



HAL
open science

Effets de deux hydrolysats de collagène de poisson sur le métabolisme de chondrocytes articulaires équinés et humains : applications pour le traitement de l'arthrose et l'ingénierie du cartilage

Bastien Bourdon

► To cite this version:

Bastien Bourdon. Effets de deux hydrolysats de collagène de poisson sur le métabolisme de chondrocytes articulaires équinés et humains : applications pour le traitement de l'arthrose et l'ingénierie du cartilage. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMC407 . tel-04229264

HAL Id: tel-04229264

<https://theses.hal.science/tel-04229264>

Submitted on 5 Oct 2023

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

Effets de deux hydrolysats de collagène de poisson sur le métabolisme de chondrocytes articulaires équins et humains. Applications pour le traitement de l'arthrose et l'ingénierie du cartilage

**Présentée et soutenue par
Bastien BOURDON**

**Thèse à caractère confidentiel soutenue le 25/05/2021
devant le jury composé de**

M. FRÉDÉRIC MALLEIN-GERIN	Directeur de recherche au CNRS, CNRS PARIS	Rapporteur du jury
Mme FRANCOISE REDINI	Directeur de recherche à l'INSERM, Université de Nantes	Rapporteur du jury
M. XAVIER CHEVALIER	Professeur des universités PraticienHosp, Université de Marne la Vallée Paris Est	Membre du jury
M. ROMAIN CONTENTIN	Docteur, Children's hospital of Philadelphia	Membre du jury
M. NICOLAS GRUCHY	Maître de conférences, praticien hosp., CHU de Caen	Membre du jury
Mme SARAH ODDOUX	Responsable en Recherche & Développement, Laboratoire Dielen	Membre du jury
M. PHILIPPE GALERA	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse
M. JEROME LAFONT	Maître de conférences HDR, Université Lyon 1 Claude Bernard	Président du jury

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



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



Ces travaux de thèse ont été menés au sein de l'équipe OErAGen (Ossification Endochondrale et Anomalies Génétiques du développement) du laboratoire Biotargen (Biologie, génétique et thérapies ostéoarticulaires et respiratoires).



Mon contrat doctoral a été financé par le laboratoire DIELEN, par le biais d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE), délivrée par l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT).



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



Remerciements

Je tiens, en tout premier lieu, à remercier le Professeur **Philippe Galéra**. Cette histoire a commencé lors de tes enseignements. Tu sais mieux que quiconque transmettre et enseigner cette science que tu maîtrises si bien. Tu m'as permis d'intégrer ton laboratoire et tu m'as fait confiance dès mon stage de Master 1, puis un an plus tard, en Master 2. Je te remercie de m'avoir confié cette thèse CIFRE et ce très beau projet. Tu as toujours su être présent pour mener ce projet à bien et m'accompagner au cours de ces trois années de thèse. Merci pour tes conseils avisés et ton soutien indéfectible. Ce fut un réel plaisir et un véritable honneur que tu diriges cette thèse, j'ai tellement appris à tes côtés, tu resteras à jamais un visionnaire et un exemple de travail pour moi. Merci pour tout.

Merci à **Antoine Noël**, Président du laboratoire Dielen. Votre engagement dans une thèse CIFRE fut un véritable challenge dans lequel s'est lancée l'entreprise Dielen, challenge mené avec brio. Merci de m'avoir fait confiance durant ces trois années de thèse, merci pour votre disponibilité et votre écoute. Vous avez tout mis en œuvre pour que le projet avance et avez assuré un soutien sans faille au projet. Vous avez su m'intégrer à la famille Dielen et je ne peux que me sentir fier d'avoir parcouru ce bout de chemin à vos côtés.

Je tiens également à remercier les docteurs **Françoise Rédini** et **Frédéric Mallein-Gérin** d'avoir accepté de juger les travaux présentés lors de cette thèse. Merci pour le temps passé à examiner ces travaux et votre regard critique de ce manuscrit. Merci au professeur **Xavier Chevalier** d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Docteur **Jérôme Lafont**, je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury mais également de m'avoir suivi tout au long de cette thèse en participant à mon comité de suivi individuel, merci pour votre temps et votre bienveillance. Merci également aux docteurs **Sarah Oddoux** et **Romain Contentin** d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Docteur **Romain Contentin**, je ne sais par où commencer. Je n'étais que stagiaire en master quand je t'ai rencontré. Tu m'as mis le pied à l'étrier, d'abord avec Rodolphe, puis au premier degré, sur la « bécane » comme tu l'appelles. Nous avons passé tellement de temps ensemble à lancer de nombreuses manips en simultané culture, western-blot, ARN, tout a fusé à tes côtés. Merci pour ton suivi, même à l'autre bout du monde, et tes nombreuses corrections sur les articles et ce manuscrit. Je sais combien cela n'a pas dû être facile. Un grand merci, on peut dire que de ce côté tu as fait bien plus que le « job ». Bien plus que de simple collègue, tu es devenu un véritable ami, à croire que l'on ne se voyait pas assez au laboratoire ! Je ne compte plus le nombre de sorties vélo, 3B (pour ne pas citer les autres junkfoods !), et matchs de basket. Je te souhaite à toi et à « madame » le meilleur pour la suite ; reviens vite de ton post-doc, tu nous manques.

Merci au Docteur **Nicolas Gruchy** pour ta gentillesse et tes conseils avisés. Tu as répondu présent à chaque fois que nous avons besoin de ton aide, toujours avec une extrême bienveillance. Merci pour nos discussions toujours intéressantes, amicales et chaleureuses qui ont été un réel plaisir.

Je tiens à remercier le Docteur **Frederic Cassé**, fraîchement débarqué au laboratoire au cours de ma dernière année de thèse. Ton investissement pour ce projet m'a été d'une aide précieuse. Merci pour ces moments où nous avons « refait la science » ensemble. Ta gentillesse, ton esprit positif et ta rigueur sont un exemple pour beaucoup.

Un grand merci à **Paul Violette** et **Sarah Oddoux**. Vous avez réussi à m'accompagner dans ce projet et à le mener avec détermination. Votre engagement sans faille à mes côtés et celui du laboratoire BioTARGen ont permis d'accomplir ce beau projet. J'espère que les résultats qui découlent de ces travaux permettront à Dielen de continuer de grandir et de prospérer à travers le monde.

Merci au Docteur **Magali Demoor**, directrice du laboratoire BioTARGen pour avoir fait du laboratoire ce qu'il est. Merci pour votre investissement et votre gestion de la crise sanitaire liée à la Covid-19.

Merci à l'ingénieur **Florence Legendre**, comment omettre notre acharnement si satisfaisant engendrant la mise en place des marchés liés aux fonds Feder.

Merci au Docteur **Thomas Branly**, tu faisais partie « des murs » au laboratoire. Tu étais (et tu l'es toujours) la personne vers laquelle se tourner dès que l'on avait une question, toujours prête à aider dans la bonne humeur exceptionnelle qui te caractérise. Bien que l'on se voie moins qu'avant c'est toujours un réel plaisir d'échanger avec toi. Je te souhaite un plein épanouissement dans ta nouvelle vie avec ta femme.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble de la **famille Dielen**. Vous m'avez accueilli à bras ouverts, dès le premier jour. Je ne vous voyais pas autant que je l'aurais souhaité mais je me suis toujours bien senti à vos côtés. Je tiens à remercier bien évidemment **Anne-Catherine, Céline, Florine, Gaëtan, Karine, Magali, Pierre, Sophie** et **Sylviane**. J'aimerais en profiter pour remercier très sincèrement M. **Bernard Noël**, co-fondateur de l'entreprise Dielen, j'ai aimé échanger avec vous, partager votre vision de la science. Vos remarques, toujours d'une extrême pertinence, et vos connaissances ont été une grande source d'inspiration. Je vous remercie pour votre gentillesse à mon égard et me fais déjà une joie de penser à notre prochaine rencontre.

Docteur **Rodolphe Rakíc**, tu m'as supporté depuis le master 1, tu m'as tellement apprécié que je suis revenu avec toi en master 2, six mois de plus. Ces moments passés à tes côtés furent mémorables, inoubliables. Merci de m'avoir tant appris, tant soutenu et fait pleinement confiance pour faire avancer tes projets. Certains diront que tu es un peu « lunaire, bisounours », mais c'est comme cela que l'on t'apprécie. Je t'espère heureux dans ta nouvelle vie lyonnaise et te souhaite le meilleur.

Ami et Docteur **Côme Thieulent**. J'ai peut-être fait l'half iron man avant toi mais tu m'auras eu pour la soutenance. Dans tous les cas, nous serons sur le même pied d'égalité cette année ! J'ai passé des moments inoubliables à tes côtés durant ces trois années. Bien plus qu'un simple collègue, c'est une réelle amitié qui est née. En

espérant que la COVID nous lâche et que l'on puisse se taquiner (toujours avec humour) à l'occasion d'un tour de piste, d'un couloir de nage ou d'un petit tour à vélo, ou, plus simplement, autour d'une bonne bière.

Merci au(x) doctorant(e)s de la plateforme et aux petits nouveaux qui en ont pris le chemin. Aux prochaines à soutenir, **Gabrielle**, **Aurélie**, **Flora**, ne lâchez rien vous tenez le bon bout (ne lâche pas le step non plus Aurélie, ni la cuisine flora). Enfin aux petites nouvelles, **Manon**, la studieuse (et pas que, à ce que j'ai cru comprendre) et **Camille** notre amie à l'accent étrange, vous avez toutes deux le potentiel pour réaliser une très belle thèse, et je ne doute pas que vous y arriverez.

Merci aux personnes qui ont cohabité sur la plateforme avec nous, encore présentes ou parties vers de nouvelles aventures. Notamment, aux équipes de Labéo, je pense notamment à **Stéphane Pronost**, **Marie-Pierre Toquet**, **Erika Hue**, ou encore, **Albertine Léon**. Merci aussi à l'équipe du RESPE et, notamment, aux « filles du RESPE », **Stéphanie** et **Virginie** à bientôt pour une petite partie de qui « respera » le dernier.

Je tiens, bien évidemment, à adresser mes plus sincères remerciements aux membres de mon CSI, au Docteur **Arnaud Bianchi**, au Docteur **Jérôme Lafont**, au Professeur **Mickael Aubert** et au Docteur **Anaïs Wambecke**. Vous avez toujours su juger de l'avancée de mes travaux de thèse avec un regard bienveillant et une extrême gentillesse. Vos remarques constructives m'ont permis de grandir et d'améliorer mon ouverture d'esprit scientifique.

Merci à mes proches qui m'ont permis de décompresser autour de bonnes petites soirées (quand on le pouvait encore) qui se résumaient la plupart du temps par de simples acronymes 3B ? KL ? LOL ? CS ? 7wonders ? Merci à **Jeanne**, **Justine**, **Laurine**, **Pauline**, **Thomas** et **Valentin**. Merci aussi à une amie de longue date, le Docteur **Romane Florent** ; nous nous suivons depuis la première année de licence dans notre belle ville du Havre (LH pour les intimes), j'ai toujours apprécié t'avoir à mes côtés tout au long de notre parcours. Merci aussi à mes amis sportifs, tant l'équipe masculine du DBCN, que les membres de l'USC Caen triathlon, avec une pensée particulière pour **Jean-Baptiste Lureau**, scientifique à ses heures perdues, je bois tes conseils et partage complètement ta philosophie sportive et te remercie, par ailleurs, d'avoir sauvé mon confinement grâce au home trainer, bon courage pour ce beau projet qu'est le « Trail Scientifique Clécy Normandie ».

Je tiens aussi à remercier **ma famille**, proche ou éloignée, et tout particulièrement **mes parents**, ces travaux de thèse ne sont qu'un passage, un aboutissement, mais, en aucun cas, une fin en soi. Je continue à apprendre tous les jours à vos côtés. Merci de m'avoir inculqué les valeurs qui sont les miennes aujourd'hui, et d'avoir fait de moi qui je suis. Je tiens également à avoir une pensée émue pour ceux qui ne sont plus présents, aujourd'hui, mais toujours présents dans mon cœur, je sais que de là où vous êtes, vous avez su veiller sur moi et que vous serez fiers de la personne que je suis devenue. Je n'oublie bien évidemment pas **ma belle famille** qui m'a accueilli les bras ouverts et m'a fait découvrir un nouveau monde culinaire. **Maëlle**, tu m'as accompagné durant ces études et ces travaux de thèse, tu m'as beaucoup soutenu et apporté au cours de ces années passées à tes côtés. Ces quelques lignes ne seraient pas suffisantes pour dire ce que je ressens pour toi et aucune ne permettrait d'écrire tout ce qui nous reste à vivre ensemble. Merci pour tout.

Sommaire

REMERCIEMENTS	3
LISTE DES ABREVIATIONS	11
LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX	15
AVANT-PROPOS	17
INTRODUCTION	23
I. LE SYSTEME OSTEO-ARTICULAIRE	23
A. <i>Classification des différents types d'articulation</i>	23
B. <i>Les différents types de cartilages</i>	26
1. Le cartilage hyalin	27
2. Le cartilage élastique	28
3. Le cartilage fibreux (fibrocartilage).....	28
C. <i>Structures avoisinantes et aspect du cartilage articulaire hyalin</i>	29
1. Structure générale	29
2. L'environnement du cartilage articulaire hyalin	30
3. Les différentes couches du cartilage articulaire	32
3.1. La couche superficielle	32
3.2. La couche moyenne	33
3.3. La couche profonde	33
3.4. La couche calcifiée	33
D. <i>Composition biologique et biochimique du cartilage articulaire</i>	34
1. Les cellules souches mésenchymateuses	34
2. Le chondrocyte	34
3. La matrice extracellulaire	36
3.1. Les collagènes du cartilage articulaire	38
3.1.1. Le collagène de type II	42
3.1.2. Le collagène de type VI	43
3.1.3. Le collagène de type IX	43
3.1.4. Le collagène de type X	44
3.1.5. Le collagène de type XI	44
3.2. Les protéoglycannes	45
3.3. Les autres protéines matricielles	50
3.4. L'hypoxie.....	51
E. <i>Chondrogenèse et homéostasie du cartilage</i>	56
1. Condensation des progéniteurs chondrocytaires	57
2. La différenciation en chondrocytes matures	59
3. L'hypertrophie des chondrocytes et l'ossification endochondrale	60
4. Les facteurs impliqués dans la régulation de la chondrogenèse.....	61
4.1. Les FGF.....	61

4.2. Les IGF	63
4.3. Les TGF- β	64
4.4. Les BMP	66
II. LE CARTILAGE ARTICULAIRE PATHOLOGIQUE.....	69
A. <i>Les lésions chondrales</i>	69
B. <i>L'arthrose</i>	71
1. Etiologie de l'arthrose	72
2. Les mécanismes moléculaires de l'arthrose	75
2.1. Les cytokines pro-inflammatoires	75
2.2. La perte de l'homéostasie et la dégradation du cartilage articulaire	78
2.3. Le collagène de type I comme marqueur du cartilage arthrosique	81
2.4. La sénescence	82
3. L'arthrose chez le modèle équin	82
3.1. L'incidence des affections articulaires chez le cheval	83
3.2. L'impact sur la filière équine	84
3.3. Arthrose équine, du diagnostic au traitement.....	84
3.4. Le cheval, un modèle patient animal de choix pour l'arthrose	85
4. L'arthrose chez l'Homme	87
4.1. Epidémiologie de l'arthrose	87
4.2. Diagnostic et coûts de l'arthrose	88
4.3. Les traitements actuels.....	89
4.3.1. Les traitements pharmacologiques	89
4.3.2. Les traitements chirurgicaux	90
4.3.3. La thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire.....	92
III. AMELIORATION DES TRAITEMENTS CONTRE L'ARTHROSE : ESSOR ET INTERET DES PRODUITS	
NUTRACEUTIQUES	95
A. Les compléments alimentaires et les collagènes hydrolysés	95
1. Les matrikines ou matricryptines	96
2. Les matrikines dérivant des collagènes	98
2.1. Le collagène de type I	99
2.2. Le collagène de type XVIII.....	100
2.3. Le collagène de type XV	101
2.4. Le collagène de type IV	101
2.4.1. L'arresten.....	102
2.4.2. La canstatine	102
2.4.3. La tumstatine	102
2.4.4. La tétrastatine	103
2.4.5. Les pentastatines.....	103
2.4.6. L'hexastatine.....	103
B. <i>Les autres compléments alimentaires</i>	103
1. La phytothérapie	104
1.1. L'harpagophytum	104

1.2. La scrophulaire (<i>Scrophularia</i>)	105
1.3. Le Saule, <i>Salix alba</i>	105
1.4. Le Curcuma	106
1.5. La boswellia	106
2. L'oligothérapie	107
2.1. Le cuivre	107
2.2. Le zinc	108
2.3. Le fer	109
2.4. Le sélénium	109
IV. OBJECTIFS GENERAUX DU PROJET DE THESE	111
RESULTATS	115
I. PREMIERE PARTIE : ARTICLE #1	115
1. Objectifs de l'article #1	115
2. Article #1	117
3. Conclusion de l'article #1	155
II. DEUXIEME PARTIE : ARTICLE #2	159
1. Objectifs de l'article #2	159
2. Article #2	161
3. Conclusion de l'article #2	209
III. TROISIEME PARTIE : ARTICLE #3	211
1. Objectifs de l'article #3	211
2. Article #3	212
3. Conclusion de l'article #3	269
DISCUSSION	271
I. TRANSPOSITION DE LA TCA AU MODELE EQUIN	273
1. Intérêt de l'utilisation des biomatériaux	273
2. Intérêts de l'utilisation de l'hypoxie	274
3. Stratégie de redifférenciation des chondrocytes articulaires	275
4. Les cellules souches mésenchymateuses comme source cellulaire	277
5. Les nouveaux outils de culture cellulaire	282
II. LES HYDROLYSATS DE COLLAGENES (PROMERIM®), COMPLEMENT ALIMENTAIRE PERTINENT CONTRE L'ARTHROSE ?	285
1. Différences entre les chondrocytes humains et équins	285
2. Mort cellulaire et sénescence	286
3. Activité métabolique et test de blessure <i>in vitro</i>	290
4. Effets observés sur HtrA1	292
5. Les compléments alimentaires et l'arthrose	293
6. La biodisponibilité des hydrolysats de collagènes	294
7. Les compléments alimentaires et les thérapies cellulaire et tissulaire	296
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	299
REFERENCES	303

ANNEXES.....	339
I. PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES.....	339
II. ARTICLE #4.....	340
III. ENCADREMENT DE STAGIAIRES.....	385
IV. FORMATIONS	387

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
A A2P	Acide ascorbique
aa	Acides Aminés
ACVR2A	« ACtiVin Receptor type-2A »
ADAMTS	« A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs »
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AH	Acide Hyaluronique
AINS	Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
ALK	« Activin receptor-Like Kinase »
ANR	Agence Nationale de la Recherche
ANRT	Association Nationale de la Recherche et de la Technologie
ARNm	Acide RiboNucléique Messenger
ARNT	« Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator »
B BAMBI	« BMP and Activin Membrane Bound Inhibitor »
bHLH	« basic Helix Loop Helix »
Biotargen	Biologie, génétique et thérapies ostéoarticulaires et respiratoires
BMP	« Bone Morphogenetic Protein »
BMPR2	« Bone Morphogenetic Protein Receptor type II »
BPM-2	« Bone Morphogenetic Protein 2 »
C CAE	Chondrocyte Articulaires Equin
CAH	Chondrocyte Articulaires Humain
CD	« Clusters of Differentiation »
CIFRE	Convention Industrielle de la Formation par la REcherche
COMP	« Cartilage Oligomeric Matrix Protein »
COX-2	Cyclooxygénase 2
CS	Chondroïtine-Sulfate
CSM	Cellules Souches Mésoenchymateuses
D DGCCRF	Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes
F FACIT	« Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple-helix »
FEDER	Fonds Européen de Développement Economique et Régional
FFE	Fédération Française Equine
FGF	« Fibroblast Growth Factor »
G GAG	GlycosAminoGlycanes

	GDF	« Growth and Differentiation Factor »
	GLUT	« GLUcose Transporter »
	GDNF	« Glial cell-Derived Neurotrophic Factor »
H	HIF	« Hypoxia Inducible Factor »
	HMG	« High Mobility Group »
	HRE	« Hypoxia Response Element »
	HtrA1	« High temperature requirement A1 »
I	ICAM-1	« IntraCellular Adhesion Molecule-1 »
	ICT	Ingénierie Cellulaire et Tissulaire
	IFCE	Institut Français du Cheval et de l'Equitation
	IGF	« Insulin-like Growth Factor »
	IL-1	InterLeukine-1
	IMC	Indice de Masse Corporelle
	IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
K	KS	Kératane-Sulfate
L	LPS	LipoPolySaccharide
	LRR	« Leucin-Rich Repeat »
M	MEC	Matrice ExtraCellulaire
	MMP	« Matrix MetalloProteinase »
	MO	Moelle Osseuse
	MSM	MéthylSulfonylMéthane
N	N-CAM	« Neutral Cell Adhesion Molecule »
	NC	Domaine C-terminal
	NO	Monoxyde d'azote
O	OErAGen	Ossification Endochondrale et Anomalies Génétiques du développement
	OMS	Organisation Mondiale de la Santé
	OP1	« Osteogenic Protein 1 »
P	PG	ProtéoGlycane
	PHD	« Prolyl HyDroxylases »
	PI3K	« PhosphoInositide 3-Kinase »
	PMU	Pari Mutuel Urbain
	PRG4	« PRoteoGlycan 4 »
	PRP	« Platelet Rich Plasma »
R	Runx2	« Runt related transcription factor 2 »
S	SLRP	« Small Leucin-rich Repeat Proteoglycan »
	SNORC	« Small Novel Rich in Cartilage »
T	TCA	Transplantation de Chondrocytes Autologues
	TGF	« Transforming Growth Factor »

TIMP	« Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase »
TNF	« Tumor Necrosis Factor»
U UCN	Université de Caen Normandie
V VEGF	« Vascular Endothelial Growth Factor »

Listes des figures et des tableaux

Liste des figures

Figure 1	Représentation schématique des différents types d'articulations.
Figure 2	Classification morphologique des articulations de type diarthrose.
Figure 3	Le cartilage hyalin.
Figure 4	Le cartilage élastique.
Figure 5	Le cartilage fibreux.
Figure 6	Schématisation d'une articulation synoviale.
Figure 7	Représentation schématique (A) et en microscopie confocale (B) à balayage laser des différentes couches de cartilage articulaire selon le modèle de Benninghoff.
Figure 8	Le chondrocyte.
Figure 9	Représentation générale de la MEC.
Figure 10	Organisation structurale des sous-domaines des hélices de collagène.
Figure 11	Représentation schématique de l'épissage alternatif des différentes isoformes des ARNm <i>COL2A1</i> .
Figure 12	Modèle de l'architecture de l'hétérofibrille de collagène de types II/IX/XI caractéristique du cartilage articulaire natif.
Figure 13	Composition disaccharidique des glycosaminoglycanes.
Figure 14	Classification des petits protéoglycanes riches en leucine.
Figure 15	Représentation schématique d'un monomère d'agrécane et d'un agrégat d'agrécane.
Figure 16	Fonction de l'agrécane dans le cartilage articulaire.
Figure 17	Régulation de HIF-1 α selon son environnement oxique.
Figure 18	Schéma récapitulatif de l'action des HIF selon les conditions oxiques.
Figure 19	Les différentes étapes du processus d'ossification endochondrale.
Figure 20	Représentation schématique des principaux marqueurs phénotypiques caractéristiques du lignage chondrocytaire.
Figure 21	Microscopie électronique d'un chondrocyte mature (gauche) et hypertrophique (droite).
Figure 22	Représentation schématique des voies de signalisation du FGF dans le cartilage articulaire.
Figure 23	Représentation schématique des membres de la superfamille du TGF- β .

Figure 24	Classification des lésions chondrales proposée par « l'international cartilage society ».
Figure 25	Représentation macroscopique (A) et microscopique (B) d'une articulation saine d'un sujet jeune et âgé.
Figure 26	Corrélation entre l'arthrose et les autres pathologies.
Figure 27	La réponse inflammatoire dans l'arthrose.
Figure 28	Représentation de l'homéostasie cartilagineuse.
Figure 29	Classification et structure des protéases.
Figure 30	Radiographie et schéma d'une articulation arthrosique.
Figure 31	Réalisation d'une micro-fracture d'une articulation arthrosique.
Figure 32	Mosaïque-plastie d'une articulation arthrosique.
Figure 33	Représentation d'une prothèse de genou et cliché radiographique représentant une prothèse de genou.
Figure 34	Transplantation de chondrocytes autologues d'une articulation arthrosique.
Figure 35	Structure du collagène de type XVIII.
Figure 36	Structure schématique du collagène de type IV.
Figure 37	Exemple de culture 3D en bioréacteur.
Figure 38	Exemple d'imprimante cellulaire 3D.
Figure 39	Prélèvements de cartilage équin.
Figure 40	Prélèvements de cartilage humain.

Liste des tableaux

Tableau I	Principaux membres de la famille des collagènes et distribution tissulaire.
Tableau II	Les BMP, leurs récepteurs.
Tableau III	Classification des lésions chondrales proposée par « l'international cartilage society ».
Tableau IV	Matrikines dérivées des différents domaines NC1 des chaînes de collagènes.

Avant-Propos

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

Ces travaux n'auraient jamais pu aboutir sans la collaboration du laboratoire de Biologie, Génétique et Thérapies Ostéoarticulaires et Respiratoires BioTARGen, l'entreprise le laboratoire DIELEN et l'Université de Caen Normandie (UCN).

Le cartilage articulaire hyalin est un tissu conjonctif hautement spécialisé, dense et élastique. Il est situé aux extrémités distales des pièces osseuses et assure la mobilité de ces dernières entre elles ainsi que l'amortissement des chocs subis par l'articulation. Le cartilage articulaire comporte un type cellulaire majoritaire, le chondrocyte, ne représentant que 3% du volume, au sein d'une abondante matrice extracellulaire (MEC). Le cartilage étant non innervé, mais aussi avasculaire, sa nutrition se fait par diffusion passive par l'intermédiaire, soit du liquide synovial synthétisé par la membrane synoviale, soit par l'os sous-chondral. Ce sont aussi ces éléments qui assurent l'apport en oxygène aux chondrocytes, on retrouve un gradient compris entre 1% et 10% en dioxygène au sein du tissu articulaire, selon leur localisation. Les chondrocytes évoluent donc dans un environnement pauvre en nutriments et présentent une physioxie de type hypoxique.

La MEC est organisée en un réseau dense de fibres de collagène de type II, collagène majoritaire de la MEC du cartilage articulaire hyalin, il est associé aux collagènes de types IX et XI, au travers de fibres hétérotypiques. Ces différentes fibres de collagènes se lient aux agrécannes, protéoglycannes (PG) majeurs et caractéristiques du cartilage. C'est l'ensemble de ces différents éléments qui compose la MEC et sa complexité, et cette organisation confère au cartilage des propriétés de résistances aux forces de compression et d'élasticité. Le collagène de type II et l'agrécane sont considérés comme étant les marqueurs spécifiques du tissu cartilagineux.

Chez l'adulte sain, le cartilage articulaire et le chondrocyte sont régis par une homéostasie, se traduisant par un équilibre entre catabolisme et anabolisme. Le catabolisme est assuré par une activité de résorption très faible par des « Matrix metalloproteinases » (MMP) ou des agrécannases comme les « A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs », notamment l'ADAMTS5, et la protéase à sérine « High temperature requirement A » (HtrA1). Ces activités sont contrebalancées par les « tissue inhibitor of matrix metalloproteinases » (TIMP).

