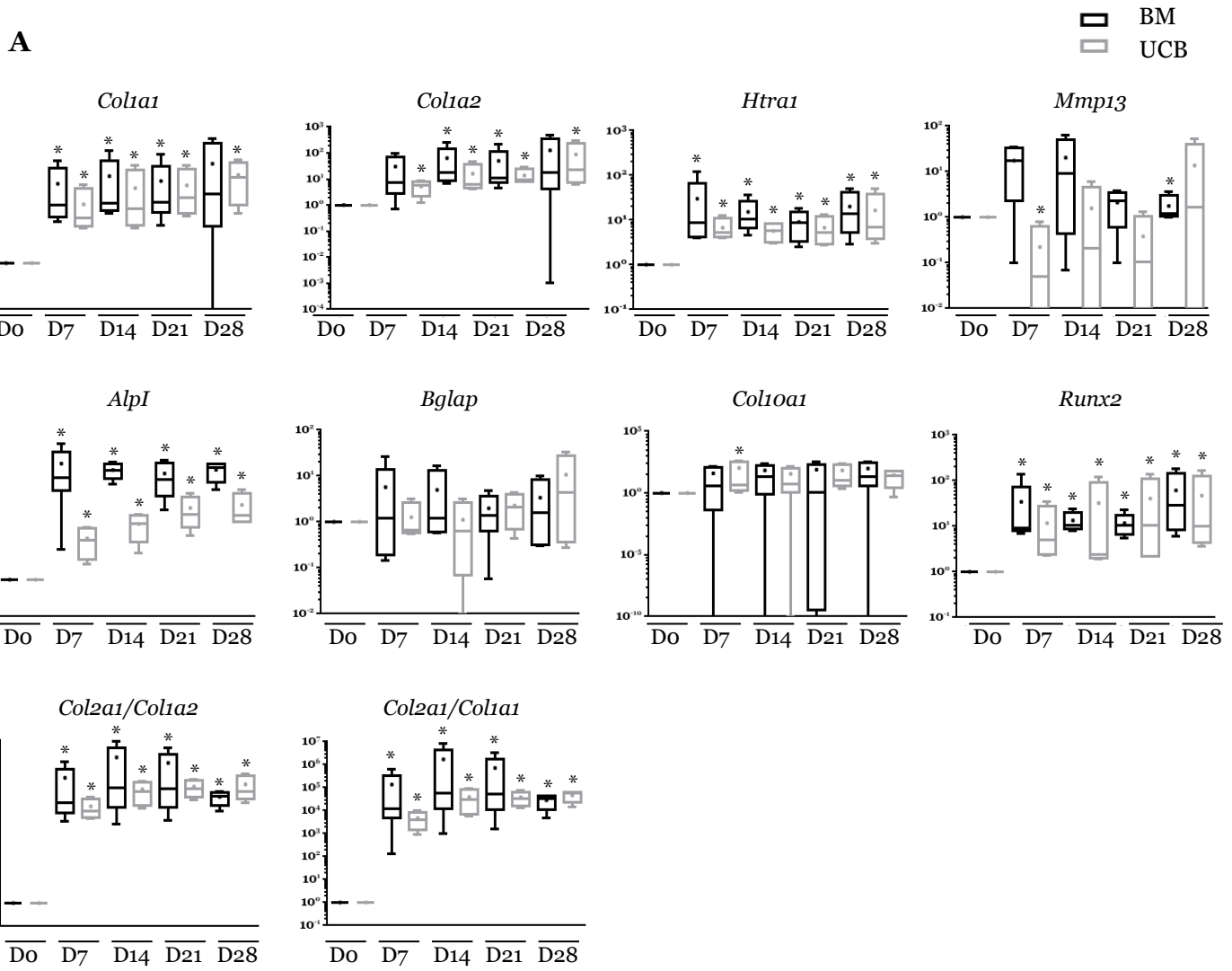
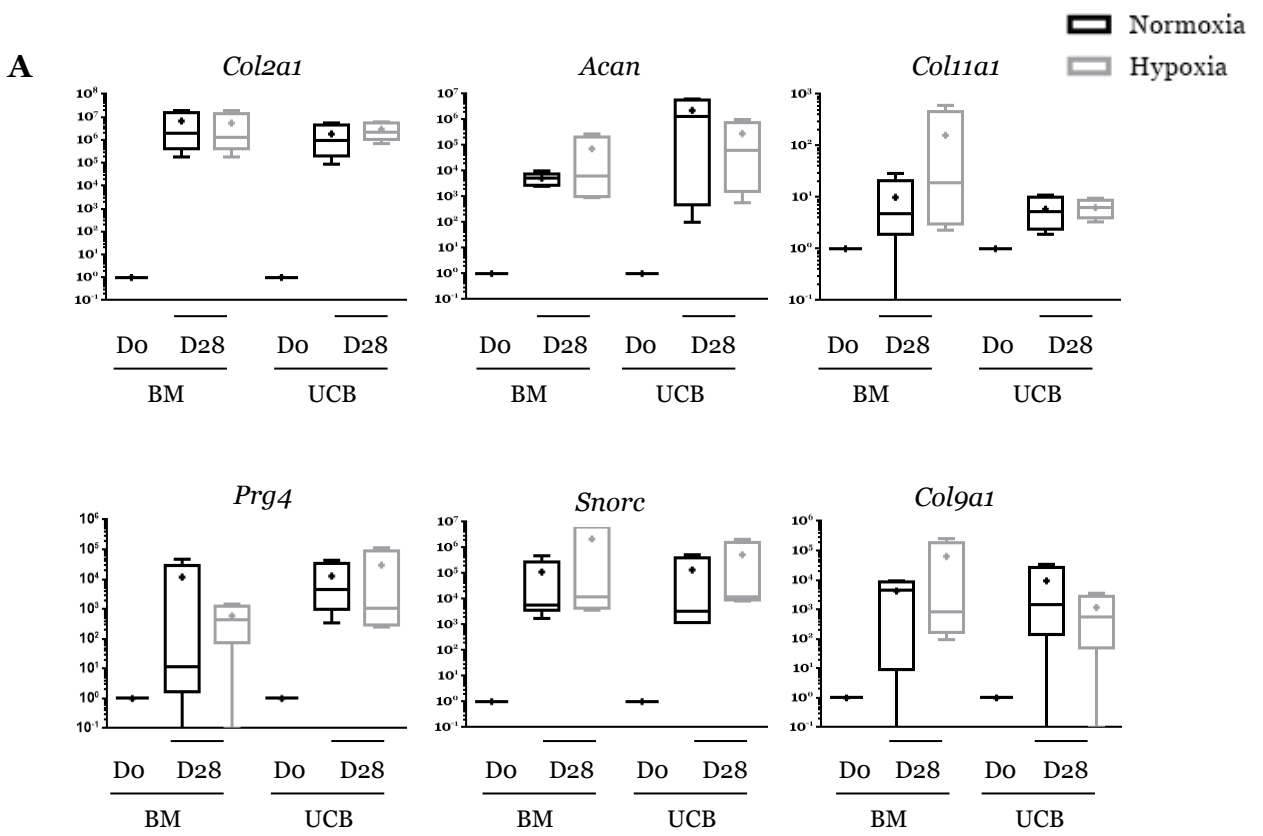


Figure 7



B

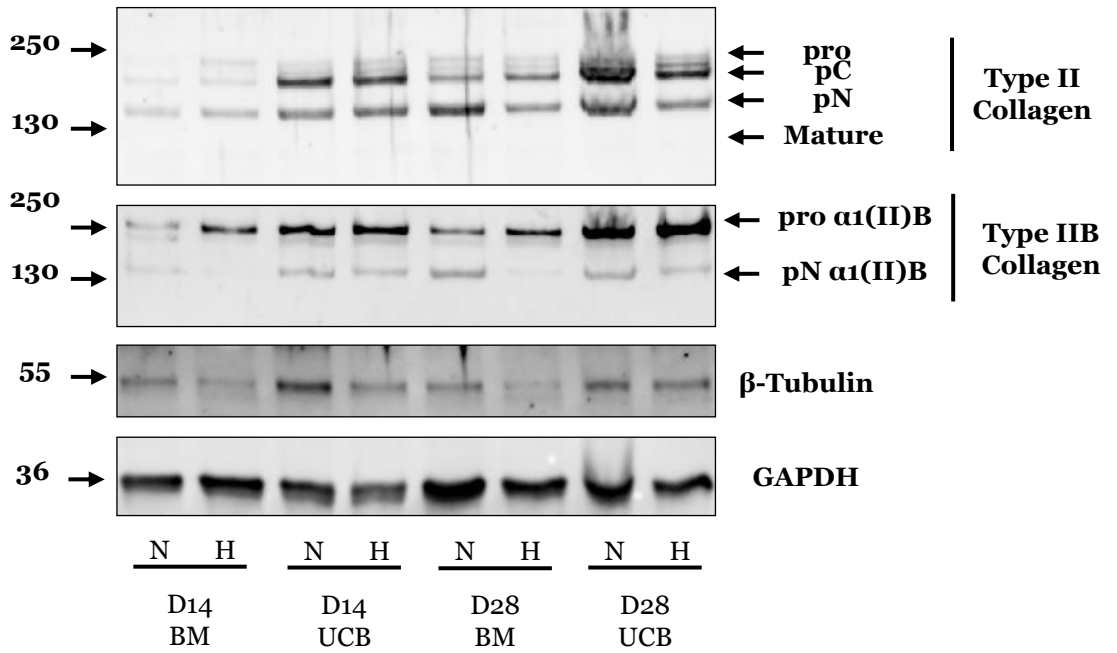
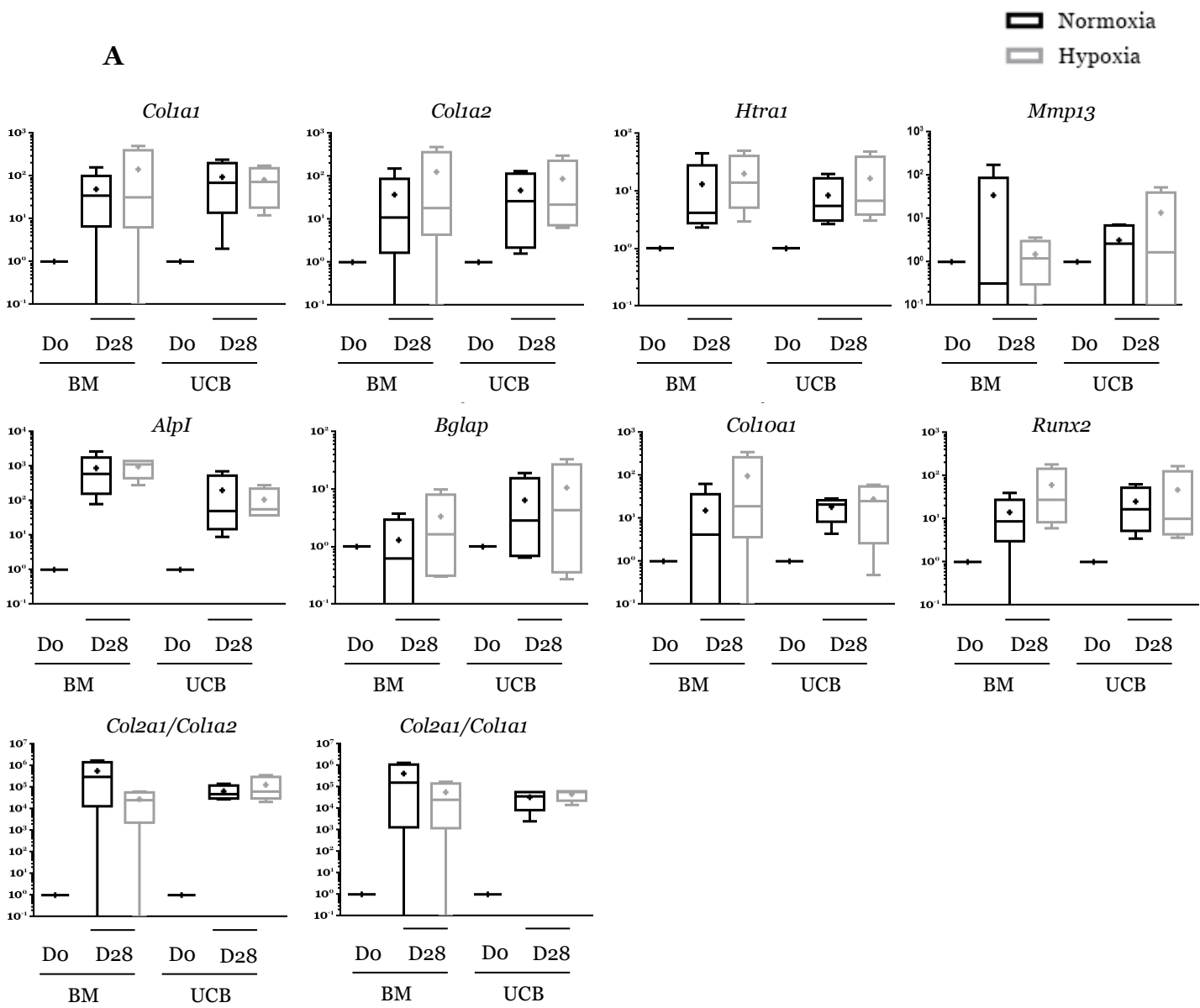


Figure 8



B

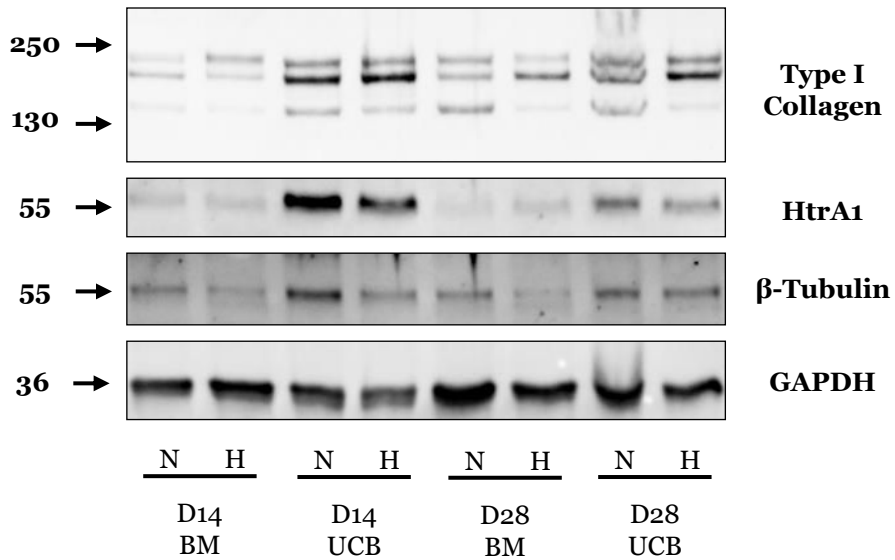


Figure 9

Normoxia

Hypoxia

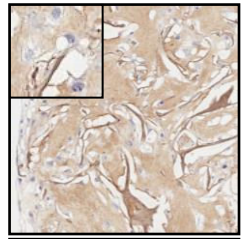
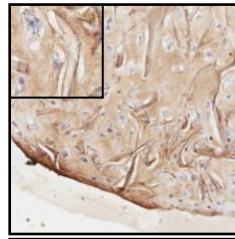
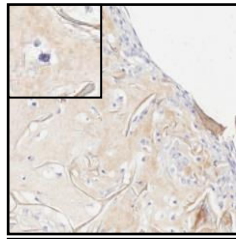
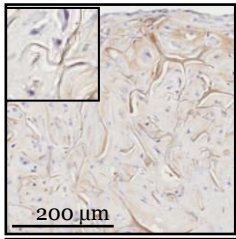
UCB-MSC

BM-MSC

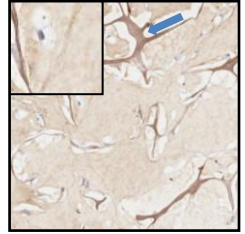
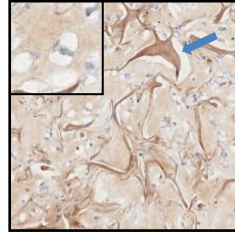
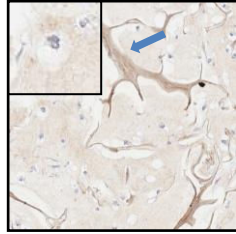
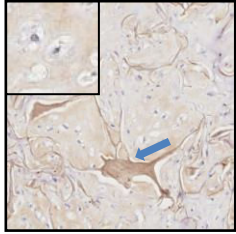
UCB-MSC

BM-MSC

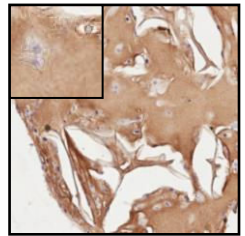
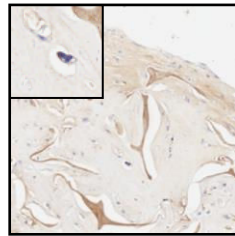
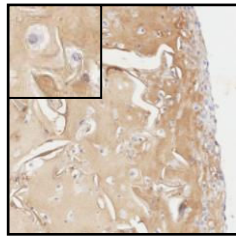
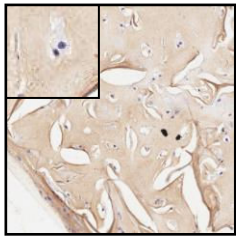
D14 Periphery



Center



D28 Periphery



Center

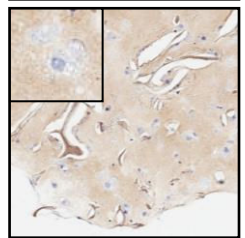
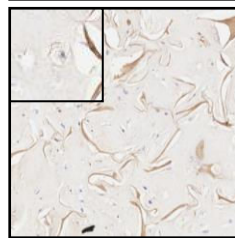
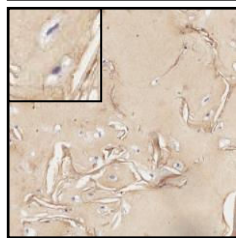
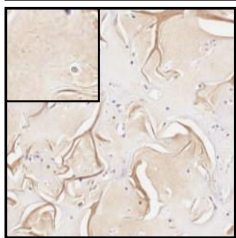


Figure 10

Normoxia

Hypoxia

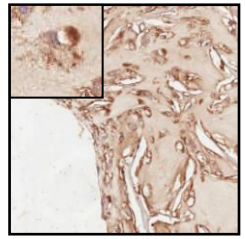
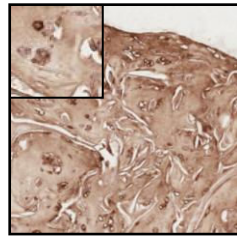
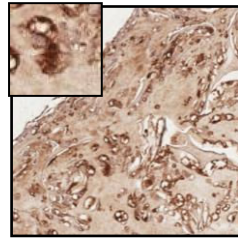
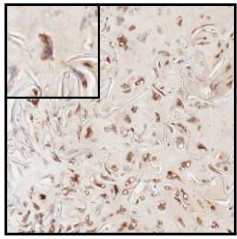
UCB-MSC

BM-MSC

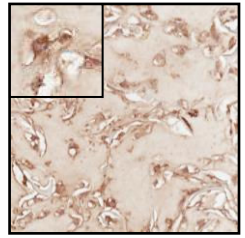
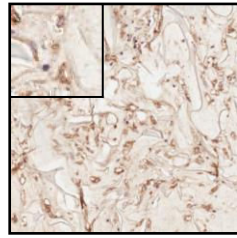
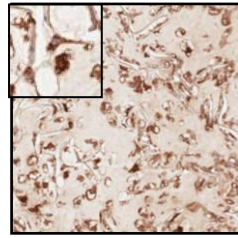
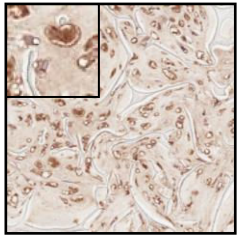
UCB-MSC

BM-MSC

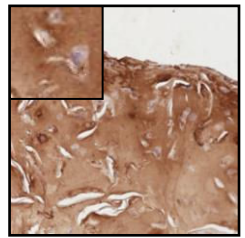
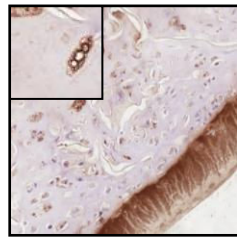
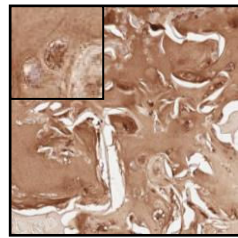
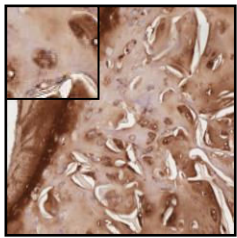
D14
Periphery



Center



D28
Periphery



Center

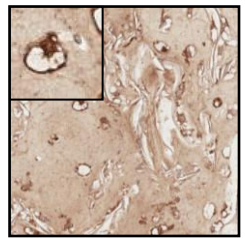
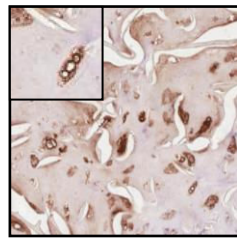
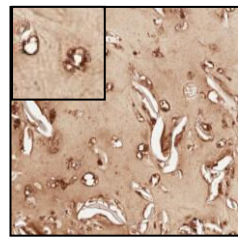
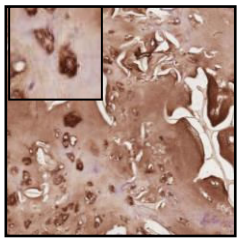


Figure 11

Normoxia

Hypoxia

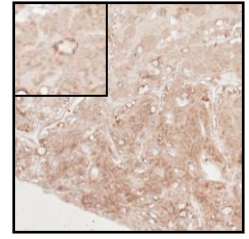
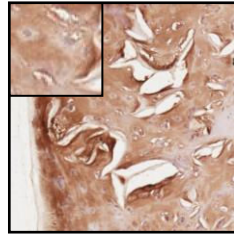
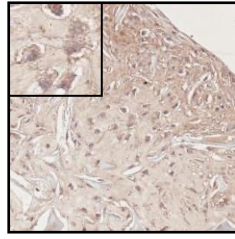
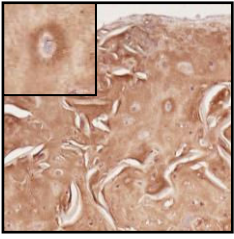
UCB-MSC

BM-MSC

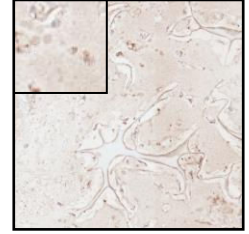
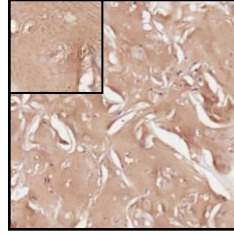
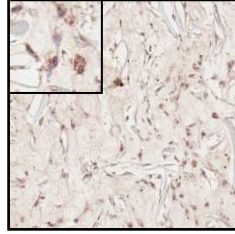
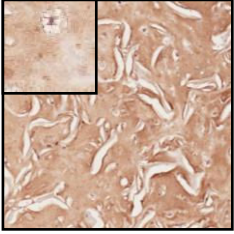
UCB-MSC

BM-MSC

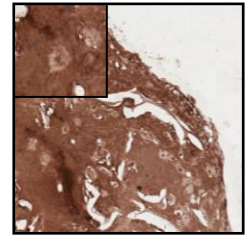
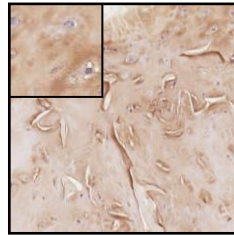
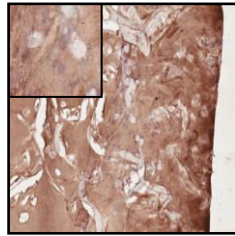
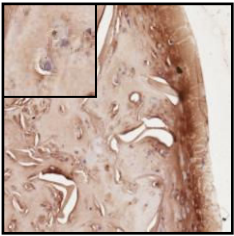
D14
Periphery



Center



D28
Periphery



Center

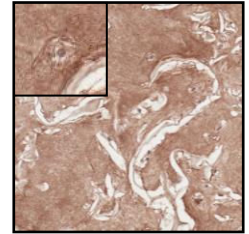
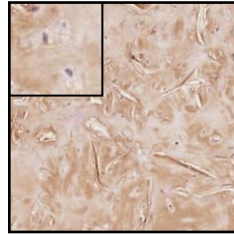
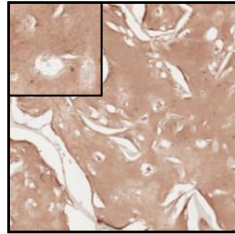
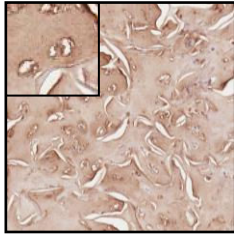


Figure 12

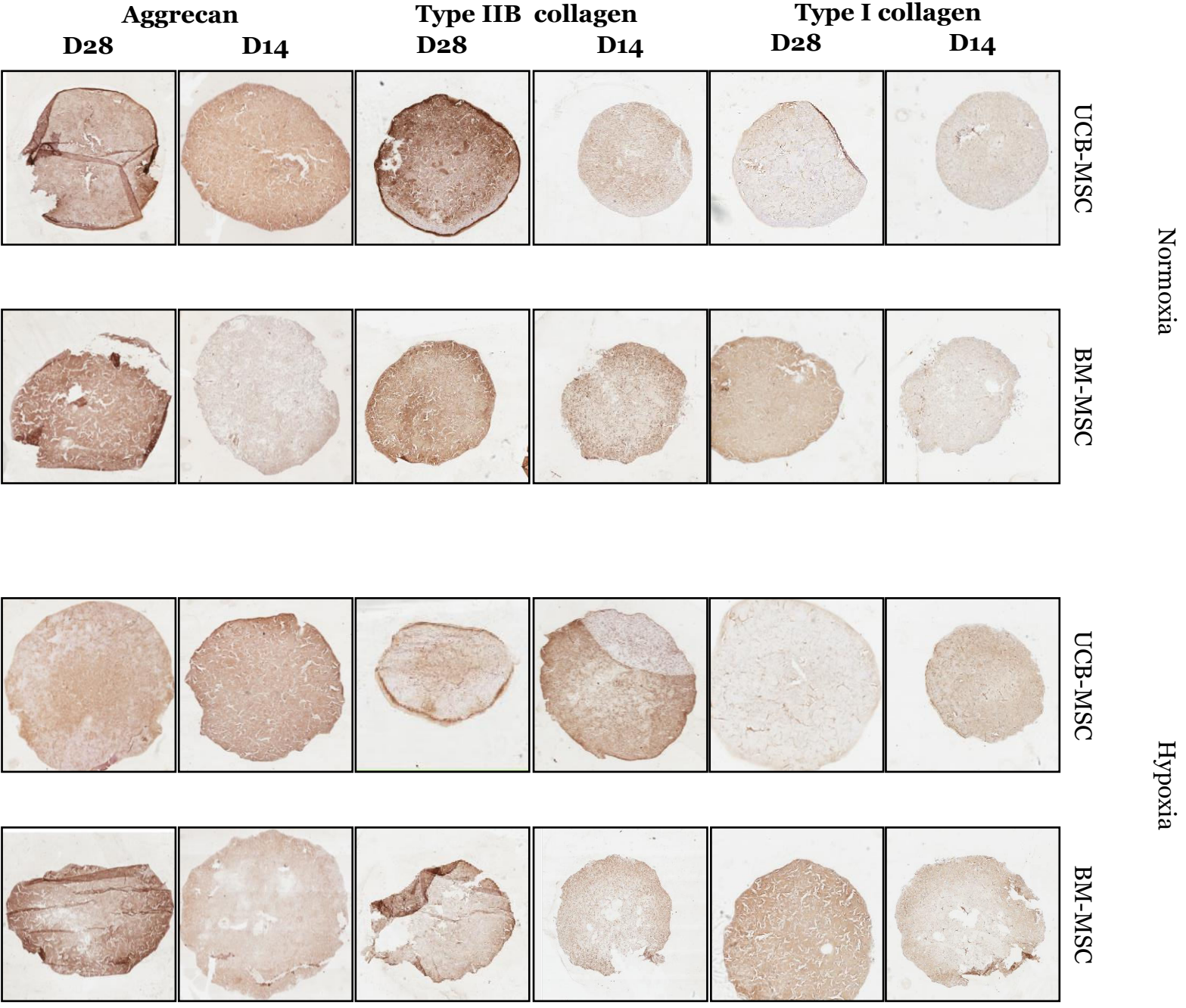


Figure 13

C. Conclusions de l'article #4

Les travaux réalisés dans cet article visaient à comparer deux sources équine de CSM, les CSM issues de MO et les CSM issues de SCO, pour déterminer la meilleure source à des fins d'ingénierie tissulaire du cartilage.