Lors de la mise en place de l'arthrose, pathologie dégénérative du cartilage, cet équilibre est rompu, la dégradation de la MEC prenant le dessus par rapport à la synthèse des différents composants matriciels. Ce phénomène se traduit, notamment, par une perte de l'expression du collagène de type II et de l'agrécane, les marqueurs caractéristiques du cartilage articulaire et par l'induction d'une synthèse non équivalente de collagène de type I, isotype atypique pour le cartilage articulaire sain. Le collagène de type I, collagène le plus abondant de l'organisme, ne possédant pas les mêmes propriétés biomécaniques que le collagène de type II (et de types IX et XI) sera la source de la genèse d'un fibrocartilage. Ce fibrocartilage néosynthétisé, ne possédant pas les mêmes caractéristiques que le cartilage articulaire hyalin, ne résiste que très temporairement aux différentes contraintes subies par l'articulation et est, par conséquent, rapidement dégradé. L'os sous-chondral va alors se retrouver mis à nu, laissant les différentes pièces osseuses composant l'articulation, entrer en contact entre elles lors de leur sollicitation, ce qui est à l'origine de fortes douleurs.

Ces dernières années, de nouvelles stratégies de médecine régénératrice, orientées vers la thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire (IT) ont vu le jour. Ces travaux ont été initiés par Brittberg et ses collaborateurs en 1994 afin de régénérer un tissu fonctionnel, sain et de type hyalin, obtenu à partir de chondrocytes autologues préalablement amplifiés *in vitro* (Brittberg *et al.*, 1994). Cependant, cette technique comprend de nombreuses limites. En effet, les chondrocytes articulaires, prélevés dans une zone non portante de l'articulation, possèdent une faible capacité proliférative. De plus, le protocole indispensable d'amplification cellulaire *in vitro* va induire la dédifférenciation des chondrocytes, qui synthétiseront alors des molécules atypiques du cartilage hyalin dont le collagène de type I. Cet isotype collagénique apparaît comme une première réponse, un processus de réparation transitoire lors de la perte de substance chondrale menant à la création d'un substitut cartilagineux de type fibrotique, plus cassant, et ne possédant pas les mêmes caractéristiques que le

cartilage articulaire hyalin. De nouvelles générations de transplantation de chondrocytes autologues (TCA) ont vu le jour depuis le développement du procédé de Brittberg afin d'optimiser de nombreux paramètres, tels que le type cellulaire, le protocole de re-différenciation, l'utilisation de biomatériaux, ou encore, la modification du microenvironnement cellulaire. Plus de 25 ans après l'initiation de ces travaux, aucune stratégie thérapeutique n'aboutit à la synthèse d'un néo-cartilage hyalin.

Les thérapies actuelles les plus couramment utilisées demeurent des traitements pharmacologiques, ne ciblant que les symptômes dus à l'arthrose, parmi lesquels on retrouve les antalgiques et les anti-inflammatoires. Ces traitements ne permettent, en aucun cas, de régénérer du tissu cartilagineux, de pallier la perte de substance chondrale et de recouvrer l'usage fonctionnel complet d'une articulation.

Les traitements alternatifs, comme les compléments alimentaires, sont de plus en plus utilisés en nutraceutique ; on retrouve parmi eux la glucosamine, la chondroïtine-sulfate (CS) qui sont des molécules faisant partie intégrante de la structure des agrécannes. De nombreuses études ont montré un effet chondroprotecteur ou permettant de soulager les symptômes dus à l'arthrose de ces deux molécules. Les matrikines, fragments de macromolécules biologiquement actifs issus de la MEC, ont aussi permis d'obtenir des résultats encourageants permettant de diminuer la sensation de douleur articulaire ainsi qu'une recouvrance de l'état de forme générale chez des patients atteints d'arthrose. Cependant, bien que ces compléments contribuent à améliorer le confort de vie des patients, aucune étude n'a permis de démontrer que ces différentes molécules étaient capables de régénérer le tissu cartilagineux. L'évolution négative de l'arthrose demeure donc inéluctable.

Le projet de thèse présenté ici s'appuie sur des travaux réalisés préalablement au laboratoire sur un projet financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), d'acronyme PROMOCART, qui permet, en 2012, le dépôt d'un brevet par l'unité BioTARGen sur une technique de génération d'un substitut néo-cartilagineux de type hyalin, à partir de chondrocytes articulaires humains. Ainsi, les études menées au sein du laboratoire ont conduit à cultiver des chondrocytes en hypoxie dans des éponges de collagène de types I/III, conditions permettant de limiter la dédifférenciation et ainsi d'obtenir des chondrocytes matures différenciés dont le phénotype est stabilisé. Le projet de recherche développé dans le cadre de ces travaux de thèse a pour objectif général d'étudier l'effet de collagènes hydrolysés, d'origine marine, sur les principaux marqueurs de l'anabolisme et du catabolisme des chondrocytes du cartilage

articulaire, sur leur activité métabolique et leur sénescence. Ces hydrolysats sont issus de deux sources d'origine marine, la peau de poisson et le cartilage de poisson cartilagineux (roussette, hémisole). Ces deux tissus possèdent une MEC importante renfermant de nombreuses macromolécules dont majoritairement des collagènes (respectivement les isotypes de type I pour la peau et II pour le cartilage). Ces hydrolysats peuvent représenter une source extrêmement importante de matrikines biologiquement actives dont les activités biologiques sur la balance prolifération/différenciation seront étudiées dans ce projet. Plusieurs axes de recherche peuvent être dégagés afin de développer les connaissances scientifiques sur ces hydrolysats permettant ainsi de caractériser leurs éventuelles interactions avec le microenvironnement chondrocytaire et le chondrocyte lui-même.

Dans un premier temps, des prélèvements de chondrocytes articulaires équins et humains ont été réalisés. Un banking systématique des différentes souches de chondrocytes articulaires équins a été mis en place et l'absence de contamination bactérienne et virale a été vérifiée.

Une fois les cellules équines obtenues et validées pour une utilisation *in vitro*, le procédé d'obtention d'un organoïde cartilagineux développé initialement avec les chondrocytes humains et breveté a été transposé aux chondrocytes articulaires équins, avec lesquels il a été possible d'obtenir un substitut néo-cartilagineux de type hyalin, même avec des chondrocytes « dédifférenciés » ayant été congelés dans le bio-banque cellulaire.

Ensuite, l'innocuité des hydrolysats vis-à-vis des chondrocytes a été étudiée. L'activité métabolique a également été analysée afin d'évaluer si l'ajout des hydrolysats au milieu de culture permet d'augmenter, ou non, leur activité métabolique mitochondriale. Une gamme de concentration allant de 0,1 à 250 µg/ml d'hydrolysats a été employée afin d'observer un éventuel effet dépendant de la concentration. Cette étude a également permis de définir la ou les concentrations optimales d'utilisation lors de la suite du programme de recherche.

Une fois les concentrations efficaces définies, les cellules ont été cultivées sous forme d'organoïdes dans des éponges de collagène de types I/III en hypoxie durant une semaine afin de mimer au mieux leur microenvironnement *in situ*. Les différents hydrolysats ont été testés en présence ou non d'Interleukine-1 (IL-1), ou du facteur chondrogénique, la « Bone Morphogenetic Protein 2 » (BMP-2). L'utilisation séparée ou la combinatoire de ces deux molécules permet de mimer, en partie, les différents

stades observés lors de l'évolution du processus arthrosique. Ainsi, l'utilisation de la BMP-2 seule permet d'induire un microenvironnement chondrogénique redifférenciant, la combinatoire BMP-2/IL-1 mime un stade d'arthrose précoce et l'IL-1 utilisée seule va induire un microenvironnement pro-inflammatoire retrouvé lors des stades d'arthrose plus avancés. La MEC néo-synthétisée a ensuite été évaluée afin de définir si sa qualité se rapproche de celle d'un cartilage articulaire de type hyalin. L'effet des hydrolysats sur l'expression des différents facteurs associés à l'inflammation a aussi été évalué.

L'ensemble de ce projet a été mené en parallèle sur le modèle équin et le modèle humain. L'impact socio-économique de l'arthrose n'est plus à démontrer chez l'Homme. Chez le modèle équin, les affections articulaires occupent une place dominante de 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).

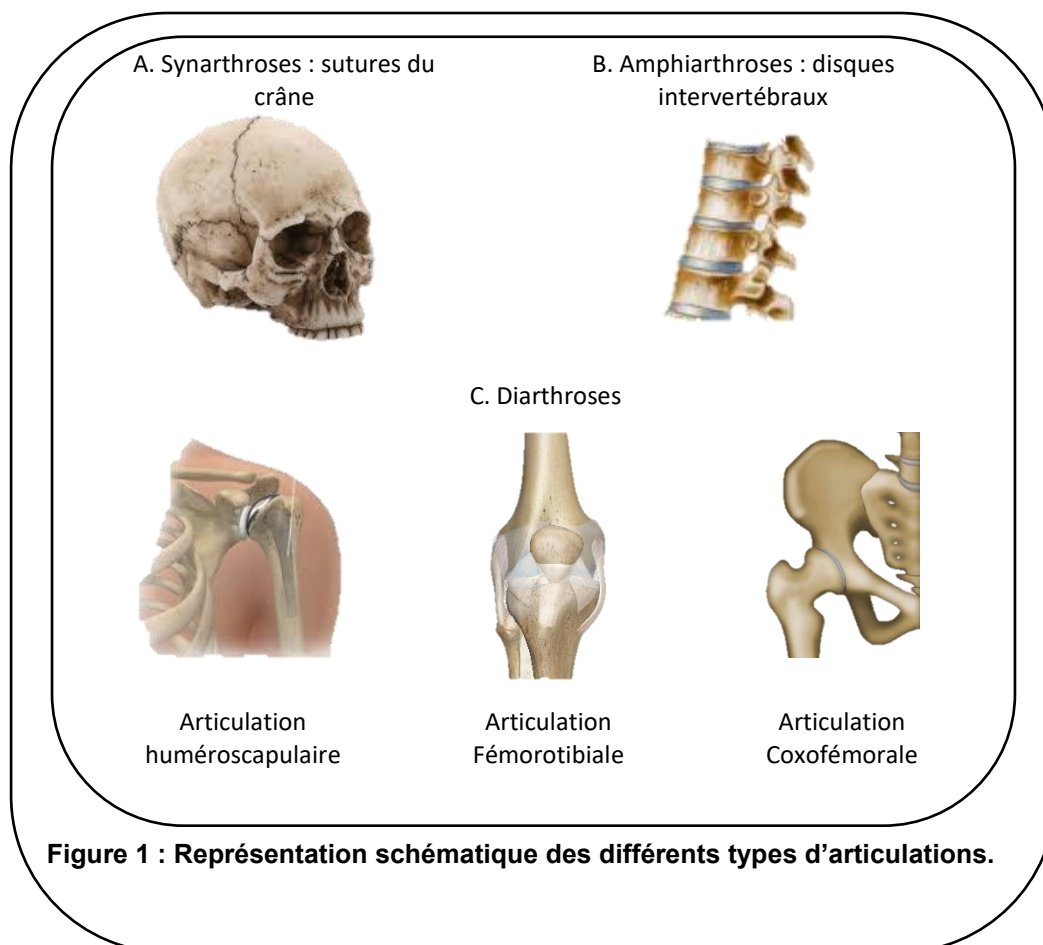
Introduction

I. Le système ostéo-articulaire

L'Homme et le cheval ont pour « charpente » un squelette composé respectivement de 206 et 205 os. Ces os rigides, véritable structure architecturale de l'organisme, servent de points d'attache aux différents muscles et de protection vis-à-vis des organes vitaux. Cependant, bien que rigides, ils n'en demeurent pas moins au cœur d'un mécanisme extrêmement souple, permettant à l'organisme de se mouvoir et d'accomplir de nombreux mouvements. Ces os sont reliés entre eux par différents types d'articulations classées selon leur degré de mobilité et leur structure.

A. Classification des différents types d'articulation

L'articulation peut être définie comme étant l'ensemble des parties molles et dures par lesquelles s'unissent deux ou plusieurs os voisins. L'Homme compte, tout comme le cheval environ 400 articulations. Les nombreuses articulations rencontrées dans l'organisme peuvent être classifiées selon deux modes, une première classification dite « fonctionnelle » et une seconde dite « morphologique ».



La classification dite fonctionnelle est basée sur la mobilité et les structures composant l'articulation. On peut alors décliner les articulations en trois grandes catégories (figure 1) :

Les synarthroses correspondent à des articulations immobiles. La jonction est alors réalisée par un tissu le plus souvent fibreux, c'est pour cette raison qu'elles sont aussi appelées articulations fibreuses. Les synarthroses regroupent donc les syndesmoses reliant deux os par un tissu entre eux comme le radius et l'ulna, les sutures décrivant la jonction entre deux os qui vont progressivement se solidifier, par exemple l'articulation entre l'os frontal et pariétal, ou encore la gomphose, articulation qui unit la dent à l'alvéole dentaire.

Les amphiarthroses sont des articulations semi-mobiles pouvant être cartilagineuses. Les liaisons entre les os sont réalisées par un coussinet de cartilage fibreux. Les amphiarthroses regroupent les symphyses reliant deux os par du tissu cartilagineux et du tissu conjonctif comme la symphyse pubienne et les synchondroses unissant deux os uniquement par du cartilage. Les articulations entre les côtes et le

sternum ou encore entre les vertèbres et le disque intervertébral sont des amphiarthroses.

Les diarthroses sont par définition des articulations mobiles dont les extrémités osseuses sont recouvertes d'un cartilage hyalin et sont unies par les ligaments. L'articulation, maintenue par les ligaments, est composée d'une capsule synoviale renfermant la synovie ou liquide synovial. C'est la raison pour laquelle elles sont aussi appelées articulations synoviales. Il est possible de distinguer six types de diarthroses selon la forme des extrémités osseuses composant l'articulation et leur capacité de mouvement (figure 2). Parmi les diarthroses, on retrouve donc les énarthroses (extrémités osseuses respectivement convexes et concaves comme entre la scapula et l'humérus) ; les condyliennes (extrémités osseuses elliptiques convexes et elliptiques concaves retrouvées dans l'articulation radio-carpienne) ; les diarthroses dites « en selle » (extrémités osseuses convexes et concaves à la fois comme l'articulation carpo-métacarpienne) ; les trochléennes (extrémités osseuses respectivement concaves avec un relief en forme de crête et convexes en forme de poulie permettant l'insertion de la crête retrouvée au niveau de l'articulation huméro-cubitale) ; les trochoïdes (extrémités osseuses respectivement cylindriques répondant à la concavité d'un cylindre pouvant être observées au niveau de l'articulation radio-cubitale supérieure) ; les arthrodèses (extrémités osseuses planes telles que l'articulation médio-carpienne).

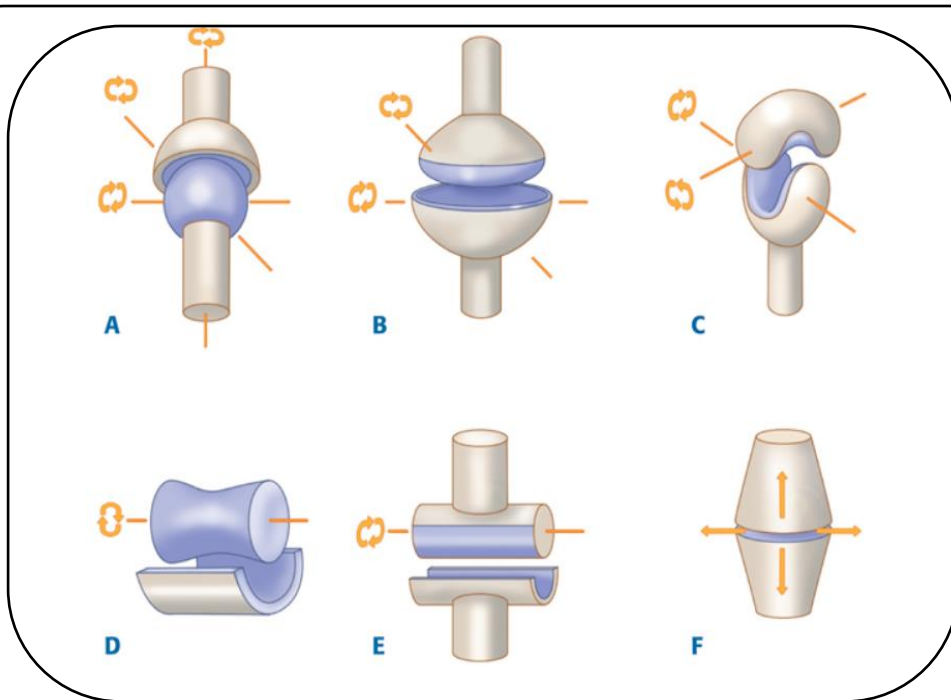


Figure 2 : Classification morphologique des articulations de type diarthrose.

A. Articulation de type énanthrose. B. Articulation de type condyléenne. C. Articulation dite « en selle ». D. Articulation de type trochléenne. E. articulation de type trochoïde. F. Articulation de type arthrodèse.

<https://www.elsevier.com/fr-fr/connect/etudes-de-medecine/paces-ue-5-organisation-des-appareils-et-des-systemes>

Le second type de classification, dit « morphologique », différencie les articulations selon leur composition. On peut ainsi distinguer trois grandes familles : les articulations fibreuses, composées d'un tissu fibreux, les articulations cartilagineuses, composées d'un cartilage hyalin ou d'un fibrocartilage, et les articulations synoviales composées d'une capsule fibreuse contenant du liquide synovial.

B. Les différents types de cartilages

Le cartilage est un tissu conjonctif hautement spécialisé formé majoritairement d'un type cellulaire prédominant de forme arrondie, le chondrocyte. Les chondrocytes synthétisent une abondante MEC constituée de fibres de collagènes et de PG. Il existe différents types de cartilages possédant des caractéristiques structurales et fonctionnelles plus ou moins distinctes : le cartilage hyalin, le cartilage élastique et le fibrocartilage (Ross & Pawlina, 2011).

1. Le cartilage hyalin

D'apparence blanchâtre et translucide, c'est le type cartilagineux le plus fréquemment retrouvé (figure 3). Il forme la première maquette squelettique lors du développement embryonnaire et sera par la suite remplacé par un squelette osseux. A l'âge adulte, il se situe au niveau du nez, de l'insertion sternale des côtes, des voies respiratoires et recouvre l'extrémité des surfaces articulaires des os longs. Le cartilage hyalin, à l'exception du cartilage articulaire, est entouré par une couche de tissu conjonctif, le périchondre. Ce dernier contient des vaisseaux sanguins qui assurent la nutrition et l'oxygénation du cartilage par diffusion passive à travers la matrice cartilagineuse. Les cellules chondrogéniques se situent dans le périchondre et assurent ainsi une croissance par apposition. Les cellules de la couche profonde du périchondre se différencient en chondroblastes, puis en chondrocytes. La MEC synthétisée est abondante, les chondrocytes y sont volumineux et produisent du collagène de type II ainsi que de nombreux PG (Ross & Pawlina, 2011).

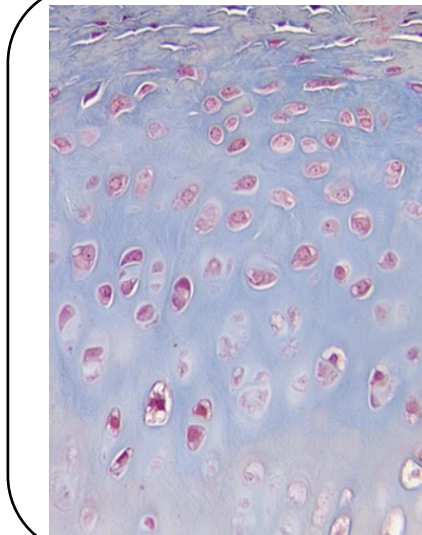


Figure 3 : Le cartilage hyalin.

<http://www.edu.upmc.fr/histologie/C/cartilage/hyalin/pages/chyal02.htm>

2. Le cartilage élastique

Le cartilage élastique est un cartilage peu abondant (figure 4). On le retrouve essentiellement dans les zones où le tissu sera très résistant et élastique comme le pavillon de l'oreille, la trompe d'eustache, l'épiglotte et certains cartilages du larynx. Comme le cartilage hyalin, il est constitué de collagène de type II et de PG mais comprend également de nombreuses fibres d'élastines. Ces dernières permettent la déformation des structures anatomiques avant le retour à leur forme initiale. De plus, le cartilage élastique présente une densité de cellules plus importante que le cartilage hyalin (Ross & Pawlina, 2011).

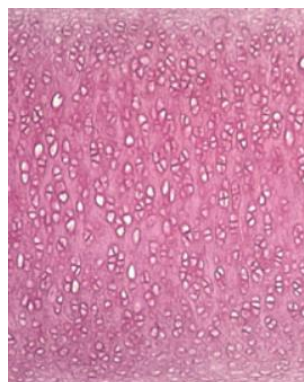


Figure 4 : Le cartilage élastique.

<https://www3.unifr.ch/apps/med/elearning/fr/stuetzgewebe/knorpel/elastisch/f-elastisch.php>

3. Le cartilage fibreux (fibrocartilage)

Le cartilage fibreux, aussi appelé fibrocartilage, se situe au niveau des disques intervertébraux, de la symphyse pubienne, des ménisques et de la zone d'insertion de certains tendons (figure 5). C'est un tissu qui résiste à la traction et qui comprend des chondrocytes de types fusiformes. La MEC synthétisée par ces derniers est composée essentiellement de collagène de type I, on peut aussi retrouver en moindre proportion d'autres types de collagènes (isotype II) et des PG. La composition de la MEC du cartilage fibreux lui confère à la fois résistance et élasticité (Ross & Pawlina, 2011).

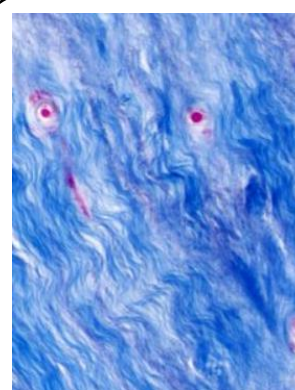


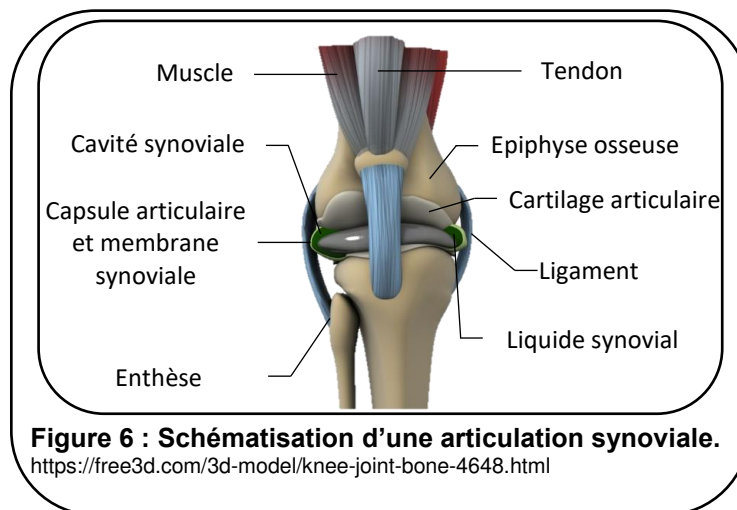
Figure 5 : Le cartilage fibreux.

https://www.kgu.de/zmorph/histopatho/histo4/pub/data/gb/de/005_c.html

C. Structures avoisinantes et aspect du cartilage articulaire hyalin

1. Structure générale

Une articulation a pour fonction de relier les os entre eux et de conférer la mobilité au squelette (figure 6). Les diarthroses ou articulations mobiles sont le plus fréquemment retrouvées dans l'organisme et se situent essentiellement au niveau des membres. Les articulations mobiles relient les extrémités osseuses séparées l'une de l'autre par une cavité articulaire. Dans ce type d'articulation, le cartilage hyalin qui recouvre les surfaces osseuses est appelé le cartilage articulaire. C'est un tissu non innervé, avasculaire et élastique qui persiste tout au long de la vie adulte. Il permet le glissement des pièces osseuses entre-elles avec un coefficient de friction extrêmement bas tout en assurant l'amortissement des chocs et la répartition des pressions subies par l'articulation.



Les diarthroses sont composées de différents éléments communiquant entre eux afin d'assurer le bon fonctionnement de l'articulation. Parmi ces structures, le cartilage articulaire hyalin possède un rôle essentiel, en effet, il va protéger les

extrémités osseuses qui sont innervées. Le cartilage hyalin persiste durant toute la vie de l'organisme et possède un très faible taux de renouvellement. Son épaisseur peut varier de 2 à 7 mm selon la localisation et les contraintes subies par l'articulation. Bien que le cartilage ait un rôle prépondérant au sein de l'articulation, la présence de structures permettant le maintien physiologique du tissu est essentielle et ce tissu doit être en synergie avec les structures avoisinantes afin de permettre un fonctionnement optimal de l'articulation.

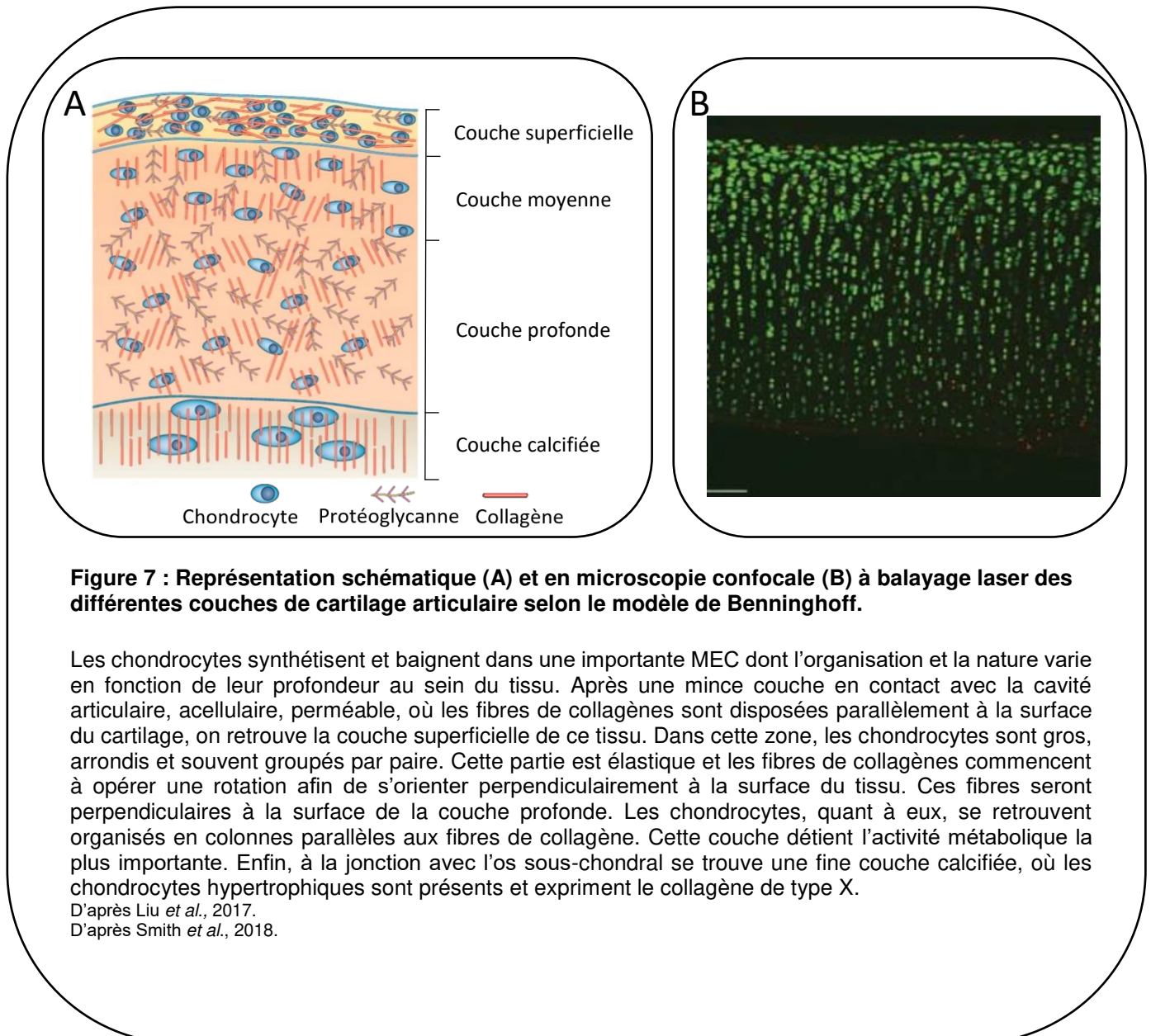
2. L'environnement du cartilage articulaire hyalin

Le cartilage articulaire hyalin est situé au cœur d'une capsule fibreuse revêtue à l'intérieur par une fine membrane appelée membrane synoviale. Cette membrane est composée principalement de synoviocytes. Les synoviocytes sont représentés par deux types cellulaires majoritaires, les synoviocytes de type A, comparables à des macrophages, assurant l'élimination des microorganismes et des débris issus de l'articulation présents dans le liquide synovial et les synoviocytes de type B dont l'activité est essentiellement sécrétoire (Palmer & Bertonne, 1994). En effet, ce sont les synoviocytes de type B qui assurent l'excrétion des principaux constituants du liquide synovial ou synovie tels que l'acide hyaluronique (AH) et les différentes protéines permettant au liquide synovial d'assurer ses fonctions (Dasuri *et al.*, 2004). En effet, le liquide synovial assure la lubrification du cartilage hyalin grâce notamment au « PRoteoGlycan 4 » (PRG4) ou lubricine et l'AH qui sont responsables des propriétés de visco-élasticité du liquide synovial. La synovie est aussi, avec l'os sous-chondral, la principale source de nutrition en glucose et en oxygène des chondrocytes (Hui *et al.*, 2012). Par ailleurs, en assurant la nutrition, la lubrification et le renouvellement du liquide synovial, les synoviocytes vont jouer un rôle prépondérant dans l'homéostasie du cartilage articulaire hyalin (Bartok & Firestein, 2010).