Nous les avons ainsi comparées lors de leurs caractérisations respectives, par les niveaux de transcrits et de protéines caractéristiques d'un cartilage hyalin, ou non, à leur état basal ou après différenciation chondrogénique. Pour induire la différenciation des CSM, nous les avons ensemencées au sein d'éponges de collagène de types I/III, que nous avons placées en normoxie ou en hypoxie pendant 28 jours, et en présence de BMP-2 et TGF- β 1.

Dès leur caractérisation, nous avons remarqué des différences entre les deux sources de CSM, que ce soit dans leur capacité de différenciation en adipocytes, dans leur immunophénotypage ou leur capacité de prolifération. Lors de l'étude de l'expression des ARNm et des protéines à leur état indifférencié, nous avons aussi remarqué des différences. L'ensemble de ces différences laissent supposer que les deux sources de CSM auraient des capacités de différenciation chondrogénique différentes. Effectivement, sur l'ensemble des 28 jours de culture, les CSM de SCO produisent une quantité des protéines matricielles étudiées plus importante que les CSM de MO, que ce soient des protéines typiques d'un cartilage hyalin mais aussi atypiques, ce qui est défavorable. De plus, l'immunohistochimie réalisée sur le néo-substitut cartilagineux montre que la répartition, notamment du collagène de type IIB, est plus hétérogène lorsque les CSM de SCO sont utilisées, ce qui est aussi défavorable puisque les propriétés mécaniques du substitut cartilagineux pourraient être moindres. Néanmoins, de 21 à 28 jours, les molécules atypiques d'un cartilage hyalin comme le collagène de type I ont une expression protéique diminuée uniquement lorsque les CSM de SCO sont utilisées, au contraire des collagènes de types II et IIB, qui ont des niveaux qui ne cessent d'augmenter.

Finalement, le critère essentiel de la facilité de prélèvement et d'isolement sont plutôt en faveur de la MO équine puisqu'ils peuvent être réalisés toute l'année contrairement au CSM de SCO qui ne peuvent être réalisés uniquement que lors des périodes de poulinages, qui généralement se déroulent au printemps.

L'ensemble des éléments cités ci-dessus nous permettent de suggérer que les CSM issues de MO équine sont les plus adaptées pour les stratégies d'ingénierie tissulaire du cartilage, avec le protocole de différenciation utilisé. Néanmoins, des études complémentaires devront être réalisées pour optimiser la différenciation des CSM de SCO, et comparer les deux sources de CSM après

différenciation chondrogénique en utilisant un protocole qui soit optimal pour chaque source de CSM.

V. Effet du sécrétome de CSM sur le phénotype chondrocytaire

A. Objectifs

Afin d'améliorer les premières générations d'**Ingénierie Cellulaire et Tissulaire (ICT)** du cartilage, de nombreuses études se sont attachées à évaluer le potentiel chondrogénique des cellules souches. Parmi les cellules souches, la différenciation de CSM en chondrocytes constitue une approche attractive, mais certains inconvénients persistent. En effet le statut de différenciation des CSM demeure généralement perfectible. Cependant, au-delà de leurs capacités de différenciation, les CSM sont capables de sécréter une variété de molécules/vésicules qui leur permet d'assurer leurs fonctions physiologiques, dont la réparation tissulaire. Ainsi, l'ensemble des propriétés des CSM sont intéressantes en vue de leur utilisation pour améliorer le traitement de l'arthrose. Des études *in vivo* ont déjà montré que des injections intra-articulaires de CSM permettaient de favoriser la régénération de lésions chondrales et de diminuer l'inflammation.

D'un autre côté, l'utilisation des chondrocytes en TCA demeure l'approche de référence. Cependant, la dédifférenciation des chondrocytes lors de leur indispensable amplification constitue un obstacle, alors que leur redifférenciation demeure perfectible. La richesse du sécrétome des CSM pourrait offrir des alternatives afin d'optimiser les stratégies actuelles de TCA. C'est pourquoi, en parallèle des études *in vivo*, d'autres équipes ont étudié l'impact d'une co-culture de CSM et de chondrocytes afin de produire un substitut cartilagineux ayant des caractéristiques proches du cartilage hyalin articulaire. L'ensemble de ces travaux est parfois discordant. En effet, alors que certaines études ont montré les bénéfices sur le phénotype chondrocytaire d'une co-culture indirecte, lorsque les deux types cellulaires n'ont pas d'interactions physiques, d'autres n'en ont montrés aucun. Nous sommes donc partis du constat que ces résultats différents pouvaient provenir de l'utilisation de modèles de culture différents et avons donc étudié la co-culture CSM chondrocytes avec nos modèles de culture.

Les premiers résultats de notre étude sont donc destinés à évaluer l'effet sur le phénotype chondrocytaire d'une co-culture indirecte de CSM de MO et de chondrocytes cultivés de 7 à 14 jours en monocouche ou dans une éponge de collagène de types I/III. Nous avons aussi cherché à évaluer l'effet de MC à partir de CSM sur le phénotype chondrocytaire et leur capacité de migration. Par ailleurs, le fait que les CSM sécrètent une grande variété de vésicules, dont les nEV, et que l'on impute différentes activités biologiques aux nEV, nous avons tenté de caractériser ces nEV dans le MC à partir de CSM. De surcroît, les nEV

pourraient offrir de réelles alternatives pour la prévention ou le traitement des lésions chondrales. Pour cela, nous avons établi une collaboration avec un spécialiste de ce domaine, le Dr Velot (UMR IMoPA 7365 CNRS-Université de Lorraine).

B. Matériel et méthodes

Isolement et culture des CSM

Les CSM ont été isolées à partir de prélèvements sternaux de MO sur des chevaux âgés de 2 à 4 ans. L'isolement et la caractérisation des CSM a été faite selon la méthode précédemment décrite par Branly *et al.* en 2017. Les CSM sont amplifiées dans du milieu « **Dulbecco's modified Eagle medium** » (DMEM) contenant 1 g/l de glucose (Invitrogen Life Technologies), 20% de **Sérum de Veau Foetal (SVF)** décomplémenté (Invitrogen Life Technologies) et 1% d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine et fungizone, Lonza). A confluence, les cellules sont rincées avec du « **Phosphate Buffered Saline** » (PBS) 1X (Invitrogen Life Technologies), puis décollées par la trypsine (0,25% trypsine / 1 mM « **Ethylenediaminetetraacetic acid** » (EDTA), Invitrogen Life Technologies), comptées et réensemencées.

Isolement et culture des chondrocytes articulaires équins

Les **Chondrocytes Articulaires Equins (CAE)** ont été isolés à partir de cartilage des condyles carpiens et fémoraux de chevaux âgés de 4 à 10 ans. Les parties visuellement saines ont été disséquées de manière à obtenir de fins copeaux de quelques millimètres d'épaisseur. Les chondrocytes ont ensuite été isolés par digestions successives, à 37°C, de 45 min avec 2 mg/ml de protéase de *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich) puis 18 heures en présence de 2 mg/ml de collagénase de type I de *Clostridium histolyticum* (Invitrogen Life Technologies). Les deux enzymes ont été reprises dans du DMEM à 4,5 g/l de glucose. Une fois les étapes de digestion terminées, la suspension cellulaire a été filtrée sur un tamis en nylon de 70 µM, puis les cellules ont été comptées et ensemencées à une densité de 2×10^4 cellules/cm² et amplifiées en présence de DMEM à 4,5 g/l de glucose contenant 10% de SVF (Invitrogen Life Technologies) et 1% d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine et fungizone, Lonza) (milieu 2D).

A confluence, les cellules sont rincées avec du PBS 1X, puis décollées par la trypsine, comptées et réensemencées.

Expériences de co-cultures

Les expériences de co-culture se sont déroulées en hypoxie (3% O₂). En P3, les chondrocytes sont ensemencés en éponges de collagène de types I/III (800000 cellules/éponge), puis, elles sont disposées dans des plaques 6 puits. Des chondrocytes en P3 ont aussi été ensemencés en monocouche dans des plaques 6 puits à raison de 20 000 cellules/cm². Les chondrocytes

ensemencés en biomatériau sont cultivés en présence de DMEM (4,5 g/l de glucose), contenant 2% de SVF, 1% d'antibiotiques et 50 µg/ml d'acide ascorbique (milieu 3D). Les cellules en monocouche sont cultivées dans le milieu d'amplification.

En parallèle, en P3, les CSM sont ensemencées dans des inserts (0,4 µm, PET transparent, Falcon) à une densité permettant d'avoir des *ratios* CSM/chondrocytes de 1/20, 1/12, 1/8, 1/4. Nous avons opté pour des *ratios* faibles pour correspondre à la situation physiologique du cartilage, et une étude a montré la pertinence d'utiliser de tels *ratios* afin d'avoir un effet immunomodulateur optimal du sécrétome des CSM humaines sur les chondrocytes (**Manferdini et al., 2013**). Les CSM sont cultivées une journée en présence de leur milieu d'amplification, puis le lendemain sont transférées dans les puits contenant les chondrocytes et leurs milieux respectifs.

Les DO correspondent aux cellules amplifiées jusqu'en P3 en monocouche.

Nous avons utilisé comme contrôle positif des chondrocytes cultivés en éponges, en présence de milieu 3D et de BMP-2 (50 ng/ml, dibotermine α, Inductos®, Medtronic BioPharma B.V.)

Les milieux sont changés deux fois par semaine, et l'expérience est arrêtée 7 jours et 14 jours après la mise en présence des deux types cellulaires.

Préparation des milieux conditionnés

Les milieux 2D et 3D sont mis en présence de CSM cultivées en monocouche à 70/80% de confluence et en normoxie (21% O₂), durant 24 h. A l'issue des 24 h, les milieux sont récupérés puis filtrés (0,20 µm) et stockés à -80°C.

Extraction des ARN

A l'issue de la culture, les ARN totaux sont extraits par l'utilisation du TRIzol Reagent® (Invitrogen). Afin d'estimer la quantité et la qualité en ARN des échantillons, les absorbances à 260 nm et 280 nm sont évaluées par l'utilisation d'un Nanodrop 2000 (Thermo scientific), la pureté des ARN étant déterminée en évaluant le rapport DO 260 nm / DO 280 nm.

Rétro-transcription des ARN

Pour éliminer une éventuelle contamination par de l'**Acide DésoxyriboNucléique (ADN)**, 1 µg d'ARN totaux est traité par la désoxyribonucléase I (DNase I; 2,5 mM ; Invitrogen). Après incubation de 15 min à 25°C, le traitement est arrêté en inactivant la DNase par de l'EDTA (0,5 mM) durant 10 min à 65°C. L'absence d'ADN dans les échantillons est vérifiée par amplification par « **Polymerase Chain Reaction** » (**PCR**) de la β-actine.

La visualisation d'une éventuelle amplification se fait par électrophorèse des échantillons sur gel d'agarose 1% et TAE 0,5X (Tris-Acétate-EDTA) contenant du Gel Red (0,005%).

Les ARN-totaux sont rétro-transcrits en ADNc par l'action d'une transcriptase inverse de type « **Moloney Murine Leukemia Virus** » (**M-MLV**) (Invitrogen) en présence d'oligodT (2,5 µM) (Invitrogen), des quatre désoxyribonucléotides (dNTP) (Invitrogen) à 0,8 mM, de 5 µl de tampon 5X de l'enzyme et d'une quantité suffisante d'eau DEPC pour un volume final de 25 µl. L'hybridation des oligodT avec la queue polyA se déroule pendant 10 min à 25°C. La réaction de rétro-transcription est effectuée durant 1 h à 37°C et l'inactivation de l'enzyme est réalisée à 90°C durant 15 min. Le bon déroulement de la rétro-transcription est contrôlé par amplification de la β-actine par PCR, puis migration sur gel d'agarose.

PCR en temps réel

Afin de quantifier le taux moyen d'expression des ARNm, l'amplification des ADNc est suivie en temps réel via l'utilisation du SYBR® Green supermix (Bio-rad) dans l'appareil CFX96 Touch (Bio-Rad). Les séquences des amorces sens et anti-sens utilisées pour les différentes PCR en temps réel sont indiquées dans le **Tableau R1**. Les amplifications se font en triplicats. La PCR est réalisée sur une plaque de 96 puits avec 10 µl de mélange réactionnel contenant du « Power SYBR® Green PCR master mix » (SYBR® Green, Taq polymérase, désoxyribonucléotides), les amorces sens et anti-sens ciblant les ADNc respectifs, ainsi que 5 µl d'ADNc dilués au 1/100^{ème}. Le cycle seuil (ct) est déterminé. Après s'être assuré que les messagers du gène étudié et du gène domestique de la β-actine montraient une efficacité d'amplification équivalente, l'expression relative des gènes à analyser est alors calculée en utilisant la méthode comparative des Ct.

Tests de blessure

La culture des chondrocyte s'est déroulée en normoxie (21% O₂). Les tests de blessure ont été réalisés de 3 manières différentes.

Blessures réalisées par l'Incucyte Woundmaker (Essen Bioscience) :

22 500 chondrocytes (P3) sontensemencés par puits de plaques 96 puits (Incucyte ImageLock, Essen Bioscience) en présence de milieu DMEM à 4,5 g/l de glucose contenant 10% de SVF et un mélange d'antibiotiques. 24 h post-ensemencement, les traitements avec les MC (ou « **Conditionned Medium** » (**CM**)) ont été effectués. 30 h post-ensemencement (T= 0 h), la blessure est réalisée avec l'Incucyte Woundmaker (Essen Bioscience). 2 rinçages par le PBS sont réalisés puis les traitements sont ajoutés.

Blessures réalisées par retrait de la cloison des Ibidi :

70 µl d'une suspension de chondrocytes (P3) (250 000 cellules/ml) sont déposés dans chacune des chambres de l'ibidi (Biovalley). Le lendemain, les chondrocytes sont mis en présence des différents traitements. 24 h après, la blessure est réalisée par le retrait de la cloison de l'ibidi puis deux rinçages par le PBS sont effectués et les traitements sont ajoutés.

Blessures réalisées par une éraflure avec un embout de pipette de 200 µl :

Les chondrocytes (P3) sontensemencés dans des puits de 9,6 cm² (20 000/cm²) puis cultivés dans du milieu d'amplification jusqu'à 80% de confluence. La veille de la blessure, le milieu est remplacé par les traitements. Une fois la blessure faite (avec un cône de P200), les puits sont rincés par le PBS puis les traitements sont renouvelés.

Nanosight

Les échantillons de CM ont subi une centrifugation de 30 min à 10 000 g afin de retirer les particules ayant une taille supérieure à 300 nm. Une étape de filtration (0,22 µm) a ensuite été opérée sur une partie des échantillons avant analyse de la suspension de CM par Nanosight®. Cette technologie permet de mettre en évidence les différentes populations de particules en fonction de leur taille au sein des échantillons. La concentration totale en particules comprises entre 1 µm et 20 nm est également déterminée.

Afin de ne pas saturer les résultats, des dilutions dans du PBS (stérile et filtré) ont été réalisées pour les échantillons n'ayant pas été soumis à la filtration. Après quelques essais, une dilution au 1/10^{ème} a été retenue pour l'analyse des échantillons.

Cytométrie

La cytométrie en flux est utilisée afin de mettre en évidence la présence de protéines membranaires spécifiques des nEV (CD9, CD63 et CD81). Cette triade de marqueurs de la famille des tétraspanines doit être mise en évidence à la surface des particules de 30 à 150 nm qui ont été isolées afin de pouvoir les qualifier de nEV. Il faut dans un premier temps, après la centrifugation à 10 000 g, culotter les nanovésicules par ultracentrifugation (100 000 g durant 1 h). Les conditions sont différentes de celles par Nanosight® car les échantillons de particules doivent être mis en culot et non en suspension.

Analyses statistiques

Les expériences ont été reproduites 3 ou 4 fois avec des cellules provenant de chevaux différents. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test de Mann-Whitney

avec le logiciel Prism (Graphpad, San Diego, USA). Les valeurs $P \leq 0,05$ ont été considérées comme significatives.

C. Résultats

Lors de ces travaux préliminaires, nous nous sommes intéressés aux marqueurs permettant de caractériser le phénotype des chondrocytes et leur statut de prolifération. Le collagène de type I est associé aux chondrocytes différenciés alors que *Prg4* et le collagène de type II sont exprimés par des chondrocytes articulaire sains. *Ki67* et *Pcna* sont associés à la prolifération tandis que *P53* est corrélé à la senescence.

Nous nous sommes d'abord intéressés à l'effet d'une co-culture sur des chondrocytes cultivés en monocouche. L'expression du collagène de type I, à l'exception du *ratio* CSM/chondrocytes de 1/4 à D7, est significativement augmentée pour l'ensemble des autres *ratios*, à D7 et D14 par rapport aux Do (**Figure R1A**). Cependant, l'expression tend à être la plus élevée pour un *ratio* de 1/4 à D14.

Aucune différence significative n'est observée pour l'expression du collagène de type II, même s'il se dégage une tendance à une expression plus élevée à D14 pour l'ensemble des *ratios* et de manière plus accentuée pour 1/8 et 1/4 qui atteignent un niveau semblable à celui des « **equine Articular Chondrocytes** » (**eAC**). Ainsi, il semblerait que le *ratio* *Col2a1/Col1a1* soit augmenté lorsque les chondrocytes sont cultivés en présence de CSM, particulièrement à D14. Dans le même sens que *Col2a1*, la co-culture, à l'exception du *ratio* 1/20, induit significativement l'expression de *Prg4*. Les molécules associées à la prolifération (*Ki67* et *Pcna*) ont aussi une expression augmentée en présence de CSM, quel que soit le *ratio* et le temps de culture, et atteignent des niveaux comparables aux eAC, voire supérieurs (1/4) (**Figure R1B**). Cependant, une augmentation de l'expression de *P53* est aussi observée.

Lorsque les chondrocytes sont cultivés en 3D, la co-culture avec les CSM induit une augmentation significative de l'expression du collagène de type I pour le *ratio* 1/20 après 7 jours et 14 jours de culture ainsi que pour le *ratio* 1/8 après 7 jours de culture (**Figure R2A**). Les autres *ratios*, quel que soit le temps de culture, semblent tendre vers l'augmentation, par rapport aux Do, mais sont comparables (D7) aux contrôles positifs de différenciation avec la BMP-2 ou inférieurs (D14). L'expression du collagène de type II n'est pas modulée en présence des CSM à D7 et D14 et reste inférieure aux contrôles cultivés en présence de la BMP-2 et aux eAC, à l'exception du *ratio* 1/20 après 14 jours de culture. En conséquence, le *ratio* *Col2a1/Col1a1* n'est pas modulé par rapport aux DO et est inférieur aux eAC. Au contraire, lorsque les chondrocytes sont cultivés en présence de CSM, l'expression de *Prg4* est comparable aux contrôles cultivés en présence de BMP-2 à D7 et est significativement augmentée à D14, par rapport aux Do. *Ki67* et *Pcna* ont une expression semblable quels que soient les *ratios* (**Figure R2B**). Après 7 jours de culture en présence des CSM, l'expression

de ces deux molécules est à un niveau comparable au cas BMP-2, et est significativement augmentée par rapport à Do. A D14, quel que soit le *ratio*, les expressions de *Ki67* et *Pcna* sont significativement plus élevées qu'à Do, avec le *ratio* 1/20 qui induit la plus forte augmentation, même si elle reste inférieure au cas BMP-2.

La co-culture de CSM et de chondrocytes entraîne une modulation de l'expression des ARNm des marqueurs phénotypiques et de prolifération. Puisqu'il s'agit d'une co-culture indirecte, nous avons supposé que le conditionnement des milieux utilisés pour la culture des chondrocytes en monocouche (milieu 2D) ou en 3D (milieu 3D) en présence des CSM pourrait avoir des effets similaires. Après 7 jours, la culture des chondrocytes en présence des CM n'induit pas de modification de l'expression du collagène de type I et du collagène de type II ainsi que de *Prg4* (**Figure R3A**). Ainsi, le *ratio Col2a1/Col1a1* n'est pas modulé par les CM. Au contraire, après 14 jours de culture, le milieu 3D CM semble augmenter l'expression du collagène de type I mais aussi celle du collagène de type II de manière à avoir un *ratio Col2a1/Col1a1* en faveur de la culture en présence de CM. L'expression de *Prg4* est aussi augmentée en présence du milieu 3D CM. Lorsque les chondrocytes sont cultivés en présence de milieu 2D CM, les expressions de *Prg4*, du collagène de type I, du collagène de type II sont inférieurs à ce que l'on observe lorsque les chondrocytes sont cultivés en présence de milieu 2D. Néanmoins, le *ratio Col2a1/Col1a1* n'est pas modulé par le CM. Après 7 ou 14 jours de culture, les CM n'induisent pas de modification de l'expression des molécules associées à la prolifération ou *P53*, à l'exception du milieu 2D CM après 14 jours de culture qui entraîne une diminution de l'expression de *Ki67* et *Pcna* mais aussi de *P53* (**Figure R3B**).

Afin d'apprécier de façon globale le comportement des chondrocytes soumis à un CM, nous avons tenté d'évaluer leur capacité de migration en présence de CM. Nous avons donc réalisé des tests de blessure selon différentes méthodes. Les graphiques représentent la densité cellulaire de la zone initialement blessée rapportée sur la densité totale (« **Relative Wound Density** » (**RWD**)). Lors des premières heures suivant la blessure, la RWD des puits cultivés en présence de CM augmente plus rapidement, par rapport au contrôle (**Figure R4A**). Le CM obtenu à partir de la souche de CSM de MO Dimona permet l'augmentation la plus rapide. Ces résultats sont confirmés par les prises d'image 36 heures après blessure, sur lesquelles nous observons que les cellules juxtaposant la zone blessée adoptent une forme allongée, avec des projections cytoplasmiques, lorsqu'elles sont cultivées en présence de CM (**Figure R4B**). Lorsque les milieux sont additionnés de BMP-2, les mêmes conclusions sont faites : Les CM induisent une augmentation de la RWD plus importante que le milieu contrôle et davantage de projections cytoplasmiques sont observées, quel que soit le CM (**Figure R5 A et B**).

Nous avons ensuite réalisé des blessures par système Ibidi. Les résultats observés, en présence de BMP-2 ou non, semblent indiquer que la fermeture de la blessure est plus rapide en présence de CM (**Figure R6**). Il en est de même lorsque la blessure est réalisée par un embout de pipette (**Figure R7**).