L'os sous-chondral 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. 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 moelle osseuse. La physiologie de l'os sous-chondral influence celle du cartilage et inversement.

Au sein du tissu cartilagineux, en partant de sa surface pour arriver à l'os sous-jacent, il est possible de distinguer quatre couches superposées aux caractéristiques et fonctions distinctes. Ce modèle est appelé modèle en arcades ou modèle de Benninghoff (figure 7) (Aydelotte & Kuetner, 1988 ; Poole *et al.*, 2001). La structure du cartilage articulaire adulte est caractérisée par la présence de couches créées par l'orientation des fibres de collagène (Benninghoff, 1925).



3. Les différentes couches du cartilage articulaire

3.1. La couche superficielle

La couche superficielle baigne dans le liquide synovial, aussi appelé couche tangentielle, elle est extrêmement mince (environ 5% du volume total du cartilage). Elle est constituée d'une première couche acellulaire semblable à un film translucide

dénoté *lamina splendenda* riche en fibres de collagène (disposées parallèlement à la surface du cartilage), en fibronectine et en eau (MacConaill, 1951 ; Gilmore & Plafrey, 1988). Cette première couche la plus superficielle du cartilage articulaire va absorber les différentes forces de compression et de tension subies par l'articulation. Juste en dessous, se trouve une couche de chondrocytes allongés et aplatis, cette couche de chondrocytes est la plus riche en cellules et ce nombre de cellules diminue avec l'âge de l'individu (Vignon *et al.*, 1976).

3.2. La couche moyenne

Aussi appelée couche de transition, la couche moyenne représente 40 à 60% du poids du cartilage et 30 à 35% de son volume matriciel. Elle est composée de chondrocytes arrondis entourés par des faisceaux radiaux de fibrilles de collagènes épaisses (Sophia-Fox *et al.*, 2009). Les fibres de collagène commencent à s'incliner progressivement et perpendiculairement par rapport à la surface du cartilage. Ces fibres sont aussi plus épaisses et moins nombreuses. C'est une zone qui est riche en PG, ce qui rend cette couche plus élastique.

3.3. La couche profonde

C'est la couche possédant le plus grand volume du cartilage articulaire, de 35 à 40%. La cellularité continue de diminuer progressivement mais la taille des chondrocytes augmente. Le taux de PG est aussi extrêmement important et la teneur en eau de la MEC diminue. L'activité métabolique des chondrocytes est la plus importante dans cette couche profonde par rapport aux autres couches du cartilage articulaire. Les fibrilles de collagène sont positionnées entre des colonnes de chondrocytes, parallèlement à l'axe long de l'os.

3.4. La couche calcifiée

La couche calcifiée sert de tampon mécanique entre le cartilage articulaire non calcifié et l'os sous-chondral. Les chondrocytes y sont rares et hypertrophiques avec une morphologie ronde et de taille relativement petite. Cette couche contient des fibres de collagène compactées, très peu d'eau et une absence de PG. En revanche, du

collagène de type X, de l'hydroxyapatite et des amas calciques seront retrouvés dans la MEC.

D. Composition biologique et biochimique du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire hyalin est composé d'une importante MEC et d'un type cellulaire majoritaire, le chondrocyte. On note aussi la présence de cellules souches mésenchymateuses (CSM).

1. Les cellules souches mésenchymateuses

Bien que le chondrocyte soit le type cellulaire cartilagineux majoritairement présent au sein du cartilage articulaire, différentes études ont démontré la présence de CSM au sein du cartilage articulaire sain, mais aussi arthrosique, dans une faible proportion (10% des cellules totales environ) (Alsalameh *et al.*, 2004). Ces CSM sont multipotentes et présentent un certain nombre de marqueurs de surface caractéristiques des CSM, elles possèdent aussi une forte capacité proliférative. Leur proportion, assez faible en condition physiologique saine est augmentée dans des cas pathologiques comme l'arthrose. Ainsi, ces cellules sont recrutées lors de lésions chondrales et semblent s'engager alors vers la redifférenciation chondrocytaire. Ces chondroprogéniteurs sont aussi retrouvés dans la synovie (Marinova-Mutafchieva *et al.*, 2000) ainsi que dans la membrane synoviale (Nishimura *et al.*, 1999).

2. Le chondrocyte

Le chondrocyte est le type cellulaire majoritaire du cartilage (figure 8). Cependant, le cartilage étant constitué d'une MEC extrêmement importante et volumineuse, les chondrocytes ne représentent qu'une faible proportion du volume total du cartilage soit 1 à 2% du volume et 3 à 5% du poids sec du cartilage (Aigner & Stöve, 2003).

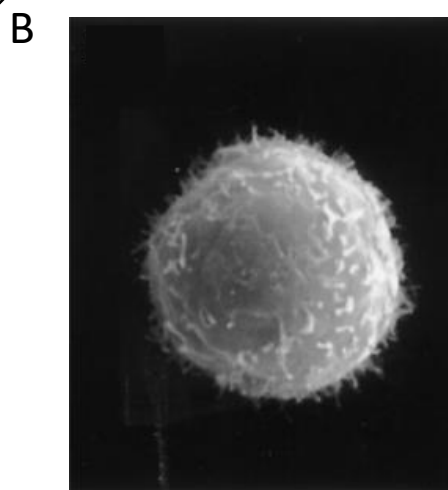
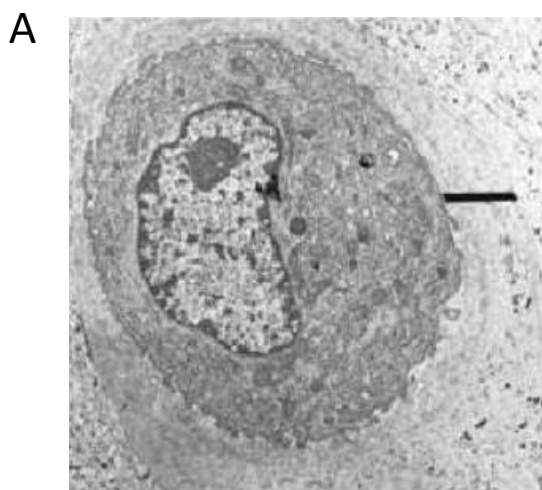


Figure 8 : Le chondrocyte.

A. Microscopie électronique d'un chondrocyte de cartilage hyalin.

B. Microscopie électronique à balayage d'un chondrocyte en condition iso-osmotique.

D'après Hashimoto *et al.*, 1998.

D'après Guilak *et al.*, 2002.

Leur morphologie varie selon leur localisation dans les différentes couches du tissu articulaire, mais ils sont généralement ronds ou polygonaux. Ces cellules possèdent un noyau volumineux, arrondi et nucléolé dans sa région centrale. Le cytoplasme contient tous les organites nécessaires à la formation et la synthèse de la MEC. Les chondrocytes obtiennent les nutriments et l'oxygène par diffusion passive à partir du liquide synovial ou de l'os sous-chondral, comme déjà indiqué. Le glucose est la principale source d'énergie des chondrocytes et est un précurseur essentiel de la synthèse des GlycosAminoGlycanes (GAG) (Kim & Conrad, 1976 ; Mason & Sweeney, 1994). Du fait de l'absence de vascularisation du tissu cartilagineux, les chondrocytes expriment de manière constitutive des « GLUcose Transporter » 3 et 8 (GLUT), des GLUT induits par des cytokines comme GLUT1 et GLUT6 ainsi que des transporteurs membranaires actifs afin de bénéficier de façon optimale du gradient de concentration de nutriments qui diffusent depuis le liquide synovial. Tout comme le glucose, l'oxygène est réparti selon un gradient de concentration qui décroît de la surface vers les couches les plus profondes du cartilage. La tension en oxygène est de l'ordre de 10% au niveau de la couche superficielle et inférieure à 1% dans la couche la plus profonde du cartilage. *In vitro*, les chondrocytes s'adaptent à de faibles tensions

d'oxygène en surexprimant l' « Hypoxia Inducible Factor » 1- α (HIF). HIF 1- α va alors stimuler l'expression de GLUT et des facteurs angiogéniques tels que le « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF) (Mobasheri *et al.*, 2005 ; Lin *et al.*, 2004).

Les chondrocytes articulaires adultes sont des cellules quiescentes ayant une faible activité métabolique. Ces cellules sont incluses dans des logettes appelées chondroplastes situées au sein même de la MEC cartilagineuse et régissent l'homéostasie du cartilage. Les chondrocytes synthétisent aussi bien les composants matriciels de la MEC dans laquelle ils évoluent, mais aussi, les protéases responsables de sa dégradation. Ainsi, l'homéostasie résulte d'un subtil équilibre entre la synthèse des composants typiques du cartilage articulaire et celle des MMP et des ADAMTS menant au catabolisme du tissu. Cet équilibre demeure essentiel afin de conserver l'intégrité, la structure, la qualité et les fonctions du cartilage articulaire hyalin.

3. La matrice extracellulaire

La MEC représente 95% du poids sec du cartilage. La majorité du poids humide est représentée par l'eau, de l'ordre de 60 à 80% de ce poids. La MEC est composée majoritairement de deux macromolécules, le collagène de type II et l'agrécanne, que l'on considère comme les marqueurs typiques ou caractéristiques du cartilage hyalin. L'arrangement tridimensionnel des collagènes et agrécannes, ainsi que l'eau liée aux différents PG, confèrent au cartilage articulaire sa résistance aux différentes forces de compression subies par l'articulation. Le contenu de la MEC varie en fonction de la distance qui la sépare des chondrocytes. Ainsi, se trouve à proximité du chondrocyte, la matrice péricellulaire, puis, en s'éloignant des cellules, la matrice territoriale et enfin la matrice interterritoriale (figure 9) (Sophia-Fox *et al.*, 2009 ; Heinegard & Saxne, 2011).

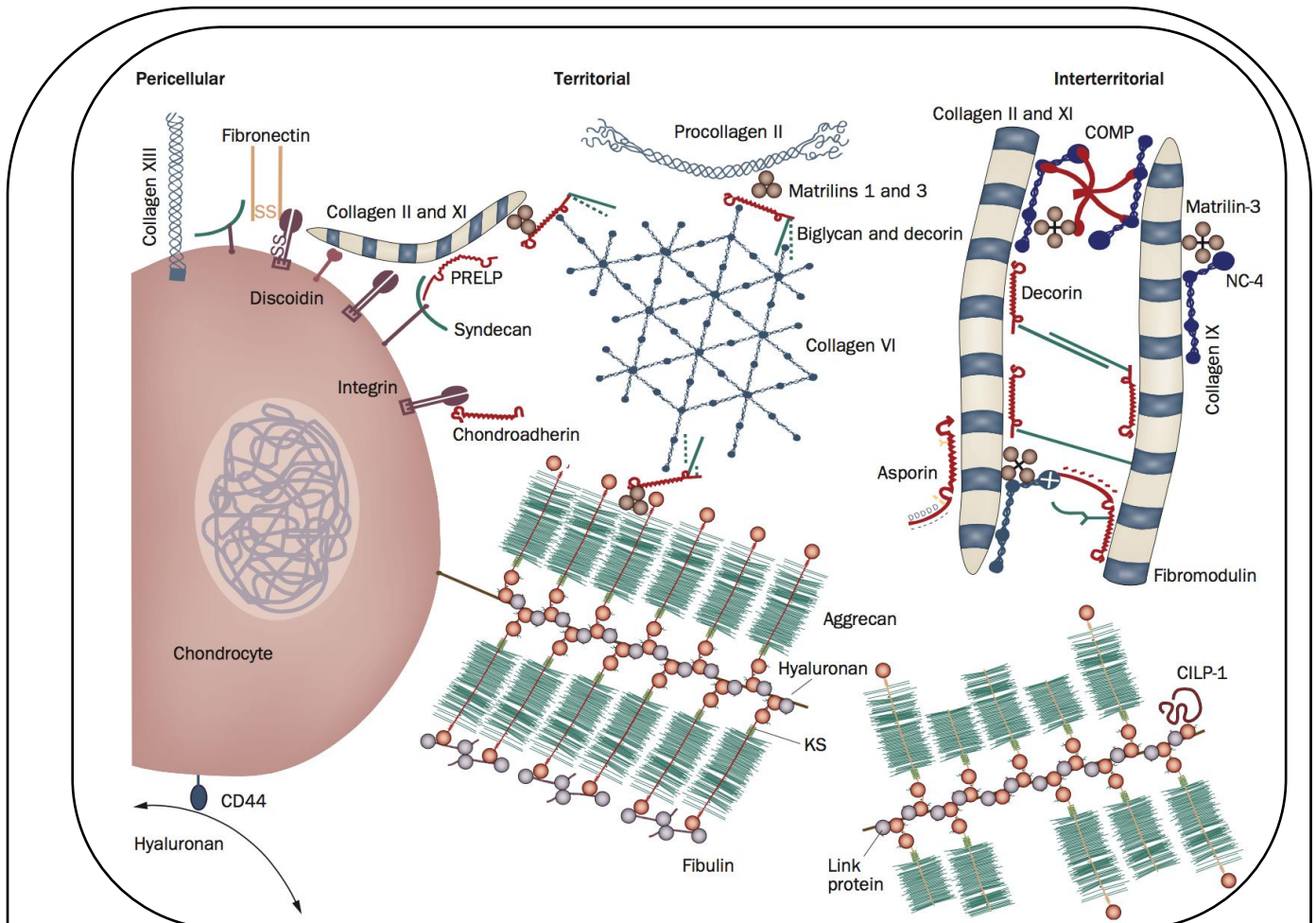


Figure 9 : Représentation générale de la MEC.

CILP-1 : « cartilage intermediate layer protein 1 » ; COMP : « cartilage oligomeric matrix protein » ; CS : « chondroïtine-sulfate » ; KS : « keratane-sulfate » ; PRELP : « proline-arginine-rich and leucine-rich repeat protein ».

D'après Heinegård & Saxne, 2011.

La matrice péri-cellulaire, régit les interactions entre le chondrocyte et la MEC (Poole *et al.*, 1988). Les intégrines situées dans la membrane plasmique des chondrocytes vont servir de récepteurs aux différents signaux de l'environnement et permettre la transduction du signal mécanique reçu (Poole *et al.*, 1988 ; 1991 ; 1992). Le chondrocyte pourra ainsi adapter sa réponse en fonction des différents signaux reçus *via* ce phénomène de mécano-transduction du signal. Cet espace est essentiellement composé de microfibrilles de collagène de types VI et IX ainsi que d'AH, on retrouve aussi des petits PG comme la décorine, la fibronectine ou encore le biglycane.

La matrice territoriale assure la jonction entre la matrice péri-cellulaire et la matrice interterritoriale. Plus en périphérie, elle englobe un ou plusieurs chondrocytes

formant des groupes isogéniques au sein de la MEC. C'est une matrice riche en collagène de type II, agrécanne et CS.

La matrice interterritoriale entoure la matrice territoriale, elle va assurer la jonction entre les différents groupes de chondrocytes, c'est la région la plus éloignée du chondrocyte et qui possède le volume le plus important. Elle est essentiellement composée de collagènes de type II, IX et XI. L'agrécanne est aussi présent et va se lier à l'AH par l'intermédiaire de polymères, de protéines de liaison. D'autres molécules non collagéniques permettent l'organisation du réseau protéique comme la « Cartilage Oligomeric Matrix Protein » (COMP), la décorine, la matriline-3 et la fibromoduline (Sophia Fox *et al.*, 2009).

3.1. Les collagènes du cartilage articulaire

Les fibres de collagènes sont les composants structurels les plus abondants du cartilage. Les molécules de collagènes sont composées de trois chaînes α polypeptidique formant une triple hélice. Les chaînes α peuvent être identiques (homotrimères) ou différentes (hétérotrimères). L'assemblage en triple hélice nécessite un résidu glycine tous les trois acides aminés (aa) dans les chaînes polypeptidiques. Il en résulte une structure répétée $(\text{Gly-X-Y})_n$ qui caractérise les domaines collagéniques. Les positions X et Y sont souvent occupées par une proline et une hydroxyproline, dans 1/3 des cas.

Dans certains collagènes, les domaines collagéniques (hélicoïdaux) alternent avec des domaines non collagéniques (non hélicoïdaux). Les interruptions au niveau de la triple hélice permettent des flexibilités intramoléculaires et des clivages protéolytiques spécifiques. Les triples hélices natives sont résistantes à presque toutes les protéases (Gelse *et al.*, 2003). La famille des collagènes se compose de 28 types qui sont classifiés en fonction de la structure et des propriétés des collagènes (Gelse *et al.*, 2003). 90% des collagènes sont fibrillaires mais il existe également des collagènes non fibrillaires (figure 10 et tableau I). Les collagènes fibrillaires contiennent des triples hélices continues ou partiellement interrompues par des domaines hélicoïdaux tels que les collagènes de type I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII. Les collagènes non fibrillaires regroupent l'ensemble des molécules de collagènes dont la structure n'est pas une triple hélice uniforme. En effet, cette famille de collagènes contient trois chaînes polypeptidiques, mais celles-ci sont interrompues fréquemment par des

domaines non hélicoïdaux. Ce groupe très hétérogène peut être subdivisé en plusieurs sous-groupes. Le sous-groupe « Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple-helix » (FACIT), comme son nom l'indique, contient des collagènes qui s'associent avec des collagènes fibrillaires. Le deuxième sous-groupe correspond aux collagènes pouvant former des réseaux comme les collagènes de types VIII et X qui présentent une chaîne collagénique courte. Le collagène des membranes basales, collagène de type IV, fait aussi partie de cette famille. La dernière catégorie est représentée par les collagènes pouvant former des microfibrilles et correspondent aux collagènes de types VI, VII et XIII. Le collagène de type VI forme des structures en « colliers de perles » alors que le collagène de type VII constitue des filaments d'ancrage (Gelse *et al.*, 2003).

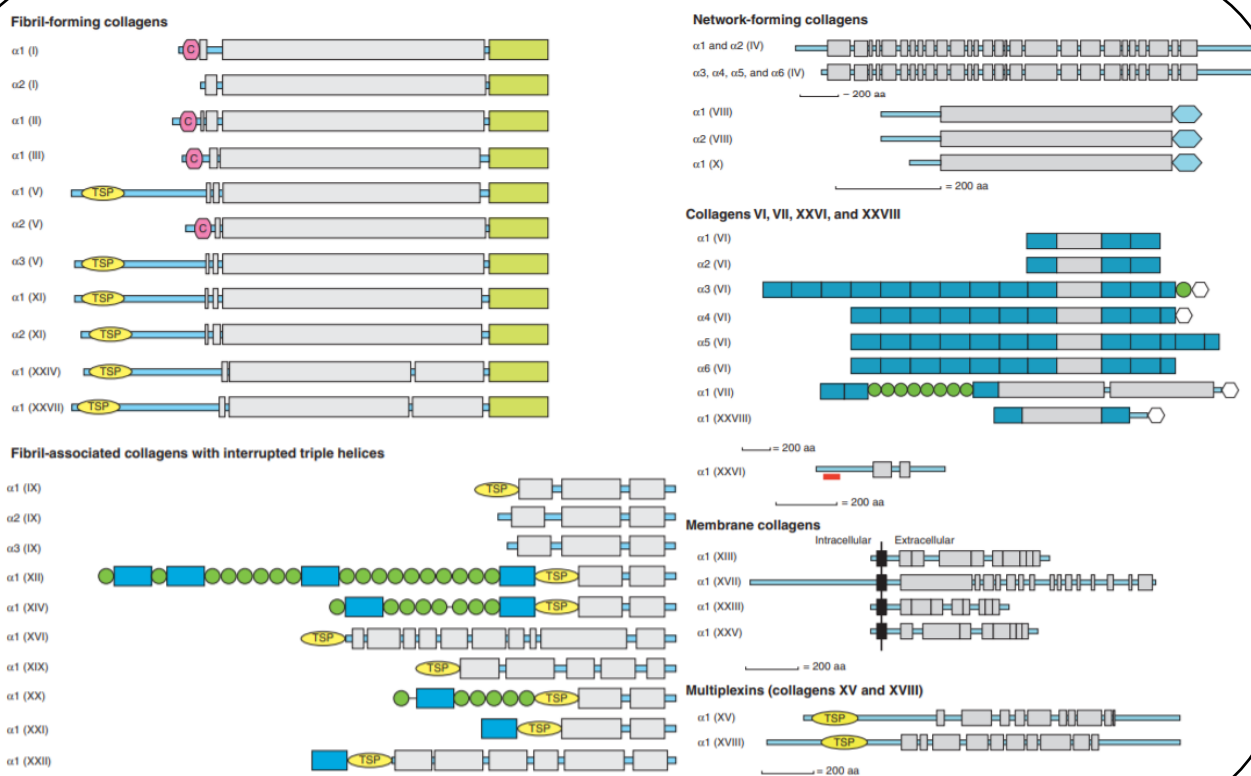


Figure 10 : Organisation structurale des sous-domaines des hélices de collagène.

D'après Ricard-Blum, 2011.

Les collagènes membranaires (isotypes XIII, XVII, XXIII et XXV) et les multiplexines (collagènes XV et XVIII) complètent les différents sous-groupes de collagènes (figure 10, tableau I).

Parmi les différents collagènes présents dans le cartilage articulaire sain, le collagène de type II représente 80% des isotypes du cartilage. Par ailleurs, 15% des collagènes du cartilage sont de types IX et XI, les 5% restants correspondent à d'autres types collagéniques (les collagènes de type III, VI, X et XII) (Aigner & Stöve, 2003).

Type	Molecular composition	Genes (genomic localization)	Tissue distribution
<i>Fibril-forming collagens</i>			
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	COL1A1 (17q21.31–q22) COL1A2 (7q22.1)	bone, dermis, tendon, ligaments, cornea
II	$[\alpha 1(II)]_3$	COL2A1 (12q13.11–q13.2)	cartilage, vitreous body, nucleus pulposus
III	$[\alpha 1(III)]_3$	COL3A1 (2q31)	skin, vessel wall, reticular fibres of most tissues (lungs, liver, spleen, etc.)
V	$\alpha 1(V),\alpha 2(V),\alpha 3(V)$	COL5A1 (9q34.2–q34.3) COL5A2 (2q31) COL5A3 (19p13.2)	lung, cornea, bone, fetal membranes; together with type I collagen
XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	COL11A1 (1p21) COL11A2 (6p21.3) COL11A3 = COL2A1	cartilage, vitreous body
<i>Basement membrane collagens</i>			
IV	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV); \alpha 1 - \alpha 6$	COL4A1 (13q34) COL4A2 (13q34) COL4A3 (2q36–q37) COL4A4 (2q36–q37) COL4A5 (Xq22.3) COL4A6 (Xp22.3)	basement membranes
<i>Microfibrillar collagen</i>			
VI	$\alpha 1(VI),\alpha 2(VI),\alpha 3(VI)$	COL6A1 (21q22.3) COL6A2 (21q22.3) COL6A3 (2q37)	widespread: dermis, cartilage, placenta, lungs, vessel wall, intervertebral disc
<i>Anchoring fibrils</i>			
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	COL7A1 (3p21.3)	skin, dermal–epidermal junctions; oral mucosa, cervix,
<i>Hexagonal network-forming collagens</i>			
VIII	$[\alpha 1(VIII)]_2\alpha 2(VIII)$	COL8A1 (3q12–q13.1) COL8A2 (1p34.3–p32.3)	endothelial cells, Descemet's membrane
X	$[\alpha 3(X)]_3$	COL10A1 (6q21–q22.3)	hypertrophic cartilage
<i>FACIT collagens</i>			
IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	COL9A1 (6q13) COL9A2 (1p33–p32.2)	cartilage, vitreous humor, cornea
XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	COL12A1 (6q12–q13)	perichondrium, ligaments, tendon
XIV	$[\alpha 1(XIV)]_3$	COL9A1 (8q23)	dermis, tendon, vessel wall, placenta, lungs, liver
XIX	$[\alpha 1(XIX)]_3$	COL19A1 (6q12–q14)	human rhabdomyosarcoma
XX	$[\alpha 1(XX)]_3$		corneal epithelium, embryonic skin, sternal cartilage, tendon
XXI	$[\alpha 1(XXI)]_3$	COL21A1 (6p12.3–11.2)	blood vessel wall
<i>Transmembrane collagens</i>			
XIII	$[\alpha 1(XIII)]_3$	COL13A1 (10q22)	epidermis, hair follicle, endomysium, intestine, chondrocytes, lungs, liver
XVII	$[\alpha 1(XVII)]_3$	COL17A1 (10q24.3)	dermal–epidermal junctions
<i>Multiplexins</i>			
XV	$[\alpha 1(XV)]_3$	COL15A1 (9q21–q22)	fibroblasts, smooth muscle cells, kidney, pancreas,
XVI	$[\alpha 1(XVI)]_3$	COL16A1 (1p34)	fibroblasts, amnion, keratinocytes
XVIII	$[\alpha 1(XVIII)]_3$	COL18A1 (21q22.3)	lungs, liver

Tableau I : Principaux membres de la famille des collagènes et distribution tissulaire.

D'après Gelse *et al.*, 2003.

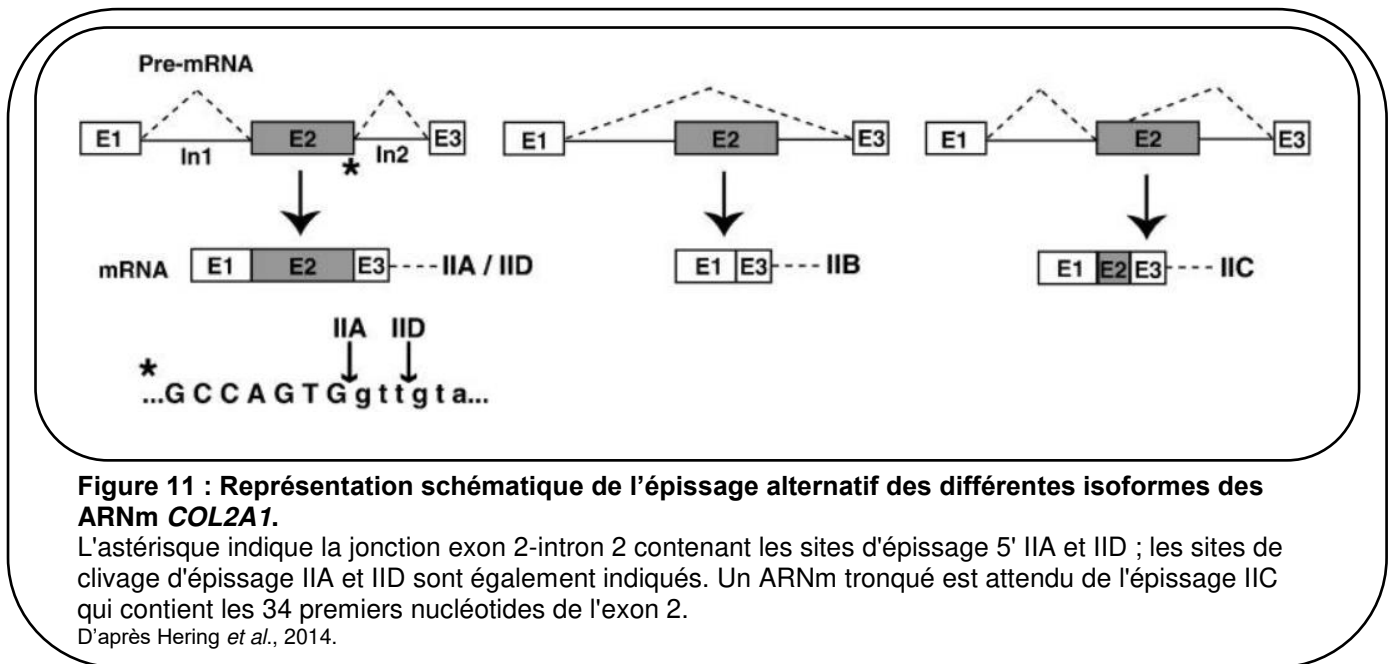
3.1.1. Le collagène de type II

Le collagène de type II est considéré comme l'un des marqueurs spécifiques du phénotype chondrocytaire (Galéra *et al.*, 1992 ; Miller & Matukas, 1969). Cet isotype présente des taux d'hydroxylation et de glycosylation très élevés qui donnent des fibres plus fines que celles des collagènes de types I et III. Les fibrilles rigides de collagènes assurent solidité et compressibilité à la MEC et lui permettent de résister à de grandes déformations. Ce sont ces propriétés qui confèrent aux articulations la capacité d'absorber les chocs. Les collagènes de types IX et XI sont associés aux fibres de collagènes de type II (Diab *et al.*, 1996).

Le collagène de type II est composé de trois chaînes $\alpha 1$ identiques, dérivées du gène *COL2A1* chez l'Homme. Elles s'assemblent pour former une triple hélice : le procollagène, molécule qui est sécrétée dans la MEC.

La biosynthèse du collagène de type II commence dans le noyau cellulaire par la transcription du gène *COL2A1*. Le procollagène est codé par 53 exons, seul l'exon 2 est connu pour subir un épissage alternatif (Ryan & Sandell, 1990). L'exon 2 code pour un domaine de 69 aa riche en cystéines dans le propeptide amino-terminal. L'épissage alternatif des acides ribonucléiques messagers (ARNm) aboutit à la formation de deux isoformes du procollagène de type II. La forme IIA, la plus longue, est exprimée au début de la chondrogenèse par les CSM, alors que la forme IIB, dépourvue de l'exon II, est exprimée par les chondrocytes matures dans le cartilage articulaire. Le passage du collagène de type IIA au type IIB, au cours de la chondrogenèse est un signe de la différenciation chondrocytaire mature (Sandell *et al.*, 1991) (figure 11). En outre, le procollagène de type II est sécrété dans la MEC du cartilage sous une forme immature. A ce stade, il contient des C- et N- propeptides qui vont être clivés par protéases pour former la molécule de collagène de type II mature (Prockop *et al.*, 1998). Plus récemment, lors de la différenciation des CSM de lapin en chondrocytes, deux nouvelles isoformes issues de l'épissage alternatif du gène *COL2A1* ont été découvertes, il s'agit des isoformes IIC et IID (McAlinden *et al.*, 2008) (figure 11). L'isoforme de type IIC contient 34 nucléotides de l'exon 2 alors que l'isoforme IID contient l'ensemble de l'exon 2, auquel trois nucléotides supplémentaires s'ajoutent. Le collagène de type IID contient donc un aa supplémentaire. Toutefois, il

semble que la forme IIC ne soit pas traduite alors que la forme IID est co-exprimée avec la forme IIA lors de la différenciation *in vitro* des CSM humaines en chondrocytes.



3.1.2. Le collagène de type VI

Le collagène de type VI est un hétérotrimère qui possède deux courts domaines en triple hélice et un important domaine globulaire terminal représentant les deux tiers de la molécule. Il est localisé dans l'environnement péricellulaire du chondrocyte et intervient dans l'adhésion du chondrocyte à la MEC (Poole *et al.*, 1988).

3.1.3. Le collagène de type IX

Le collagène de type IX est un biomarqueur caractéristique du cartilage articulaire hyalin. Il s'agit d'un hétérotrimère appartenant à la famille des collagènes non fibrillaires et à la sous-famille des FACIT. Il est composé de trois chaînes polypeptidiques, $\alpha 1(\text{IX})$, $\alpha 2(\text{IX})$ et $\alpha 3(\text{IX})$ codées respectivement par les gènes *COL9A1*, *COL9A2* et *COL9A3*. Il possède deux ou trois segments en triple hélice, reliés par des coudes et un segment globulaire en N-terminal. Une chaîne de CS se lie de manière covalente à la chaîne $\alpha 2(\text{IX})$ au niveau du coude flexible et se projette vers l'extérieur de la fibrille. Dans le cartilage, les molécules de collagène de type IX sont liées à intervalles réguliers le long des fibrilles de collagènes de type II. Le

collagène de type IX permet le maillage des fibres de collagènes et l'interaction avec les autres protéines matricielles (Roughley & Lee, 1994 ; Diab *et al.*, 1996).

3.1.4. Le collagène de type X

Le collagène de type X est un homotrimère codé par le gène *COL10A1*. Il est retrouvé dans la zone hypertrophique des cartilages de conjugaison, mais aussi autour des chondrocytes de la zone minéralisée du cartilage articulaire (Von Der Mark *et al.*, 1992). Il favorise le processus de minéralisation de la MEC (Schmid & Linsenmayer, 1985). Dans le cartilage articulaire sain, le collagène de type X n'est pas exprimé, alors que dans le cartilage articulaire arthrosique les chondrocytes le synthétisent et il constitue à ce titre un biomarqueur de l'arthrose (Von Der Mark *et al.*, 1992). Le collagène de type X est considéré comme un marqueur de l'hypertrophie chondrocytaire.

3.1.5. Le collagène de type XI

Le collagène de type XI est spécifique du cartilage articulaire hyalin. C'est un hétérotrimère qui comporte 3 chaînes $\alpha 1(XI)$, $\alpha 2(XI)$ et $\alpha 3(XI)$ codées respectivement par les gènes *COL11A1*, *COL11A2* et *COL2A1* (Morris & Bächinger, 1987). Il est présent à l'intérieur des fibres de collagènes de type II. Il est associé de manière covalente aux fibrilles de collagènes de type II, principalement grâce à l'hydroxylation de résidus lysines par les lysyl-oxydases. Il a un rôle important dans l'initiation de la formation fibrillaire, dans la détermination du diamètre de ces fibrilles et assure la cohésion de la MEC (Mendler *et al.*, 1989). Le collagène de type XI s'associe avec le collagène de type II et IX pour former des hétérofibrilles (figure 12).

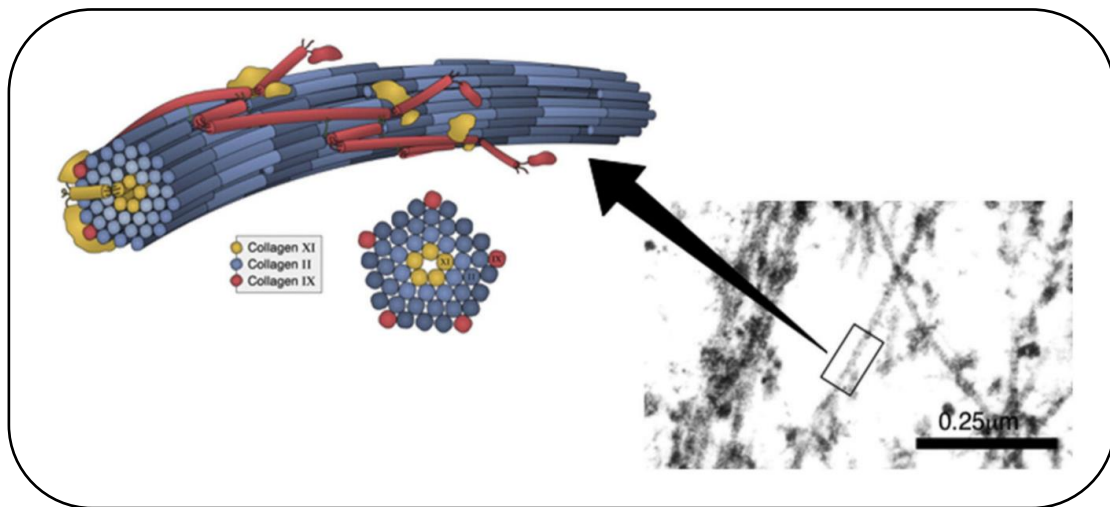


Figure 12 : Modèle de l'architecture de l'hétérofibrille de collagène de types II/IX/XI caractéristique du cartilage articulaire natif.

Le collagène de type II (bleu) est la molécule prédominante dans le cartilage articulaire, et il forme un réseau de réticulation covalent avec les collagènes de types XI (jaune) et IX (rouge). Le collagène de type XI forme une matrice filamenteuse à l'intérieur de la fibrille de collagène de type II. Le collagène de type IX décore la surface de la fibrille.

D'après Murdoch *et al.*, 2016.

3.2. Les protéoglycannes

Les PG sont des macromolécules hydrophiles majoritairement situées à la surface des cellules, au sein de la MEC (figure 13). Les PG sont constitués d'un corps protéique (partie polypeptidique d'un PG) relié à des chaînes de GAG fixées de manière covalente à des résidus sérines par l'intermédiaire d'un tétra-saccharide invariant. Les PG sont généralement faciles à distinguer des autres glycoprotéines par la nature, la quantité et la disposition de leurs chaînes latérales en sucre. Au moins une des chaînes latérales de sucre d'un PG doit être un GAG. Les PG peuvent contenir jusqu'à 95% de glucides, surtout sous la forme de longues chaînes de GAG non ramifiées, chacune d'une longueur typique de 80 sucres.

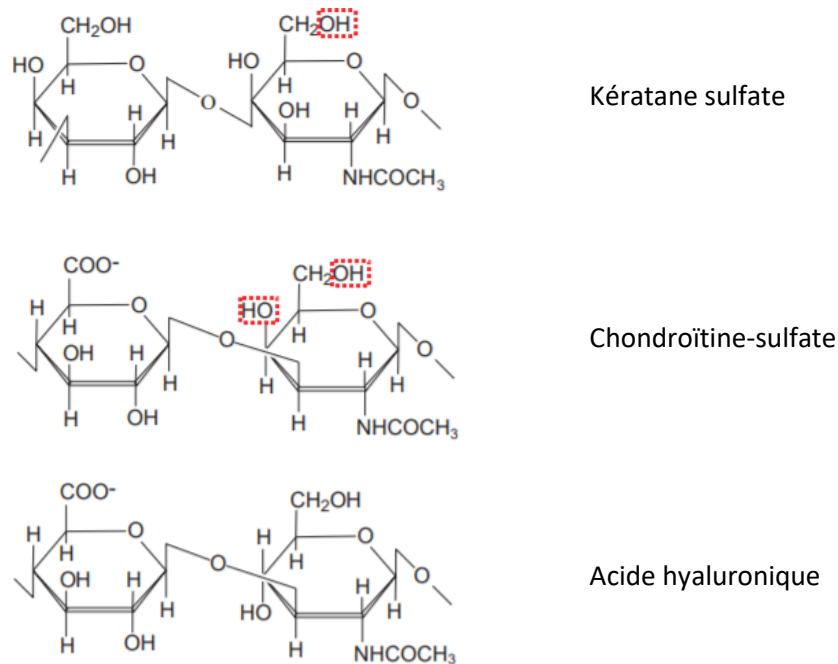


Figure 13 : Composition disaccharidique des glycosaminoglycanes.

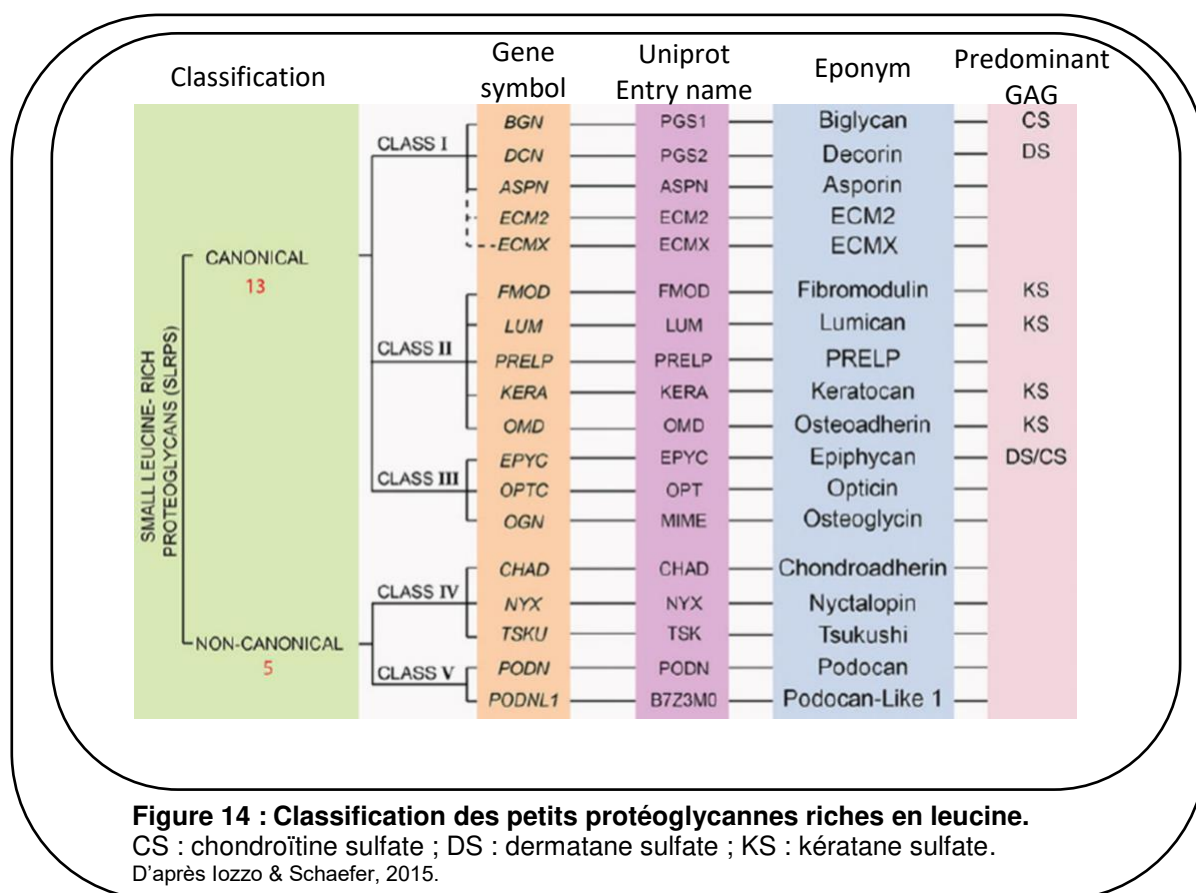
La structure des disaccharides répétés dans les différents types de chaînes de glycosaminoglycanes est dessinée sans sulfatation. Les différentes positions de sulfatation dans chaque GAG sont marquées par un trait rouge en pointillé.

D'après Prydz & Dalen, 2000.

Les GAG sont formés d'une succession répétitive de disaccharides. Le disaccharide glucidique est toujours composé d'un glucide aminé, N-acétylglucosamine ou N-acétylgalactosamine, qui sera sulfaté dans la plupart des cas et d'un acide uronique, glucuronique ou iduronique. Les GAG possèdent une forte charge négative due aux différents groupements carboxyles ou sulfates présents sur la plupart de leurs sucres. Une liaison spécifique tétra-saccharidique s'assemble d'abord sur une chaîne latérale de sérine. Dans la plupart des cas, on ne sait pas clairement comment s'effectue le choix de cette sérine spécifique, mais il semble que cela implique la reconnaissance d'une conformation locale spécifique de la chaîne polypeptidique, plutôt que d'une séquence linéaire spécifique en acides aminés. La liaison entre le GAG et le corps protéique implique un tri-saccharide qui est composé d'un résidu xylose fixé à la sérine et de deux résidus galactose. Les GAG du cartilage articulaire sont principalement la chondroïtine-6-sulfate (CS), le kératane-sulfate (KS) et de l'AH (Iozzo, 1997 ; 1998). L'AH aussi appelé hyaluronate est le GAG le plus simple. Il est composé d'une séquence régulière répétitive, d'au maximum 25 000 unités disaccharidiques non sulfatées. L'AH, contrairement aux autres GAG, ne

contient pas de sucres sulfatés, toutes ses sous-unités disaccharidiques sont identiques, sa chaîne est extrêmement longue et il n'est généralement pas relié au noyau protéique de façon covalente. Les composés disaccharidiques des GAG ont une forte charge négative, 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.

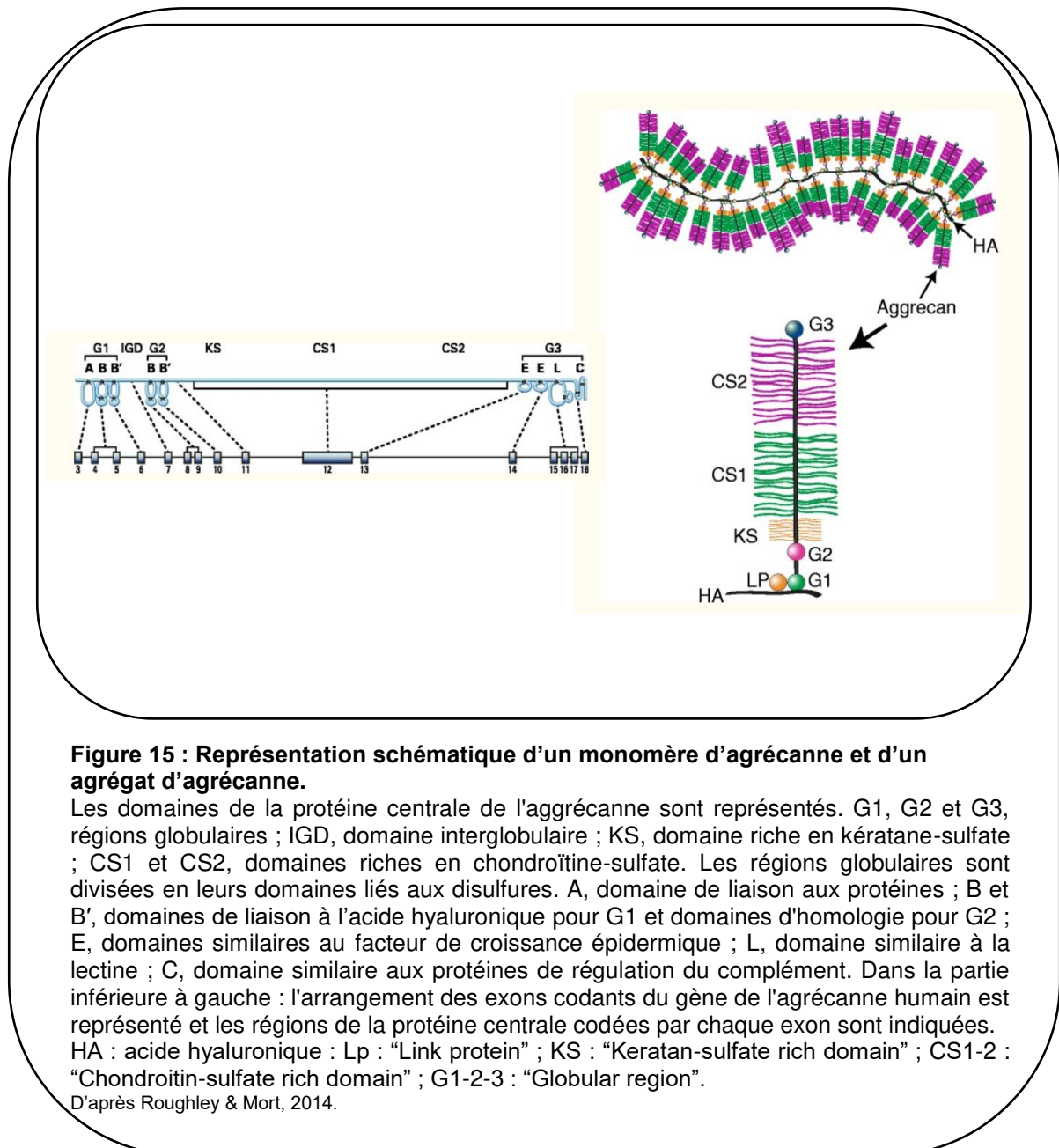
Au sein du tissu cartilagineux articulaire, il existe trois grandes catégories de PG. Les « Small Leucin-rich Repeat Proteoglycans » (SLRP) représentent environ 3% des PG totaux (figure 14). Leur analyse structurale a montré qu'ils étaient constitués de deux principaux composants structuraux, un noyau protéique conservé et de plusieurs types de GAG (CS, KS, dermatane- ou héparane-sulfate) (Iozzo, 1997 ; 1998). Le noyau protéique contient un certain nombre de répétitions riches en leucine (« Leucin-Rich Repeat », LRR), qui sont constituées de la séquence consensus LXX-LXLXXNXL, où X représente n'importe quel aa, L une leucine, une isoleucine ou une valine, et N une asparagine, une cystéine ou une thréonine. Ces LRR sont généralement flanquées par des séquences de quatre résidus de cystéine à l'extrémité N-terminale et de deux résidus cystéine en C-terminal. Les SLRP sont déclinés en cinq classes basées sur le nombre des LRR ainsi que sur l'espacement des résidus cystéines N-terminaux et leur organisation chromosomique (Merline *et al.*, 2009 ; Dellett *et al.*, 2012). L'asporine, est placée dans la famille des SLRP en raison de son homologie de séquence, même si elle ne contient pas de chaîne de GAG (Lorenzo *et al.*, 2001). La décorine et la fibromoduline participent à l'organisation de la MEC en liant le collagène et contribuent à la cohésion du cartilage (Roughley & Iee, 1994). La structure protéique de ces PG fixerait les fibres de collagène alors que la partie GAG interviendrait pour maintenir l'espace entre les fibres matricielles, participant, de fait, à l'hydratation de la matrice (Iozzo, 1998). Une étude datant de 2011 a montré que les cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 β et le TNF- α , diminuent l'expression de l'asporine alors que le « Transforming Growth Factor » (TGF)- β 1 l'augmente (Duval *et al.*, 2011). Par ailleurs, le TGF- β stimule l'expression de la décorine et inhibe celle du biglycane (Roughley & Iee, 1994).



Les PG de surface incluent les syndécanes, le bétaglycane, le glypicane, le perlécane et le « Cluster of Differentiation » (CD) 44 qui correspond au récepteur de l'AH. Les PG peuvent intervenir dans la transduction de signaux extracellulaires vers l'intérieur de la cellule, au travers des intégrines. De plus, ils servent de réservoir pour les cytokines et les facteurs de croissance dont ils régulent l'activité, la biodisponibilité et la stabilité. Un PG transmembranaire de 121 aa nommé « Small Novel Rich in Cartilage » (Snorc) a été décrit chez la souris. Les travaux de Heinonen et collaborateurs suggèrent qu'il serait un marqueur spécifique du cartilage, dans la mesure où son patron d'expression et la régulation de son expression suivent ceux du collagène de type II (Heinonen *et al.*, 2011).

L'agrécanne est le PG majeur du cartilage articulaire, il représente plus de 90% des PG totaux. Le collagène II et l'agrécanne sont les deux principaux composants de la matrice du cartilage articulaire, et, à ce titre, l'agrécanne est considéré comme l'un des marqueurs phénotypiques du cartilage articulaire. Le monomère d'agrécanne est constitué d'une protéine axiale de 220 kDa sur laquelle se fixent une centaine de chaînes de CS et une trentaine de chaînes de KS. La région N-terminale de la protéine

axiale se lie de façon non covalente à une molécule d'AH. Une petite glycoprotéine appelée « link protein » ou protéine de liaison stabilise cette interaction en se fixant simultanément à l'AH et à la protéine axiale (ou « core protein »). Les agrécannes forment des agrégats de gros PG branchés sur l'AH (chaîne pouvant atteindre 25 000 disaccharides) (figure 15). Des milliers d'agrécannes peuvent être liés sur une molécule d'AH.



L'agrécane joue un rôle essentiel dans le cartilage articulaire en lui conférant ses propriétés de visco-élasticité. Les agrégats d'agrécane sont emprisonnés dans le réseau collagénique et piègent l'eau. Lors d'une compression, une pression

importante s'exerce sur le cartilage articulaire. L'eau va être chassée en dehors du réseau, l'éjectant vers le liquide synovial. Lorsque la pression est levée, la force osmotique va ramener l'eau dans le tissu. C'est une propriété biomécanique importante qui permet à l'articulation d'amortir les chocs et de résister aux forces de compression (figure 16) (Marudas, 1976). Lors de l'arthrose, le réseau de collagène est dégradé et les agrégates ne sont plus emprisonnées dans le réseau, la force osmotique diminue avec, pour conséquence, un tissu moins hydraté et donc une diminution de ses propriétés biomécaniques (Marudas, 1976).