Enfinement, en collaboration le Dr Velot E. (UMR IMoPA 7365 CNRS-Université de Lorraine), nous avons cherché à déterminer la présence de nEV dans les CM à partir de CSM de MO. L'analyse par Nanosight permet de déterminer que la taille moyenne des particules présentes dans le CM non filtré est d'environ 200 nm (respectivement 198,4 nm pour la souche Luna et 197,6 nm pour la souche Active) à des concentrations respectives de $8,69 \times 10^9$ particules/ml et $8,12 \times 10^9$ particules/ml (**Figure R8A**).

Lorsque les échantillons sont filtrés, le CM à partir de la souche Luna présente des particules d'une taille moyenne de 134,9 nm avec une concentration de $2,68 \times 10^9$ particules/ml et, pour Active, la taille moyenne est de 149,5 nm avec une concentration de $1,35 \times 10^9$ particules/ml (**Figure R8B**). Après filtration, il a été observé une baisse très significative (entre 3 et 5 fois) de la concentration en particules totales, mais la proportion de particules dans l'échelle de taille des nEV (<150 nm) est bien supérieure et la population présente une meilleure homogénéité.

Afin de pouvoir qualifier les vésicules isolées de nEV, les membres de la famille des tétraspanines, CD9, 63, 81 doivent être mis en évidence à leur surface. Néanmoins, ces marqueurs membranaires n'ont pas pu être mis en évidence (<3% de marquage pour les 3 marqueurs) par cytométrie en flux que ce soit pour la souche Luna ou pour Active (**Figure R9**). Ceci est très certainement lié au fait que les anticorps humains ne semblent pas reconnaître ces marqueurs chez les cellules équines.

<i>Actin</i>	Forward	GATGATGATATCGCCGCGCTC
	Reverse	TCGCCCACGTATGAGTCCTT
<i>Col2a1</i>	Forward	GGCAATAGCAGGTTACGTACA
	Reverse	CGATAACAGTCTTGCCCCACTT
<i>Prg4</i>	Forward	CTACCACCCAACGCAACAAA
	Reverse	ACTGTTGTCTCCTTATTGGGTGT
<i>Col1a1</i>	Forward	CACCAATCACCTGCGTACAGAA
	Reverse	CAGATCACGTCATCGCACAAAC
<i>Ki67</i>	Forward	AAGCTGCACGTTTCATGGAGA
	Reverse	ACCCACAGTTCTTCCTCCGA
<i>Pcna</i>	Forward	GCGTGAACCTCACCAGTATGT
	Reverse	GCAAATTGCCCAGAAGGCAT
<i>P53</i>	Forward	CACCTGAGGTTGGCTCTGAC
	Reverse	GCACAAACACGCACCTCAAA

Tableau R1 : Primers used for RT-qPCR.

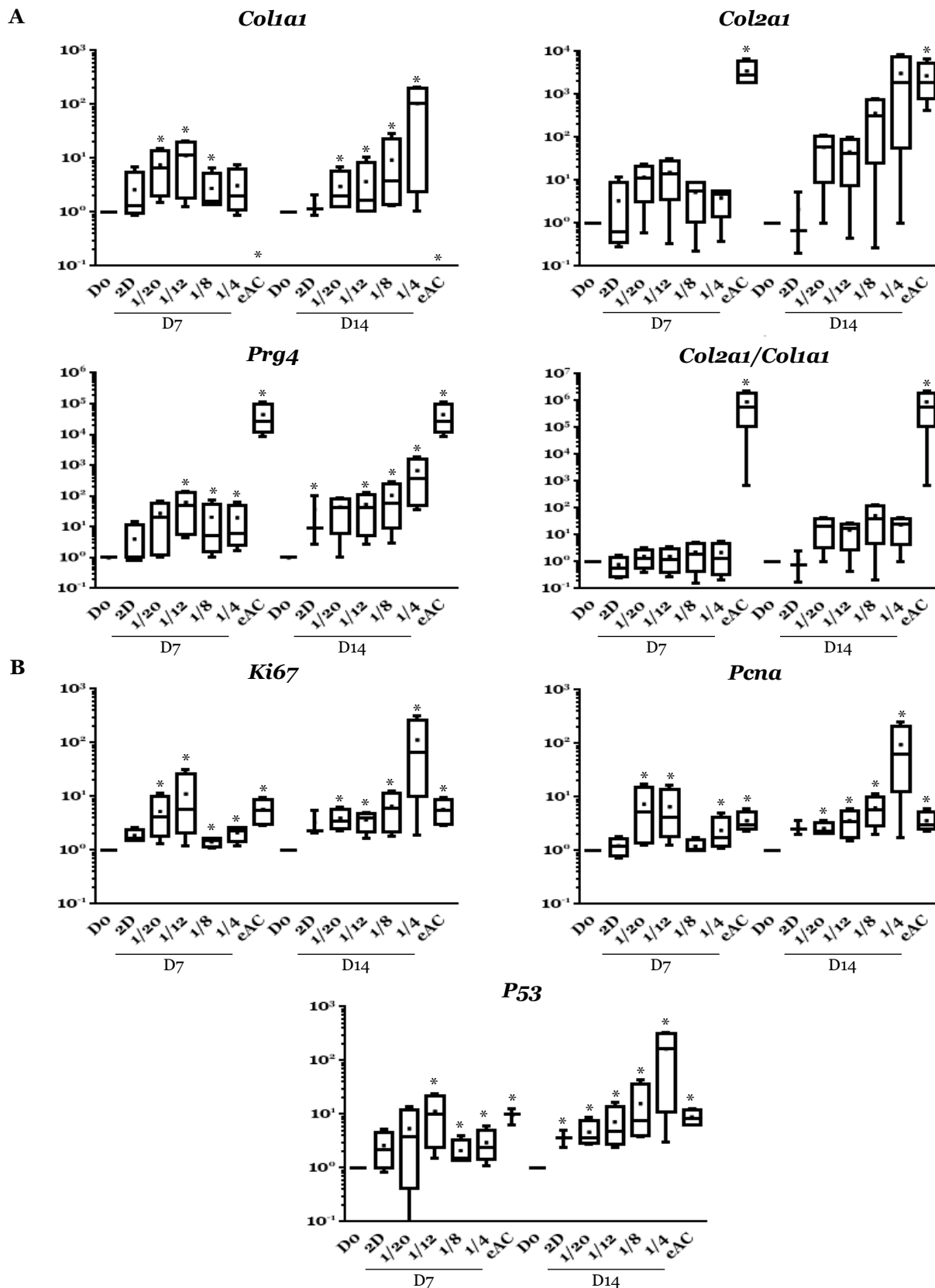
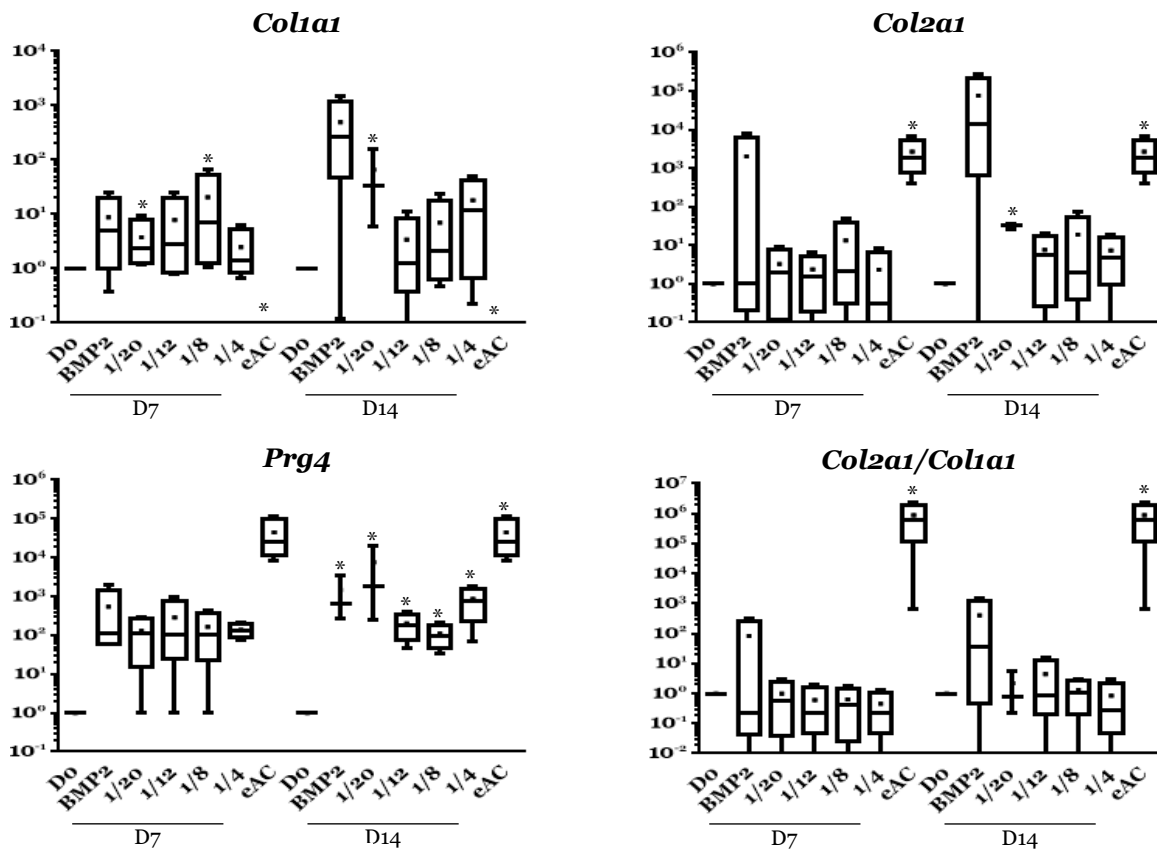


Figure R1 : Chondrocyte mRNA expression of ECM molecules and proliferation associated molecules when chondrocytes were seeded in monolayer and cocultured with MSC at different *ratio* for 7 or 14 days.

Chondrocytes were seeded in monolayer at 20 000 cells/cm². Then, MSC were seeded in the upper chamber at a density to obtain chondrocytes/MSC *ratios* from 1/20 to 1/4. Then, cells were cultured in DMEM HG supplemented with 10% of FBS and 1% antibiotics for 7 or 14 days. At the end of the culture, mRNA were extracted and RT-qPCR were performed to assess the mRNA levels of type I and II collagens, *Prg4* (A) and the mRNA amounts of *Ki67*, *Pena* and *P53*. The Do condition corresponds to chondrocytes cultured in monolayer at P4 with the amplification medium and the equine articular chondrocyte (eAC) condition corresponds to the mRNA extracted from chondrocytes at P0. mRNA levels were estimated by RT-qPCR after normalization relative to the β -*actin* reference gene. The results are represented as box plots (median, quartiles, extreme values) and the significance of the values was tested using a Mann-Whitney test (* $p < 0.05$).

A



B

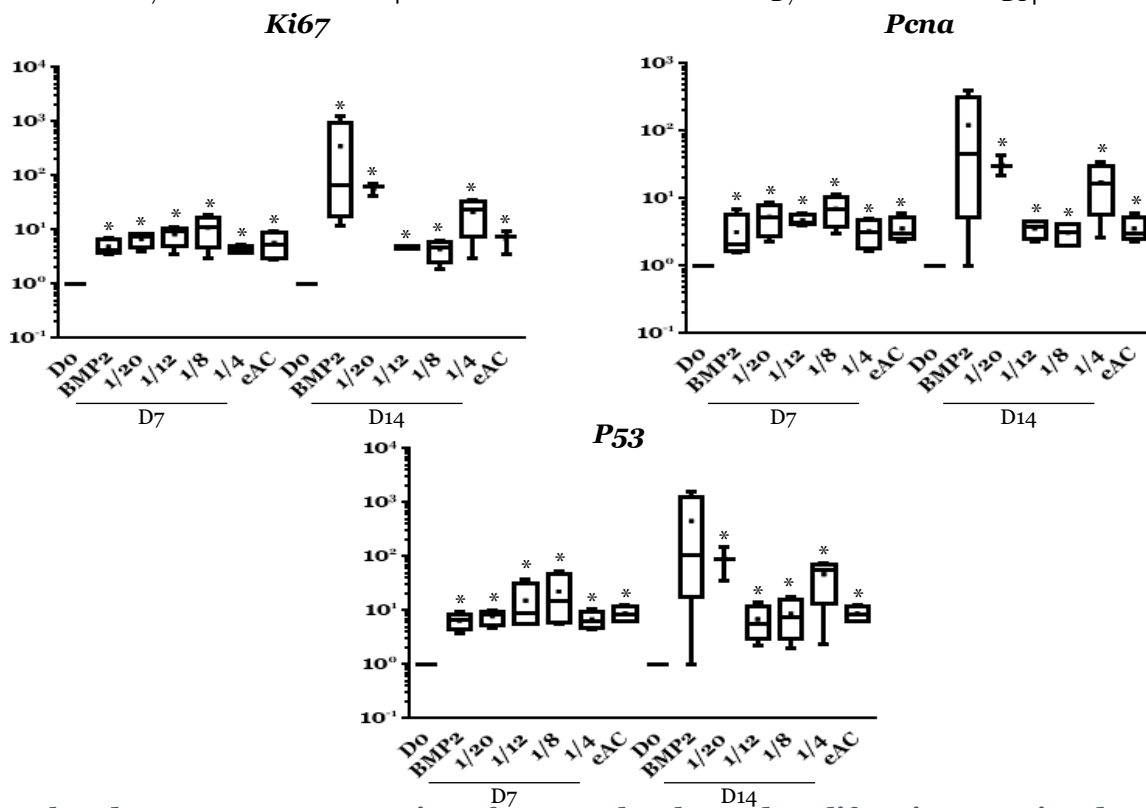
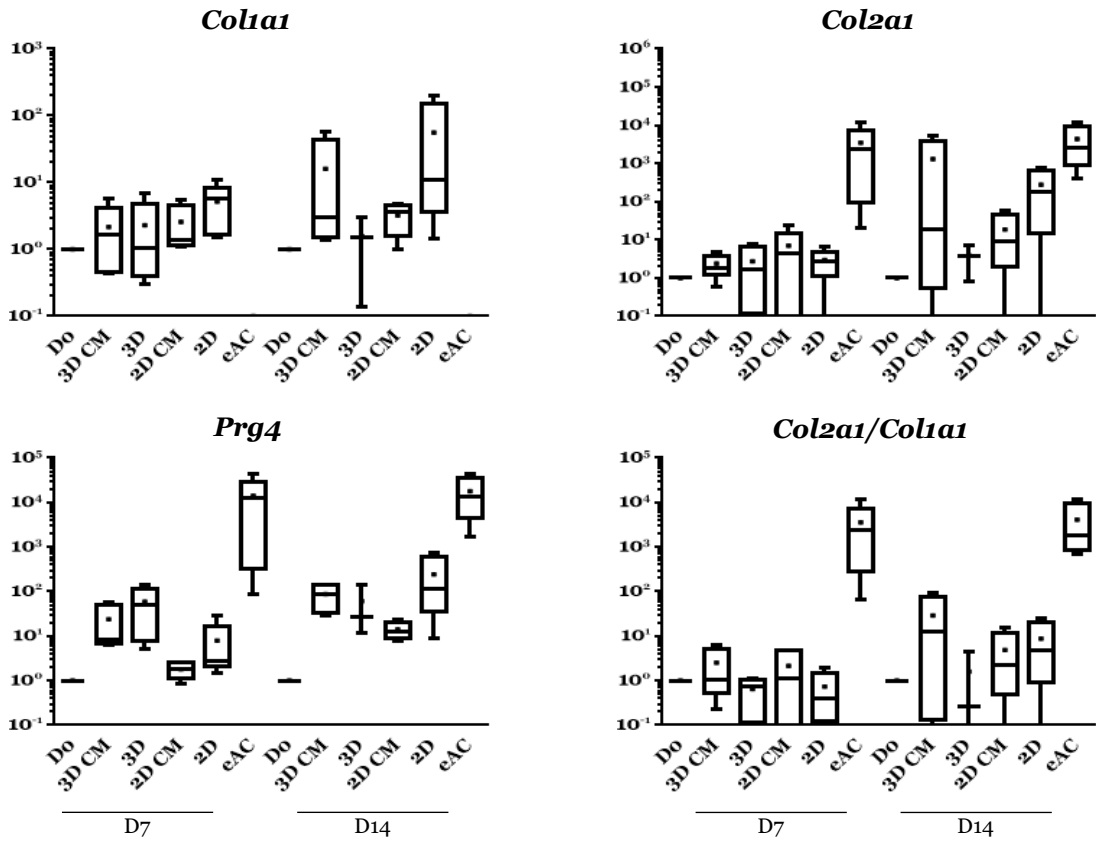


Figure R2 : Chondrocyte mRNA expression of ECM molecules and proliferation associated molecules when chondrocytes were seeded in 3D and cocultured with MSC at different ratio for 7 or 14 days.

Chondrocytes were seeded in type I/III collagen sponges at 800 000 cells/sponge. Then, MSC were seeded in the upper chamber at a density to obtain chondrocytes/MSC ratios from 1/20 to 1/4. Then, cells were cultured in DMEM HG supplemented with 2% of FBS, 50 μ g/ml of ascorbic acid and 1% antibiotics for 7 or 14 days in hypoxia (3% O_2). At the end of the culture, mRNA was extracted and RT-qPCR was performed to assess the mRNA levels of type I and II collagens, *Prg4* (A) and the mRNA amounts of *Ki67*, *PcnA* and *P53*. The Do condition corresponds to chondrocytes cultured in monolayer at P4 with the amplification medium and the equine articular chondrocyte (eAC) condition corresponds to the mRNA extracted from chondrocytes at the first passage. BMP-2 condition corresponds to chondrocytes culture in a type I/III collagen sponge in the presence of BMP-2 (50 ng/ml). mRNA levels were estimated by RT-qPCR after normalization relative to the β -actin reference gene. The results are represented as box plots (median, quartiles, extreme values) and the significance of the values was tested using a Mann-Whitney test (* $p <$

A



B

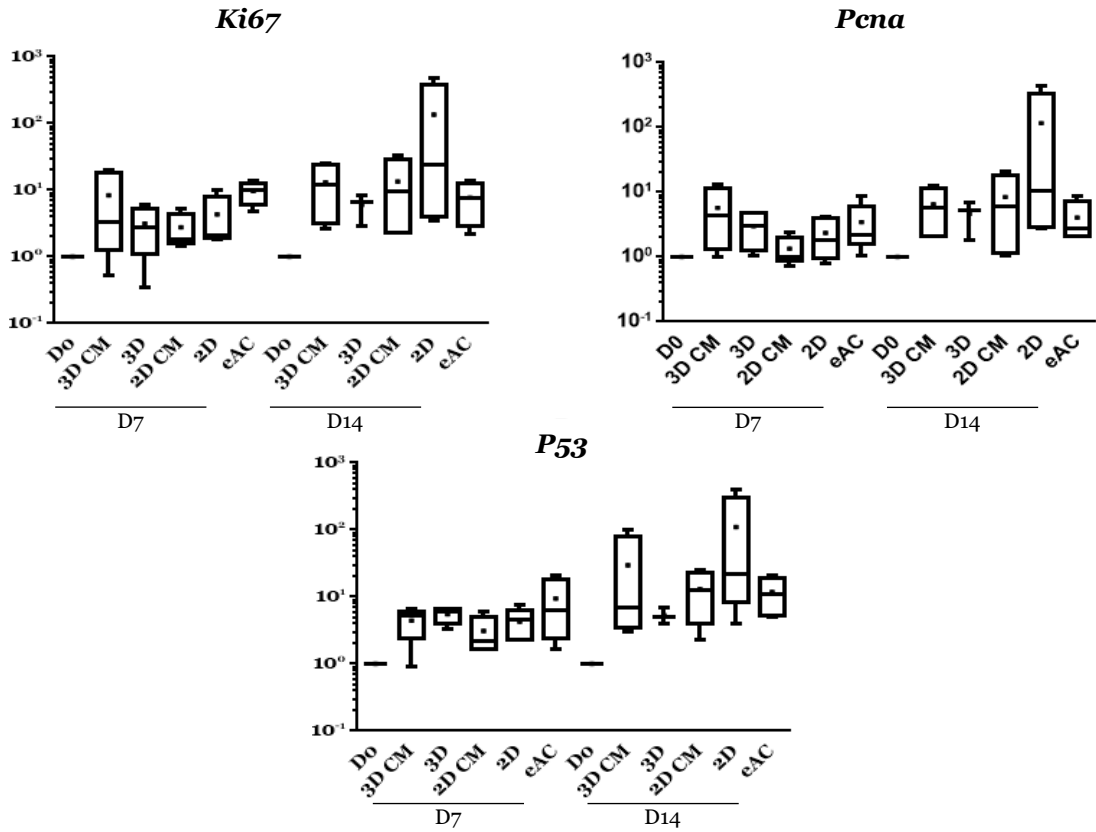
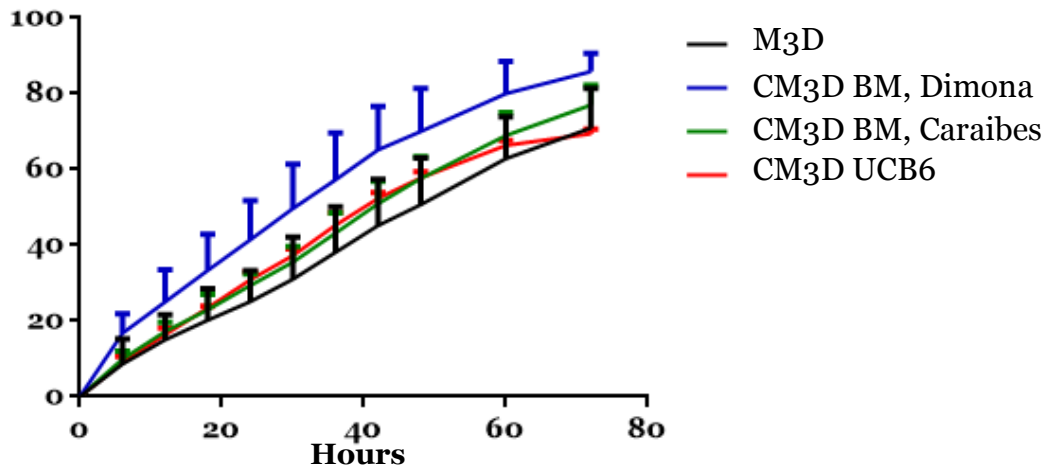


Figure R3 : Chondrocyte mRNA expression of ECM molecules and proliferation associated molecules when chondrocytes were cultured in the presence of CM.

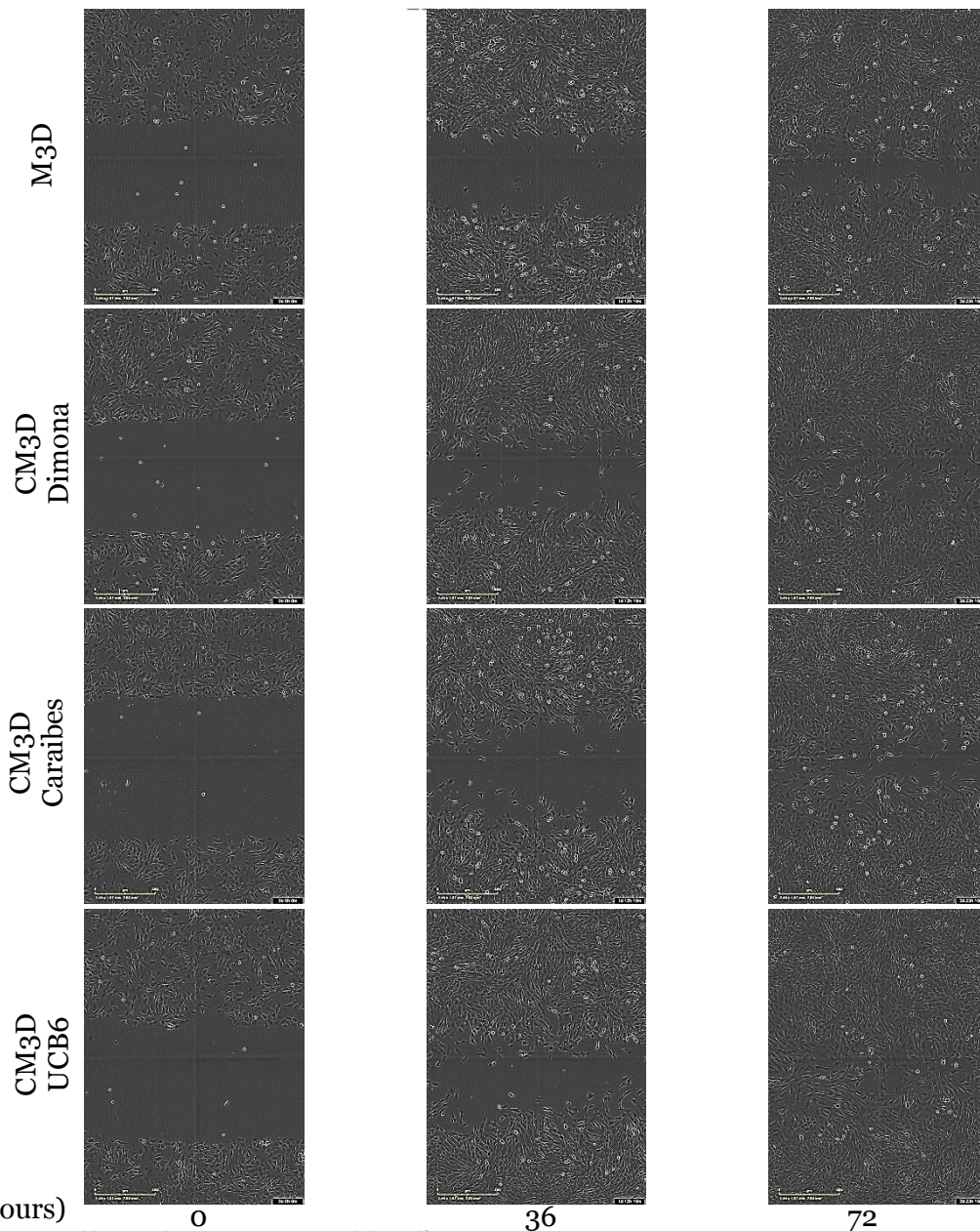
Chondrocyte were seeded in type I/III collagen sponges at 800 000 cells/sponge or in monolayer at 20 000 cells/cm². 24 h later, treatments were added for 7 or 14 days in hypoxia (3% O₂). At the end of the culture, mRNA were extracted and RT-qPCR were performed to assess the mRNA levels of type I and II collagens, *Prg4* (A) and the mRNA amounts of *Ki67*, *Pna* and *P53*. The Do condition corresponds to chondrocytes cultured in monolayer at P4 with the amplification medium and the equine articular chondrocyte (eAC) condition corresponds to the mRNA extracted from chondrocytes at the first passage. mRNA levels were estimated by RT-qPCR after normalization relative to the β -actin reference gene. The results are represented as box plots (median, quartiles, extreme values) and the significance of the values between CM and respective control media were tested using a Mann-Whitney test (* p < 0.05).

A

Relative wound density (%)



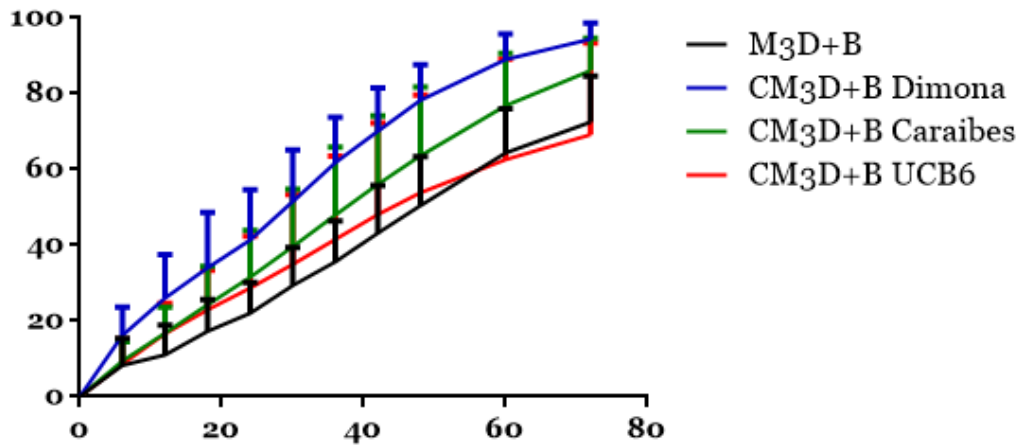
B

**Figure R4 : Effect of CM on wound healing.**

22 500 chondrocytes were seeded in triplicates in a 96 well microplate (Incucyte ImageLock, Essen Bioscience) in the presence of DMEM HG supplemented with 10% of FBS and 1% antibiotics. 24 h later, treatments with conditioned media (CM) were added. 30 hours post-seeding (t= 0 h), the wounds were performed with the Incucyte woundmaker device (Essen Bioscience), then wells were rinsed twice and treatments were added. The graph represents the average of two independent experiments (A). Relative wound density is a measure (%) of the density of the wound region relative to the density of the cell region. The significance of the values between CM and control media were tested using a Mann-Whitney test (* $p < 0.05$). Photographs are representative wells of the experiments (B). CM3D Dimona and Caraibes : CM from BM-MS. CM3D UCB6 : CM from UCB-MS.

A

Relative wound density (%)



B

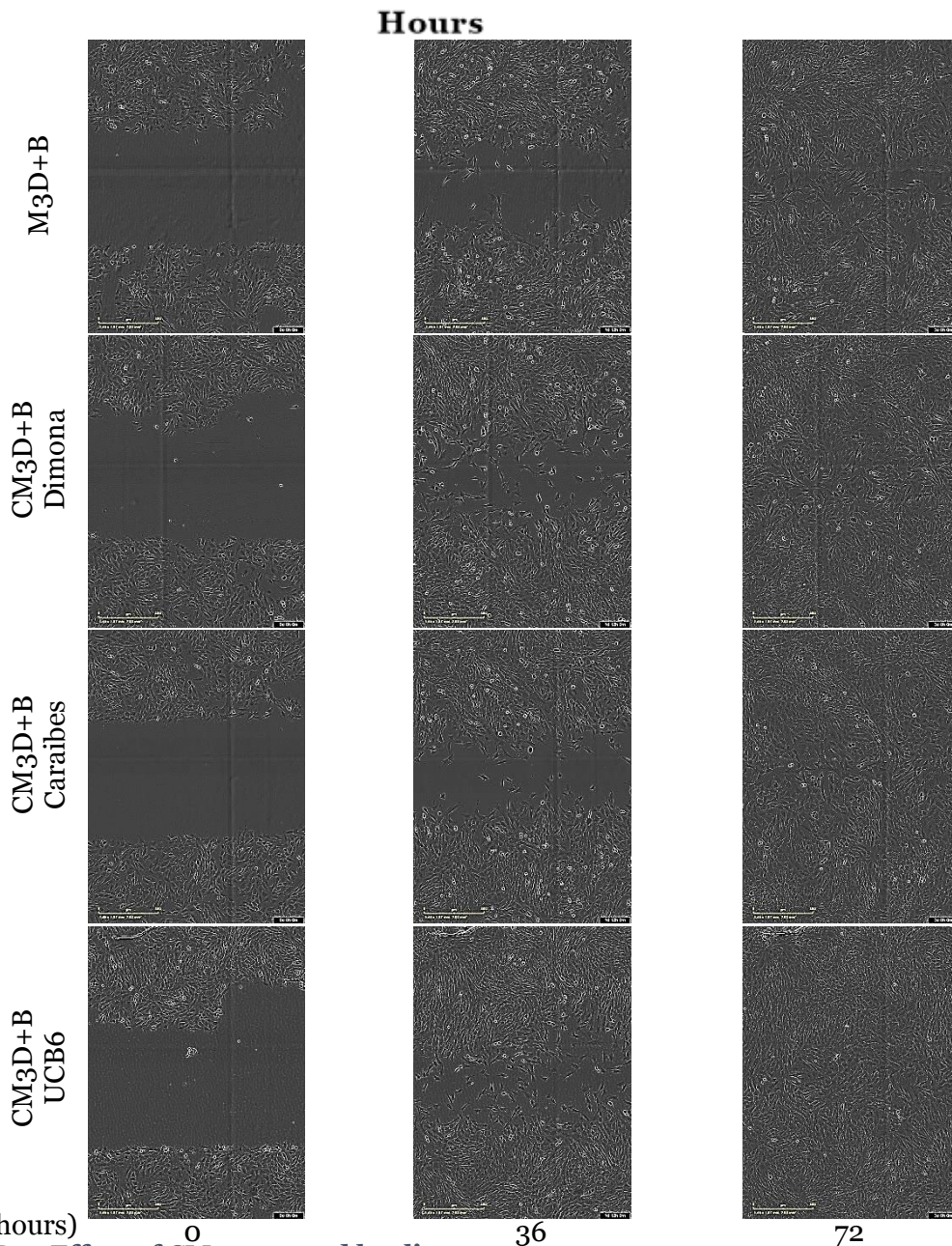


Figure R5 : Effect of CM on wound healing.

22 500 chondrocytes were seeded in triplicates in a 96 well microplate (Incucyte ImageLock, Essen Bioscience) in the presence of DMEM HG supplemented with 10% of FBS and 1% antibiotics. 24 h later, treatments with conditioned media (CM) supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) were added. 30 hours post-seeding (t= 0 h), the wounds were performed with the Incucyte woundmaker device (Essen Bioscience), then wells were rinsed twice and treatments were added. The graph represents the average of two independent experiments (A). Relative wound density is a measure (%) of the density of the wound region relative to the density of the cell region. The significance of the values between CM and control media were tested using a Mann-Whitney test (* p < 0.05). Photographs are representative wells of the experiments (B). CM3D Dimona and Caraibes : CM from BM-MS. CM3D UCB6 : CM from UCB-MS.

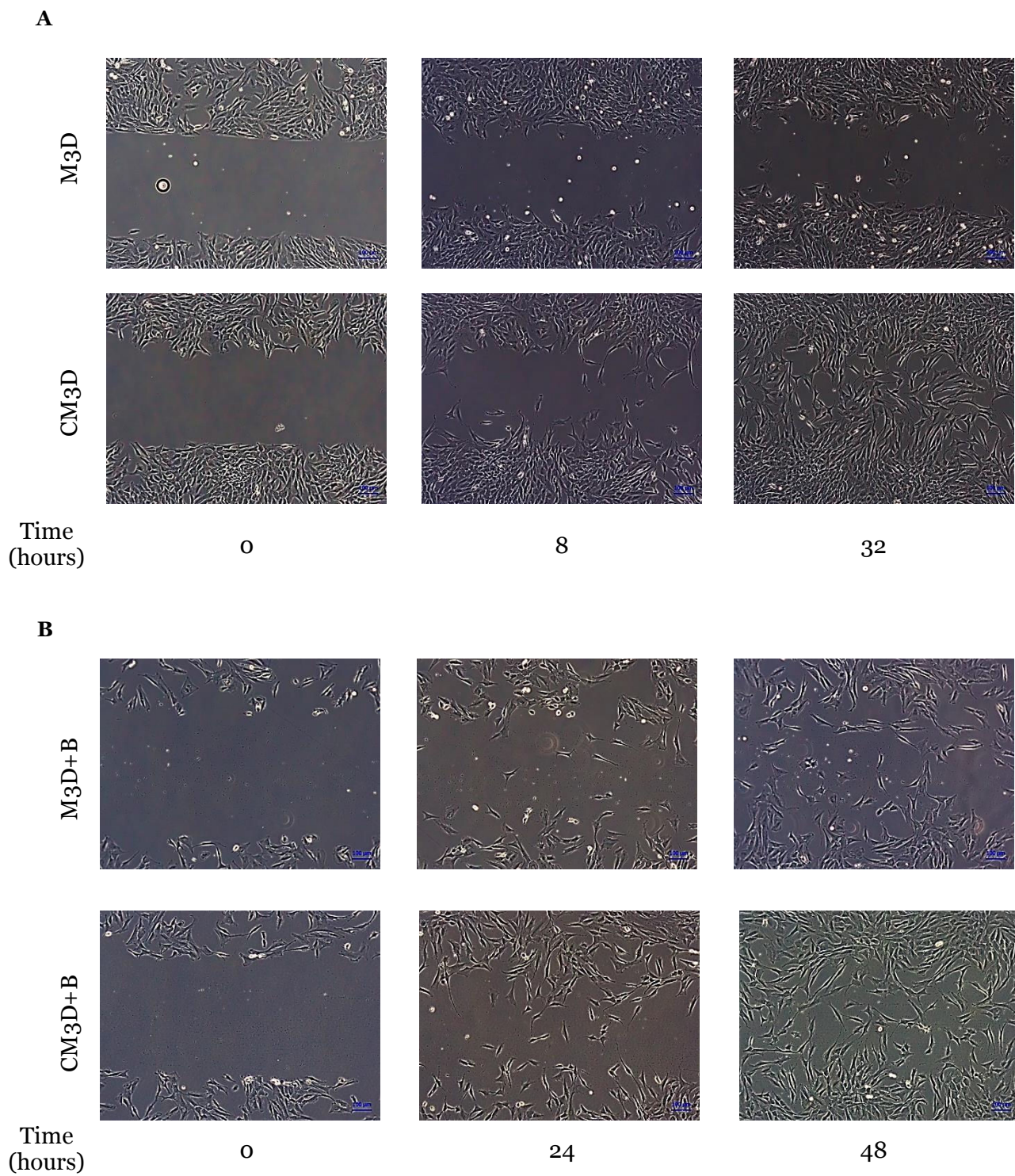


Figure R6 : Effect of CM on wound healing.

70 μ l of a chondrocyte suspension (250 000 cells/ml) were dropped in each chamber of an Ibidi device (Biovalley) in the presence of DMEM HG supplemented with 10% of FBS and 1% antibiotics. 24 h later, treatments with conditioned media (CM) (A) or CM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) (B) were added. 30 hours post-seeding (t=0 h), the walls were removed and the wounds were made. Photographs are representative wells of the experiment.

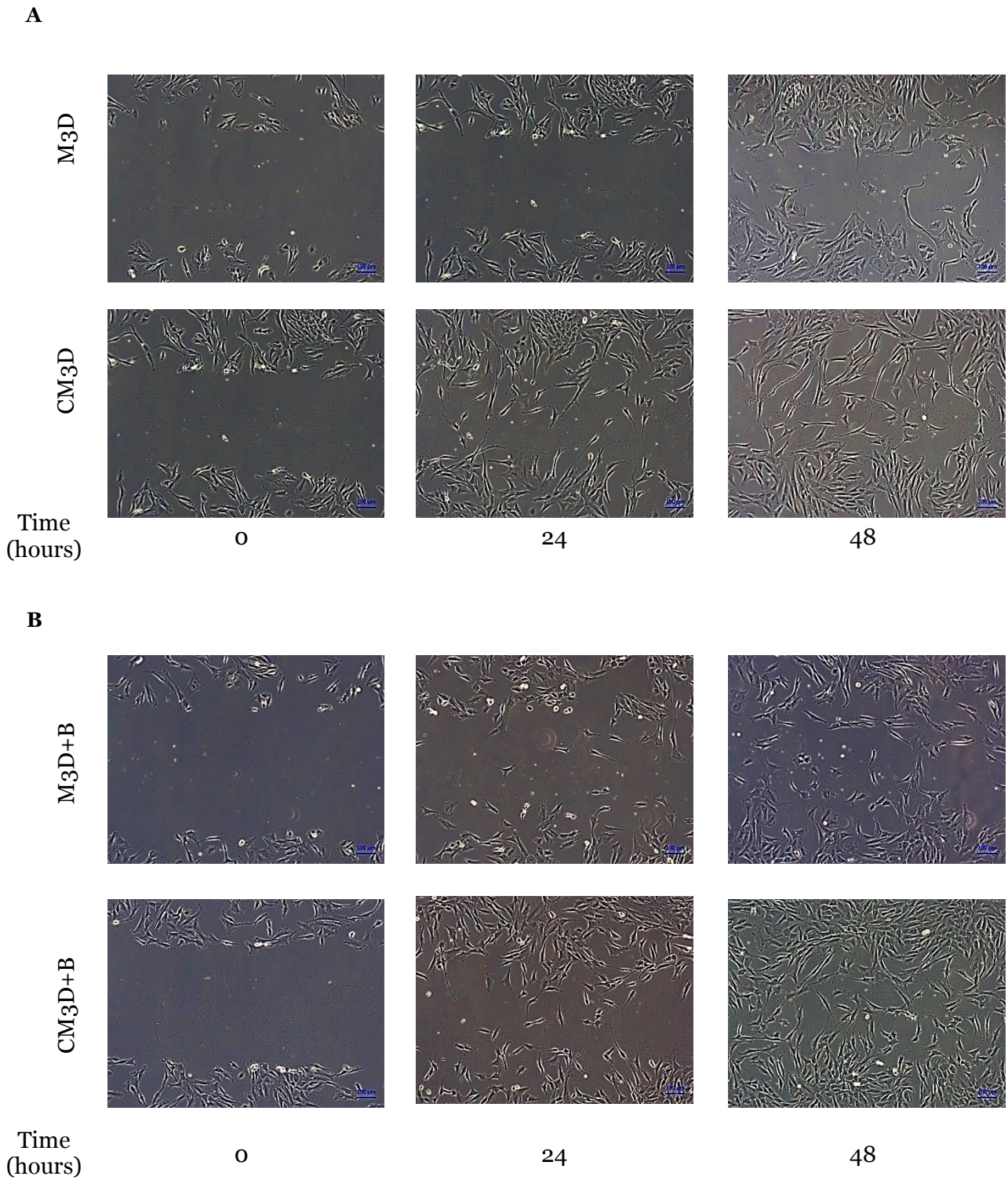


Figure R7 : Effect of CM on wound healing.

Chondrocytes were seeded in a 6 well plate (20 000 cells/well) and then cultured in the presence of DMEM HG supplemented with 10% of FBS and 1% antibiotics until 80% of confluence. The medium is replaced by the treatments and 24 h later, the wound is made with a pipet tip. Then, wells are rinsed twice with PBS and conditioned media (CM) (A) or CM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) (B) are added.

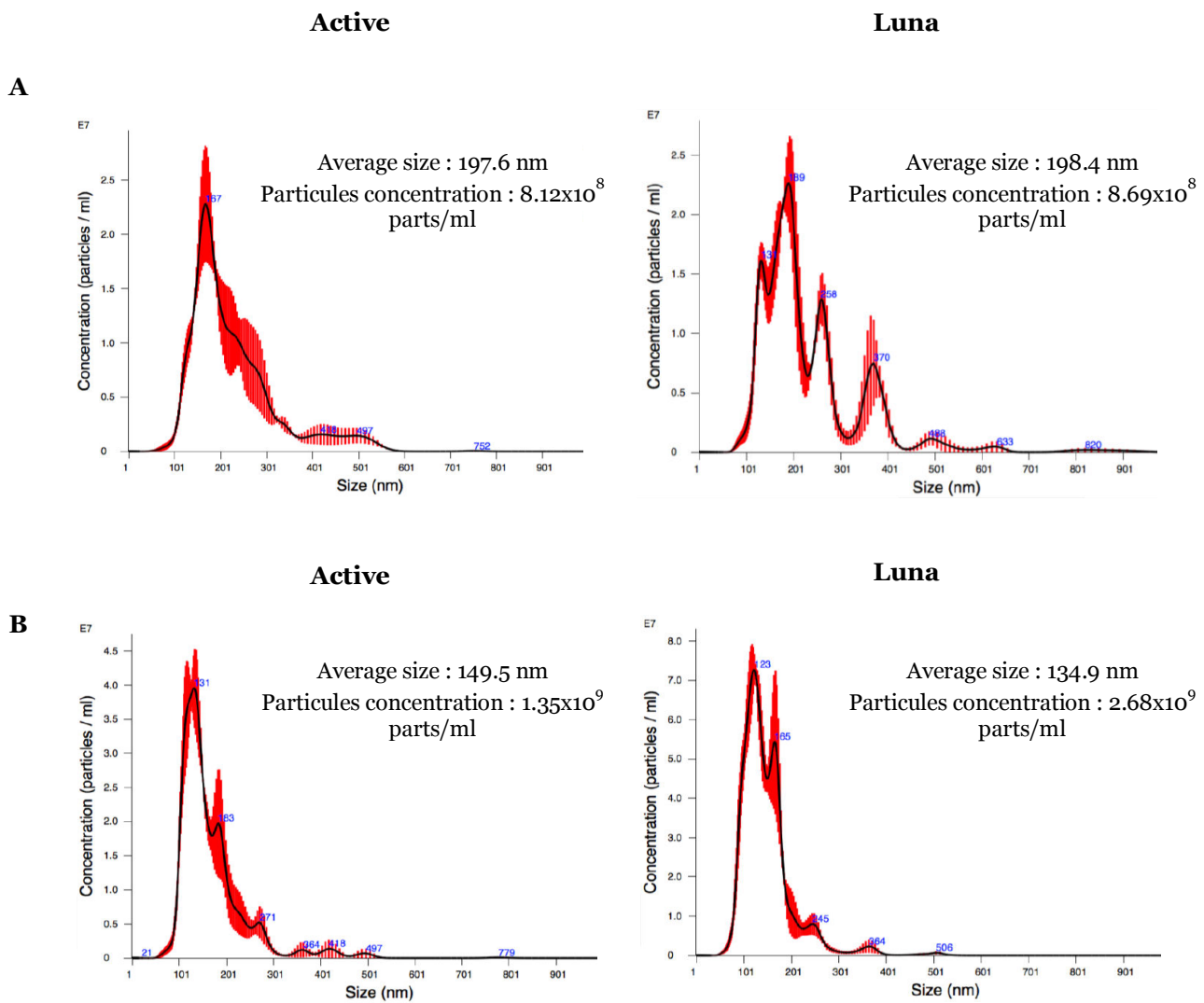


Figure R8 : Detection of nEV in BM-MSC CM with (B) or without filtration (A).

CM were prepared from two strains of BM-MSC, Active and Luna. CM were centrifuged at 10 000 g for 30 min in order to remove particles bigger than 300 nm. CM were filtered (B) or not (A). When CM were not filtered, they were diluted with PBS to prevent a saturated signal. Then CM were analysed with Nanosight.

	Active	Luna
CD9	1.24	0.95
CD63	0.92	0.68
CD81	6.23	3.82

Figure R9 : Detection of nEV markers by flow cytometry of BM-MSC CM.

CM were prepared from two strains of BM-MSC, Active and Luna. CM were centrifuged at 10 000 g for 30 min in order to remove particles bigger than 300 nm. Then, CM were ultracentrifuged at 100 000 g for 1 h to pellet nanovesicles. Results are given as percentages.

D. Conclusion de l'étude

Les propriétés des CSM offrent de nombreuses opportunités dans le but d'améliorer les stratégies thérapeutiques actuelles pour le traitement des lésions chondrales. En effet, au-delà de leur potentiel de différenciation chondrogénique, leur sécrétome est attractif. Il est désormais largement décrit que le sécrétome des CSM est capable de moduler la réponse immunitaire et l'inflammation. Cependant, l'effet de ce sécrétome sur la redifférenciation de chondrocytes est moins clair. Cette ambiguïté pourrait provenir de l'utilisation de modèles expérimentaux différents. C'est pourquoi, nous avons initié une étude afin de clarifier l'impact du sécrétome de CSM sur les chondrocytes selon nos modèles expérimentaux.

Nous avons d'abord évalué l'effet d'une co-culture indirecte de CSM et de chondrocytes. Les résultats obtenus montrent une modulation de l'expression de certaines molécules étudiées, que les chondrocytes soient cultivés en monocouche ou en biomatériau et quel que soit le *ratio* CSM/chondrocytes. Ces résultats nous ont poussé à évaluer l'effet de CM préparé à partir de CSM sur le phénotype et la prolifération des chondrocytes. Nous avons obtenu des résultats semblables bien que plus modérés. De plus, le CM permet d'augmenter les capacités de migration des chondrocytes, consécutivement à une blessure *in vitro*. Les effets du CM pourraient être dus à la présence de microvésicules et nanovésicules. En effet, nous avons pu déterminer la présence de vésicules de taille nanométrique dans les CM sans pour autant pouvoir les caractériser par cytométrie en flux. Ces résultats peuvent s'expliquer par le faible volume de CM analysé (1,5 ml contre 10 ml recommandé), ainsi que par l'absence d'anticorps développés spécifiquement pour des cellules équinnes. Afin de mettre en évidence l'origine endosomale des particules obtenues, il faudra alors dans un premier temps augmenter le volume de CM à traiter et obtenir des anticorps monoclonaux équinnes (CD9, CD63, CD81 et CD82) qui seront efficaces pour des échantillons issus de cellules équinnes. Par ailleurs, il sera nécessaire de réaliser des western-blots de protéines attestant de leur origine endosomale (ALIX et Tsg 101).

L'ensemble de ces résultats montre clairement un impact du sécrétome des CSM sur les chondrocytes. Néanmoins, à ce stade, les résultats ne permettent pas de définir si le sécrétome des CSM améliore le phénotype et/ou la prolifération des chondrocytes et quel *ratio* permet d'induire l'effet le plus important. Des travaux complémentaires devront être réalisés pour répondre à ces questions.

Discussion

Les lésions chondrales, qui engendrent l'arthrose, demeurent sans réelles solutions curatives, que ce soit chez l'Homme ou le cheval. De ce fait, ces lésions représentent un véritable fléau que ce soit économique ou pour le confort des personnes ou animaux atteints.

Ces travaux de thèse s'insèrent dans ce contexte. En effet, une des solutions prometteuses pour le traitement de l'arthrose est la thérapie cellulaire et/ou l'ingénierie tissulaire du cartilage. Nous sommes partis de travaux initialement réalisés chez l'Homme pour différencier des CSM de MO et de SCO en chondrocytes au sein d'un biomatériau (éponge de collagène de types I/III) afin de générer un substitut cartilagineux implantable au niveau d'une lésion chondrale. Ainsi, nous avons d'abord réalisé l'isolement et la caractérisation de souches de CSM de MO et de SCO équines, puis nous avons transposé le protocole de différenciation chondrogénique chez le modèle équin avec succès. Cependant, le substitut cartilagineux formé demeurerait perfectible, puisque des molécules atypiques du cartilage demeureraient présentes. Nous avons essayé d'optimiser le protocole de différenciation puis déterminé la stratégie de différenciation optimale pour différencier les CSM. Finalement, nous avons comparé les deux sources de CSM (MO et SCO) afin de déterminer la source qui permet la synthèse du substitut cartilagineux de la meilleure qualité.

Finalement, conscients que les stratégies de thérapie cellulaire et tissulaire comportent des inconvénients, et que le sécrétome des CSM pourrait s'avérer être un formidable outil dans l'amélioration du traitement des lésions chondrales, nous nous sommes intéressés à l'effet de MC sur les chondrocytes.