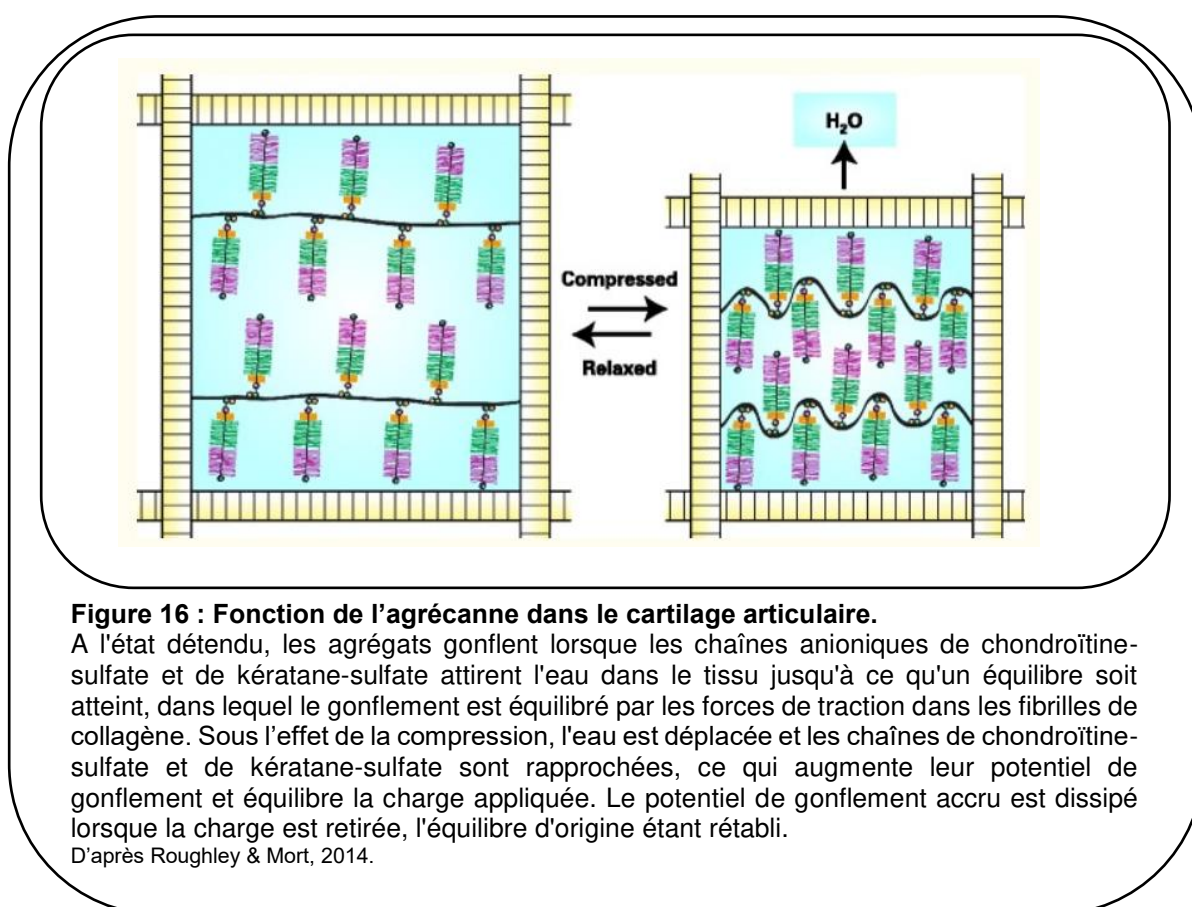


Figure 16 : Fonction de l'agrégate dans le cartilage articulaire.

A l'état détendu, les agrégats gonflent lorsque les chaînes anioniques de chondroïtine-sulfate et de kératane-sulfate attirent l'eau dans le tissu jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint, dans lequel le gonflement est équilibré par les forces de traction dans les fibrilles de collagène. Sous l'effet de la compression, l'eau est déplacée et les chaînes de chondroïtine-sulfate et de kératane-sulfate sont rapprochées, ce qui augmente leur potentiel de gonflement et équilibre la charge appliquée. Le potentiel de gonflement accru est dissipé lorsque la charge est retirée, l'équilibre d'origine étant rétabli.

D'après Roughley & Mort, 2014.

3.3. Les autres protéines matricielles

Des 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. Parmi ces éléments qui participent à l'organisation du tissu ainsi qu'aux différentes interactions chondrocytes-MEC, se trouve la COMP qui peut être considérée comme un marqueur typique du cartilage avec le collagène de type II et l'agrégate. La COMP possède une très forte affinité pour les collagènes et peut interagir simultanément avec

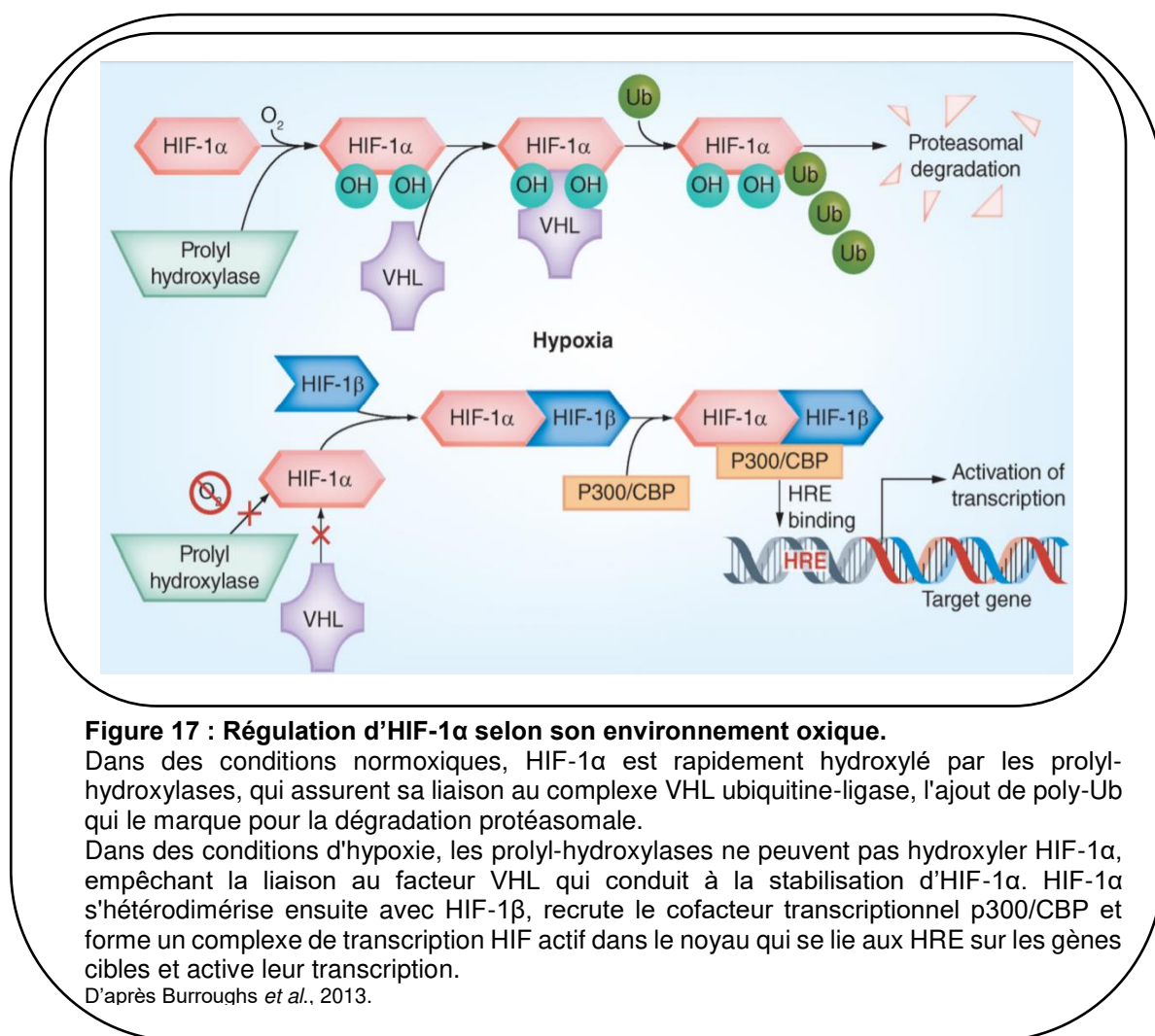
plusieurs molécules, permettant ainsi la création d'un réseau collagénique en participant à la formation de fibrilles. D'autres molécules non collagéniques sont également présentes au sein du cartilage et ont un rôle dans la cohésion de la MEC et des chondrocytes (Söder *et al.*, 2002) ; on retrouve ainsi des protéines membranaires de type anchorine II, des intégrines et des molécules matricielles telles que la fibronectine, ou encore la ténascine, etc. (Mollenhaure *et al.*, 1984 ; DiCesare *et al.*, 1995).

3.4. L'hypoxie

Les chondrocytes articulaires font partie des rares types cellulaires à se développer en présence d'une faible teneur en oxygène. Le cartilage articulaire ne possédant pas de réseaux capillaires, le microenvironnement cartilagineux est hypoxique. L'hypoxie est définie comme une réduction de la quantité d'oxygène disponible pour une cellule, un tissu ou un organisme. La baisse du niveau d'O₂ peut entraîner une altération de la transcription des gènes ou des modifications post-traductionnelles des protéines, entraînant des changements dans le métabolisme cellulaire (Loboda *et al.*, 2010). Dans des conditions physiologiques, saines, la concentration d'oxygène dans le cartilage articulaire varie de 0,5 à 10 % (4 à 70 mmHg) (Pfander *et al.*, 2006 ; Ströbel *et al.*, 2010). Lors de telles concentrations en oxygène, une cascade d'événements intracellulaires est activée, ce qui augmente l'expression des facteurs inductibles par l'hypoxie (HIF : « Hypoxia-inducible factor »).

Les facteurs HIF sont des hétérodimères constitués de deux sous-unités : la sous-unité α , instable, régulée par l'hypoxie (HIF- α) et la sous-unité β qui est stable et insensible à l'oxygène (HIF- β), (également connue sous le nom de « Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator » (ARNT)) (Chen *et al.*, 2012). HIF- α et HIF- β partagent plusieurs domaines structurels conservés, dont une région bHLH (« basic helix loop helix ») assurant la liaison à l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) et deux domaines PAS (PAS A et PAS B) garantissant la spécificité de la liaison avec le gène et la dimérisation (Jang *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2007a). Trois membres de la famille humaine des HIF- α ont été décrits : HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α . En raison des conditions d'hypoxie dans le cartilage articulaire, les trois membres de la famille des protéines HIF- α jouent un rôle essentiel.

HIF-1 α est une protéine de 120 kDa ayant été caractérisée et purifiée pour la première fois en 1995 par Wang et Semenza (Wang & Semenza, 1995). C'est un polypeptide de 826 aa codé par le gène *HIF1A* (chromosome 14 chez l'Homme et 24 chez le modèle équin). C'est un facteur de transcription régulant la transcription de certains gènes en fonction du taux oxygène ambiant. Dans des conditions normoxiques, HIF-1 α est hydroxylé par l'intermédiaire des prolyl-hydroxylases (PHD) qui sont des dioxygénases dépendantes de l'oxygène, de l'acide ascorbique (A2P) et du Fe²⁺. Cette hydroxylation permet sa dégradation par la suite *via* le protéasome (Chen *et al.*, 2012 ; Maxwell, 2005 ; Patel & Simon, 2008). En condition hypoxique, l'hydroxylation de HIF-1 α est inhibée, ce dernier va alors s'accumuler dans le cytoplasme. Il va alors être phosphorylé et transloqué dans le noyau où il se dimérisera avec HIF- β . Cet hétérodimère se lie à l'« Hypoxia response element » (HRE) sur des gènes sensibles à l'hypoxie tels que *COL2A1*, *SOX9*, *GLUT1*, *EPO*, *NOS*, *VEGF*, ... (figure 17) (Gorlach, 2009 ; Semenza, 2000). HIF-1 α joue donc un rôle essentiel dans la synthèse des protéines essentielles au maintien d'une MEC cartilagineuse de type hyaline ainsi que dans le maintien de l'homéostasie (Lafont, 2010).



HIF-2α a été identifié en 1997 (Hara *et al.*, 2001), c'est un polypeptide de 870 aa, aussi connu sous le nom de Epas1, il est codé par le gène *EPAS1* (chromosome 2). La variabilité entre HIF-1α et HIF-2α s'observe essentiellement au niveau du domaine de *transactivation* amino-terminal (N-TAD). Tout comme HIF-1α, HIF-2α phosphorylé va être transloqué dans le noyau et forme par la suite un dimère avec HIF-β. Cet hétérodimère va ensuite, lui aussi, se lier au complexe HRE sur des gènes cibles, tels que *COL10A1*, *RUNX2*, ainsi que certaines *MMP* (les *MMP3*, 9 et 13) et *ADAMTS* (notamment *ADAMTS4*). HIF-2α apparaît ainsi comme un régulateur de l'expression des divers facteurs cataboliques, y compris les enzymes de dégradation de la MEC cartilagineuse (Ryu *et al.*, 2011).

HIF-2α est une molécule structurellement et fonctionnellement similaire à HIF-1α, mais avec des gènes cibles différents. Alors que HIF-1α induit l'expression de

COL2A1, *SOX9*, *GLUT1*, *EPO*, *NOS* et *VEGF* afin de maintenir l'homéostasie du cartilage, HIF-2 α induit l'expression de gènes associés à la différenciation hypertrophique, tels que *COL10A1* et *RUNX2* (formation d'ostéophytes), et de gènes associés à la dégradation du cartilage, tels que *MMP9*, *MMP13*, *MMP3*, *ADAMTS* (Husa *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2015). Néanmoins, alors que dans les modèles murins HIF-2 α se comporte plutôt comme un facteur favorisant l'hypertrophie chondrocytaire, dans les chondrocytes articulaires humains, il a été démontré qu'HIF-2 α favorisait le phénotype hyalin des chondrocytes en conjonction avec *SOX9* (Lafont *et al.*, 2008).

HIF-3 α a été identifié en 1998 chez la souris (Gu *et al.*, 1998), il se différencie de HIF-1 α et HIF-2 α dans son domaine de liaison à l'ADN, par son domaine bHLH, et PAS avec seulement 55% d'identité avec ces derniers (Tanaka *et al.*, 2009). Chez l'Homme, HIF-3 α a été identifié en 2001 (Hara *et al.*, 2001), c'est une protéine de 662 aa avec un poids moléculaire de 73 kDa. HIF-3 α joue aussi le rôle de régulateur de l'expression génique, cependant il affecte négativement la transcription et rentre en compétition avec HIF-1 α et HIF-2 α au niveau des sites de liaison à l'ADN dans les gènes cibles régulés par l'hypoxie (Zhang *et al.*, 2014a ; Ando *et al.*, 2013). Tout comme HIF-1 α et HIF-2 α , HIF-3 α , une fois dans le noyau, va former un dimère avec HIF- β , il agirait sur de nombreux gènes cibles tels que *SOX2*, *GLUT1*, *EPO* et *IGFBP-1*. Alors que certaines isoformes d'HIF-3 α courtes agissent comme des régulateurs dominants-négatifs de HIF-1 α /2 α , d'autres isoformes HIF-3 α peuvent inhiber la fonction de HIF-1 α /2 α en se faisant concurrence pour l'interaction avec la sous-unité HIF- β (Maynard *et al.*, 2003). HIF-3 α a été décrit pour la première fois dans les chondrocytes dans l'étude réalisée par Schrobback et ses collaborateurs en 2012 (Schrobback *et al.*, 2012). Ils ont constaté que les chondrocytes cultivés dans des conditions normoxiques et hypoxiques exprimaient HIF-3 α . Bien que les niveaux d'expression de l'ARNm soient extrêmement faibles, ce qui pourrait potentiellement signifier qu'il n'est exprimé que par une minorité de chondrocytes, sa transcription dépendrait des faibles concentrations d'oxygène et semblerait suivre les profils d'expression d'autres gènes chondrogéniques au cours de la différenciation des chondrocytes. Les niveaux de HIF-3 α seraient évocateurs de l'état hypertrophique des cellules chondrogéniques, et qu'un ou plusieurs variants d'épissage peuvent être d'importants régulateurs du phénotype chondrocytaire.

Les trois isoformes de HIF ont donc des actions bien différentes, HIF-1 α a un effet bénéfique dans le maintien de la matrice du cartilage articulaire, HIF-2 α a plutôt

un effet inverse sur la matrice du cartilage articulaire, et HIF-3 α agit comme un dominant-négatif d'HIF-1 α et HIF-2 α (figure18).

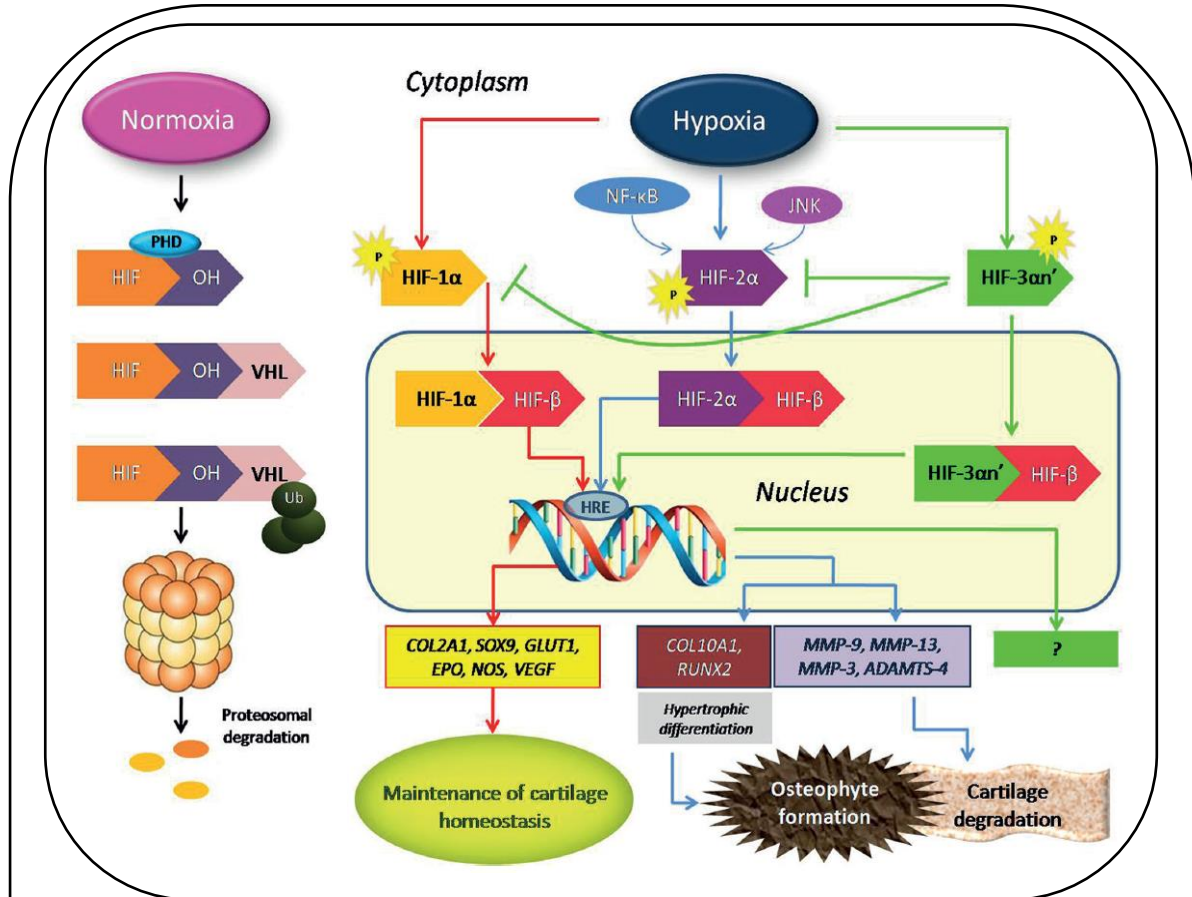


Figure 18 : Schéma récapitulatif de l'action des HIF selon les conditions oxiques.

En condition normoxique, les HIF sont ubiquitinylés et dégradés par le protéasome. En condition hypoxique, cette dégradation est inhibée et les différents HIF seront transloqués dans le noyau afin de former un dimère avec HIF- β . Ce dimère se fixera alors sur ses gènes cibles modifiant ainsi les protéines et facteurs de transcription responsables de l'homéostasie du cartilage.

D'après Fernandez-Torres *et al.*, 2017.

E. Chondrogenèse et homéostasie du cartilage

Lors du développement embryonnaire chez les Vertébrés, la mise en place du squelette met en jeu deux types d'ossifications : l'une qualifiée de membranaire ou membraneuse et l'autre endochondrale (figure 19) (Karsenty, 2003). Ces noms se réfèrent uniquement au mécanisme par lequel l'os est initialement formé.

Dans l'ossification membranaire, l'os se met en place par différenciation directe, sans aucun intermédiaire, des CSM en ostéoblastes. Ce procédé d'ossification membranaire intervient principalement dans la formation des os plats.

L'ossification endochondrale passe, tout d'abord, par une maquette cartilagineuse qui sera progressivement remplacée par du tissu osseux. Cette ossification concerne les os longs, et quelques os de la base du crâne. Elle permet l'élongation et l'épaississement de l'os et elle est initiée pendant la vie fœtale, puis continue jusqu'à la fin de la croissance à l'âge adulte.

Les deux types d'ossification font appel à des processus complexes incluant la migration et la condensation des cellules mésenchymateuses ainsi que leur différenciation en cellules cartilagineuses et/ou osseuses (Karsenty, 2003). De nombreux facteurs transcriptionnels sont impliqués dans l'ossification endochondrale, tout comme des facteurs chondrogéniques-ostéogéniques, des facteurs de signalisation et des protéines de la MEC.

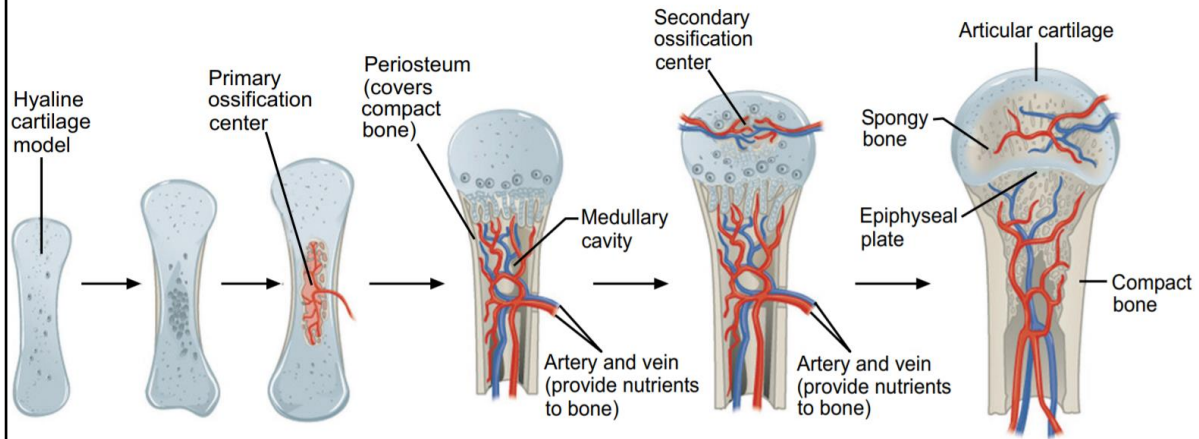


Figure 19 : Les différentes étapes du processus d'ossification endochondrale.

Les cellules issues du mésenchyme se condensent et se différencient en pré-chondrocytes puis en chondrocytes. Le périchondre et la maquette cartilagineuse se forment. Au centre de l'os, on assiste à une hypertrophie cartilagineuse et à une mort cellulaire par apoptose qui laisse place à une MEC minéralisée. La mort des chondrocytes entraîne l'infiltration de vaisseaux sanguins. Le centre d'ossification primaire se met en place. La croissance cartilagineuse est assurée par la prolifération des chondrocytes le long des extrémités osseuses. Vient ensuite le développement d'un centre d'ossification secondaire et le cartilage subsiste le long des plaques de croissance et des extrémités osseuses.

D'après Brannigan & Griffin, 2016.

1. Condensation des progéniteurs chondrocytaires

La mise en place du cartilage de croissance s'effectue *in utero*. La première étape de la chondrogenèse débute par la condensation des CSM (Fell, 1925). Elle repose sur des interactions cellules-cellules qui établissent un centre d'agrégation conduisant au recrutement des cellules à partir des tissus avoisinants (Hall & Miyake, 2000). Les cellules du mésoderme latéral et celles du bord latéral des somites migrent dans la région présumptive du membre. Les bourgeons des membres apparaissent sous la forme de petites protubérances issues de la paroi latérale du tronc. Chaque bourgeon se compose d'une partie centrale mésenchymateuse, d'origine

mésodermique recouverte d'une coiffe d'ectoderme. L'ectoderme situé à l'extrémité du bourgeon s'épaissit pour former une structure spécialisée : la crête ectodermique apicale. Cette structure maintient une croissance continue du bourgeon du membre le long de l'axe proximo-distal et les cellules dans un état indifférencié. Les cellules de la crête ectodermique apicale définissent une 2^{ème} zone, la zone de progrès. Une troisième zone, située postérieurement, appelée zone d'activité polarisante, détermine la polarité antéro-postérieure. Les chondroprogéniteurs mésenchymateux participant à la condensation produisent une MEC qui est riche en AH et en collagènes de types I et IIA (Sandell *et al.*, 1994). L'initiation de la condensation est associée à une augmentation de l'activité de la hyaluronidase et à l'apparition de molécules de l'adhésion cellulaire telles que la N-cadhérine et la « Neural Cell Adhesion Molecule » (N-CAM). Le facteur de croissance « Transforming Growth Factor- β 1 » (TGF- β 1), un des premiers stimuli lors de la condensation chondrogénique, induit la synthèse de la fibronectine, qui en retour régule les récepteurs de N-CAM. Les syndécanes, un type de PG membranaires, se fixent à la fibronectine et régulent négativement les récepteurs N-CAM, définissant ainsi les limites de la condensation. L'augmentation de la prolifération cellulaire et le remodelage de la MEC, initient la transition des cellules chondroprogénitrices vers les chondrocytes, alors entièrement engagés dans la différenciation chondrogénique. Cela se traduit d'une part, par la disparition de l'expression du collagène de type I, de la fibronectine et de la N-cadhérine, et d'autre part, par l'induction de l'expression de la ténascine, de matrilines, de thrombospondines et de COMP (Delise *et al.*, 2000).

2. La différenciation en chondrocytes matures

La condensation des progéniteurs chondrocytaires est rapidement suivie par la différenciation des cellules (figure 20). Elle semble principalement régie par des facteurs de transcription de la famille « High Mobility Group » (HMG), les Sox. Deux membres de la famille Sox, L-Sox5 et Sox6, qui ne sont pas présents dans les premières étapes de la condensation mésenchymateuse, vont être co-exprimés avec Sox9 et favoriser la différenciation des cellules en chondrocytes matures (Lefebvre *et al.*, 1998 ; Akiyama *et al.*, 2002). L'expression de Sox9 ne dépend pas de L-Sox5 et Sox6. Sox9, L-Sox5 et Sox6 exercent une action concertée, qui est associée à une co-régulation transcriptionnelle positive de l'expression des collagènes de types II, IX et XI et de l'agrécane (Lefebvre *et al.*, 2001 ; Han & Lefebvre, 2008). Les chondrocytes matures vont alors produire une MEC abondante en agrécane et en fibres hétérotypiques de collagènes II, IX et XI. Ils synthétisent du collagène de type IIB, la forme mature du collagène de type II, qui est le principal marqueur du statut différencié des chondrocytes (Sandell *et al.*, 1994).

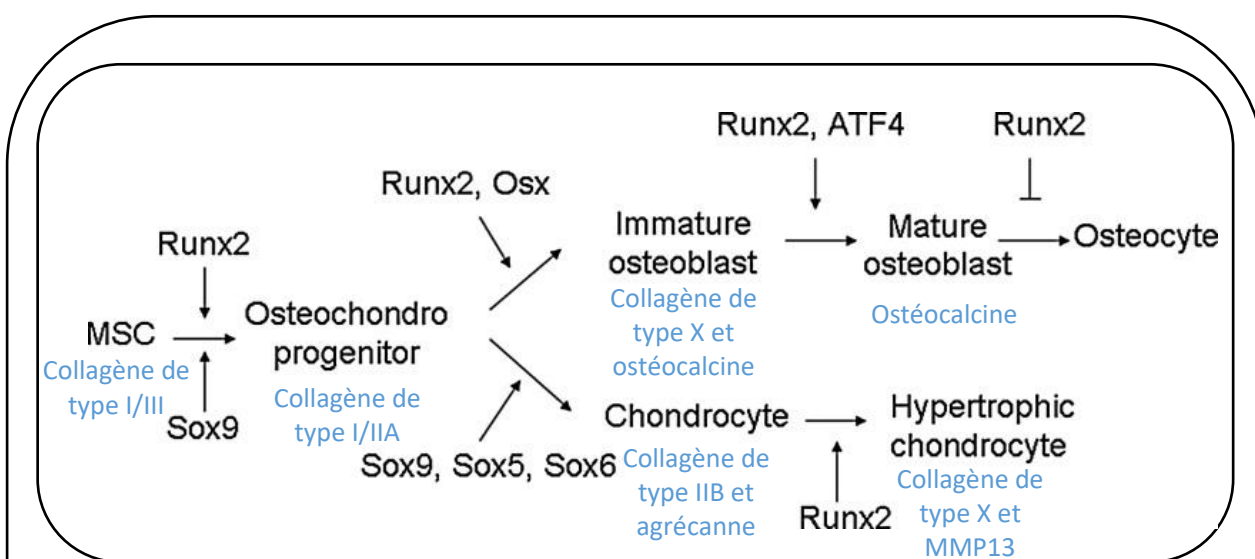


Figure 20 : Représentation schématique des principaux marqueurs phénotypiques caractéristiques du lignage chondrocytaire.