I. Avantages et limites des travaux réalisés

A. Isolement et caractérisation des CSM

Les CSM ont été isolées à partir d'un prélèvement de MO équine sternale (CSM de MO) ou d'un prélèvement de SCO équin (CSM de SCO). Le prélèvement de MO a été fait à partir de chevaux jeunes (2 à 4 ans), contrairement à ce qui est généralement fait pour le prélèvement de MO humaine. Quel que soit le prélèvement, les CSM ont été isolées par centrifugation sur gradient de Ficoll suivi d'une culture sur support plastique. L'efficacité de l'isolement des CSM semble dépendre du volume du prélèvement et du délai de prise en charge, entre prélèvement et centrifugation sur gradient de Ficoll. La prise en charge des prélèvements de MO s'est faite dans les 4 h suivant le prélèvement initial, et tous les prélèvements ont permis l'isolement de CSM. La prise en charge des prélèvements de SCO nécessitait un délai plus long, mais a permis l'isolement systématique de CSM lorsque le délai était inférieur à 40 h post-prélèvement. Le délai de prise en charge plus long pour les CSM de SCO s'explique par le fait que le poulinage n'est pas finement planifié et peut se produire à n'importe quel moment. Néanmoins, bien que lorsque la prise en charge du prélèvement de SCO dépasse les 40 h, le taux de réussite de l'isolement ne soit pas de 100%, il pourrait être amélioré en modifiant la technique d'isolement (**Koch et al., 2009**). Dans cette étude, les auteurs ont comparé le taux de réussite d'isolement de CSM de SCO en utilisant soit la méthode de centrifugation sur gradient de Ficoll, soit le PrepaCyte-EQ medium (BioE Inc). Alors que le taux de réussite n'était que de 60% avec le Ficoll, il était de 100% avec le PrepaCyte-EQ medium.

Les CSM ont été caractérisées selon les critères utilisés internationalement (**Dominici et al., 2006**). Les CSM de MO et SCO présentent d'importantes capacités prolifératives, cependant, les CSM de MO semblent avoir un plus fort potentiel. De plus, les capacités prolifératives des CSM pour une source donnée (MO ou UCB), varient d'une souche à l'autre. L'étude de la prolifération met en avant une hétérogénéité des CSM à plusieurs niveaux : en fonction du tissu d'origine (MO ou SCO) et en fonction du donneur, pour un même tissu d'origine (**McLeod & Mauck, 2017**). L'hétérogénéité entre les sources de CSM est aussi soulignée dans leur différence de multipotence et l'expression des marqueurs membranaires. En effet, l'ajout de facteurs adipogéniques à des CSM de SCO ne permettait pas d'obtenir une coloration positive de vacuoles lipidiques, en accord avec les travaux de Bieback et ses collaborateurs, même si nous avons observé une modification de la morphologie cellulaire (**Bieback et al., 2004**). Cependant, Koch et ses collaborateurs ont montré que l'ajout de sérum de lapin pouvait améliorer la différenciation adipogénique de CSM de SCO (**Koch et**

al., 2007). Au contraire, les CSM de MO, après différenciation adipogénique, contenaient des vacuoles lipidiques. Concernant l'induction de la chondrogenèse, révélée par la coloration des PG sulfatés par le bleu alcian, elle semble meilleure chez les CSM de SCO, bien que nous ayons aussi observé une variabilité inter-souches. La différenciation ostéoblastique que nous avons réalisée pour la caractérisation des CSM permet la formation de dépôts calciques pour les deux sources de CSM, et ne permet pas de présager d'une éventuelle prédisposition d'une source de CSM plutôt que l'autre à s'engager vers cette voie de différenciation. Le test de tripotence des CSM souligne l'importance d'améliorer le protocole de différenciation chondrogénique afin d'obtenir un phénotype chondrocytaire permettant son utilisation à des fins de thérapie cellulaire et tissulaire du cartilage.

Le troisième critère utilisé pour caractériser les CSM est la détermination de la présence d'un panel de marqueurs de surface caractéristique des CSM. Ce panel de marqueurs de surface est bien caractérisé chez les cellules humaines, contrairement aux cellules équine. En effet, alors que de nombreuses études ont pu détecter la présence des CD29, 44, 90, et l'absence des CMH de type II et du CD45, les expressions du CD73 et du CD105 sont moins évidentes (**Tessier et al., 2015**). Le principal obstacle à l'étude du panel de marqueurs de surface de cellules équine est la disponibilité des anticorps ciblant les protéines d'intérêt. Avec les anticorps disponibles, comme attendu, les CSM de MO et de SCO exprimaient les CD29, CD44, CD90 et n'exprimaient pas les CD 45 et CMH de type II. Par ailleurs, nous avons aussi essayé de détecter les CD73 et 105. Pour les deux sources de CSM, l'expression du CD73 était variable alors que le CD105 n'était pas exprimé (CSM de SCO) ou peu exprimé (CSM de MO). Ces résultats pourraient être dus à une altération des CD lors des manipulations. En effet, une étude a montré que l'utilisation de la trypsine pouvait endommager et ainsi empêcher la détection par cytométrie en flux de protéines de surface (**Hackett et al., 2011**). Concernant la variabilité d'expression du CD73, elle pourrait être due à la présence de différentes sous-populations au sein d'un même prélèvement et signifier une répartition des sous-populations différente entre les deux sources de CSM puisque nous avons observé une différence significative dans l'expression du CD73 en fonction de la source des CSM. De plus, la possibilité qu'il y ait des différences dans la proportion des sous-populations est appuyée par les différences observées entre les deux sources de CSM lors du test de multipotence. En effet, certaines sous-populations seraient plus aptes que d'autres à s'engager dans une voie de différenciation, comme démontré par l'équipe de Duttenhoefer et collaborateurs sur le potentiel ostéogénique supérieur de CSM de MO dépourvues des cellules exprimant le CD34 et le CD133 (**Duttenhoefer et al., 2015**). La mise en évidence des différentes sous-populations d'un même prélèvement pourrait se faire par tri-cellulaire en cytométrie en flux ou par l'emploi de billes magnétiques, mais nécessite l'utilisation d'anticorps ciblant les CD, identifiés comme différents d'une sous-population à l'autre, adaptés pour le modèle équin.

Dans l'objectif de s'affranchir d'une éventuelle modification de l'expression des CD ou d'une sélection clonale qui pourrait modifier le profil de la population de CSM originalement isolée au cours de l'amplification des CSM, nous avons réalisé une étude des marqueurs de surface à un passage plus précoce. L'expression du CD73 était effectivement plus importante lors du précédent passage (**Branly et al., 2017**). Cependant, la réalisation d'une amplification des CSM est indispensable afin d'avoir un nombre de cellules suffisant pour imaginer une stratégie de thérapie cellulaire et tissulaire du cartilage, et pour réaliser les expériences de différenciation chondrogénique.

L'ensemble des résultats obtenus mis en lien avec les données de la littérature permettent de conclure quant à la nature des cellules isolées, ce sont effectivement des CSM, que le prélèvement initial soit de MO ou de SCO.

B. Différenciation des CSM

Parmi les différentes propriétés des CSM, elles possèdent la capacité à se différencier en différents types cellulaires issus du mésoderme. Néanmoins, cette capacité de différenciation nécessite la présence de *stimuli* et d'un microenvironnement précis pour induire l'engagement de la différenciation et la stabilisation du phénotype induit. Ainsi, les CSM sont en théorie capables de se différencier en chondrocytes, mais, il faut les soumettre à des conditions de différenciation chondrogénique précises. C'est la raison pour laquelle le protocole de différenciation chondrogénique utilisé pour le test de multipotence aboutit à une différenciation incomplète, et est donc perfectible. Dans le but d'améliorer la différenciation chondrogénique, nous avons utilisé le protocole établi pour induire la différenciation de CSM humaines. Nous avons donc utilisé des éponges de collagène de types I/III en tant que biomatériau, une culture en hypoxie pour mimer le microenvironnement du chondrocyte *in vivo*, des facteurs chondrogéniques (BMP-2 et TGF- β 1) et des siRNA afin de diminuer la production de molécules atypiques du cartilage hyalin telles que le collagène de type I.

1. Intérêts de l'utilisation d'un biomatériau

Dans le souci de réaliser une culture *in vitro* s'approchant au mieux de la situation *in vivo*, l'utilisation d'un biomatériau est essentielle. En effet, il permet de reproduire les interactions directes et indirectes entre les cellules elles-mêmes et entre les cellules et la MEC. L'impact bénéfique des éponges de collagène de types I/III dans les stratégies de thérapie cellulaire et tissulaire du cartilage a déjà été démontré. En effet, ces éponges ont été utilisées lors de plusieurs études et ont contribué à la redifférenciation de chondrocytes dans les modèles humain et équin (**Demoor et al., 2014; Legendre et al., 2013; Rakic et al., 2017**).

Conformément à nos attentes, l'utilisation des éponges de collagène en tant que biomatériau a permis la différenciation des CSM en un type cellulaire synthétisant des molécules matricielles caractéristiques du cartilage hyalin, même si des molécules atypiques étaient concomitamment produites. En plus de favoriser la différenciation chondrogénique, l'utilisation d'un biomatériau tel que les éponges de collagène de types I/III permet de produire un substitut cartilagineux implantable au niveau de la lésion chondrale (**Makris et al., 2014**). Cependant, et pour améliorer la différenciation chondrogénique, de nouveaux biomatériaux ont été développés par d'autres équipes. En effet, les nouvelles générations de biomatériaux subissent des modifications physiques et/ou biochimiques dans le but d'améliorer leurs avantages en s'approchant du microenvironnement *in vivo* et de surmonter leurs inconvénients comme la diffusion des facteurs chondrogéniques qui peut être limitée dans la région centrale du biomatériau (**Cao et al., 2014**). Par exemple, certains biomatériaux subissent des modifications physiques ou fonctionnalisations dans le but de modifier la rigidité de ce dernier afin d'obtenir une rigidité permettant une différenciation chondrogénique optimale. De la même manière, des facteurs chondrogéniques peuvent être greffés afin de fonctionnaliser le biomatériau. Néanmoins, les éponges de collagène de types I/III, bien que non fonctionnalisées, que nous avons utilisées sont d'ores et déjà utilisées en clinique humaine et sont conformes aux exigences essentielles de santé et de sécurité (elles possèdent un marquage CE). Ce dernier point est un avantage indiscutable en vue d'une application en médecine.

Bien que les stratégies de thérapie cellulaire et tissulaire du cartilage offrent de séduisantes perspectives en permettant la production d'un substitut cartilagineux implantable au niveau des lésions chondrales, elles présentent certains inconvénients et interrogations. Quelle peut être la réaction du système immunitaire de l'hôte ? Quelle est l'influence du microenvironnement pathologique sur le phénotype des cellules du substitut cartilagineux ? Pour éviter ces inconvénients, l'utilisation de biomatériaux sans cellules pourrait être pertinente (**Makris et al., 2014**). Dans les études réalisées, ce biomatériau est associé à de la microfracture. En effet, la zone lésée est débridée puis la microfracture est réalisée, ce qui permet l'afflux de sang et de MO contenant des CSM, puis le biomatériau composé de collagène de types I/III est suturé et collé au niveau de la zone lésée. Le biomatériau est censé favoriser la coagulation et la régénération du cartilage grâce à sa colonisation par des CSM. Une étude *in vivo* a permis de montrer que la lésion chondrale était comblée par un cartilage (**Makris et al., 2014**). Cependant, des études supplémentaires doivent être réalisées pour caractériser la nature du cartilage néo-synthétisé, est-il de la plus haute qualité hyaline ?

2. Effet des facteurs de croissance

Nous avons d'abord testé l'effet du FGF-2 sur la prolifération des CSM. Nous avons remarqué que ce facteur de croissance permet d'augmenter le taux de doublement de CSM uniquement lors des passages précoces et permet ainsi d'obtenir un nombre de cellules important dans un délai plus court. Néanmoins, des expérimentations menées au laboratoire dans le but de déterminer l'effet de l'ajout de FGF-2 lors de l'amplification des CSM sur l'induction subséquente de la chondrogenèse des CSM n'ont pas montré de bénéfice contrairement à Stewart et ses collaborateurs (**Stewart et al., 2007**). Cependant, cette équipe a utilisé un protocole de différenciation différent. Néanmoins, l'utilisation du FGF-2, en permettant d'obtenir un nombre de cellules plus important dans un délai plus court, permettrait un gain de temps et d'argent dans des approches *in vivo* dans le modèle équin.

Les facteurs chondrogéniques que nous avons initialement utilisés pour permettre la différenciation de CSM équines en chondrocytes sont le TGF- β 1 et la BMP-2, comme pour le protocole de différenciation des CSM humaines. Comme attendu, ces facteurs chondrogéniques permettent l'expression des marqueurs du cartilage hyalin mais aussi des molécules atypiques telles que le collagène de type I. Cependant, quelle que soit la source de CSM, le *ratio Col2a1/Col1a1* est augmenté par ce traitement et celui-ci présente l'avantage de diminuer le niveau protéique de la protéase à sérine HtrA1. Il a été reporté que le TGF- β pouvait induire une augmentation des molécules associées à l'hypertrophie comme le collagène de type X (**Legendre et al., 2017; Pelttari et al., 2006**). Néanmoins, nos résultats montrent que les molécules associées à l'hypertrophie, le collagène de type X et la Mmp13, ont une expression peu influencée par la stratégie de différenciation des CSM équines que nous avons utilisée. Ensuite, nous avons essayé d'optimiser l'utilisation des facteurs chondrogéniques en testant le TGF- β 3, en présence ou absence de la BMP-2, qui est utilisé par d'autres équipes pour induire la chondrogenèse de CSM. Le TGF- β 3 permet une induction du collagène de type II plus importante que le TGF- β 1 chez les CSM de MO, mais induit aussi une nette augmentation de la production du collagène de type I. Ce collagène représente la principale molécule indésirable pour la régénération d'un cartilage articulaire de qualité, ce qui nous amène à préférer l'utilisation du TGF- β 1. En ce qui concerne les CSM de SCO, le TGF- β 3 est sans effet bénéfique comparé au traitement par le TGF- β 1 sur les niveaux protéiques des collagènes de type II et I. Ainsi, quelle que soit la source des CSM, le TGF- β 1 semble plus adapté que le TGF- β 3 pour produire un substitut cartilagineux de qualité optimale.

3. Effet de la stratégie d'interférence par l'ARN

Le principal inconvénient de l'utilisation des facteurs chondrogéniques est l'induction de la synthèse du collagène de type I, caractéristique d'un cartilage fibreux non adapté aux fonctions du cartilage articulaire hyalin. Afin de diminuer la production de ce collagène atypique du cartilage hyalin, l'emploi de siRNA ciblant ce collagène semblait pertinent. En effet, ils permettent de diminuer la production du collagène de type I lors de la différenciation de CSM de MO humaine en chondrocytes (**Legendre et al., 2017**). Néanmoins, la transposition de la stratégie d'interférence par l'ARN, à partir des résultats obtenus chez l'Homme, dans la visée de différencier des CSM équines en chondrocytes n'a pas eu les mêmes effets, malgré le test de différents siRNA ciblant le collagène de type I. De plus, la stratégie employée chez l'Homme fait appel à un siRNA ciblant *HtrA1*. Cependant, nos travaux de différenciation de CSM équines en chondrocytes, bien que montrant l'efficacité du siRNA *HtrA1*, démontrent que l'emploi de ce siRNA est inutile dans le sens où la combinatoire BMP-2 et TGF- β 1 seule permet de diminuer le niveau d'expression protéique d'*HtrA1*. Ces résultats sont obtenus pour les deux sources de CSM. Par ailleurs, nous avons essayé d'optimiser cette stratégie en ciblant la chaîne alpha 2 du collagène de type I, mais les siRNA demeurent trop peu efficaces pour diminuer les niveaux protéiques du collagène de type I, même pour des concentrations allant jusqu'à 200 nM pour les CSM de SCO. La combinatoire des siRNA ciblant la chaîne alpha 1 et la chaîne alpha 2 du collagène de type I montre aussi des effets insuffisants. Nous pourrions penser à un problème de l'efficacité de transfection au sein du biomatériau, mais le protocole réalisé, et qui a fonctionné chez l'Homme était le même. Un autre outil qui pourrait s'avérer utile dans la différenciation chondrogénique serait l'emploi de miRNA. En effet, ils sont impliqués dans la chondrogenèse et le maintien du phénotype chondrocytaire (**Kobayashi et al., 2008**). De plus, ils présentent l'avantage d'agir sur des réseaux de cibles impliqués dans les mécanismes de différenciation chondrogénique (**Wu et al., 2014**). Ainsi, ils pourraient permettre de s'affranchir des synthèses du collagène de type I en régulant le phénotype cellulaire, et donc d'avoir une action en aval de l'expression du collagène de type I. Néanmoins, la sélection d'un miRNA capable de ce genre de régulation est plus complexe que la sélection d'un siRNA ciblant un ARNm puisque lors de la survenue de l'arthrose ou lors de la chondrogenèse aucun « master miRNA » n'a été identifié, mais uniquement un ensemble de miRNA (**Han et al., 2010; Kobayashi et al., 2008; Wu et al., 2014**). Des travaux préliminaires ont été réalisés au laboratoire sur des CSM humaines transfectées par des miRNA potentiellement impliqués dans la différenciation chondrogénique. Cependant, nous avons rencontré un obstacle dans la réalisation de ces travaux : Nous n'avons pas pu obtenir une quantité de cellules suffisantes pour réaliser l'étude des niveaux protéiques des marqueurs typiques et atypiques du cartilage. Pour la première fois, nous utilisons des CSM-MO humaines de

sujets jeunes et sains (collaboration avec E. Velot, IMoPA, Université de Lorraine; A-S Willemin, Unité de Thérapie Cellulaire est Tissulaire, CHU de Nancy) et non des CSM-MO de sujets arthrosiques (**Legendre et al., 2017**).

Ainsi, nous avons seulement réalisé l'étude des messagers des marqueurs typiques et atypiques du cartilage hyalin, et leurs expressions n'étaient pas modulées par la transfection des miRNA. Les miRNA n'ont pas d'effets sur ces messagers, mais, il se peut tout de même que ces miRNA ciblent de manière directe ces ARNm afin d'inhiber leur traduction. Des études complémentaires devront être réalisées. Finalement, lors de ces travaux préliminaires, nous avons vérifié et validé la surexpression des miRNA. Cela conforte l'hypothèse que l'inefficacité de nos siRNA ciblant le collagène de type I n'est pas due à un manque d'efficacité lors de la transfection.

4. Effet de la condition oxygène

Lors de la chondrogenèse et dans un état différencié au sein du cartilage articulaire, le chondrocyte évolue dans un environnement hypoxique (**Kozhemyakina et al., 2015**). Afin de se rapprocher des réalités physiologiques, nous avons réalisé la différenciation des CSM équines en condition hypoxique, que nous avons comparée à une différenciation en normoxie. La condition hypoxique permet la synthèse d'un cartilage de meilleure qualité pour les CSM de MO, il est plus difficile de conclure de manière certaine concernant les CSM de SCO. En effet, la condition normoxique permet d'induire une plus forte expression du collagène de type II mature que la condition hypoxique (**Desancé et al., 2018**), alors que l'étude comparative entre CSM de MO et SCO met en avant la diminution des niveaux protéiques du collagène de type X après 28 jours de culture uniquement en hypoxie pour les CSM de SCO. Pour répondre à la question de la condition oxygène optimale pour induire la différenciation des CSM de SCO, le substitut cartilagineux néo-formé nécessite davantage d'études. Parmi celles-ci, nous pouvons citer l'analyse des propriétés mécaniques, ou encore le devenir *in vivo* du substitut cartilagineux. De plus, le microenvironnement *in vivo* peut modifier la nature du cartilage néo-synthétisé. En effet, des études précédemment menées par l'équipe ont montré que l'implantation en sous-cutané chez la souris *nude* de CSM issues de MO humaine menait à l'apparition d'un phénotype hypertrophique (**Legendre et al., 2017**). Ces cellules ayant été auparavant différenciées en conditions hypoxiques, leur retour dans un environnement normoxique après implantation pourrait expliquer l'apparition d'un tel tissu indésirable car leur phénotype chondrocytaire n'est pas stabilisé.

5. Détermination du temps de culture optimal

Le protocole de différenciation de CSM développé chez l'humain durait 14 jours et semblait optimal. Cependant, les CSM humaines provenaient de donneurs âgés, alors que les CSM

équines proviennent de chevaux jeunes ou de SCO dans lequel se trouve des CSM que l'on peut assimiler à des CSM issues de très jeunes chevaux puisque le prélèvement de SCO se fait par ponction sanguine à partir de la veine ombilicale (**Koch et al., 2007**). Nous avons supposé que l'absence d'amélioration des synthèses des molécules matricielles par des CSM humaines au-delà de 14 jours pouvait s'expliquer par le fait que les CSM provenant de sujets âgés présentent des propriétés altérées et une sénescence répliquative accélérée (**Stenderup et al., 2003**). De plus, l'allongement du temps de culture de CSM humaines jeunes aboutit à un substitut cartilagineux de meilleure qualité (**Liu et al., 2008**). Ainsi, il était possible que les CSM équines issues de chevaux/donneurs jeunes produisent une MEC aussi bien qualitativement et quantitativement de meilleure qualité après un temps de différenciation allongé. Pour les deux sources de CSM, l'allongement du temps de culture permet une augmentation des synthèses des molécules matricielles, molécules typiques et atypiques du cartilage hyalin, pour la plupart des souches utilisées. Cependant, certaines souches avaient un niveau protéique pour le collagène de type II maximal atteint dès 14 jours. Néanmoins, pour l'ensemble des souches étudiées et quelle que soit la source de CSM, on constate une expression d'HtrA1 minimale à 28 jours. L'allongement du temps de culture à 42 jours ne semble pas induire de bénéfice sur la qualité du substitut cartilagineux obtenu. En effet, pour les CSM de MO, les molécules typiques et atypiques sont augmentées, par rapport à une culture de 28 jours. En ce qui concerne les CSM de SCO, bien que l'expression des messagers du collagène de type I semble stabilisée de 28 jours à 42 jours, l'ensemble de la stratégie de différenciation ne permet pas de diminuer davantage les taux protéiques du collagène de type I à 42 jours. La détermination du temps de culture optimal est difficile à apprécier, notamment à cause de la variabilité inter-souches, et de l'approche semi-quantitative du western-blot. L'utilisation de dosages ELISA ciblant la dégradation (CTX-II) et la synthèse (CPII) du collagène de type II, mis au point sur les prélèvements biologiques équins récemment au sein du laboratoire, permettra de définir le temps optimal. En l'état actuel et de manière globale, l'allongement du temps de culture à 28 jours, et pas au-delà, pour les CSM de MO semble bénéfique. Au contraire, l'article #4 laisse supposer que le temps de culture optimal pour les CSM de SCO serait plus long que 28 jours puisqu'en normoxie et en hypoxie, le niveau protéique du collagène de type I semble amorcer une diminution de 21 à 28 jours.

6. Quelle source de CSM est la plus adaptée ?

Une partie des travaux de cette thèse s'est attachée à comparer deux sources de CSM (article #4) : Les CSM de MO et de SCO. Les CSM de gelée de Wharton ont été écartées de notre étude puisqu'elles se sont révélées incapables de réaliser la chondrogenèse (**Rakic et al., 2018**). Les différents travaux précédents laissaient penser que le protocole de différenciation

optimal consistait en une différenciation des CSM au sein d'éponges de collagène de types I/III, en présence de BMP-2 et de TGF- β 1 pendant 14 à 28 jours. La condition hypoxique semblait être optimale pour les CSM de MO, alors que pour les CSM de SCO, la condition oxygène optimale était incertaine. Conscients que les conditions optimales de différenciation pour une source de CSM ne sont pas nécessairement les mêmes que pour l'autre, nous avons réalisé les expériences de différenciation en normoxie et en hypoxie. En se basant sur la qualité du substitut cartilagineux obtenu après 28 jours de culture, les CSM de MO semblent être les plus appropriées pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. Mais, comme discuté dans l'article #4, il semblerait que le phénotype des CSM de SCO ne soit pas stabilisé à l'issue des 28 jours, contrairement aux CSM de MO. Ainsi, la différenciation des CSM de SCO pourrait être améliorée, et le substitut cartilagineux pour être de meilleure qualité que celui obtenu à partir des CSM de MO.

En plus de leur différenciation en un substitut cartilagineux de bonne qualité, d'autres critères sont à prendre en compte dans la sélection de la source de CSM la plus adaptée. Parmi ceux-ci, leur facilité d'isolement, le taux de réussite, leur capacité proliférative et leur résistance à la congélation (puisque un grand nombre de cellules est requis pour imaginer des stratégies de thérapie cellulaire et tissulaire du cartilage), sont des critères primordiaux à considérer. En les évaluant, les CSM de MO équine semblent plus intéressantes. En effet, un prélèvement de MO équine peut se faire à n'importe quel moment, et en partie en conséquence, leur isolement est systématiquement réussi.

Bien que la détermination du choix de la source de CSM à des fins de thérapie cellulaire/tissulaire du cartilage nécessite d'être davantage étudiée, l'ensemble des stratégies de différenciation chondrogénique menées au cours de cette thèse sur le modèle équin ont permis la synthèse d'un substitut cartilagineux de nature hyaline, même si des molécules atypiques persistaient comme le collagène de type I qui constitue une limite. Néanmoins, au-delà des limites liées à la qualité du substitut cartilagineux produit, d'autres limitations inhérentes à l'utilisation des CSM existent.

II. Limitations de l'utilisation de CSM différenciées

L'ensemble des propriétés des CSM leur confère une attractivité dans les stratégies visant à réparer les lésions chondrales. Néanmoins, certaines limitations restent à surmonter.

A. Caractérisation, amplification et conservation des CSM

La caractérisation des CSM que nous avons réalisée lors de ces travaux met en avant la variabilité inter-sources et même au sein d'une même source, entre des souches différentes. Ces différences pourraient s'expliquer par l'existence d'une hétérogénéité cellulaire au sein de chaque prélèvement. En effet, l'ensemble des propriétés d'une population de CSM serait l'addition des propriétés des différentes sous-populations (**Phinney, 2012**). Ainsi, les différents prélèvements pourraient présenter des modulations de la proportion de ces différentes sous-populations, et donc des propriétés de la population totale de CSM qui varient entre les différents prélèvements. Une meilleure caractérisation des sous-populations semble donc être essentielle afin de prévoir le potentiel de différenciation de la population totale, voire d'envisager l'isolement de la sous-population la plus apte à se différencier en chondrocytes. *In fine*, le but est de pouvoir réaliser des différenciations optimales et reproductibles.

De plus, l'ensemble des procédés utilisé pour prélever, isoler, amplifier et différencier les CSM peut induire une variation de la proportion des sous-populations et affecter les propriétés de la population totale (**Phinney, 2012; Seeger et al., 2007**). Afin de s'affranchir au maximum des contraintes dues aux manipulations des cellules, la meilleure approche consisterait à isoler et amplifier les cellules en bioréacteur, dans un système automatisé et contrôlé informatiquement. Ce type d'approche a d'ailleurs été développé par une équipe allemande, en collaboration avec l'Etablissement Français du Sang (**Rojewski et al., 2013**). Cette étude a ainsi montré qu'il était possible d'isoler les progéniteurs non hématopoïétiques à partir de prélèvements de MO humaine issus de patients jeunes (moins de 30 ans) pour ensuite les amplifier par ce système. Ce dernier permet par ailleurs de s'affranchir du SVF, étape essentielle en vue d'une industrialisation du procédé. Cependant, le protocole développé ne permet pas d'obtenir un nombre de cellules aussi important qu'une culture classique, menée dans une flasque de culture manipulée manuellement. Le nombre de divisions cellulaires à P1 passe alors de 4,9 (en culture en flasque) à 2,9 (en culture en bioréacteur). Enfin, et de manière tout à fait intéressante, l'étude menée ici souligne que le temps de prise en charge des prélèvements doit être compris entre 1 et 6 heures (**Rojewski et al., 2013**). Il est à noter que la prise en charge des prélèvements de MO équine a été réalisée dans les 2 heures, mais celui de SCO était plus long. Cette différence pourrait aussi expliquer une partie des différences observées entre ces deux sources de CSM.

Lors de l'isolement et de l'amplification des CSM, nous avons utilisé du SVF. L'utilisation de SVF présente plusieurs limites. En effet, la proportion des différents facteurs de croissance et

de survie est différente en fonction des différents lots, et des contaminations par des protéines bovines, des virus, et des prions sont possibles (**Oikonomopoulos et al., 2015; Sensébé et al., 2011**). Afin de s'affranchir de ces limites, avant mon arrivée en thèse, un milieu synthétique développé par Miltenyi Biotec, le milieu «StemMACS MSC Expansion Media» a été testé lors de la phase d'amplification des CSM équines. Ce milieu, standardisé et optimisé pour l'amplification des CSM humaines, devait théoriquement permettre une normalisation et une reproductibilité plus importante de la réponse des CSM lors de leur ensemencement en présence de ce type de milieu. Les essais menés au laboratoire n'ont malheureusement pas été concluants, puisque les cellules équines perdaient leurs capacités de prolifération et de multipotence. De la même manière, dans le but d'éviter d'éventuelles contaminations xénogéniques, un milieu additionné de sérum équin, à la place du SVF habituellement utilisé, a été testé pour isoler des CSM à partir de prélèvement de MO. Ces essais n'ont pas permis l'isolement de CSM. Nous supposons donc que la composition du sérum équin diffère du SVF au moins dans la composition de facteurs qui interviennent dans la prolifération des CSM équines.

Cependant, d'autres alternatives existent dans le modèle humain, et consistent à remplacer le SVF par l'emploi de lysat de plaquettes. Cette stratégie permet d'obtenir des CSM qui adoptent des propriétés immunomodulatrices et de différenciation comparables à ce qui est obtenu avec l'emploi de SVF (**Oikonomopoulos et al., 2015**). Il est possible aussi d'amplifier des CSM humaines à partir d'un milieu sans sérum mais, nécessite l'ajout de facteurs de croissance et de tapisser les puits avec de la fibronectine par exemple (**Chase et al., 2010**).

Lors de leur amplification, les CSM pourraient être exposées à l'instabilité génomique. En effet, certaines études montrent que des CSM en amplification peuvent se transformer (**Sensébé et al., 2011**). Cependant, ces résultats étaient dus à une contamination par des cellules de lignées cancéreuses exogènes. Lors d'une amplification prolongée, il semblerait plutôt que les CSM deviennent sénescents, sans transformation subséquente (**Sensébé et al., 2011**). En ce qui concerne notre étude, les expérimentations ont été réalisées au quatrième passage, avant que les marqueurs de la sénescence ne soient exprimés (**Gomez-Leduc et al., 2016**).

Dans le cadre des stratégies de thérapie cellulaire et tissulaire du cartilage, tout comme l'amplification, le stockage à long terme des cellules est essentiel. Pourtant, les procédés de cryopréservation induisent un stress cellulaire et ont un effet négatif sur la survie cellulaire. Lors de nos travaux, nous avons utilisé en tant que milieu de congélation un mélange composé de 90% de SVF et de 10% de **Diméthylsulfoxyde (DMSO)**. En plus des limites inhérentes à l'utilisation du SVF, lors des décongélations, environ 30% de

cellules présentes dans l'ampoule ne sont plus viables. De plus, il est possible que certaines sous-populations soient plus sensibles que d'autres, ce qui aurait pour conséquence l'émergence d'une modification des propriétés de la population totale de CSM. Cette idée est renforcée par le fait que certaines études ont montré la diminution des propriétés, notamment immunomodulatoires, des CSM après congélation (**François et al., 2012; Moll et al., 2014**). L'ensemble des expériences de différenciation que nous avons menées se sont déroulées après un seul cycle de congélation/décongélation des CSM.

Il serait tout de même intéressant d'étudier l'effet d'autres agents cryoprotecteurs sur nos cellules équines, comme cela a pu être fait sur des cellules humaines, afin d'augmenter la viabilité des CSM et de s'affranchir de l'utilisation du SVF (**Al-Saqi et al., 2015**). Par exemple, l'utilisation d'un mélange composé notamment de 10% de DMSO, de dextran et de glucose (Stem Cell Banker, amsbio) permet de conserver un potentiel de prolifération des CSM après décongélation égal à celui de CSM non congelées, tout en ayant une survie cellulaire proche de 100% (**Al-Saqi et al., 2015**). Le principal inconvénient est le coût relativement élevé de ce cryoprotectant.

B. Difficulté du choix de la source de CSM

Bien qu'initialement découverte dans la MO, il s'avère que les CSM sont présentes dans la plupart des tissus (**Ahmed et al., 2017**). Néanmoins, les différences dans le microenvironnement de leur tissu d'origine est responsable d'une hétérogénéité inter-sources. L'hétérogénéité inter-sources peut aussi être favorisée par les techniques d'isolement des CSM, qui peuvent varier en fonction du tissu d'origine et donc induire un stress différent. De cette hétérogénéité découle des propriétés différentes. Ainsi, la sélection de la source de CSM la plus propice à la différenciation chondrogénique est essentielle. Au-delà des propriétés des CSM, il est aussi indispensable de prendre en compte la facilité d'isolement des CSM, la proportion des CSM en fonction du tissu d'origine et le taux de réussite. La limitation du choix de la source de CSM intervient lorsque l'on travaille sur une espèce animale afin d'obtenir une preuve de concept que l'on envisage de transposer chez l'Homme. En effet, par exemple, les CSM de MO équines de notre étude ont été isolées à partir de chevaux jeunes. Il sera alors indispensable d'obtenir des prélèvements de MO à partir d'Hommes jeunes pour que le concept soit adaptable à l'Homme, puisque les propriétés des CSM sont altérées avec l'âge (**Stenderup et al., 2003**). De plus, les modalités de prélèvement d'un tissu peuvent être simples dans une espèce, et plus compliquées chez une autre. Par exemple, le prélèvement de MO équine est une procédure relativement peu invasive, contrairement à la procédure chez l'Homme.

En outre, la manière avec laquelle la différenciation chondrocytaire est évaluée est essentielle. En effet, dans les stratégies de thérapie cellulaire et tissulaire du cartilage, l'objectif est de produire un néo-cartilage qui peut se substituer au tissu dégradé. En ce sens, lors de ces travaux de thèse, nous nous sommes attachés à caractériser les synthèses des CSM au cours de leur différenciation. Néanmoins, la MEC néo-synthétisée à l'issue du protocole de différenciation correspond aux synthèses des différents stades de différenciation que les CSM ont adoptés tout au long de leur différenciation. De plus, l'étude des ARNm ne révèle pas si ceux-ci seront traduits. Ainsi, même si les synthèses matricielles sont liées au phénotype cellulaire, nous avons évalué la composition d'un substitut cartilagineux formé par des CSM soumises à un protocole de différenciation chondrocytaire plutôt qu'un phénotype cellulaire. Nous avons décidé de réaliser cette analyse biochimique puisque les propriétés du substitut cartilagineux dépendent de sa composition. Une étude complémentaire pourrait être réalisée afin d'estimer les propriétés mécaniques du substitut. Tout cela étant, la validation d'une stratégie de production d'un substitut cartilagineux doit passer par une étude *in vivo*. En effet, bien que la qualité du substitut cartilagineux reflète le phénotype cellulaire, il est possible que ce dernier ne soit pas stabilisé et évolue de façon défavorable une fois implanté au niveau du site lésionnel et aboutisse à la production d'un cartilage de mauvaise qualité. Donc, la détermination du choix de la meilleure source de CSM doit se terminer par une étude *in vivo*, avec toutes les contraintes que cela implique telles que le développement de modèles d'arthropathies appropriés. En effet, comme notre stratégie vise à soigner les lésions chondrales avant qu'elles n'évoluent en lésions ostéochondrales, et que celles-ci sont asymptomatiques et donc difficilement détectables, il sera nécessaire de les induire.

III. Amélioration des stratégies d'ingénierie tissulaire du cartilage

A. Optimisation de la différenciation des CSM

Lors de ces travaux, nous avons initialement transposé un modèle de différenciation de CSM humaines à des CSM équines. Ce protocole semblait perfectible, nous avons alors tenté de l'améliorer en modulant la stratégie d'interférence par l'ARN, en allongeant la durée du protocole de différenciation, et en testant d'autres facteurs chondrogéniques. Cette étude a permis de déterminer que le temps de culture optimal était d'au moins 28 jours. Néanmoins, la production du collagène de type I reste conséquente. Nous pouvons donc imaginer une nouvelle optimisation de notre protocole.

Une des optimisations possibles concerne le biomatériau. En effet, les nouveaux biomatériaux peuvent être bioactifs pour permettre la libération homogène et contrôlée de facteurs de croissance (**Keller et al., 2017**). Les progrès dans l'impression en 3D, permettent la fabrication de polymères constitués de molécules retrouvées dans la MEC cartilagineuse telles que du collagène ou de l'AH (**Costantini et al., 2016**). Ces approches ouvrent des perspectives intéressantes quant à la synthèse de biomatériaux constitués de plusieurs couches dans le but d'obtenir une polarisation du biomatériau qui s'insère dans la polarisation du cartilage *in vivo*. Au contraire, les éponges de collagènes que nous utilisons actuellement présentent, à la fin du protocole de différenciation chondrogénique, un gradient d'expression des protéines matricielles qui décroît de la périphérie vers le centre du substitut cartilagineux. L'objectif est d'apposer ce biomatériau au cartilage au niveau de la zone lésée. La polarisation du cartilage ne serait donc pas respectée.

D'autres travaux mettent en avant le bénéfice d'utiliser un bioréacteur afin de soumettre le biomatériau à des contraintes mécaniques. Dans une étude, lorsque le biomatériau était soumis à des forces de cisaillement et des compressions mécaniques, l'expression des marqueurs chondrogéniques était plus importante (**Cochis et al., 2017**). De même, la culture dynamique en bioréacteur de substituts néo-cartilagineux (utilisant les mêmes éponges de collagène que les nôtres) obtenus à partir de chondrocytes permet de s'affranchir des problèmes de gradients oxygène et nutritifs, ce qui conduit à un néo-cartilage hyalin, homogène avec une expression de collagène de type I pratiquement abolie (**Mayer et al., 2016**).

Une autre piste pour l'amélioration de la différenciation des CSM en chondrocytes serait l'amélioration de la stratégie d'interférence par l'ARN en utilisant des miRNA en vue de favoriser la différenciation chondrogénique plutôt que cibler une conséquence du phénotype cellulaire, le collagène de type I. En effet, différents miRNA agissent sur l'expression génique de ces régulateurs de la chondrogenèse (**Wu et al., 2014**), et il a été montré que l'invalidation de la machinerie de synthèse des miRNA entraîne des anomalies de prolifération et différenciation des chondrocytes, démontrant l'importance des miRNA dans la chondrogenèse et la stabilisation du phénotype (**Kobayashi et al., 2008; Wu et al., 2014**). Néanmoins, se pose le problème de l'identification d'un ou de quelques miRNA les plus impliqués dans la chondrogenèse, que ce soit chez l'Homme mais aussi le cheval.

B. Utilisation de CSM indifférenciées

1. Dédifférenciation chondrocytaire

La TCA demeure l'approche la plus répandue concernant la thérapie cellulaire du cartilage chez l'Homme. Elle nécessite une étape d'amplification cellulaire conduisant à la dédifférenciation des chondrocytes. La richesse des sécrétions des CSM fait que leur utilisation dans le cadre de la TCA a un intérêt double : 1) améliorer la survie/prolifération des chondrocytes lors de leur amplification et 2) favoriser la redifférenciation chondrocytaire. Durant ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à la redifférenciation des chondrocytes, tout en gardant en tête le potentiel effet des CSM sur la prolifération des chondrocytes. Pour ce faire, nous avons réalisé des expériences de co-culture indirecte de CSM de MO/chondrocytes. Il s'agit de travaux très préliminaires qui nécessitent d'être approfondis. Cependant, ils permettent de mettre en avant l'effet d'une co-culture indirecte sur l'expression des messagers des marqueurs phénotypiques et de prolifération des chondrocytes. Pour conclure quant à la nature de l'effet de cette co-culture, il sera nécessaire de poursuivre ces travaux en évaluant les niveaux protéiques des marqueurs typiques et atypiques du cartilage hyalin, et explorer davantage l'effet sur la prolifération/survie des chondrocytes. Les expériences de co-cultures sont relativement compliquées à réaliser, ce qui pourrait être un frein à une utilisation en routine. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à l'effet du sécrétome des CSM sur les chondrocytes. Les résultats préliminaires obtenus en co-culture ont aussi été obtenus par l'utilisation d'un MC à partir de CSM, bien que moindres. Il est alors probable que la sécrétion/expression des molécules solubles synthétisées par les CSM qui affectent les chondrocytes soient elles-mêmes modulées par le sécrétome des chondrocytes.

D'autres équipes cherchent à co-cultiver des CSM et des chondrocytes de manière directe. Par exemple, un ensemencement de chondrocytes et de CSM dans un même biomatériau aboutit à un niveau de GAG et collagènes supérieur à un biomatériau ensemencé avec un seul type cellulaire (**Bian et al., 2011**). Au contraire, une diminution de l'expression du collagène de type X est observée. De telles stratégies semblent pertinentes afin d'améliorer la qualité du substitut cartilagineux *in vitro*. Mais, il est difficile de suivre et d'estimer le phénotype des deux types cellulaires séparément. Est-ce que les CSM initient leur différenciation en chondrocytes, est-ce qu'elles permettent de favoriser la production de molécules matricielles par les chondrocytes ou une combinatoire des deux ? Dans ce type de stratégie, nous retrouvons les inconvénients de l'utilisation des CSM, à savoir : Adoptent-elles un phénotype qui sera stable une fois implanté *in vivo*, ou seront-elles à l'origine d'un néo-cartilage de mauvaise qualité ?

2. Utilisation des CSM *in vivo*

Du fait du large spectre de molécules présentes dans les sécrétions des CSM, une injection de CSM au niveau de l'articulation arthrosique pourrait constituer une approche thérapeutique innovante dans le but de régénérer le cartilage lésé et de diminuer l'inflammation. En effet, des essais cliniques chez l'Homme ont d'ores et déjà eu lieu et ont permis de montrer le rôle de l'injection de CSM autologues dans la régénération du cartilage et la réduction de l'environnement inflammatoire (**Kong et al., 2017**).

En pratique, des expériences réalisées au laboratoire dans le projet Equistem, en collaboration avec le CIRALE, ont montré que des injections de CSM allogéniques au niveau d'articulations de chevaux pouvaient être à l'origine de réactions inflammatoires. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Pigott et ses collaborateurs (**Pigott et al., 2013**). Dans ce projet, nous avons injecté en intra-articulaire des CSM de MO et de SCO lors d'une étude expérimentale en aveugle portant sur 8 chevaux expérimentaux afin d'évaluer leur efficacité dans le traitement et la prévention de l'extension de lésions d'arthropathie induites chirurgicalement. Le modèle d'induction des lésions, basé sur une fragmentation arthroscopique de la partie proximo-médiale de la phalange proximale a permis d'induire en 3 mois sur les 4 boulets (articulations métacarpo- et métatarso-phalangiennes) de chaque cheval, une arthropathie dégénérative secondaire se caractérisant cliniquement et en imagerie (radiographie, échographie, IRM) notamment par l'apparition de remodelages osseux péri-articulaires substantiels. Ce modèle d'arthropathie s'est avéré répétable et bien toléré cliniquement par les chevaux. Les principaux résultats de notre étude d'efficacité tendent à montrer :

- que les injections de CSM de MO sont plutôt bien tolérées localement, elles provoquent une discrète réaction inflammatoire (malgré le fait qu'au moment de l'injection et pour éviter toute apparition de réaction inflammatoire majeure chaque cheval recevait une injection intra-veineuse d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (Flunixin de méglubine, Finadyne Nd à la dose de 1,1 mg/kg), comparable à celle observée suite aux injections de placebo (PBS) ;
- que les CSM de MO semblent avoir un effet protecteur sur le développement des signes d'arthropathie par rapport au placebo, et ce d'autant plus qu'elles sont associées à un dérivé de l'AH comme milieu de transport ;
- les CSM de SCO ne semblent pas apporter d'effet bénéfique sur le développement des signes d'arthropathie comparativement au placebo. Elles provoquent de plus une réaction inflammatoire articulaire locale supérieure à l'injection des CSM-MO et du placebo.

Ces résultats doivent encore être confirmés au plan statistique. De plus, des expériences d'IHC post-mortem sur les cartilages sont actuellement en cours pour suivre l'évolution de

l'expression des collagènes I, II, III, de l'agrécan et de Snorc, afin de statuer sur l'effet curatif des injections de CSM de MO et de SCO dans ce modèle d'arthrose expérimentale.

Globalement, l'injection de CSM allogéniques présente donc certaines limites. Par ailleurs, la question du devenir des CSM injectées *in vivo* est essentielle. Dans différentes études, la survie des cellules injectées était limitée dans le temps (**Vinatier & Guicheux, 2016**). Une autre préoccupation concerne la migration des CSM hors de l'articulation, et leur devenir au sein d'autres tissus (**Von Bahr et al., 2012**).

L'ensemble de ces limites mène à considérer davantage le potentiel thérapeutique du sécrétome des CSM. Afin de garantir une parfaite innocuité des injections intra-articulaires de l'agent thérapeutique, nécessaire avant le passage en phase clinique, il est fortement souhaitable de poursuivre l'étude du sécrétome des CSM, véritable principe actif de ces cellules. Ainsi, dans l'optique d'une thérapie visant à traiter l'arthrose, les MC à partir de CSM, et à *fortiori*, les nEV, présentent l'avantage de s'affranchir des inconvénients inhérents à la thérapie cellulaire tout en conservant des propriétés immunomodulatrices et régénératrices intéressantes. Elles pourraient aussi être utilisées en prévention. L'éventuel inconvénient du remplacement d'injection de CSM par l'injection de leurs sécrétions est que les sécrétions injectées *in vivo* ne peuvent s'adapter à leur microenvironnement, contrairement aux CSM. Néanmoins, il reste possible de soumettre les CSM à un environnement précis *in vitro*, en mimant par exemple une situation *in vivo* comme l'inflammation, afin de potentialiser les sécrétions des CSM de manière à les adapter à l'environnement *in vivo* dans lequel seront les sécrétions une fois injectées (« priming »). Par ailleurs, l'injection de nEV présente l'avantage d'être une approche purement acellulaire, qui pourra permettre probablement des approches allogéniques tout en s'affranchissant du problème de rejet contre le greffon. Néanmoins, nous nous heurterons aussi au problème de leur biodistribution, leur devenir au sein de l'articulation *in vivo*, tout comme avec les CSM. Se posera ainsi la question de leur ciblage, de leur transport au sein de la lésion chondrale? Devra-t-on les véhiculer par des nanotransporteurs? Devra-t-on les appliquer sur la lésion sous forme de pansement?

Finalement, nous avons commencé à étudier l'effet de MC sur les capacités des chondrocytes à migrer. Il semblerait que les MC favorisent la migration des chondrocytes et de leur potentiel de réparation. En plus de favoriser leur migration, il serait intéressant de voir si le MC possède un effet chimio-attractant sur les chondrocytes. Ainsi, nous pourrions imaginer de coupler un biomatériau avec les molécules mises en jeu, puis placer ce biomatériau au niveau de la zone lésée afin que les chondroprogéniteurs présents dans l'ensemble de l'articulation colonisent ce biomatériau puis comblent la lésion, dans la même idée que ce qui est fait lorsqu'un biomatériau vide est couplé à la microfracture (**Makris et al., 2014**).

Conclusion générale et perspectives

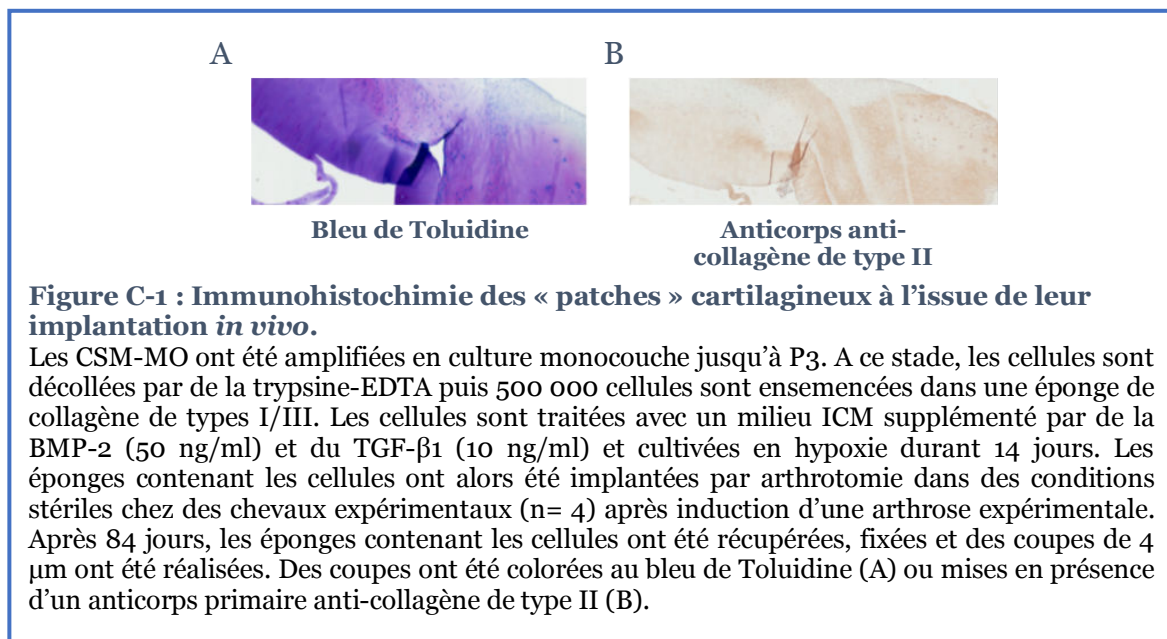
La répétition de traumatismes articulaires induit un microenvironnement propice à la dégradation du cartilage et, *in fine*, l'émergence de l'arthrose. Les traitements utilisés à l'heure actuelle visent uniquement à soulager la douleur, réduire l'inflammation et la progression de l'arthrose. Chez l'Homme, en dernier recours, la solution chirurgicale est utilisée, avec la mise en place d'une prothèse. Cette approche reste temporaire, puisque la prothèse se dégrade, tout comme l'os au contact de la prothèse, et n'est pas envisageable dans le modèle équin. Il n'y a donc pas de traitement curatif de l'arthrose que ce soit chez l'Homme ou le cheval. Notre étude s'insère dans ce contexte et avait pour but de développer une stratégie de thérapie cellulaire/tissulaire du cartilage en vue d'améliorer les prises en charge actuelles des lésions chondrales. Nous avons réalisé nos travaux sur le modèle équin puisque les affections locomotrices du cheval ont une importance prépondérante dans le secteur économique de la filière équine, et ce modèle animal pourrait constituer une preuve de concept pour la médecine humaine. En effet, le cheval et l'Homme possèdent un cartilage en de multiples points semblables, et la nature des lésions chondrales des chevaux sportifs est similaire aux lésions retrouvées chez l'Homme, particulièrement chez le sujet sportif.