L'induction du lignage menant à la différenciation des CSM en chondrocytes matures met en jeu des facteurs de croissance (la BMP-2, entre autres) et fait intervenir des facteurs de transcription, notamment le trio des Sox Sox9, L-Sox5 et Sox6. Des marqueurs de l'état différencié des chondrocytes sont alors exprimés par les cellules (collagène de type IIb, agrécane). Cependant, ces mêmes facteurs peuvent mener à la différenciation terminale des chondrocytes en ostéoblastes.

D'après Liu & Lee, 2013.

3. L'hypertrophie des chondrocytes et l'ossification endochondrale

Une fois la maquette cartilagineuse établie, les chondrocytes de la région centrale de l'os en formation augmentent de taille et deviennent hypertrophiques (figure 21). Ils sécrètent une matrice caractérisée par la synthèse du collagène de type X. Des facteurs comme « Runt related transcription factor 2 » (Runx2) ou Ostérix orientent la différenciation des chondrocytes matures en chondrocytes hypertrophiques et sont impliqués dans l'ultime étape d'ossification endochondrale (Komori, 2005 ; Nishimura *et al.*, 2012). Les chondrocytes hypertrophiques dirigent la minéralisation de la matrice environnante et attirent les vaisseaux sanguins grâce à la production de VEGF (Zelzer *et al.*, 2001). La pénétration de bourgeons vasculaires assure l'arrivée des CSM qui se différencieront en ostéoblastes au sein de cette partie centrale, hypertrophique et calcifiée de la maquette. Les chondrocytes hypertrophiques meurent par apoptose et sont remplacés par des ostéoblastes qui commencent à sécréter la matrice osseuse. Il a cependant été montré récemment qu'une partie de ces chondrocytes hypertrophiques poursuivent leur différenciation et deviennent alors des ostéoblastes en mettant en jeu un processus de *transdifférenciation* (Zhou *et al.*, 2014 ; Marcucio *et al.*, 2016). Le centre de la maquette, appelé diaphyse, se comble progressivement de moelle osseuse (MO) ainsi que d'os alors que les extrémités, ou épiphyses, demeurent cartilagineuses (Ortega *et al.*, 2004). Un deuxième centre d'ossification apparaît ainsi qu'une plaque de croissance à chaque extrémité des os longs (Burdan *et al.*, 2009).

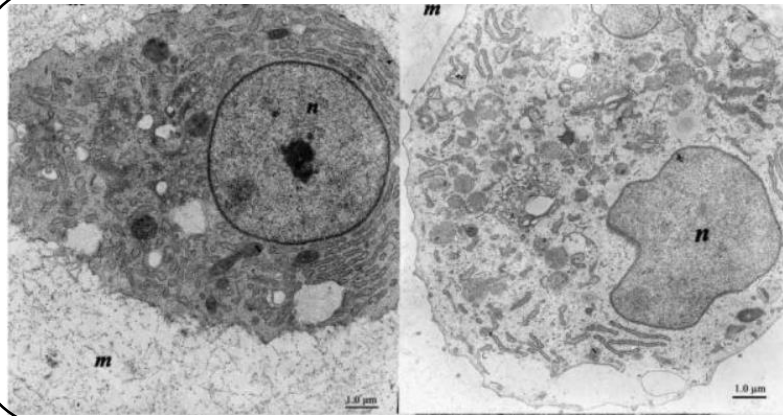


Figure 21 : Microscopie électronique d'un chondrocyte mature (gauche) et hypertrophique (droite).

D'après Pourmand *et al.*, 2007.

Ces évènements représentent le stade précoce de la formation osseuse endochondrale qui se produit chez le fœtus. Le processus de croissance continue après la naissance et dure jusqu'à l'âge adulte. A la naissance, les cartilages de conjugaison sont clairement identifiés. Ils assurent la croissance longitudinale de l'os grâce à la multiplication et à l'hypertrophie des chondrocytes. Vers l'âge de 20 ans, le cartilage de croissance disparaît et seul subsiste le cartilage dit « articulaire » qui recouvre les extrémités des os longs (Burdan *et al.*, 2009).

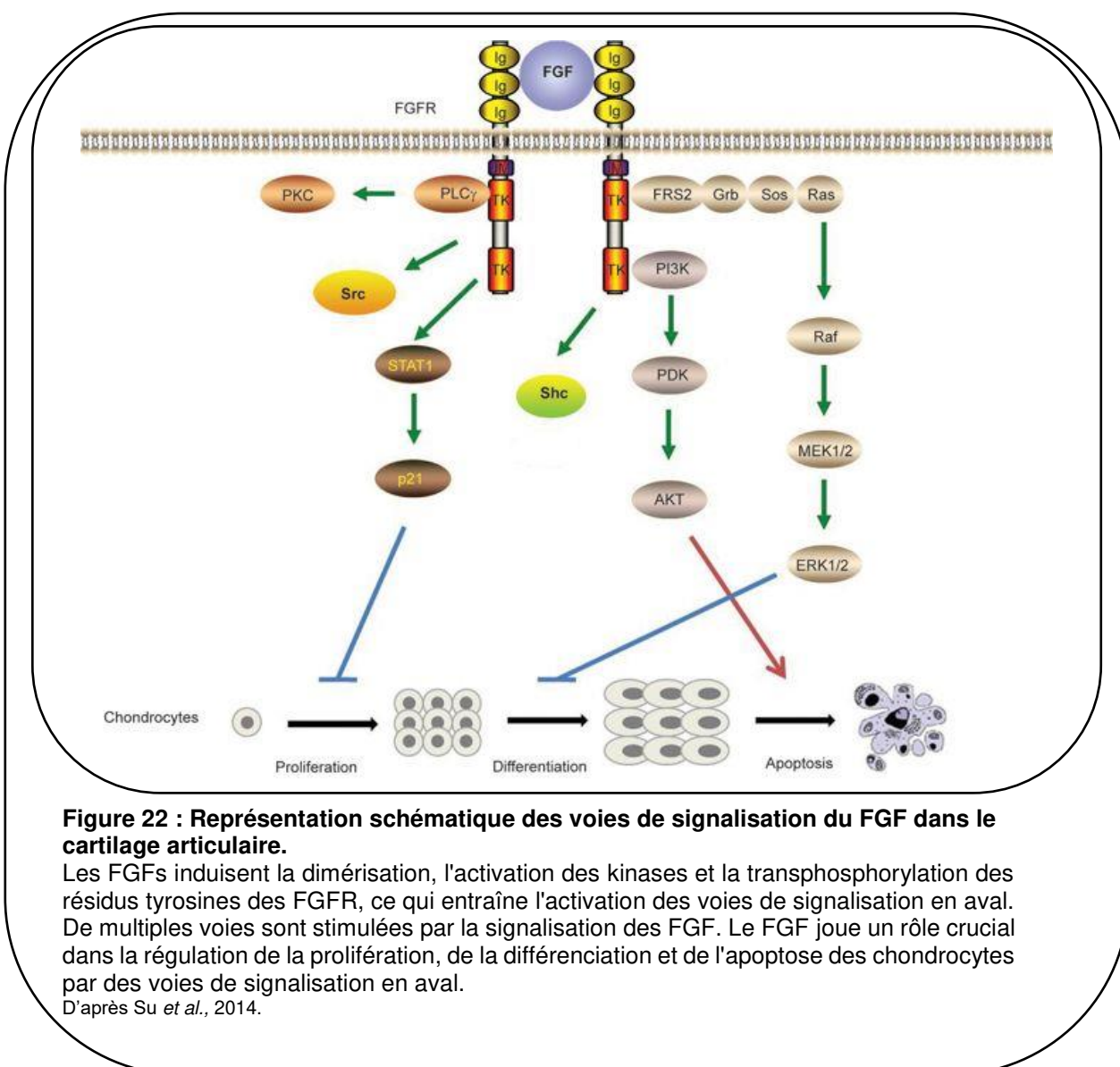
4. Les facteurs impliqués dans la régulation de la chondrogenèse

4.1. Les FGF

Le FGF, ainsi que ses récepteurs, jouent un rôle central lors de l'ossification endochondrale. Ils sont par ailleurs impliqués dans de nombreux processus biologiques, tels que le développement embryonnaire, la survie cellulaire et l'angiogenèse. Lors de la chondrogenèse et pendant la phase de condensation des CSM, le FGF induit l'expression de Sox9 et augmente son activité de liaison sur l'amplificateur spécifique du gène *Col2a1* (Ornitz, 2005). Il existe quatre types de

récepteurs au FGF (FGFR1, FGFR2, FGFR3 et FGFR4), et chacun est capable d'augmenter l'expression et la liaison de Sox9 au gène du collagène de type II.

Le FGF est capable d'augmenter la prolifération des chondrocytes dans les couches superficielles du cartilage et stimule également l'invasion vasculaire et l'ossification de la zone hypertrophique dans les couches plus profondes (Lazarus *et al.*, 2007). A ce jour, de l'ordre de 22 molécules appartenant à la famille des FGF ont été identifiées chez l'Homme et les isoformes 1, 2, 17 et 19 apparaissent comme étant les plus exprimées dans le cartilage de croissance. Les isoformes 17 et 19 sont présentes dans toutes les couches du cartilage de croissance, tandis que le FGF-1 est majoritairement exprimé dans les chondrocytes prolifératifs et hypertrophiques. Le FGF-2 est lui-même exprimé dans la zone de réserve et la zone de prolifération (Krejci *et al.*, 2007). Les FGF-1, -2 et -17 diminuent la prolifération des chondrocytes en mettant en jeu le FGFR3 dans les couches les plus profondes du cartilage, et certaines isoformes sont capables d'induire la chondrogenèse chez l'Homme en association avec les membres de la famille des TGF- β (Cucchiaroni *et al.*, 2011) (figure 22). Ainsi, selon la progression de l'état de différenciation chondrogénique, le FGF semble avoir un double rôle, régulant à la fois l'initiation de la différenciation des CSM en chondrocytes, et la différenciation terminale de ces cellules.



4.2. Les IGF

Les « Insulin-like Growth Factors » (IGF) sont des protéines qui présentent une structure similaire à celle de l'insuline. Ils sont impliqués dans la régulation de la croissance, de la différenciation, de la migration et de la survie cellulaire. Il existe deux formes : l'IGF-I et l'IGF-II. Cependant, les deux isoformes exercent leurs effets au travers du même récepteur, le récepteur de l'IGF de type I (IGF-IR). L'IGF-I joue un rôle majeur dans le cartilage de croissance. Ce facteur est produit principalement par le foie, mais aussi, par le chondrocyte lui-même, assurant ainsi une régulation autocrine et/ou paracrine (Schlechter *et al.*, 1986). L'IGF-I stimule la croissance en

induisant la prolifération des chondrocytes du cartilage de croissance, mais aussi, en stimulant la différenciation des CSM en pré-chondrocytes (Van Wyk & Smith, 1999).

Dans le sang, environ 98% de l'IGF est lié à l'une des six classes d'IGF-BP (« IGF-Binding Proteins »). Au sein du cartilage, l'IGF est associé à l'IGFBP-3 où il est retenu dans la MEC. Dans les chondrocytes articulaires, l'IGF-I augmente les taux d'ARNm et protéiques du collagène de type II de manière dépendante de la concentration *via* la voie de signalisation AKT (Zhang *et al.*, 2009). *In vivo*, les chondrocytes prolifératifs ainsi que les chondrocytes hypertrophiques sont exposés à la production locale d'IGF-I et son récepteur est exprimé dans chaque couche de la plaque de croissance. La voie de signalisation par ERK est réduite dans les chondrocytes hypertrophiques et pendant la phase de condensation des CSM, tandis que la signalisation par la voie AKT est maintenue. Dans les CSM, l'IGF-I induit la prolifération, régule l'apoptose et stimule l'expression de marqueurs spécifiques du cartilage, tels que le collagène de type II et Sox9 (O'Rear *et al.*, 2005 ; Seifarth *et al.*, 2009). Enfin, l'IGF-I est parfois associé au TGF- β 1 ou à la BMP-2 pour induire la différenciation des CSM en chondrocytes (An *et al.*, 2010).

Lors de l'ossification endochondrale, l'IGF-I inhibe également l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques (Olney, 2009).

Des travaux issus du laboratoire ont pu démontrer l'action chondrogénique de l'IGF-I qui induit l'expression du collagène de type II en augmentant l'activité de liaison du trio de facteurs de transcription Sox9, L-Sox5 et Sox6 sur le gène *COL2A1*. Cependant, l'IGF-I semble exercer un effet activateur non spécifique puisqu'il induit en parallèle l'expression des marqueurs fibrotiques et hypertrophiques du cartilage, dont les collagènes de types I et X (Legendre *et al.*, 2013).

4.3. Les TGF- β

Les « Transforming Growth Factors β » font partie d'une super-famille possédant de larges et divers spectres d'activités biologiques, telles que les régulations de la prolifération cellulaire, de l'apoptose, de la différenciation et de la migration cellulaire. Les membres de la famille des TGF- β sont impliqués dans toutes les étapes de l'ontogenèse, ils participent également à la régulation de l'homéostasie tissulaire au cours de la vie adulte. Une trentaine de membres composent la super-famille des TGF- β , au sein de laquelle on les retrouve aux côtés des activines, des

« Growth and Differentiation Factors » (GDFs), des « Glial cell-Derived Neurotrophic Factor » (GDNFs) et des « Bone Morphogenetic Protein » (BMP). Cette super-famille, peut être classée en différentes sous-familles selon leur domaine actif qui ne présente pas forcément les mêmes séquences, bien que d'autres séquences soient très conservées (figure 23) (Massagué, 1998 ; Weiskirchen & Meurer, 2013). Nous concentrerons notre propos sur les TGF- β et BMP qui gouvernent de manière essentielle l'homéostasie du cartilage articulaire hyalin.

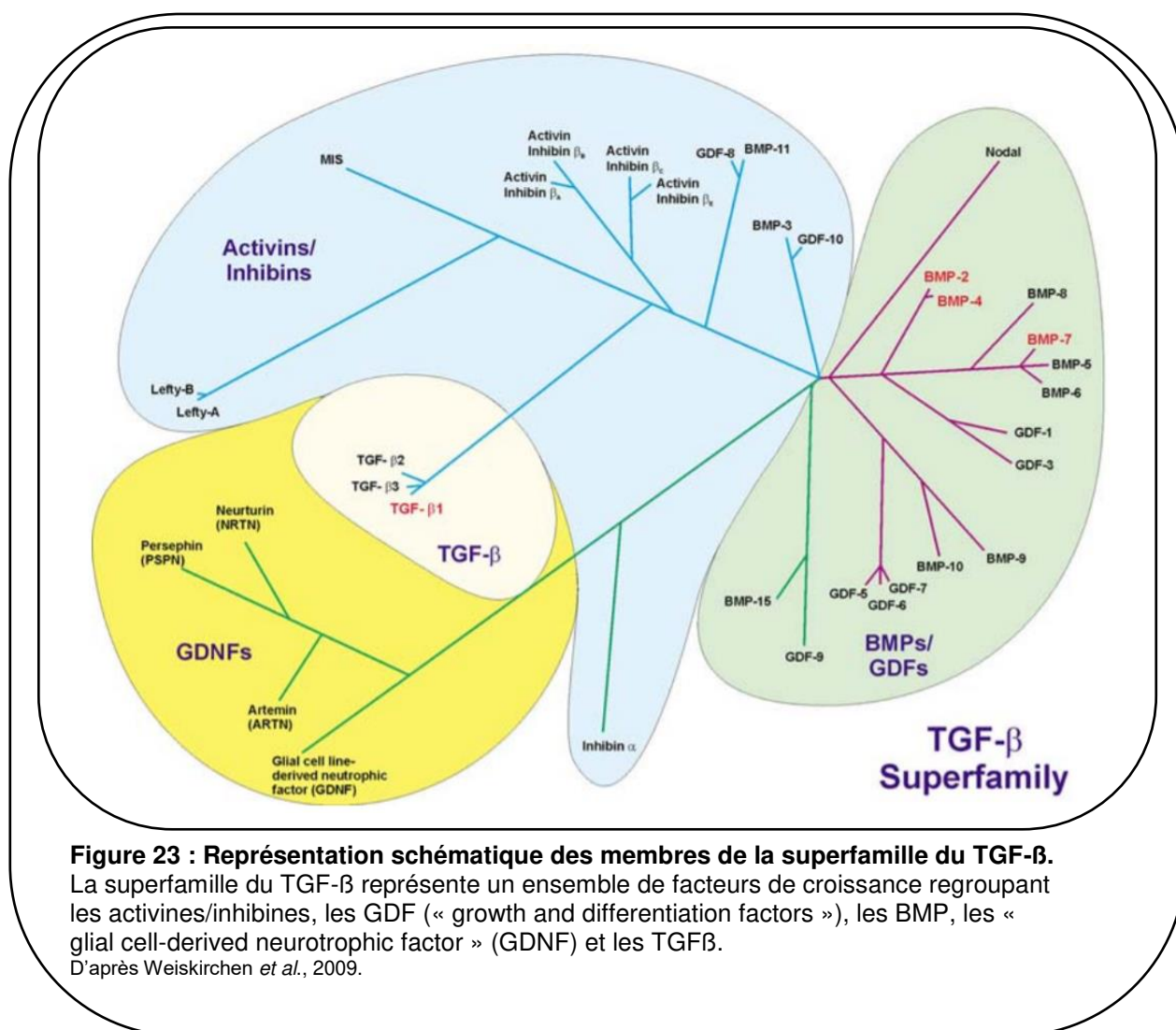


Figure 23 : Représentation schématique des membres de la superfamille du TGF- β .

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

D'après Weiskirchen *et al.*, 2009.

Trois des cinq isoformes du TGF- β sont exprimées chez les mammaliens, les isoformes - β 1, - β 2 et - β 3. Ces trois isoformes présentent 64 à 82% d'homologie et sont exprimées par les chondrocytes articulaires. Les trois isoformes du TGF- β sont des homodimères de 25 kDa, chaque monomère est constitué de 112 aa et contient neuf résidus cystéines capables de créer des liaisons disulfures (Archer *et al.*, 1993). Le

TGF- β 1 représente l'archétype de la famille, sa forme mature est composée de 112 aa, et, à lui seul, exerce un rôle majeur dans la physiopathologie du cartilage articulaire. Les membres de la famille des TGF- β sont sécrétés sous forme de complexes biologiquement inactifs stockés, en partie, dans la MEC.

La présence et l'absence du TGF- β 1 jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie cartilagineuse, pouvant aller jusqu'à induire une dégénérescence prématurée des articulations chez la souris en cas d'inactivation de la voie de signalisation induite par le TGF- β (Serra *et al.*, 1997). Néanmoins, *in vitro*, son action sur les chondrocytes articulaires en culture se traduit par l'augmentation de la synthèse du collagène de type II et de l'agrécanne (Rédini *et al.*, 1988 ; Galéra *et al.*, 1992), constituants essentiels et marqueurs de la MEC cartilagineuse.

Parallèlement, le TGF- β 1 augmente l'expression des inhibiteurs tissulaires des MMP (« Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases » (TIMP)), mais aussi, des « A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs » (ADAMTS) dans des cultures de chondrocytes humains, suggérant un rôle du TGF- β dans le remodelage tissulaire (James *et al.*, 2009).

4.4. Les BMP

Les différentes BMP jouent un rôle important dans la synthèse protéique des chondrocytes, notamment les BMP-2, -7 (OP1), -4, -6, -9 (GDF2) et -14 (GDF5) (Chen *et al.*, 2004 ; Van Caam *et al.*, 2016). Les BMP, dans les chondrocytes, se lient à deux types de récepteurs, les récepteurs de type I, des « Activin receptor-Like Kinase » (ALK), ALK1, 2 3 et 6 et des récepteurs de type II comme le BMPR2 (« Bone Morphogenetic Protein Receptor type II », ACVR2A (« Activin receptor type-2A ») et ACVR2B (« Activin receptor type-2B ») (tableau II). Comme les TGF- β , les BMP sont produites sous formes de dimères, on retrouve des homodimères ainsi que des hétérodimères de BMP-2/6, BMP-2/7 et de BMP-4/7 (Bragdon *et al.*, 2011). L'activité des BMP semble être régulée par des protéines antagonistes de piégeage (comme par exemple gremlin, noggin ou encore la sclérostine). On trouve aussi la présence de récepteurs leurres comme les BAMBI « BMP and Activin Membrane Bound Inhibitor » (produits par les chondrocytes) qui vont jouer un rôle important dans la régulation des voies de signalisation induites par les BMP. Les BMP peuvent aussi être en

compétition les unes avec les autres pour se lier aux récepteurs de type II (Aykul & Martinez-Hackert, 2016).

	BMP ligands	Other names	Type I receptor	Type II receptor	R-Smad	Co-Smad
BMP2/4 group	BMP2 BMP4	BMP2b	BMPR-Ia BMPR-Ib	BMPR-II ActR-IIA ActR-IIB	Smad1 Smad5 Smad8	Smad4
OP1 group	BMP5 BMP6 BMP7 BMP8a BMP8b	Vgr1, DVR6 OP1 OP2	ALK2 BMPR-Ia BMPR-Ib			
BMP9 group	BMP9 BMP10	GDF2	ALK1 ALK2			
GDF5 group	GDF5 GDF6 GDF7	BMP14/CDMP1 BMP13/CDMP2 BMP12/CDMP2	BMPR-Ia BMPR-Ib			

Tableau II : Les BMP, leurs récepteurs.
 Sur la base de leur fonction et de leur structure, les BMP sont divisées en quatre sous-groupes : (1) BMP 2 et 4 ; (2) BMP 5, 6, 7, 8a, et 8b ; (3) BMP 9 et 10 ; et (4) BMP 12, 13, et 14. En outre, les récepteurs BMP apparentés, les protéines Smad et d'autres noms pour les ligands BMP sont énumérés. BMP, protéine morphogénétique osseuse ; OP, protéine ostéogénique ; GDF, facteur de différenciation et de croissance ; Vgr, végétal ; DVR, végétal décapentaplégique ; CDMP, protéine morphogénétique dérivée du cartilage ; BMPR, récepteur de BMP ; ALK, kinase de type récepteur d'activine ; ActR-II, récepteur d'activine de type II. D'après Ma *et al.*, 2019.

La BMP-2 induit une production importante de MEC chez le chondrocyte avec une forte concentration de collagène de type II et de PG. Dans les cellules stromales mésenchymateuses *in vitro* et les lignées cellulaires de type chondrocytaire, et dans les chondrocytes épiphysaires *in vivo*, la BMP-2 est un inducteur bien connu de la maturation et de l'hypertrophie des chondrocytes (Zhou *et al.*, 2016 ; Freyria *et al.*, 2008).

La BMP-7, également connue sous le nom de « Osteogenic Protein 1 » (OP1), augmente l'expression de collagène de type II et d'agrécanne. Elle se fixe à différents récepteurs tels que ALK2, 3 et 6 ainsi que des récepteurs de type II BMPR2, ACVR2A

et 2B (Bragdon *et al.*, 2011). La signalisation induite par BMP-7 semble nécessiter la présence du CD44, sans lequel les chondrocytes ne sont pas capables d'induire la voie de signalisation intracellulaire mettant en jeu pSMAD1/5 (Peterson *et al.*, 2004 ; Andhare *et al.*, 2009 ; Luo *et al.*, 2014).

Nous pouvons conclure pour cette première partie que les chondrocytes régulent finement la production de la MEC cartilagineuse. Ils sont soumis à de nombreux stimuli, qu'ils soient d'origine mécanique ou environnementale, régulant leur activité métabolique ainsi que la qualité de la matrice qu'ils synthétisent. La synthèse d'une matrice cartilagineuse hyaline est donc la résultante de l'expression de l'ensemble de ces factrices orchestrées par le chondrocyte.

En effet, l'homéostasie du cartilage résulte d'un subtil équilibre entre anabolisme et catabolisme, cet équilibre est directement influencé par le microenvironnement. Cette balance est contrôlée par différentes cytokines et facteurs de croissance présents au sein du cartilage, et sécrétés le plus souvent par la membrane synoviale, et, à un degré moindre, par les chondrocytes. Le chondrocyte joue donc un rôle bivalent, il est capable de synthétiser les protéines constitutives d'une matrice cartilagineuse hyaline, mais est aussi capable de synthétiser les facteurs déclenchant la dégradation de ce tissu, ce qui correspond à un processus de remodelage tissulaire naturel. Cependant l'activité métabolique des chondrocytes demeure extrêmement faible, cela est notamment dû au microenvironnement spécifique dans lequel il évolue (pauvreté en apport nutritif, hypoxie), cette faible activité qui entraînera une faible capacité de réparation intrinsèque de la part des chondrocytes, mais aussi des CSM résidentes. En cas de lésion du tissu, une altération tant qualitative que quantitative de la MEC mènera inexorablement à une dédifférenciation des chondrocytes, une perte de leurs spécificités, pouvant aller jusqu'à l'apoptose. Cela augmente ainsi les altérations tissulaires. Avec le temps, le tissu cartilagineux sera donc confronté à des réactions inflammatoires multiples qui, associées aux lésions chondrales, conduiront à l'arthrose.

II. Le cartilage articulaire pathologique

Le cartilage articulaire hyalin est un tissu de liaison qui peut présenter de nombreuses pathologies de différentes natures. En effet, en tant que tissu de support, le cartilage articulaire peut faire face à des charges au niveau de la hanche, par exemple, qui peuvent atteindre 18 MPa (Hodge *et al.*, 1986). Des lésions traumatiques peuvent donc apparaître (lésions chondrales associées à des pertes de substance chondrale), et ce, malgré la capacité du cartilage articulaire à absorber et dissiper les contraintes mécaniques subies par l'articulation ; le cartilage reste sensible aux dommages causés par les différents traumatismes auxquels il est soumis. D'autres pathologies de ce tissu peuvent être d'origine inflammatoire (polyarthrite rhumatoïde, chondrites), métabolique (chondrocalcinose articulaire, goutte, ochronose) ou encore dégénérative (arthrose).

A. Les lésions chondrales

Les lésions chondrales apparaissent généralement suite à un traumatisme subi par l'articulation. Ce traumatisme peut être de nature diverse et variée, ainsi on retrouve le surpoids, une sur-sollicitation de l'articulation lors d'activités sportives trop intenses (sportif de haut niveau et cheval athlète sont comparables à ce niveau), chute...

Ces traumatismes subis par l'articulation vont alors générer l'apparition de micro-lésions dans un premier temps au sein du tissu, micro-lésions qui ne seront pas réparées par les chondrocytes et elles vont alors évoluer en lésions chondrales de plus grande ampleur. En 2003, l'agence de recherche internationale sur le cartilage a publié une classification relevant la profondeur des lésions chondrales (Brittberg & Winalski, 2003). Cette dernière comporte 4 grades qui sont fonction de la profondeur de la lésion étudiée (figure 24, tableau III).

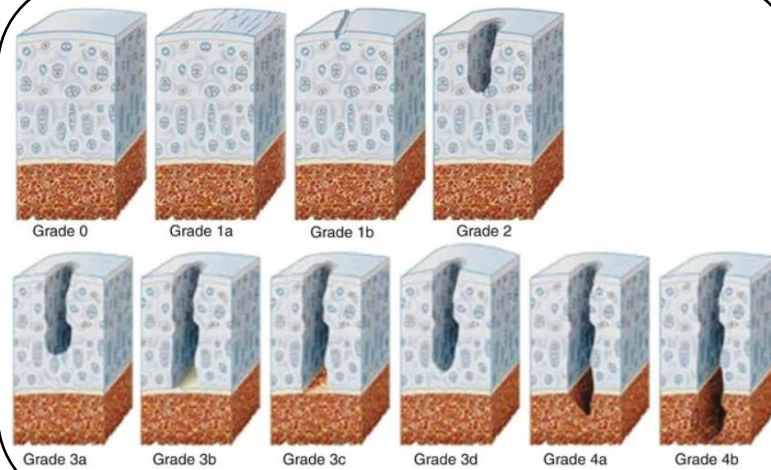


Figure 24 : Classification des lésions chondrales proposée par « l'international cartilage society ».
<https://musculoskeletalkey.com/diagnosis-of-osteochondral-defects-by-arthroscopy/>

Cartilage status	Grade	Description
Normal	0	Healthy cartilage
Almost normal	1a	Superficial lesions/softening
	1b	As in 1a and/or superficial cracks or fissures
Abnormal	2	Extent <50% of thickness
Severe lesion	3a	Extent >50%
	3b	Down to the calcified layer
	3c	Down to the surface of the subchondral bone (without penetration)
	3d	Includes budging of the cartilage around the lesion
Very severe lesion	4a	Penetration of the subchondral bone but not across the entire diameter of the defect
	4b	Penetration across the full diameter of the defect

Tableau III : Classification des lésions chondrales proposée par « l'international cartilage society ».

D'après Abdel-Sayed & Pioletti, 2015.

De plus, lors de l'apparition et de l'évolution de ces lésions, des pertes de substances chondrales vont avoir lieu dans l'environnement articulaire, essentiellement au sein du liquide synovial. Ces fragments de tissu ainsi présents dans la synovie vont modifier le microenvironnement et ainsi induire la synthèse de facteurs pro-inflammatoires et protéases, qui, en retour, vont dégrader les fragments présents au sein de la capsule articulaire. Cependant, à terme, ces facteurs inflammatoires vont influencer sur l'homéostasie cartilagineuse favorisant ainsi la voie catabolique chez les chondrocytes et les synoviocytes et provoquer de ce fait l'apparition de l'arthrose (Neidhart *et al.*, 1997).

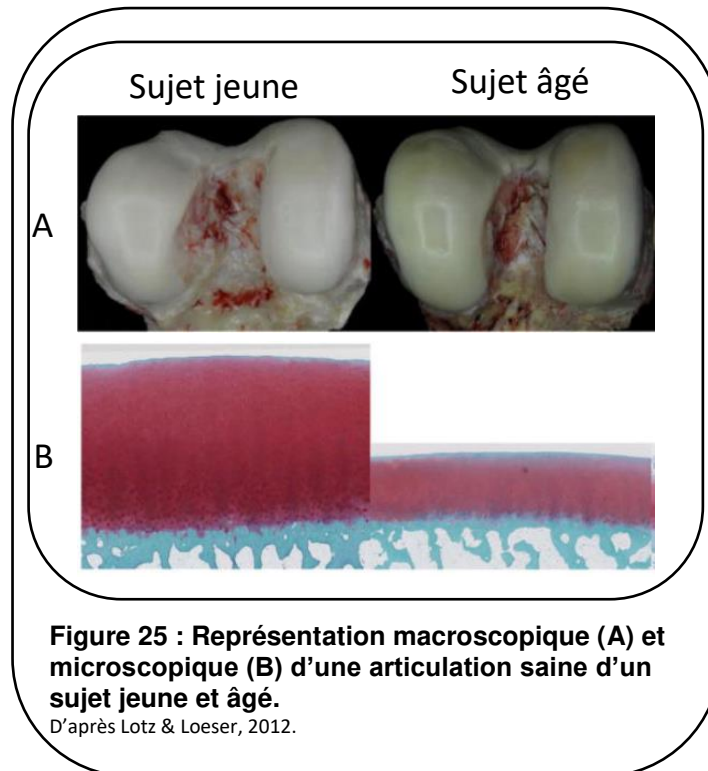
B. L'arthrose

L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et « l'American Academy of Orthopaedic Surgeons » ont proposé une définition pour l'arthrose en 1994 :

« L'arthrose est la résultante des phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral. Ce déséquilibre peut être initié par de multiples facteurs : génétiques, de développement, métaboliques et traumatiques. L'arthrose touche tous les tissus de l'articulation diarthrodiale et se manifeste par des modifications morphologiques, biochimiques, moléculaires et biomécaniques des cellules et de la matrice cartilagineuse conduisant à un ramollissement, une fissuration, une ulcération et une perte du cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral avec production d'ostéophytes et de kystes sous-chondraux. Quand elle devient symptomatique, l'arthrose entraîne douleur et raideurs articulaires, un éventuel épanchement articulaire avec des degrés variables d'inflammation locale ».

L'arthrose est une maladie dégénérative, sa prévalence est très élevée dans le monde. Elle se manifeste essentiellement sur les articulations les plus sollicitées par l'organisme telles que les hanches, genoux, doigts et les gros orteils.

L'arthrose est considérée comme une pathologie globale de l'articulation dont la conséquence est la dégradation progressive et irréversible du cartilage articulaire menant à la mise à nu des extrémités osseuses. L'âge représente donc à ce titre un élément important dans la prévalence de l'arthrose (figure 25).

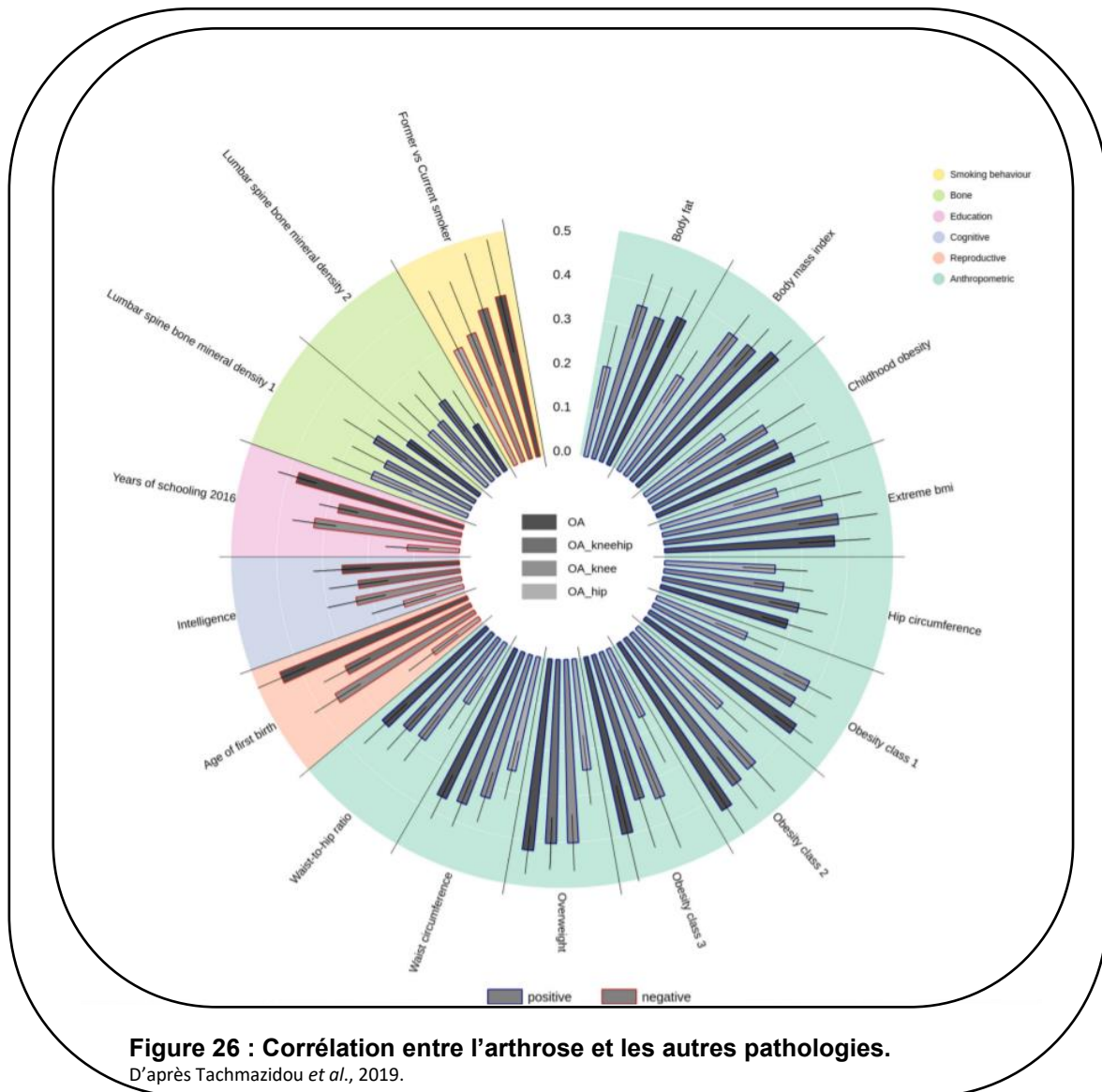


1. Etiologie de l'arthrose

L'identification de facteurs de risque a permis de mettre en place une classification de l'arthrose avec deux grands groupes. L'arthrose « mécanique » est due à un excès de pression sur un cartilage normal. Avec le temps, ce cartilage ne peut plus assumer cette hyperpression et finit par dégénérer, c'est alors que l'arthrose s'installe. L'arthrose « structurale » en revanche est due à un cartilage fragile évoluant dans un environnement à pression normale.

L'arthrose mécanique est donc due à une hyperpression subie par le tissu cartilagineux normal. Elle est la résultante d'une mauvaise répartition des pressions à cause d'un os sous-chondral anormal, le réseau collagénique se rompt permettant une expansion anormale des PG et une hyperhydratation du cartilage. Sous l'effet des pressions persistantes, ce cartilage hyper-hydraté va alors perdre ses propriétés biomécaniques. La teneur en AH diminue, les agrégats de PG se dépolymérisent et la taille des monomères eux-mêmes diminue. Le tissu cartilagineux perd de son élasticité et amortit moins bien les pressions de l'articulation sur l'os sous-chondral. Ce dernier réagit en se condensant et en développant une ostéophytose réactionnelle.

Différentes causes peuvent être invoquées, parmi lesquelles l'hyper-sollicitation d'une même articulation lors d'une activité sportive ou professionnelle intense, l'obésité, les malformations articulaires (figure 26). Plus généralement, un lien est établi entre une altération ou une sur-sollicitation d'une articulation et l'arthrose. De même, une méniscectomie, ou encore, certaines entorses articulaires peuvent être précurseurs d'une éventuelle évolution arthrosique.



L'obésité constitue alors un important facteur de risque puisqu'il existe une forte corrélation entre l'indice de masse corporelle (IMC) et l'arthrose du genou (Sharma *et al.*, 2006a), du fait des plus fortes pressions s'exerçant sur les articulations portantes et de l'augmentation de la masse osseuse, qui semblerait augmenter le risque de détérioration du cartilage articulaire. Néanmoins, ce facteur de risque, directement

corrélé avec l'hygiène de vie de la population, peut être prévenu par la simple perte de poids (Messier, 2008).

Les activités physiques et sportives très intensives sont considérées comme des facteurs de risque dans l'apparition de l'arthrose du genou et de la hanche, ce risque est corrélé avec l'intensité et la durée du niveau des activités sportives qui dans les cas extrêmes, conduisent à la dégradation du cartilage (Buckwalter & Lane, 1997). Par contre, un sportif exerçant une activité régulière et modérée, ne présentera pas de risque de survenue de l'arthrose. De plus, des études menées sur le genou montrent que l'activité sportive semble moins néfaste pour l'articulation que le surpoids ou les différents traumatismes subis (Vignon *et al.*, 2006).

L'arthrose structurale, comme son nom l'indique, va mettre en jeu la structure même du cartilage, c'est alors la nature de la MEC qui va se retrouver fragilisée et dégradée au fur et à mesure. De multiples facteurs peuvent être impliqués, comme par exemple, les facteurs hormonaux chez les femmes ménopausées, les prédispositions génétiques, ou encore, toute pathologie induisant des inflammations à proximité du site articulaire, telles que la membrane synoviale, la goutte, la chondrocalcinose ou encore l'ochronose. Chez la femme ménopausée, il existe une corrélation entre la survenue de l'arthrose et les femmes de plus de 50 ans mettant en avant le rôle central des œstrogènes dans la survenue de l'arthrose (Roman-Blas *et al.*, 2009 ; Watt, 2016). L'âge mène aussi à une arthrose naturelle dite structurale qui demeure normale. Lors du vieillissement, l'épaisseur du cartilage diminue, et son aspect devient plus jaunâtre (Lotz & Loeser, 2012 ; Greene & Loeser, 2015).

Les mutations génétiques sont aussi des facteurs à ne pas négliger. En effet, des mutations des protéines structurelles de la MEC, telles que les collagènes de types II, IX, X et XI mènent à des changements de conformation de la MEC, proposant ainsi un environnement favorable au développement du processus arthrosique (Cicuttini & Spector, 1996). Une mutation du collagène de type II peut, par exemple, mener à l'apparition du syndrome de Stickler, ou encore, d'une dysplasie spondylo-épimétaphysaire type Strudwick, le collagène de type IX une dysplasie épiphysaire multiple et le type X, une chondrodysplasie métaphysaire type Schmidt. Des mutations des facteurs régulant l'homéostasie de la MEC cartilagineuse peuvent aussi être la source d'un dérèglement de cette homéostasie pouvant, là aussi, mener à l'apparition de l'arthrose. Selon les articulations, les prédispositions génétiques sont à l'origine de

la survenue de plus de 50% des arthroses (Spector & Macgregor, 2004 ; Pelt *et al.*, 2015).

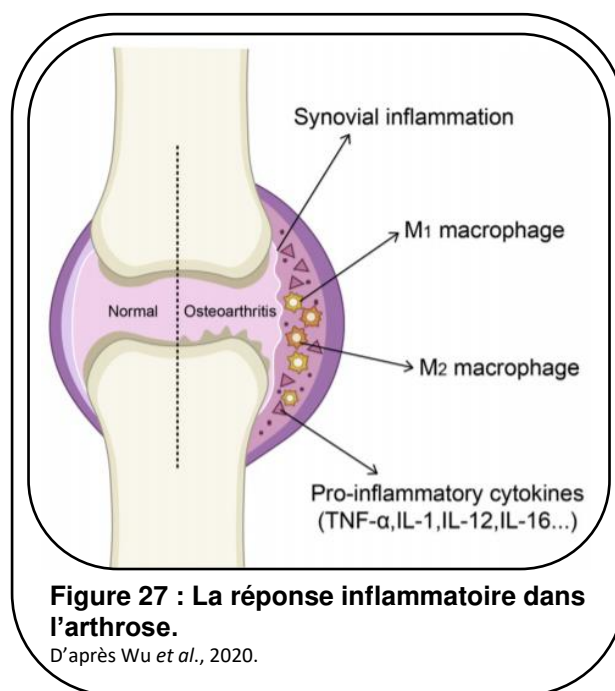
2. Les mécanismes moléculaires de l'arthrose

Au sein du cartilage articulaire de type hyalin sain, les chondrocytes assurent le maintien de l'homéostasie, équilibre dynamique entre synthèse et dégradation des différentes protéines composant la MEC. Lors de la mise en place du processus arthrosique, on va observer à partir des micro-lésions, une perte progressive de substance chondrale (Sandell & Aigner, 2001). Lors des stades précoces de l'arthrose, les chondrocytes prolifèrent davantage et augmentent la synthèse des différents composants de la MEC pour tenter de combler les lésions et pallier la perte de substance chondrale. Cependant, cette tentative de réparation n'est que transitoire, elle aboutit à la synthèse de collagène de type I essentiellement, atypique du cartilage articulaire de type hyalin au niveau de la zone péricellulaire ; la mise en jeu des cytokines pro-inflammatoires cataboliques prend le pas sur les processus anaboliques (Aigner *et al.*, 1999 ; Sandell & Aigner, 2001 ; Soder *et al.*, 2002).

2.1. Les cytokines pro-inflammatoires

Dès les premiers stades du développement du processus arthrosique, les premières pertes de substances chondrales vont entraîner la synthèse de cytokines afin d'enclencher la dégradation des fragments de tissus se retrouvant dans le liquide synovial. C'est essentiellement le synoviocyte, cellule de la membrane synoviale, et les chondrocytes eux-mêmes qui vont produire des cytokines telles que l'IL-1 β et le TNF- α , ces deux facteurs ayant des rôles prépondérants dans la progression de la maladie (Goldring & Goldring, 2004). La réponse inflammatoire induite par l'IL-1 est de 100 à 1000 fois plus importante que celle du TNF- α , cependant, il existe une synergie importante entre ces deux cytokines (Van den berg, 2001). Bien qu'étant majoritaires, ces cytokines agissent avec un « cocktail » composé d'autres cytokines, telles que l'IL-8, l'oncostatine M ou encore l'IL-6 (Goldring & Goldring, 2004). Ces cytokines vont par la suite induire la synthèse de protéases (notamment des collagénases et agrécannases) qui vont venir dégrader les fragments cartilagineux ayant été relargués au sein du liquide synovial par le tissu cartilagineux (figure 27). Ces facteurs pro-inflammatoires pourraient être des cibles à fort potentiel pour de nouvelles thérapies

biologiques utilisées pour la prévention de l'arthrose et de la douleur (Dieppe & Lohmander, 2005 ; Bauer *et al.*, 2006 ; Lee *et al.*, 2011 ; Schaible *et al.*, 2011).



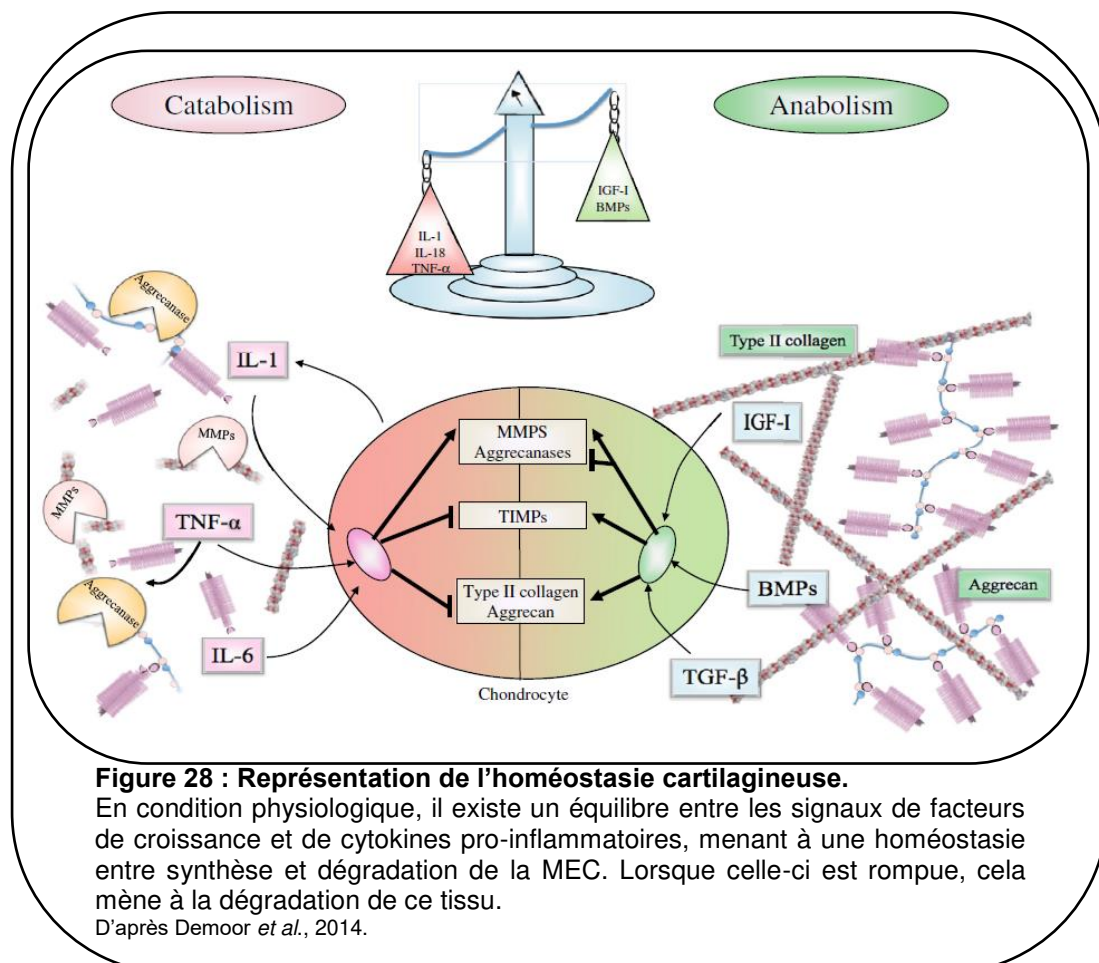
L'IL-1 β est la cytokine centrale de la réponse inflammatoire et du processus de dégradation du cartilage dans l'arthrose (Pujol *et al.*, 2008). La famille des interleukines est composée de 11 membres (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , antagoniste des IL-1R (IL-1Ra), IL-36Ra, IL-37 et IL-38) qui peuvent avoir des fonctions biologiques complémentaires ou distinctes (Garlanda *et al.*, 2013). La plupart des gènes codant pour les membres de la famille des cytokines de type IL-1 sont situés sur le chromosome 2 humain, à l'exception des gènes codant pour les IL-18 et IL-33 qui sont situés sur les chromosomes 11 et 9 respectivement. Les cytokines de la famille IL-1 partagent une structure commune à l'extrémité C-terminale (Palomo *et al.*, 2015). L'IL-1 β et l'IL-18 sont exprimées sous forme de zymogènes inactifs qui sont activés par un clivage dans la région N-terminale par la caspase-1, qui est elle-même activée par la formation d'un complexe multiprotéique connu sous le nom d'inflammasome (Martinon *et al.*, 2004 ; Sharma & Kanneganti, 2016). La libération d'IL-1 β sous forme bio-active est également censée nécessiter une certaine forme de mort cellulaire inflammatoire (Lukens *et al.*, 2012). Par conséquent, l'activité de l'IL-1 β est étroitement régulée au niveau de son expression, mais son activité est aussi dépendante de sa maturation par les caspases activées.

Cette cytokine inhibe la synthèse des composants matriciels, tels que le collagène de type II et les PG. Elle induit également la dégradation des composants de la MEC en stimulant l'expression de protéases telles que les MMP, ou encore, les ADAMTS. D'autre part, elle favorise la production de monoxyde d'azote (NO) qui agit comme un relais pour l'IL-1 β et qui peut par lui-même inhiber la synthèse du collagène de type II et des PG, stimuler l'action des MMP et probablement déclencher l'apoptose des chondrocytes (Lotz *et al.*, 1999).

Le TNF- α est la cytokine de l'inflammation synoviale (Goldring & Goldring, 2004). Elle est produite notamment par les macrophages de la membrane synoviale et joue un rôle paracrine sur l'activation des chondrocytes arthrosiques (Bondeson *et al.*, 2010). Les effets biologiques du TNF- α se manifestent par la liaison aux récepteurs TNFR1 et TNFR2, qui sont régulés différemment selon les types de cellules (Al-Lamki *et al.*, 2001). Le TNFR1 est associé à des lésions tissulaires et à une réponse pro-inflammatoire. On constate que le TNF- α est principalement séquestré dans l'appareil de Golgi des cellules au repos, notamment dans les cellules de la membrane synoviale, et il peut agir comme un réservoir pour augmenter la densité d'expression des récepteurs de surface, sensibilisant ainsi les cellules aux actions du TNF (Jones *et al.*, 1999). Un traitement anti-TNF- α diminue de façon prolongée la douleur dans l'arthrose (Grunke & Schulze-koops, 2006).

2.2. La perte de l'homéostasie et la dégradation du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire de type hyalin est régi par un équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme (figure 28). Cette homéostasie est assurée par les chondrocytes eux-mêmes, qui en fonction du micro-environnement dans lequel ils évoluent, vont venir réguler la synthèse et la dégradation des collagènes et de PG. Suite à l'apparition de micro-lésions au niveau du cartilage articulaire, le micro-environnement va se trouver modifié, la perte de substance chondrale entraînant une réaction inflammatoire qui conduit à une perte de l'homéostasie. En effet, les chondrocytes ne vont alors plus pouvoir assurer une synthèse suffisante de collagènes et de PG afin de pallier ceux qui sont dégradés. Ce déséquilibre, issu de l'augmentation du catabolisme rapidement installé lors du processus arthrosique, va alors participer à la rupture de l'homéostasie par l'intermédiaire des protéases comme les MMP et les ADAMTS, qui verront leurs activités fortement augmentées et ceci sera associé à une diminution de l'anabolisme matriciel et des TIMP par les chondrocytes (Goldring & Marcu, 2009).



Les MMP -1, -8 et -13 sont les principales MMP impliquées dans le catabolisme des collagènes de la MEC du cartilage (figure 29) (Fields, 2013). 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-1 assure la dégradation des collagènes. La MMP-13 est, quant à elle, surtout retrouvée dans les couches profondes du cartilage lors du remodelage matriciel (Rengel *et al.*, 2007), elle est considérée comme un marqueur d'hypertrophie chondrocytaire et est retrouvée dans les chondrocytes articulaires humains atteints d'arthrose.

Parmi les ADAMTS, on retrouve des agrécannases, qui sont les principales protéases impliquées dans la dégradation de l'agrécanne lors des premières étapes du remodelage tissulaire inhérent à l'arthrose (figure 29). Les ADAMTS-4 (agrécanase-1) et ADAMTS-5 (agrécanases-2) sont les principales agrécannases présentes au sein du cartilage arthrosique. L'ADAMTS-5 est considérée comme la principale enzyme qui dégrade l'agrécanne lors de la survenue de l'arthrose. Les ADAMTS sont induites par des cytokines inflammatoires comme l'IL-1 et le TNF- α . L'IL-1 semble induire spécifiquement ADAMTS-4 (Goldring & Otero, 2011).