La stratégie consistait en la production d'un substitut cartilagineux à partir de CSM de MO et de SCO équines, de façon semblable à des travaux antérieurs réalisés avec des CSM humaines. Les CSM ont d'abord été isolées puis caractérisées selon les critères internationalement utilisés. En se basant sur l'ensemble des critères de caractérisation, les cellules isolées présentaient les caractéristiques des CSM. Cependant, des travaux ultérieurs devront être réalisés pour affiner cette caractérisation.

Le substitut cartilagineux produit en utilisant le protocole développé chez l'Homme demeurerait perfectible pour les deux sources de CSM équines. Nous avons donc tenté de l'optimiser par différentes approches. Le protocole qui semble être le plus efficace est une culture des CSM pendant 28 jours au sein d'un biomatériau (éponge de collagène de types I/III) en présence de BMP-2 et de TGF- β 1 et dans une physioxie de type hypoxique. L'étude de la qualité du substitut cartilagineux synthétisé a été réalisée par une analyse des marqueurs typiques et atypiques d'un cartilage hyalin. Nous nous sommes aussi intéressés à Snorc. Nous pensions initialement que Snorc pouvait être assimilé à un marqueur typique du cartilage hyalin puisque l'expression de ses ARNm suivait celle des autres marqueurs typiques du cartilage comme le collagène de type II. Néanmoins, nous n'avons pas pu détecter son expression protéique dès lors que les chondrocytes étaient placés en culture et ce dès les passages les plus précoces (culture primaire, et en P1). Cela est confirmé par de récents travaux parus en 2017 qui suggèrent que Snorc serait plutôt associé à un phénotype

chondrocytaire pré-hypertrophique et à l'ossification endochondrale (**Heinonen et al., 2017**). Le rôle de Snorc, ainsi que les conditions et la signification de son expression nécessite davantage de recul, bien que nous disposions de tous les outils humains et équins (anticorps, vecteur d'expression (avec tag ou sans), promoteurs associés à des gènes rapporteurs, « **recombinant Adeno-Associated Virus** » (**rAAV**) sens et anti-sens en cours. C'est pourquoi nous n'avons pas conclu davantage sur son expression.

La validation de notre protocole devra passer par une étude du devenir du substitut une fois implanté *in vivo*. Cette approche est en cours au sein du laboratoire (implantation d'un néo-cartilage obtenu à partir de CSM de MO dans une lésion chondrale chez le cheval, provoquée de manière chirurgicale). Des coupes de la zone traitée ont été réalisées pour analyses immunohistochimiques (**Figure C-1**). Ces premiers résultats sont encourageants puisqu'une fusion partielle du néo-cartilage au cartilage sous-jacent est observée, ainsi qu'un marquage du collagène de type II, bien qu'il ne soit pas homogène. Par ailleurs, les études *in vivo* seront aussi essentielle dans le choix de la source de CSM. En cas d'échec, le protocole de différenciation des CSM pourraient être amélioré selon les pistes citées en discussion.



Finalement, l'emploi des CSM dans de nouvelles stratégies de thérapie des lésions chondrales pourrait se faire au-delà de leur capacité à se différencier en chondrocytes. En effet, elles pourraient être utilisées afin d'améliorer la redifférenciation des chondrocytes dans le cadre de la TCA, ou encore la prolifération et survie cellulaire de ces mêmes cellules. Couplée à la stratégie de production d'un substitut cartilagineux par ingénierie tissulaire ou non, l'injection de CSM indifférenciées ou de leur sécrétome (nEV) pourrait aussi être une alternative attractive aux solutions thérapeutiques actuelles.

Des travaux en ce sens sont en cours de développement au sein du laboratoire. Leur objectif vise au développement de nouveaux biomatériaux à base de molécules naturelles, ou synthétiques souples, bioimprimés ou non, pour une application sous forme de pansements thérapeutiques. Ils seront fonctionnalisés par de l'AH (différentes masses moléculaires apparentes), ou la BMP-2, voire des nEV.

De plus, en vue d'une utilisation en médecine équine ou humaine, les protocoles d'isolement et d'amplification des CSM devront être adaptés afin de se placer dans des conditions « **Good Manufacturing Practices** » (**GMP**). Pour l'instant, deux des principales limites sont l'utilisation du SVF et la standardisation des lots de néo-cartilages produits, mais ce dernier aspect pourra être pallié par l'utilisation de bioréacteurs dynamiques. De plus, du fait que cette stratégie s'attache à produire un substitut cartilagineux voué à être implanté au niveau de lésions chondrales lors des premiers stades de l'arthrose, il semble essentiel de développer une méthode pour diagnostiquer les lésions chondrales plus précocement, associée au développement de techniques d'imagerie plus sophistiquées. Différentes pistes pourraient être intéressantes, que ce soit par l'analyse de fragments de dégradation du cartilage, de miRNA ou de nEV.

Références

A

Abumaree M, Al Jumah M, Pace RA, Kalionis B (2012) The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev.* **8** : 375-392.

Adatia A, Rainsfordb KD, Keana WF (2011) Osteoarthritis of the knee and hip. Part I: aetiology and pathogenesis as a basis for pharmacotherapy. *J. Pharm. Pharmacol.* **64** : 617-625.

Ahmed ASI, Sheng MHC, Wasnik S, Baylink DJ, Lau KHW (2017) Effect of aging on stem cells. *World J. Exp. Med.* **7** : 1-10.

Aigner T & 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 & Dudhia J (1997) Phenotypic modulation of chondrocytes as a potential therapeutic target in osteoarthritis: a hypothesis. *Ann Rheum Dis.* **56** : 287-291.

Al-Saqi SH, Saliem M, Quezada HC, Ekblad A, Jonasson AF, Hovatta O, Götherström C (2015) Defined serum- and xeno-free cryopreservation of mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Bank.* **2** : 181-193.

Archer SJ, Bax A, Roberts AB, Sporn MB, Ogawa Y, Piez KA, Weatherbee JA, Tsang ML-S, Lucas R, Zheng B-L, Wenker J, Torchia DA (1993) Transforming Growth Factor beta 1: Secondary Structure As Determined by Heteronuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biochemistry* 1164-1171.

Archer CW & Francis-West P (2003) The chondrocyte. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35** : 401-404.

Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz, M (2004). Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* **50** : 1522-1532.

Aubert-Foucher E, Mayer N, Padeloup M, Pagnon A, Hartmann D, Mallein-Gerin F (2013) A unique tool to selectively detect the chondrogenic IIB form of human type II procollagen protein. *Matrix Biol.* **34** : 80-88.

Augello A & De Bari C (2010) The Regulation of Differentiation in Mesenchymal Stem Cells. *Hum. Gen Ther.* **21** : 1226-1238.

Ayhan E, Kesmezacar H, Akgun I (2014) Intraarticular injections (corticosteroid, hyaluronic acid, platelet rich plasma) for the knee osteoarthritis. *World J. Orthop.* **5** : 351-361.

B

Benya PD, Padilla SR, Nimni ME (1978) Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell* **15** : 1313-1321.

Bian L, Zhai DY, Mauck RL, Burdick JA (2011) Coculture of Human Mesenchymal Stem Cells and Articular Chondrocytes Reduces Hypertrophy and Enhances Functional Properties of Engineered Cartilage. *Tissue Eng. Part A.* **17** : 1137-1145.

Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H (2004) Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* **22** : 625-634.

Blumenfeld O, Williams FM, Hart DJ, Spector TD, Arden N, Livshits G (2013) Association between cartilage and bone biomarkers and incidence of radiographic knee osteoarthritis (RKOA) in UK females: a prospective study. *Osteoarthritis Cartilage* **21** : 923-929.

Branly T, Bertoni L, Contentin R, Rakic R, Gomez-Leduc T, Desancé M, Hervieu M, Legendre F, Jacquet S, Audigié F, Denoix JM, Demoor M, 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- β 1. *Stem Cell Rev. and Rep.* **5** : 611-630.

Braun J & Gold GE (2012) Diagnosis of Osteoarthritis : Imaging. *Bone* **51** : 278-288.

Breton A, Sharma R, Diaz AC, Parham AG, Graham A, Neil C, Whitelaw CB, Milne E, Donadeu FX (2013) Derivation and characterization of induced pluripotent stem cells from equine fibroblasts. *Stem Cells Dev.* **22** : 611-621.

Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, Ohlsson C, Peterson L (1996) Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **326** : 270-283.

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* **331** : 889-895.

Brittberg M & Winalski CS (2003) Evaluation of cartilage injuries and repair. *J. Bone Joint Surg. Am* **85-A Suppl 2** : 58-69.

C

Cao Z, Dou C, Dong S (2014) Scaffolding biomaterials for cartilage regeneration. *J. Nanomater.* **2014** : 4.

Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM (2014) Bone Morphogenetic Proteins : Structure, biological function and therapeutic applications. *Arch. Biochem. Biophys.* **561** : 64-73.

Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA (1980) Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* **56** : 289-301.

Chase LG, Lakshmipathy U, Solchaga LA, Rao MS, Vemuri MC (2010) A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem cell Res. Ther.* **1** : 8.

Chen G, Deng C, Li YP (2012) TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Int. J. Biol. Sci.* **8** : 272-288.

Chubinskaya S, Otten L, Soeder S, Borgia JA, Aigner T, Rueger DC, Loeser RF (2011) Regulation of chondrocyte gene expression by osteogenic protein-1. *Arthritis. Res. Ther.* **13** : R55.

Cochis A, Grad S, Stoddart MJ, Farè S, Altomare L, Azzimonti B, Alini M, Rimondini L (2017) Bioreactor mechanically guided 3D mesenchymal stem cell chondrogenesis using a biocompatible novel thermo-reversible methylcellulose-based hydrogel. *Sci. Rep.* **7** : 45018.

Costantini M, Idaszek J, Szöke K, Jaroszewicz J, Dentini M, Barbetta A, Brinckmann JE, Świąszkowski W (2016) 3D bioprinting of BM-MSCs-loaded ECM biomimetic hydrogels for in vitro neocartilage formation. *Biofabrication* **8** : 035002.

Cucchiari M, de Girolamo L, Filardo G, Oliveira JM, Orth P, Pape D, Reboul P (2016) Basic science of osteoarthritis. *J. Exp. Orthop.* **3**-22.

D

Danisovic L, Varga I, Polak S (2012) Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Tissue Cell* **44** : 69-73.

Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF (1989) Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J. Clin. Invest.* **84** : 678-685.

- De Crombrughe B, Lefebvre V, Behringer RR, Bi W, Murakami S, Huang W (2000) Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* **5** : 389-94.
- Desancé M, Contentin R, Bertoni L, Gomez-Leduc T, Branly T, Jacquet S, Betsch JM, Batho A, Legendre F, Audigié F, Galéra P, Demoor M (2018) Chondrogenic Differentiation of Defined Equine Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord Blood for Use in Cartilage Repair Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **19** : 537.
- Dell'Accio F, Vanlauwe J, Bellemans J, Neys J, De Bari C, Luyten FP (2003) Expanded phenotypically stable chondrocytes persist in the repair tissue and contribute to cartilage matrix formation and structural integration in a goat model of autologous chondrocyte implantation. *J. Orthop. Res.* **21** : 123-31.
- Delling U, Lindner K, Ribitsch I, Jülke H, Brehm W (2012) Comparison of bone marrow aspiration at the sternum and the tuber coxae in middle-aged horses. *Can. J. Vet. Res.* **76** : 52-56.
- 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 (2014) Cartilage tissue engineering : Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim. Biophys. Acta* **1840** : 2414-2440.
- Denoix J-M (2000) *The equine distal limb : atlas of clinical anatomy and comparative imaging*, Manson Pub./Veterinary Press.
- Dewan AK, Gibson MA, Elisseeff JH, Trice ME (2014) Evolution of autologous chondrocyte repair and comparison to other cartilage repair techniques. *Biomed. Res. Int.* **2014** : 1-11.
- Diab M, Wu JJ, Eyre DR (1996) Collagen type IX from human cartilage : a structural profile of intermolecular cross-linking sites. *Biochem. J.* **314** : 327-332.
- Di Leva G, Garofalo M, Croce CM (2014) MicroRNAs in Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech.* **9** : 287-314.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8** : 315-317.
- Duttenhoefer F, de Freitas RL, Loibl M, Bittermann G, Richards RG, Alini M, Verrier S (2015) Endothelial Progenitor Cell Fraction Contained in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Populations Impairs Osteogenic Differentiation. *BioMed Research International.* 659542.

Duval E, Leclercq S, Elissalde J-M, Demoor M, Galéra P, Boumédiène 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. *Crit. Rev. Biotechnol.* **23** : 3038-3048.

E

Edgar JR (2017) Q&A : What are exosomes, exactly? *BMC Biol.* **14** : 46-53.

Ellman MB, Yan D, Ahmadiania K, Chen D, An HS, Im HJ (2013) Fibroblast Growth Factor Control of Cartilage Homeostasis. *J. Cell. Biochem.* **114** : 735-742.

F

Fox AJS, Bedi A, Rodeo SA (2009) The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Orthopaedics* **1** : 461-468.

François M, Copland IB, Yuan S, Romieu-Mourez R, Waller EK, Galipeau J (2012) Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon- γ licensing. *Cytotherapy* **14** : 147-152.

Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG (1997) Hyaluronan : its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.* **242** : 27-33.

Freemont AJ (1996) The pathophysiology of cartilage and synovium. *Br. J. Rheumatol.* **35** : 10-3.

Freyria AM & Mallein-Gerin F (2012) Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: The indisputable role of growth factors. *Injury* **43** : 259-265.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* **3** : 393-403.

Fujioka R, Aoyama T, Takakuwa T (2013) The layered structure of the articular surface. *Osteoarthr. Cartil.* **21** : 1092-1098.

G

Galéra P, Redini F, Vivien D, Bonaventure J, Penfornis H, Loyau G, Pujol JP (1992) Effect of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) on matrix synthesis by monolayer cultures of rabbit articular chondrocytes during the dedifferentiation process. *Exp. Cell Res.* **200** : 379-392.

Galéra P, Vivien D, Pronost S, Bonaventure J, Rédini F, Loyau G, Pujol, JP (1992) Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 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.

Gelse K, Pöschl E, Aigner T (2003) Collagens - Structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55** : 1531-1546.

Goldring MB & Marcu KB (2009) Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* **11** : 224-224.

Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K (2006) The control of chondrogenesis. *J. Cell. Biochem.* **97** : 33-44.

Goldring SR & Goldring MB (2016) Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage–bone crosstalk. *Nat. Rev. Rheumatol.* **12** : 632-644.

Gomez-Leduc T, Desancé M, Hervieu M, Legendre F, Ollitrault D, de Vienne C, Herlicoviez M, Galéra P, Demoor M (2017) Hypoxia Is a Critical Parameter for Chondrogenic Differentiation of Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells in Type I/III Collagen Sponges. *Int. J. Mol. Sci.* **18** : 1-23.

Gomez-Leduc T, Hervieu M, Legendre F, Bouyoucef M, Gruchy N, Poulain L, de Vienne C, Herlicoviez M, Demoor M & Galéra P (2016) Chondrogenic commitment of human umbilical cord-blood derived mesenchymal stem cells in collagen matrices for cartilage engineering. *Sci. Rep.* **6** : 32786.

Grande DA, Pitman MI, Peterson L, Menche D, Klein M (1989) The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J. Orthop. Res.* **7** : 208-18.

Grimaud E, Heymann D, Rédini F (2002) Recent advances in TGF- β effects on chondrocyte metabolism potential therapeutic roles of TGF- β in cartilage disorders. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13** : 241-257.

Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ (1994) The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* **84** : 4164-4173.

Gründer T, Gaissmaier C, Fritz J, Stoop R, Hortschansky P, Mollenhauer J, Aicher WK (2004) Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *Osteoarthr. Cartil.* **12** : 559-567.

Grunke M & Schulze-Koops H (2006) Successful treatment of inflammatory knee osteoarthritis with tumour necrosis factor blockade. *Ann. Rheum. Dis.* **65** : 555-556.

Gutierrez-Nibeyro SD (2011) Commercial Cell-based Therapies for Musculoskeletal Injuries in Horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **27** : 363-371.

H

Hackett CH, Flaminio MJBF, Fortier LA (2011) Analysis of CD14 expression levels in putative mesenchymal progenitor cells isolated from equine bone marrow. *Stem Cells Dev.* **20** : 721-735.

Han J, Yang T, Gao J, Wu J, Qiu X, Fan Q, Ma B (2010) Specific microRNA expression during chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Med.* **25** : 377-384.

Halász K, Kassner A, Mörgelin M, Heinegård D (2007) COMP acts as a catalyst in collagen fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* **282** : 31166-31173.

Hall BK & Miyake T (2000) All for one and one for all : condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* **22** : 138-147.

Heinegård D (2009) Proteoglycans and more-from molecules to biology. *Int. J. Exp. Pathol.* **90** : 575-586.

Heinegård D & Saxne T (2011) The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7** : 50-56.

Heinonen J, Taipaleenmäki H, Roering P, Takatalo M, Harkness L, Sandholm J, Uusitalo-Järvinen H, Kassem M, Kiviranta I, Laitala-Leinonen T, Säämänen AM (2011) Snorc is a novel cartilage specific small membrane proteoglycan expressed in differentiating and articular chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* **19** : 1026-1035.

Heinonen J, Zhang FP, Surmann-Schmitt C, Honkala S, Stock M, Poutanen M, Säämänen AM (2017) Defects in chondrocyte maturation and secondary ossification in mouse knee joint epiphyses due to Snorc deficiency. *Osteoarthr. Cartil.* **25** : 1132-1142.

Henrotin Y & Reginster JY (1998) Anabolic events in osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **7** : 310-312.

Hinck AP & Huang T (2013) TGF- β Antagonists : Same Knot but Different Hold. *Structure* **21** : 1-4.

Hofer HR & Tuan RS (2016) Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. *Stem Cell Res. Ther.* **7** : 131-145.

Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, Olson L (2002) Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99** : 2199-2204.

Hoynowski SM, Fry MM, Gardner BM, Leming MT, Tucker JR, Black L, Sand T, Mitchell KE (2007) Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362** : 347-353.

Hui AH, McCarty WJ, Masuda K, Firestein GS, Sah LH (2012) A System biology approach to synovial joint lubricant in health, injury, and disease. *Wiley interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **4** : 4-37.

J

James AW, Xu Y, Lee JK, Wang R, Longaker MT (2009) Differential effects of TGF-beta1 and TGF-beta3 on chondrogenesis in posterofrontal cranial suture-derived mesenchymal cells *in vitro*. *Plast. Reconstr. Surg.* **123** : 31-43.

Jones E, English A, Churchman SM, Kouroupis D, Boxall SA, Kinsey S, Giannoudis PG, Emery P, McGonagle D (2010) Large-scale extraction and characterization of CD271+ multipotential stromal cells from trabecular bone in health and osteoarthritis : implications for bone regeneration strategies based on uncultured or minimally cultured multipotential stromal cells. *Arthritis Rheum.* **62** : 1944-1954.

Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME (1990) Transforming Growth Factor- β and the Initiation of Chondrogenesis and Osteogenesis in the Rat Femur. *J. Cell Biol.* **110** : 2195-2207.

K

Kafienah W, Mistry S, Dickinson SC, Sims TJ, Learmonth I, Hollander AP (2007) Three-dimensional cartilage tissue engineering using adult stem cells from osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum.* **56** : 177-187.

Karsenty (2003) The complexities of skeletal biology. *Nature* **423** : 316-318.

Karsenty G (1998) Genetics of skeletogenesis. *Dev. Genet.* **22** : 301-13.

Karystinou A, Dell'Accio F, Kurth TB, Wackerhage H, Khan IM, Archer CW, Jones EA, Mitsiadis TA, De Bari C (2009) Distinct mesenchymal progenitor cell subsets in the adult human synovium. *Rheumatology (Oxford)* **48** : 1057-1064.

Keller L, Schwinté P, Gomez-Barrena E, Arruebo M & Benkirane-Jessel N (2017) Smart Implants as a Novel Strategy to Regenerate Well-Founded Cartilage. *Trends Biotechnol.* **35** : 8-11.

Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB (2002) Structure and function of aggrecan. *Cell Res.* **12** : 19-32.

Koch TG, Heerkens T, Thomsen PD, Betts DH (2007) Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnol.* **7**.

Koch TG, Thomsen PD, Betts DH (2009) Improved isolation protocol for equine cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* **11** : 443-447.

Kolf CM, Cho E, Tuan RS (2007) Biology of adult mesenchymal stem cells : regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res. Ther.* **9** : 204.

Kobayashi T, Lu J, Cobb BS, Rodda SJ, McMahon AP, Schipani E, Merckenschlager M, Kronenberg HM (2008) Dicer dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105** : 1949-1954.

Kong L , Zheng LZ , Qin L, Ho KKW (2017) Role of mesenchymal stem cells in osteoarthritis treatment. *J. Orthop. Trans.* **9** : 89-103.

Kozhemyakina E, Lassar AB, Zelzer E (2015) A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Development* **142** : 817-831.

Kuyinu EL, Narayanan G, Nair LS, Laurencin CT (2016) Animal models of osteoarthritis : classification, update, and measurement of outcomes. *J. Orthop. Surg. Res.* **11** : 1-27.

L

Lafont JE (2010) Lack of oxygen in articular cartilage: consequences for chondrocyte biology. *Int. J. Exp. Pathol.* **91** : 99-106.

Lazarus JE, Hegde A, Andrade AC, Nilsson O, Baron J (2007) Fibroblast growth factor expression in the postnatal growth plate. *Bone* **40** : 577-586.

Lee KBL, Hui JHP, Song IC, Ardany L, Lee EH (2007) Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects-a porcine model. *Stem Cells.* **2511** : 2964-2971.

Lefebvre V, Behringer RR, de Crombrughe B (2001) L-Sox5, Sox6 and Sox 9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthr. Cartil. Suppl A* : S69-75.

Legendre F, Ollitrault D, Gomez-Leduc T, Bouyoucef M, 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- β 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, Boumediene K, Galéra P, 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** : 550-557.

Levorson EJ, Santoro M, Kasper FK, Mikos AG (2014) Direct and indirect co-culture of chondrocytes and mesenchymal stem cells for the generation of polymer/extracellular matrix hybrid constructs. *Acta Biomater.* **10** : 1824-1835.

Li G, Yin J, Gao J, Cheng TS, Pavlos NJ, Zhang C, Zheng MH (2013) Subchondral bone in osteoarthritis : insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis Res. Ther.* **6** : 15-223.

Li H, Ghazanfari R, Zacharaki D, Ching Lim H, Scheduling S (2016) Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1370** : 109-118.

Li X, Duan L, Liang Y, Zhu W, Xiong J, Wang D (2016) Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Contribute to Chondrogenesis in Coculture with Chondrocytes. *Biomed. Res. Int.* **2016** : 1-16.

Li Z, Liu C, Xie Z, Song P, Zhao RCH, Guo L, Liu Z, Wu Y (2011) Epigenetic Dysregulation in Mesenchymal Stem Cell Aging and Spontaneous Differentiation. *PLoS ONE* **6** : e20526.

Litwic A, Edwards M, Dennison E, Cooper C (2013) Epidemiology and Burden of Osteoarthritis. *Br. Med. Bull.* **105** : 185-199.

Liu K, Zhou GD, Liu W, Zhang WJ, Cui L, Liu X, Liu TY, Cao Y (2008) The dependence of *in vivo* stable ectopic chondrogenesis by human mesenchymal stem cells on chondrogenic differentiation *in vitro*. *Biomaterials* **29** : 2183-2192.

Lohmander S (1988) Proteoglycans of joint cartilage. Structure, function, turnover and role as markers of joint disease. *Baillieres Clin. Rheumatol.* **2** : 37-62.

Luo Y, Sinkeviciute D, He Y, Karsdal M , Henrotin Y , Mobasher A, Önerfjord P , Bay-Jensen A (2017) The minor collagens in articular cartilage. *Protein Cell* **8** : 560-572.

M

Mandilaras V, Vernon M, Meryet-Figuière M, Karakasis K, Lambert B, Poulain L, Oza A, Denoyelle C, Lheureux S (2017) Updates and current challenges in microRNA research for personalized medicine in ovarian cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* **8** : 927-943.

Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, Hu JC, Athanasiou KA (2014) Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat. Rev. Rheumatol.* **11** : 21-34.

Man GS & Mologhianu G (2014) Osteoarthritis pathogenesis – a complex process that involves the entire joint. *J. Med. life* **7** : 37-41.

Markway BD, Cho H, Johnstone B (2013) Hypoxia promotes redifferentiation and suppresses markers of hypertrophy and degeneration in both healthy and osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* **15** : R92.

Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y (2014) Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death and Differ.* **21** : 216-225.

Manferdini C, Maumus M, Gabusi E, Piacentini A, Filardo G, Peyrafitte JA, Jorgensen C, Bourin P, Fleury-Cappellesso S, Facchini A, Noël D, Lisignoli G (2013) Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Exert Antiinflammatory Effects on Chondrocytes and Synoviocytes From Osteoarthritis Patients Through Prostaglandin E2. *Arthritis Rheum.* **65** : 1271-1281.

Maumus M, Manferdini C, Toupet K, Peyrafitte JA, Ferreira R, Facchini A, Gabusi E, Bourin P, Jorgensen C, Lisignoli G, Noël D (2013) Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis. *Stem Cell Res.* **11** : 834-844.

Mayer N, Lopa S, Talò G, Lovati AB, Padeloup M, Riboldi SA, Moretti M, 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, Hering TM (2008) Expression of two novel alternatively spliced COL2A1 isoforms during chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* **27** : 254-266.

McCoy AM (2015) Animal Models of Osteoarthritis : Comparisons and Key Considerations. *Vet. Pathol.* 1-16.

McLeod CM & Mauck RL (2017) On the origin and impact of mesenchymal stem cell heterogeneity: new insights and emerging tools for single cell analysis. *Eur. Cell. Mater.* **34** : 217-231.

McIlwraith CW, Frisbie DD (2012) The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone and Joint* **1** : 297-309.

Mendler M, Eich-Bender SG, Vaughan L, Winterhalter KH, Bruckner P (1989) Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *J. Cell Biol.* **108** : 191-197.

Miller EJ & Matukas VJ (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.

Mobasheri A, Richardson S, Mobasheri R, Shakibaei M, Hoyland JA (2005) Hypoxia inducible factor-1 and facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT3 : putative molecular components of the oxygen and glucose sensing apparatus in articular chondrocytes. *Histol. Histopathol.* **20** : 1327-1338.

Moll G, Alm JJ, Davies LC, von Bahr L, Heldring N, Stenbeck-Funke L, Hamad OA, Hinsch R, Ignatowicz L, Locke M, Lönnies H, Lambris JD, Teramura Y, Nilsson-Ekdahl K, Nilsson B, Le Blanc K. (2014) Do Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells Display Impaired Immunomodulatory and Therapeutic Properties? *Stem Cells* **32** : 2430-2442.

Moran CJ, Ramesh A, Brama PAJ, O'Byrne JM, O'Brien FJ, Levingstone TJ (2016) The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair. *J. Exp. Orthop.* **3** : 1-12.

Moulharat N, Lesur C, Thomas M, Rolland-Valognes G, Pastoureau P, Anract P, De Ceuninck F, Sabatini M (2004) Effects of transforming growth factor-beta on aggrecanase production and proteoglycan degradation by human chondrocytes in vitro. *Osteoarthr. Cartil.* **12** : 296-305.

Mukaida T, Urabe K, Naruse K, Aikawa J, Katano M, Hyon SH, Itoman M (2005) Influence of threedimensional culture in type II collagen sponge on primary cultured and dedifferentiated chondrocytes. *J. Orthop. Sci.* **10** : 521-528.

N

Nakashima M & Reddi AH (2003) The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* **21** : 1025-1032.

Nelson L, Mc Carthy HE, Fairclough J, Williams R, Archer CW (2014) Evidence of a viable pool of stem cells within human osteoarthritic cartilage. *Cartilage* **5** : 203-214.

Nishimura R, Wakabayashi M, Hata K, Matsubara T, Honma S, Wakisaka S, Kiyonari H, Shioi G, Yamaguchi A, Tsumaki N, Akiyama H, Yoneda T (2012) Osterix regulates calcification and degradation of chondrogenic matrices through matrix metalloproteinase 13 (MMP13) expression in association with transcription factor Runx2 during endochondral ossification. *J. Biol. Chem.* **287** : 33179-33190.

O

Oikonomopoulos A, van Deen WK, Manansala AR, Lacey PN, Tomakili TA, Ziman A, Hommes DW (2015) Optimization of human mesenchymal stem cell manufacturing: the effects of animal/xeno-free media. *Sci. Rep.* **5** : 16570.

Oka C, Tsujimoto R, Kajikawa M, Koshiha-Takeuchi K, Ina J, Yano M, Tsuchiya A, Ueta Y, Soma A, Kanda H, Matsumoto M, Kawaichi M (2004) HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins. *Development* **131** : 1041-1053.

Oke SL & McIlwraith CW (2010) Review of the economic impact of osteoarthritis and oral joint-health supplements in horses. *Joints AAEP* **56** : 12-16.

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, Boumediene K, Demoor M, 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.

Ortved KF & Nixon AJ (2015) Cell-based cartilage repair strategies in the horse. *Vet. J.* 1-12.

Ourradi K, Sharif M (2017) Biomarkers for Diagnosis of Osteoarthritis. *JSM Bone and Joint Dis.* **1** : 1002-1007.

P

Pelttari K, Winter A, Steck E, Goetzke K, Hennig T, Ochs BG, Aigner T, Richter W (2006) Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum.* **54** : 3254-3266.

Perkins N, Reid S, Morris R (2005) Profiling the New Zealand Thoroughbred racing industry. 2. Conditions interfering with training and racing. *N. Z. Vet. J.* **53** : 59-68.

Penny J, Harris P, Shakesheff K, Mobasher A (2012) The biology of equine mesenchymal stem cells : phenotypic characterization, cell surface markers and multilineage differentiation. *Front. Biosci.* **17** : 892-908.

Pham T (2009) Les injections intra-articulaires de hanche dans la coxarthrose : corticoïdes, hyaluronan. *Rev. Rhum. Ed. Fr.* **76** : 356-360.

Phinney DG (2012) Functional Heterogeneity of Mesenchymal Stem Cells : Implications for Cell Therapy. *J. Cell. Biochem.* **113** : 2806-2812.

Phinney DG & Pittenger MF (2017) Concise Review : MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells* 1-8.

Pigott JH, Ishihara A, Wellman ML, Russell DS, Bertone AL (2013) Inflammatory effects of autologous, genetically modified autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. *Vet. Comp. Orthopaed.* **26** : 453-460.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284** : 143-147.

Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Laverty S (2001) Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* S26-33.

Preston SA, Trumble TN, Zimmel DN, Chmielewski TL, Brown MP, Hernandez JA (2008) Lameness, athletic performance, and financial returns in yearling Thoroughbreds bought for the purpose of resale for profit. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **232** : 85-90.

Pretzel D, Linss S, Rochler S, Endres M, Kaps C, Alsalameh S, Kinne RW (2011) Relative percentage and zonal distribution of mesenchymal progenitor cells in human osteoarthritic and normal cartilage. *Arthritis Res. Ther.* **13** : R64.

Prockop DJ, Sieron AL, Li SW (1998) Procollagen n-proteinase and procollagen C-proteinase. Two unusual metalloproteinases that are essential for procollagen processing probably have important : Roles in development and cell signaling. *Matrix Biol.* **16** : 399-408.

R

Rakic R, Bourdon B, Demoor M, Maddens S, Saulnier N, Galéra P (2018) Differences in the intrinsic chondrogenic potential of equine umbilical cord matrix and cord blood mesenchymal stromal/stem cells for cartilage regeneration. *Sci. Rep.*

Rakic R, Bourdon B, Hervieu M, Branly T, Legendre F, Saulnier N, Audigié F, Maddens S, Demoor M, Galéra P (2017) RNA Interference and BMP-2 Stimulation Allows Equine Chondrocytes Redifferentiation in 3D-Hypoxia Cell Culture Model: Application for Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation. *Int. J. Mol. Sci.* **18** : 1-23.

Rand JA, Trousdale RT, Ilstrup DM, Harmsen WS (2003) Factors affecting the durability of primary total knee prostheses. *J. Bone Joint Surg. Am.* **85** : 259-65.

Renard E, Porée B, Chadjichristos C, Kypriotou M, Maneix L, Bigot N, Legendre F, Ollitrault D, De Crombrughe B, Mallein-Gerin F, Moslemi S, Demoor M, Boumédiène K, Galéra P (2012) Sox9/Sox6 and Sp1 are involved in the insulin-like growth factor-I-mediated upregulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes. *J. Mol. Med.* **90** : 649-666.

Rengel Y, Ospelt C, Gay S (2007) Proteinases in the joint : clinical relevance of proteinases in joint destruction. *Arthritis Res. Ther.* **9** : 221.

Ricard-Blum S (2011). The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* **3** : a004978.

Robins JC, Akeno N, Mukherjee A, Dalal RR, Aronow BJ, Koopman P, Clemens TL (2005) Hypoxia induces chondrocyte-specific gene expression in mesenchymal cells in association with transcriptional activation of Sox9. *Bone* **37** : 313-322.

Rojewski MT, Fekete N, Baila S, Nguyen K, Fürst D, Antwiler D, Dausend J, Kreja L, Ignatius A, Sensebé L, Schrezenmeier H (2013) GMP-compliant isolation and expansion of bone marrow-derived MSCs in the closed, automated device quantum cell expansion system. *Cell Transplant.* **22** : 1981-2000.

Ross M & Pawlina W (2011) Histology A Text and Atlas. *Lippincott Williams & Wilkins* : 1-1996.

Ryan MC & Sandell LJ (1990) Differential expression of a cysteine-rich domain in the amino-terminal propeptide of type II (cartilage) procollagen by alternative splicing of mRNA. *J. Biol. Chem.* **265** : 10334-10339.

S

Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, Tagliafico E, Ferrari S, Robey PG, Riminucci M, Bianco P (2007) Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* **131** : 324-336.

Sandell LJ, Nalin AM, Reife RA (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.

Sandell LJ, Morris N, Robbins JR, Goldring MB (1991) Alternatively spliced type II procollagen mRNAs define distinct populations of cells during vertebral development : differential expression of the aminopropeptide. *J. Cell Biol.* **114** : 1307-1319.

Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE (2006) A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on *in vivo* cartilage healing and repair. *Osteoarthr. Cartil.* **14** : 403-12.

Schofield R (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4** : 7-25.

Seeger FH, Tonn T, Krzossok N, Zeither AM, Dimmeler S (2007) Cell isolation procedures matter: A comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **28** : 766-772.

Sensebé L, Bourin P, Tarte K (2011) Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Hum. Gene Ther.* **22** : 19-26.

Sharif M, Kirwan J, Charni N, Sandell LJ, Whittles C, Garnero P (2007) A 5-yr longitudinal study of type IIA collagen synthesis and total type II collagen degradation in patients with knee osteoarthritis--association with disease progression. *Rheumatology* **46** : 938-943.

Shen G (2005) The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthod. Craniofac. Res.* **8** : 11-17.

Söder S, Hambach L, Lissner R, Kirchner T, Aigner T (2002) Ultrastructural localization of type VI collagen in normal adult and osteoarthritic human articular cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* **10** : 464-470.

Sokolove J & Lepus CM (2013) Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis : latest findings and interpretations. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* **5** : 77-94.

Shi M, Zhu J, Wang R, Chen X, Mi L, Walz T, Springer TA (2011) Latent TGF- β structure and activation. *Nature* **474** : 343-349.

Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M (2003) Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* **33** : 919-926.

Stewart AA, Byron CR, Pondenis H, Stewart MC (2007) Effect of fibroblast growth factor-2 on equine mesenchymal stem cell monolayer expansion and chondrogenesis. *Am. J. Vet. Res.* **68** : 941-945.

T

Takahashi K & Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126** : 663-676.

Tavella S, Raffo P, Tacchetti C, Cancedda R, Castagnola P (1994) N-CAM and N-cadherin expression during in vitro chondrogenesis. *Exp. Cell Res.* **215** : 354-62.

Tessier L, Bienzle D, Williams LB, Koch TG (2015) Phenotypic and Immunomodulatory Properties of Equine Cord Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *PLoS One* **10** : e0122954.

Thiede RM, Lu Y, Markel MD (2012) A review of the treatment methods for cartilage defects. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* **25** : 263-272.

Thoms BL, Dudek KA, Lafont JE, Murphy CL (2013) Hypoxia promotes the production and inhibits the destruction of human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* **65** : 1302-1312.

Toh W S, Lai R C, Po Hui J H, Lim S K (2016) MSC exosome as a cell-free MSC therapy for cartilage regeneration: implications for osteoarthritis treatment. *Semin. Cell Dev. Biol.* 1-22.

V

Van Wyk JJ & Smith EP (1999) Insulin-like growth factors and skeletal growth : possibilities for therapeutic interventions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84** : 88-96.

Von Bahr L, Batsis I, Moll G, Hägg M, Szakos A, Sundberg B, Uzunel M, Ringden O, Le Blanc K (2012) Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation. *Stem Cells* **30** : 1575-1578.

Vidal MA, Walker NJ, Napoli E, Borjesson DL (2012) Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue. *Stem Cells Dev.* **21** : 273-283.

Vinatier C & Guicheux J (2016) Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* **59** : 139-144.

Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R (2017) Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **18** : 1852-1876.

W

Wang Q, Rozelle A, Lepus C, Scanzello C, Song J, Larsen D, Larsen DM, Crish JF, Bebek G, Ritter SY, Lindstrom TM, Hwang I, Wong HH, Punzi L, Encarnacion A, Shamloo M, Goodman SB, Wyss-Coray T, Goldring SR, Banda NK, Thurman JM, Gobeze R, Crow MK, Holers VM, Lee DM, Robinson WH. (2011) Identification of a central role for complement in osteoarthritis. *Nat Med.* **17** : 1674-1679.

Watt FM & Driskell RR (2010) The therapeutic potential of stem cells. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **365** : 155-163.

Wells T, Davidson C, Mörgelin M, Bird JLE, Bayliss MT, Dudhia J (2003) Age-related changes in the composition, the molecular stoichiometry and the stability of proteoglycan aggregates extracted from human articular cartilage. *Biochem. J.* **370** : 69-79.

Williams R, Khan IM, Richardson K, Nelson L, McCarthy HE, Anabalsi T, Singhra SK, Dowthwaite GP, Jones RE, Baird DM, Lewis H, Roberts S, Shaw HM, Dudhia J, Fairclough J, Briggs T, Archer CW (2010) Identification and clonal characterisation of a progenitor cell sub-population in normal human articular cartilage. *PLoS ONE* **5** : e13246.

Wu W, Tian B, Qu X, Liu F, Tang T, Qin A, Zhu Z, Dai K (2014) MicroRNAs play a role in chondrogenesis and osteoarthritis (review). *Int. J. Mol. Med.* **34** : 13-23.

X

Xia B, Chen D, Zhang J, Hu S, Jin H, Tong P (2014) Osteoarthritis Pathogenesis: A Review of Molecular Mechanisms. *Calcif. Tissue Int.* **95** : 495-505.

Xu L, Golshirazian I, Asbury BJ, 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

Yang HN, Park JS, Woo DG, Jeon SY, Do H-J, Lim H-Y, Kim SW, Kim J-H, Park K-H (2011) Chondrogenesis of mesenchymal stem cells and dedifferentiated chondrocytes by transfection with SOX Trio genes. *Biomaterials* **32** : 7695-7704.

Yang L, Tsang KY, Tang HC, Chan D, Cheah KSE (2014) Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111** : 12097-120102.

Z

Zelzer E, Glotzer DJ, Hartmann C, Thomas D, Fukai N, Soker S, Olsen BR (2001) Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mech. Dev.* **106** : 97-106.

Zhang Z, Kang Y, Zhang Z, Zhang H, Duan X, Liu J, Li X, Liao W (2012) Expression of microRNAs during chondrogenesis of human adipose-derived stem cells. *Osteoarthr. Cartil.* **20** : 1638-1646.

Annexes

I. Publications scientifiques

Desancé M, Contentin R, Bertoni L, Gomez-Leduc T, Branly T, Jacquet S, Betsch JM, Batho A, Legendre F, Audigié F, Galéra P*, Demoor M* (2018) Chondrogenic differentiation of defined equine mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood for use in cartilage repair therapy. *Int J Mol Sci.* **19**. * : Contribution équivalente des auteurs.

Branly T*, Contentin R*, Desancé M, Concari M, Jacquet T, Rakic R, Bertoni L, Jacquet S, Mallein-Gerin F, Denoix JM, Legendre F, Audigié F, Demoor M, Galéra P (2018) 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. *Int J Mol Sci.* **18**. * : Contribution équivalente des auteurs.

Branly T*, Bertoni L*, Contentin R, Rakic R, Gomez-Leduc T, Desancé M, Hervieu M, Legendre F, Jacquet S, Audigié F, Denoix JM, Demoor M, 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- β 1. *Stem Cell Rev.* **13** : 611-630. * : Contribution équivalente des auteurs.

II. Communications orales

- Communication orale lors des 45^{ème} Journées Annuelles de l'AVEF (Paris, 2017)

Différenciation de cellules souches mésenchymateuses équine de moelle osseuse en chondrocytes articulaires : Quelle est la meilleure stratégie ?

Contentin R, Branly T, Desancé M, Concari M, Jacquet T, Rakic R, Bertoni L, Jacquet S, Denoix JM, Legendre F, Audigié F, Demoor M, Philippe Galéra.

- Communication orale lors de la 2^{ème} Journée des doctorants de la filière équine (Paris, 2016)

Nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques pour le traitement des affection articulaire chez le cheval

- Communication orale lors de la 19^{ème} Journée de l'école doctorale (Caen, 2016)

Characterization of equine bone marrow mesenchymal stem cells which are able to differentiate into phenotypically stabilized chondrocytes synthesizing a hyaline-like neo-matrix

Branly T, Contentin R, Desancé M, Bertoni L, Jacquet S, Rakic R, Legendre F, Audigié F, Demoor M, Denoix JM, Galéra P.

- Communication orale lors de la XXIII^{ème} réunion annuelle de la SFBMec (Lyon, 2015)

Characterization and use of equine bone marrow mesenchymal stem cells in equine cartilage engineering. *In vivo* proof of concept in the equine model.

Branly T, Contentin R, Concari M, Desancé M, Bertoni L, Jacquet S, Rakic R, Legendre F, Audigié F, Demoor M, Denoix JM, Galéra P.

III. Communications affichées

- Poster lors des 45^{ème} Journées Annuelles de l'AVEF (Paris, 2017)

Caractérisation et différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) de la moelle osseuse équine et du sang de cordon ombilical pour des applications en ingénierie du cartilage.

Branly T, Desancé M, Bertoni L, Contentin R, Rakic R, Concari M, Legendre F, Jacquet S, Audigié F, Denoix JM, Demoor M, Galéra P. Prix de la meilleure communication

- Poster lors des 19^{ème} Journées Française de la Biologie des Tissus Minéralisés (Lyon, 2017)

Equine bone marrow mesenchymal stem cells in cartilage engineering. Study of their hyaline cartilage forming potential when cultured under hypoxia in a biomaterial in the presence of BMP-2 and TGF- β 1.

Branly T, Bertoni L, Contentin R, Rakic R, Gomez-Leduc T, Desancé M, Hervieu M, Legendre F, Jacquet S, Audigié F, Denoix JM, Demoor M, Galéra P.

- Poster lors des 19^{ème} Journées Française de la Biologie des Tissus Minéralisés (Lyon, 2017)

Improvement of the chondrocyte-specific phenotype upon equine bone marrow mesenchymal stem cell differentiation. Influence of TGF- β 1, TGF- β 3, associated with BMP-2 and type I collagen siRNAs.

Contentin R, Branly T, Desancé M, Concari M, Jacquet T, Rakic R, Bertoni L, Jacquet S, Mallein-Gerin F, Denoix JM, Legendre F, Audigié F, Demoor M, Galéra P.

- Poster lors de la 19^{ème} Journée de l'école doctorale (Caen, 2016)

Characterization of equine bone marrow mesenchymal stem cells which are able to differentiate into phenotypically stabilized chondrocytes synthesizing a hyaline-like neo-matrix

Branly T, Contentin R, Desancé M, Bertoni L, Jacquet S, Rakic R, Legendre F, Audigié F, Demoor M, Denoix JM, Galéra P.

- Poster lors des 18^{ème} Journées Française de la Biologie des Tissus Minéralisés (Nancy, 2016)

Characterization and differentiation of equine umbilical cord blood mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering

Desancé M, Bertoni L, Contentin R, Branly T, Gomez-Leduc T, Rakic R, Jacquet S, Legendre F, Audigié F, Galéra P, Demoor M.

IV. Encadrement de stagiaires

2018 :

- Encadrement d'une stagiaire en première année de Master (2 mois).

- Encadrement d'un stagiaire en deuxième année de Master (5 mois).

- Co-encadrement d'un binôme de deux élèves (collégien et lycéen) dans le cadre Dispositif «Apprentis chercheurs» de l'association «Arbre des Connaissances» (7 séances).

V. Enseignement

2016-2017:

- Enseignements de TD et TP au sein des modules de cultures cellulaires (2^{ème} année) et d'immunologie (1^{ère} année) à l'IUT de Caen (64 h).

VI. Formations

2018 :

- « Structure et fonctionnement de l'enseignement supérieur et la recherche » (3h).
- « Financement et management des projets de recherche » (12h).

2017 :

- Formation aux missions d'enseignement organisée par l'ESPE de Caen (30h).

2016 :

- « Fonctions avancées de Word » (6h).
- « Fonctions avancées d'Excel » (6h).
- « Règles de publication de documents scientifiques (thèses, posters, articles) » (12h).
- « Initiation à la bibliométrie, archive ouverte, brevets et marques » (12h).

Nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des affections articulaires chez le cheval

Le cartilage articulaire est un tissu possédant une faible capacité de réparation intrinsèque. Dès lors, la répétition de traumatismes articulaires induit un microenvironnement propice à la dégradation du cartilage et, *in fine*, l'émergence de l'arthrose. Les traitements utilisés à l'heure actuelle visent uniquement à soulager la douleur, réduire l'inflammation et la progression de l'arthrose. Ainsi, le traitement des lésions chondrales équinnes revêt une importance majeure puisque les affections locomotrices constituent la première cause de baisse de performances et d'arrêt prématuré de la carrière du cheval sportif. De plus, le cheval est le modèle animal qui possède le cartilage articulaire le plus semblable à celui de l'Homme et, en conséquence, représente un modèle d'étude pertinent pour les lésions chondrales humaines. Dans ce contexte, notre étude s'est attachée à développer de nouvelles stratégies pour le traitement des lésions chondrales basées sur la différenciation chondrogénique de CSM en vue de produire *in vitro* un substitut cartilagineux implantable en site articulaire. Ainsi, nous avons d'abord isolé et caractérisé des CSM équinnes à partir de prélèvements de moelle osseuse (MO) et de sang de cordon ombilical (SCO), puis, nous avons réalisé la différenciation en cultivant les CSM durant 14 jours en hypoxie ou normoxie au sein d'un biomatériau (éponges de collagène de types I/III), en présence de BMP-2 et TGF- β 1 et de siRNA ciblant le collagène de type I et HtrA1, molécules atypiques du cartilage hyalin. Bien que ce protocole nous ait permis d'obtenir un substitut cartilagineux riche en marqueurs du cartilage hyalin comme le collagène de type II et l'agrécan, la présence du collagène de type I persistait. Nous avons donc tenté d'optimiser le protocole en allongeant le temps de culture, en utilisant le TGF- β 3, et en modifiant la stratégie d'interférence par l'ARN. Cette étape nous a permis de conclure sur l'effet bénéfique de l'allongement de la culture à 28 jours et l'efficacité des facteurs chondrogéniques initialement utilisés. Néanmoins, la stratégie d'interférence par l'ARN demeure encore perfectible. Finalement, nous avons comparé la qualité du substitut cartilagineux obtenu après différenciation en fonction de la source de CSM utilisée. Les CSM de MO semblent les plus adaptées mais le protocole que nous avons utilisé n'est probablement pas le plus efficace pour induire la différenciation des CSM de SCO. Dans une partie complémentaire, bien que ces résultats soient préliminaires, nous avons montré que le sécrétome des CSM pourrait être un formidable outil afin d'améliorer le traitement des lésions chondrales. Dans leur ensemble, les résultats obtenus permettent d'avoir un regard optimiste concernant la mise en place de thérapies cellulaire et tissulaire du cartilage, aussi bien en médecine équine qu'humaine.

Mots clés : Cartilage, Arthrose, Chondrocytes, Cellules souches mésenchymateuses, Milieu conditionné, Exosomes.

New therapeutic strategies for the treatment of horse joint disorders

Articular cartilage is a tissue with low intrinsic repair abilities. Therefore, repeated traumas lead to cartilage degradation and ultimately, to the emergence of osteoarthritis (OA). Current therapies aim to reduce pain, inflammation and to prevent the progression of OA. Thus, treatment of equine chondral lesions is of major importance since locomotor disorders are the main causes of poor performance and early retirement of the athlete horses. In addition, the horse is an animal model with the most human-like articular cartilage and, therefore, represents the best relevant model to study human chondral lesions and arthropathies. In this context, our study focused on developing new strategies for the treatment of chondral lesions based on the chondrogenic differentiation of equine mesenchymal stem cells (MSC) in order to produce an *in vitro* neo-synthesized cartilaginous substitute, which could be implantable in the chondral lesion site. Thus, we first isolated and characterized equine MSC derived from bone marrow (BM) and umbilical cord blood (UCB). Then, we have differentiated MSC by culturing them for 14 days in hypoxia or normoxia, in a biomaterial (types I / III collagen sponges), in the presence of BMP-2 and TGF- β 1 and siRNA targeting type I collagen and HtrA1, two atypical hyaline cartilage molecules overexpressed in OA. Although this protocol allowed us to obtain a cartilaginous substitute composed of large amounts of hyaline cartilage markers such as type II collagen and aggrecan, the presence of type I collagen persisted. We therefore tried to optimize the protocol by extending the culture time, using TGF- β 3, and modifying the RNA-interference strategy. We have concluded on the beneficial effect of the lengthening of the culture to 28 days and the effectiveness of the chondrogenic factors initially used. Nevertheless, the RNA-interference strategy still remains perfectible. Finally, we compared the quality of the neo-synthesized cartilaginous substitute according to the source of MSC used. BM-MSC seem to be the most suitable, but the protocol we used is probably not the most effective for inducing UCB-MSC differentiation. In a complementary part, although these results are very preliminary, we have shown that the MSC secretome could be a tremendous tool to improve current therapies of chondral lesions. Overall, the results obtained make it possible to look ahead with optimism, in order to obtain future efficient cartilage tissue engineering therapies, both in equine and human medicines.

Key words : Cartilage, Osteoarthritis, Chondrocytes, Mesenchymal stem cells, Conditioned medium, Exosomes.

Laboratoire BIOTARGEN-Université de Caen Normandie-UFR santé-3 Rue Nelson Mandela-14280 Saint Contest
Romain Contentin-romaincontentin@hotmail.fr