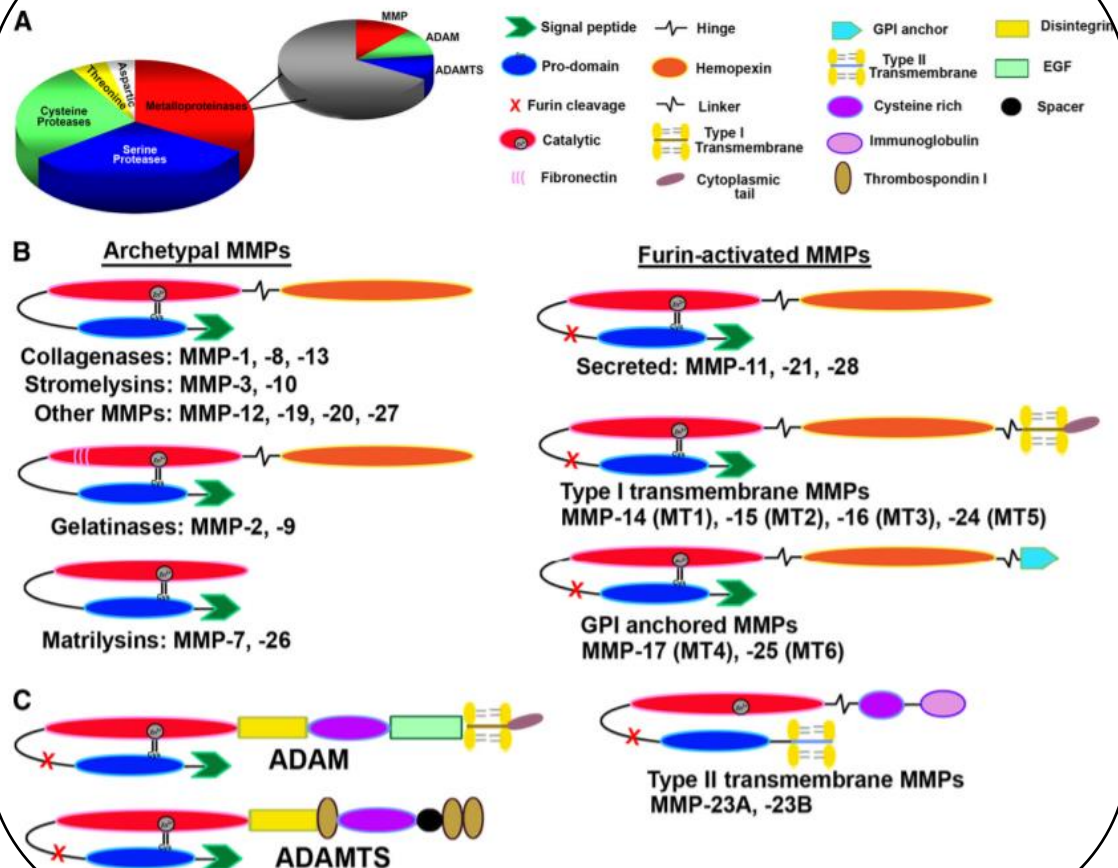


Figure 29 : Classification et structure des protéases.

A, Le dégradome humain, le répertoire des protéases produites par les cellules, comprend au moins 569 protéases et homologues subdivisés en cinq classes : 21 protéases aspartiques, 28 thréonines protéases, 150 cystéines protéases et 176 sérines protéases et 194 métalloprotéases, y compris les membres des familles MMP, ADAM et ADAMTS. B, Classification structurelle des MMP basée sur la composition de leurs domaines, y compris les MMP sécrétées et associées à la membrane, et les MMP qui sont activées intracellulairement via le clivage médié par la furine. C, La plupart des ADAM sont des protéines transmembranaires de type I qui possèdent des domaines de désintégration, riches en cystéine et EGF au lieu du domaine hémopexine des MMP. Les ADAMTS sont des protéines sécrétées qui contiennent des motifs de thrombospondine I au lieu du domaine EGF.

D'après Rivera *et al.*, 2010.

Une protéase à sérine, HtrA1 (« High-temperature requirement A1 »), joue aussi un rôle important dans l'homéostasie cartilagineuse. HtrA1 appartient à la superfamille des HtrA ayant les caractéristiques d'une protéase à sérine. Elle participe à de nombreux processus biologiques et voies de signalisation cellulaire, et est impliquée dans la pathogenèse, notamment dans l'ostéoporose, l'arthrose, la maladie d'Alzheimer, la dégénérescence maculaire liée à l'âge et différents cancers (Hadfield *et al.*, 2008 ; Hu *et al.*, 1998 ; Lejima *et al.*, 2015 ; Poepsel *et al.*, 2015). HtrA1 a été

identifiée comme une protéine sécrétée, néanmoins on la retrouve également présente à l'intérieur des cellules (Chien *et al.*, 2009 ; Clawson *et al.*, 2008). HtrA1 est présente en grande quantité dans le liquide synovial et le cartilage articulaire des patients atteints d'arthrose et de polyarthrite rhumatoïde (Guo *et al.*, 2018). Cette augmentation d'expression d'HtrA1 lors de l'arthrose serait due à l'activation de DDr-2, qui est un récepteur de surface cellulaire, qui, lorsqu'il est régulé négativement, entraînant aussi une augmentation de la dégradation de la MEC en induisant la synthèse de MMP13 dégradant le collagène de type II (Xu *et al.*, 2014 ; Manning *et al.*, 2016). Le TGF- β , par l'intermédiaire de la phosphorylation de Smad2 et Smad3 peut aussi activer HtrA1. Par ailleurs, cette protéase semblerait induire la dégradation des récepteurs des membres de la famille des TGF- β (Oka *et al.*, 2004) et inhiber la voie de signalisation induite par la BMP-2 (Hadfield *et al.*, 2008). HtrA1 joue donc un double rôle dans la dégradation du cartilage articulaire puisqu'elle va à la fois être un acteur majeur de la dégradation de la MEC (PG et collagène), mais elle va aussi venir réguler négativement les voies de signalisation menant à la différenciation cellulaire, à l'anabolisme et au maintien du phénotype chondrocytaire.

Les chondrocytes vont alors tenter de combler les pertes de MEC induites par ces protéases, en synthétisant, d'une part, des cytokines-anti inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-13, ...), et d'autre part, le collagène de type I, en vain, la perte des spécificités tissulaires ne sera jamais recouvrée.

2.3. Le collagène de type I comme marqueur du cartilage arthrosique

Le chondrocyte, du fait de la non vascularisation du cartilage induisant un faible apport en nutriments et un microenvironnement hypoxique, possède une faible capacité de réparation intrinsèque. Suite aux premiers dommages subis par l'articulation et le tissu cartilagineux, le chondrocyte va tenter une première réparation qui se traduit par une synthèse transitoire de collagène de type I. Cette synthèse va amener à l'apparition d'un fibrocartilage. Ce fibrocartilage ne possédant pas les mêmes propriétés biomécaniques que le cartilage de type hyalin sera néanmoins rapidement dégradé, laissant apparaître des lésions plus importantes et une évolution inéluctable de l'arthrose. Le collagène de type I est donc un excellent marqueur des stades d'arthrose précoce (Benya *et al.*, 1978).

2.4. La sénescence

A l'origine du vieillissement cellulaire, tissulaire, et, à plus grand échelle, de l'organisme, la sénescence va induire une perte de fonction et une dégradation lente des cellules. La sénescence cellulaire des chondrocytes participe activement à l'initiation et la progression de l'arthrose pouvant être à l'origine d'arthrose due au vieillissement.

Une étude comparant le cartilage articulaire arthrosique et le cartilage articulaire sain provenant d'autopsie humaine a été réalisée (Rose *et al.*, 2012). Un degré plus élevé de dommages à l'ADN génomique (démonstré par test COMET) a été détecté dans l'arthrose par rapport au cartilage sain, mais il n'y avait aucune preuve d'un raccourcissement critique des télomères, pourtant marqueur de sénescence. La quantification des inhibiteurs du cycle cellulaire p53, 16 et 21 dans les chondrocytes sénescents (Loeser, 2009) a révélé une augmentation concomitante de l'expression des protéines p53, p16INK4a et p21Cip1 avec la sénescence cellulaire, et une corrélation positive avec la présence de SA- β -Galactodisade.

Dans une autre étude plus fondamentale menée chez la souris, l'apparition de pathologies liées à l'âge, au sein du tissu adipeux, des muscles squelettiques et des yeux pourrait être retardée en éliminant des cellules sénescents p16INK4a-positives, un marqueur typique pour la sénescence cellulaire (Baker *et al.*, 2011). Il est important de noter que cette étude suggère que les cellules sénescents jouent un rôle dans le vieillissement et la progression des maladies liées à l'âge. Avec le vieillissement de la population, les stratégies efficaces de régénération du cartilage devraient aborder et surmonter les problèmes pertinents de la sénescence cellulaire et des changements liés à l'âge qui en découlent, afin d'assurer une régénération fonctionnelle durable du cartilage.

3. L'arthrose chez le modèle équin

Chez le cheval, l'arthrose a été rapportée pour la première fois en 1938 et a été comparée à celle observée chez l'Homme (Callender & Kelsner, 1938). Les affections locomotrices sont la première cause de baisse de performances ou d'arrêt de carrière des chevaux de course et de sports et représentent 80% des cas (Perkins *et al.*, 2004). De plus, le risque de développer de nouveau un trouble musculo-squelettique, lors du retour à l'entraînement, est alors plus élevé. Une étude portant sur les performances

équines chez 40 pur-sang a montré que 37 chevaux présentaient des boîteries 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). L'arthrose est une pathologie se développant naturellement chez le modèle équin et pouvant aussi apparaître avec l'âge. Les affections articulaires ont un impact économique majeur pour la filière équine car leurs coûts directs et indirects sont estimés à plus de 100 millions d'euros, seulement pour la filière trot. C'est pourquoi le diagnostic précoce de ces affections et leur prise en charge sont fondamentaux pour les professionnels de la filière, mais aussi, pour les cavaliers, qu'ils soient amateurs ou professionnels, ainsi que pour les propriétaires.

3.1. L'incidence des affections articulaires chez le cheval

Avec plus d'un million soixante mille équidés en 2016 en France, (les deux tiers du cheptel présent fin 2016 sont des chevaux de selle et des poneys, les chevaux de race, de course, avec 170 000 chevaux, représentent près de 16% du cheptel, alors que les cheptels d'ânes et de chevaux de trait représentent respectivement 9% et 7% de la population), la filière équine Française est en plein essor économique et génère 14 milliards d'euros de flux financier par an (dont 10 milliards sont générés par la filière course, 750 millions par la filière sport-loisir et 350 millions par la filière viande). En 2018, en France, la filière équine génère environ 66 000 emplois en activité principale, dont 7 emplois sur 10 en lien direct avec le cheval (producteurs et utilisateurs du cheval). Le cheval représente une activité secondaire pour 80 000 autres personnes, en particulier en élevage et en points de vente PMU. De plus, la filière équine est le premier organisateur mondial de compétitions internationales et la 3^{ème} fédération sportive française avec environ 644 800 licenciés pour l'année 2017-2018 (FFE). Enfin, la France est le seul pays au monde à pouvoir afficher des performances équines dans les trois disciplines principales que sont le galop, le trot et le sport. Dans ce contexte, la Normandie est la 1^{ère} région d'élevage avec 30% de la production nationale et plus de 12 000 naissances par an. Elle est également la 1^{ère} région sur le plan économique avec 17 900 emplois et compte 670 établissements équestres avec plus de 46 700 licenciés (Sources IFCE).

3.2. L'impact sur la filière équine

Lors de la survenue des arthropathies chez le cheval, de nombreux frais doivent être engagés par le propriétaire, afin de poser le diagnostic et de prodiguer les soins à l'animal. Une étude estime ainsi ces frais directs à approximativement 3000 dollars américains par an et par équidé victime d'une telle pathologie. Les auteurs de cette étude estiment à plus de 15000 dollars par an et par cheval les frais et les pertes financières causées par la survenue de l'arthropathie (Oke & McIlwraith, 2010). Ces pertes peuvent d'ailleurs potentiellement s'avérer bien plus importantes si l'on considère les chevaux sportifs de haut niveau.

A ce titre, les affections locomotrices représentent la première cause de baisse de performances ou d'arrêt de carrière de chevaux de course et de sport, et surviennent dans 80% des cas selon une étude néo-zélandaise (Perkins *et al.*, 2004). De plus, 95% des chevaux de course présentent un problème locomoteur au cours des six premiers mois de leur entraînement, et au sein de ces troubles locomoteurs, les affections articulaires occupent une place dominante par leur fréquence et leur impact économique majeur.

3.3. Arthrose équine, du diagnostic au traitement

L'arthrose chez les équidés peut être suspectée dès lors que le cheval présente une boîterie visible lorsqu'il n'est pas à l'effort, s'il est difficile de manipuler un membre ou encore si ce dernier présente une raideur ou des craquements lors de la mobilisation. Dans un cas de suspicion d'arthrose, le vétérinaire posera le plus souvent un diagnostic définitif à la radiographie. En cas d'intervention chirurgicale (retrait de fragment osseux ou lavage articulaire par exemple), l'arthroscopie permettra d'évaluer précisément l'état du cartilage.

Il n'existe aucun traitement curatif pour l'arthrose. Tout comme chez l'Homme, différents traitements palliatifs peuvent alors être mis en place. Dans un premier temps, des conditions d'hygiène de vie pourront soulager l'animal, telles que des ferrures adaptées et un régime alimentaire optimal afin d'éviter tout surpoids et surcharge inutile sur les articulations lésées, favorisant le développement arthrosique. Dans un second temps, des anti-inflammatoires peuvent aussi être prescrits ainsi que des infiltrations de corticoïdes ou encore d'AH mais cela peut présenter un risque infectieux, bien qu'il reste limité (Pham, 2009). La mise au point de thérapies cellulaires

à bases de cellules souches peut aussi être envisagée. En effet, les propriétés immuno-modulatrices et anti-inflammatoires des cellules souches indifférenciées de moëlle osseuse ou adipeuses peuvent tenter de rétablir une certaine homéostasie (Ortved & Nixon, 2016). Les CSM peuvent aussi être différenciées *in vitro* en chondrocyte puis apposées sur les lésions tissulaires afin de combler ces dernières. Ces différentes approches demandent néanmoins une mise au point importante afin de générer un néo-cartilage de type hyalin présentant les propriétés physico-chimiques compatibles avec les contraintes subies par l'articulation. Il est aussi possible d'administrer des compléments alimentaires aux chevaux afin de prévenir l'apparition d'arthrose et d'en limiter la progression. On retrouve différents compléments alimentaires sur le marché, certains à base de chondroïtine, glucosamine, MSM (méthylsulfonylméthane), mais aussi, des compléments à base de plantes tels que l'Harpagophytum, la prêle, le curcuma... Ces compléments alimentaires semblent néanmoins avoir un meilleur effet lorsqu'ils sont utilisés de manière préventive, ils ont l'avantage d'être simples d'utilisation et peuvent être administrés par voie orale lors de ration journalière. Il reste néanmoins conseillé d'accompagner ces compléments alimentaires avec une bonne hygiène de vie des équidés et des conditions de vie adaptées (notamment pour les chevaux de course).

3.4. Le cheval, un modèle patient animal de choix pour l'arthrose

Afin d'évaluer l'efficacité des différents traitements innovants utilisés dans le cadre de l'ingénierie tissulaire (IT) du cartilage, il est nécessaire de réaliser une preuve de concept chez l'animal. Les modèles animaux permettent d'analyser la physiopathologie de l'arthrose ainsi que le développement d'agents thérapeutiques et de marqueurs biologiques pour le diagnostic et le pronostic de la maladie. Si la plupart des premiers modèles utilisés afin de valider la faisabilité dans les modèles précliniques restent murins, de nombreux modèles « gros animaux » sont utilisés tels que la chèvre, le lapin, le chien ou encore les chevaux. Chacun de ces modèles présente des avantages et des inconvénients (Moran *et al.*, 2016). Le modèle murin est utilisé *in vivo*, d'une part pour son faible coût, sa disponibilité, et sa relative facilité d'entretien. Les expérimentations en sous-cutané pour tester l'innocuité et l'aspect biodégradable sont généralement étudiées sur ce modèle. Cependant, rapidement, ce

modèle atteint ses limites en IT du cartilage car il possède des articulations trop petites afin de permettre des expérimentations directement au niveau des sites articulaires.

Les modèles « gros animaux » présentent donc l'avantage de pouvoir permettre de réaliser des études directement *in situ*. De plus, avec les moyens technologiques dont nous disposons aujourd'hui (radiographie, échographie, arthroscopie, IRM, ...), il est de plus en plus aisé de suivre l'évolution de la pathologie chez ces modèles. Plusieurs modèles de ce type sont utilisés tels que la chèvre, le lapin, le chien, mais le modèle le plus pertinent est le cheval si l'on se base, entre autres, sur la structure, l'épaisseur, la cellularité du cartilage, la biochimie et les contraintes mécaniques appliquées aux articulations (Aigner *et al.*, 2010).

L'intérêt de développer des modèles d'arthrose chez le cheval est double : l'arthrose est une pathologie se développant naturellement et qui est très répandue chez cette espèce, de plus, l'homologie tissulaire entre le cheval et l'Homme en fait un candidat idéal. La taille de ses articulations permet de réaliser des arthroscopies en routine permettant ainsi de créer des lésions cartilagineuses ou pour suivre l'évolution des différentes stratégies thérapeutiques mises en place et l'évolution des différentes lésions cartilagineuses *in situ* (Moran *et al.*, 2016).

Les origines de la pathologie chez le modèle équin sont les mêmes que chez l'Homme. On retrouve ainsi des facteurs, tels que l'hygiène de vie et le surpoids, mais aussi, les facteurs liés à l'âge et, enfin, le cas des chevaux sportifs présentant les mêmes contraintes biomécaniques subies au niveau des différentes articulations mises en jeu. Ces articulations vont, tout comme chez l'Homme athlète de haut niveau, subir des chocs répétés laissant apparaître des micro-lésions conduisant, à terme, à l'apparition d'arthrose. Une mauvaise prise en charge, une surcharge de travail mèneront inévitablement à l'apparition d'arthrose et d'ostéophytes provoquant d'importantes douleurs, une perte de ses capacités locomotrices et par conséquent un arrêt du cheval. Le cheval développe donc des pathologies ostéoarticulaires dont l'étiologie est similaire à ce qui est retrouvé chez l'Homme (McIlwraith *et al.*, 2012).

Différents types d'induction d'arthrose expérimentale existent (Kuyinu *et al.*, 2016). Cependant, le plus souvent, les arthroses induites chez le cheval impliquent la création d'une lésion ostéo-chondrale au niveau de l'articulation du carpe, même si certaines études utilisent l'articulation métacarpo-phalangienne 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 soin de ne pas atteindre l'os.

Les affections locomotrices sont la première cause de baisse de performances ou d'arrêt de carrière des chevaux de course et de sports (Perkins *et al.*, 2004). 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.

4. L'arthrose chez l'Homme

4.1. Epidémiologie de l'arthrose

L'arthrose est la pathologie articulaire la plus fréquente. A terme, elle entraîne une importante invalidité pouvant être à l'origine d'une morbidité croissante dans les pays développés. Un adulte sur deux souffre d'arthrose symptomatique à partir de soixante ans et ceci est à l'origine d'un coût médico-socio-économique exorbitant en France.

La prévalence de l'arthrose en France est de 15% selon la Société Française de Rhumatologie, elle concerne un peu plus de 10 millions de Français (chiffres de l'INSEE). Les mêmes proportions sont également observées dans l'ensemble des pays dits industrialisés. D'après les chiffres rapportés par l'INSERM en 2017, son incidence augmente avec l'âge, elle est de l'ordre de 65% pour les plus de 65 ans. Toutefois, elle ne touche pas exclusivement les personnes âgées. Cette pathologie peut avoir un impact physique et psychologique important, nécessitant des aides techniques et humaines au long court. En France en 2010, le coût pour la société a été évalué à plus de 3 milliards d'euros (Grange *et al.*, 2012). Le vieillissement de la population en fait un problème de santé publique conduisant au développement de différentes stratégies potentiellement thérapeutiques. L'arthrose peut atteindre toutes les zones articulaires. Pour certaines articulations, telles que le genou, la main, la hanche et le rachis, elle est généralement idiopathique, tandis que pour les affections plus rares du coude ou du poignet, elle est secondaire, c'est à dire due à un traumatisme ou une pathologie sous-jacente. Sa prévalence générale est importante pour les personnes âgées de plus de 50 ans, en effet l'âge est le principal facteur de risque.

Cependant l'ensemble des arthroses ne sont pas douloureuses, des autopsies ont révélé que 60% des plus de 65 ans présentent une arthrose douloureuse. L'ensemble des articulations peuvent être touchées par un phénomène arthrosique,

les articulations les plus fréquemment touchées sont la colonne vertébrale, le genou, la main et la hanche. Ces différentes localisations sont dépendantes de l'utilisation et de la sollicitation propre à chaque personne des différentes articulations. L'âge, comme indiqué, est un facteur important dans l'évolution de l'arthrose, le pourcentage de personnes atteintes par l'arthrose augmentant avec l'âge, on dénombre environ 3% des moins de 45 ans, 65% des plus de 65 ans et 80% des plus de 80 ans (Source : Société française de rhumatologie).

Aux côtés de l'âge, de nombreux autres facteurs peuvent intervenir dans l'apparition de l'arthrose comme le surpoids, une sur-sollicitation de l'articulation ou encore des facteurs génétiques (mutation spontanée ou d'origine héréditaire) ou hormonaux (œstrogènes).

4.2. Diagnostic et coûts de l'arthrose

Le diagnostic de l'arthrose est suspecté cliniquement (apparition de douleur ou perte de mobilité) et confirmé par radiographie. La radiographie permet d'observer un éventuel pincement articulaire et l'apparition d'ostéophytes (figure 30) (Braun & Gold, 2012). Des cavités osseuses appelées géodes peuvent aussi apparaître et être observées en radiographie. Cependant, cette technique génère des images moins nettes que celles que l'on peut obtenir à l'aide d'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique). Des ponctions de liquides synoviaux ou des prises de sang ne permettent pas d'identifier les articulations arthrosiques mais peuvent permettre de faire la différence entre une arthrose et un autre rhumatisme, tel que l'arthrite qui présente des CRP élevés, ainsi qu'une hyperleucocytose (plus de 1000 leucocytes/mm³).

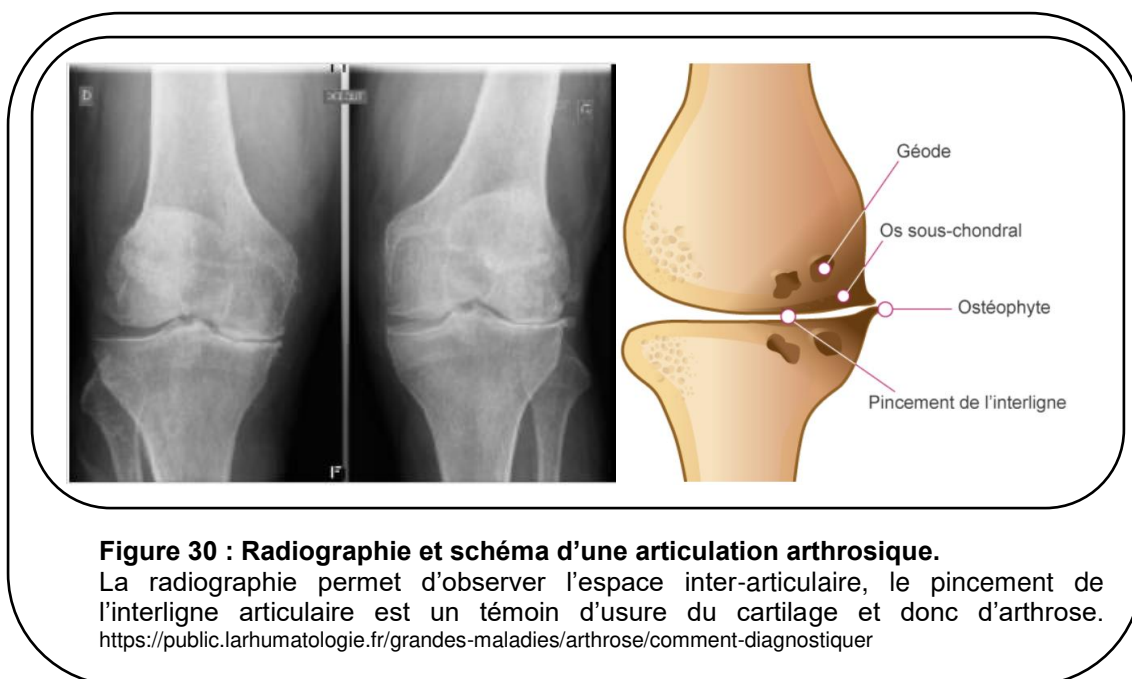


Figure 30 : Radiographie et schéma d'une articulation arthrosique.

La radiographie permet d'observer l'espace inter-articulaire, le pincement de l'interligne articulaire est un témoin d'usure du cartilage et donc d'arthrose. <https://public.larhumatologie.fr/grandes-maladies/arthrose/comment-diagnostiquer>

4.3. Les traitements actuels

Aujourd'hui, il n'existe aucun traitement permettant de régénérer un tissu cartilagineux lésé. Les traitements, qu'ils soient pharmacologiques, chirurgicaux, tissulaires ou alimentaires ne permettent que de traiter les symptômes inflammatoires ou la sensation de douleur, voire de retarder l'évolution de l'arthrose.

4.3.1. Les traitements pharmacologiques

Les traitements pharmacologiques peuvent prendre plusieurs formes, ils peuvent être administrés par voie orale, en application locale ou encore par injection intra-articulaire. Le traitement passe donc par la prescription d'antalgiques, de chondroprotecteurs, d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et stéroïdiens comme les corticoïdes. Des injections intra-articulaires de glucocorticoïdes ou AH peuvent être réalisées mais peuvent présenter un risque infectieux, bien que mineur (Pham, 2009). Bien que ces injections augmentent la qualité de vie durant un court laps de temps après l'injection, aucune étude ne montre la régénération du cartilage (Ayhan, 2014). D'autres types d'injections comme celles de « Platelet Rich Plasma » (PRP) peuvent aussi être réalisées (Grunke & Schulze Koops, 2006) ; les injections de PRP, obtenues à partir du sang du patient qui a été concentré en plaquettes afin

d'en obtenir 4 fois plus qu'à la normale, 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 sans régénérer le cartilage.

4.3.2. Les traitements chirurgicaux

Ces traitements seront proposés pour les cas d'arthrose les plus avancés présentant des lésions plus étendues. Parmi ces solutions, on retrouve le lavage arthroscopique consistant à laver l'intérieur d'une articulation atteinte afin d'éliminer les débris cartilagineux présents dans le liquide synovial (Thiede *et al.*, 2012). Le but étant de diminuer l'inflammation au sein de la cavité articulaire, cette technique est souvent associée au débridement qui consiste à éliminer localement des fines couches de cartilage lésé. Ceci, une fois encore, a pour but de limiter les débris de MEC se retrouvant dans la synovie qui entraîneront par la suite un contexte inflammatoire au sein de l'articulation, et par conséquent, une balance homéostatique propice au développement de l'arthrose. Cependant une fois encore, cette solution ne soulage le patient que temporairement et n'empêche pas la survenue et le développement de l'arthrose.

Différentes stratégies peuvent être mises en place afin de suppléer la perte de cartilage. On retrouve ainsi différentes techniques comme la micro-fracture qui consiste à perforer l'os sous-chondral pour stimuler la formation d'une nouvelle surface articulaire (figure 31). Des forages sont ainsi réalisés au poinçon ou à la mèche au niveau des pertes de substance chondrale tous les 1 à 3 mm sur une profondeur de 3 à 4 mm. La pénétration de l'os sous chondral va induire des saignements et ainsi générer la formation d'un caillot. Des CSM migrent dans le caillot, prolifèrent et forment une surface fibrocartilagineuse. Cette technique est réalisée par arthroscopie sur des lésions de moins de 2 cm². Cependant, elle conduit à la création d'un fibrocartilage et non à du cartilage de type hyalin. La mosaïque-plastie consiste à effectuer un transfert de blocs ostéo-

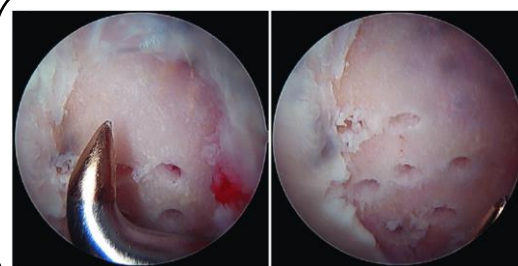


Figure 31 : Réalisation d'une micro-fracture sur une articulation arthrosique.
D'après Mella *et al.*, 2017.

chondraux d'une zone non portante macroscopiquement « saine » de l'articulation vers une zone présentant des lésions avancées (figure 32). Ces blocs ostéo-chondraux sont constitués d'une couche inférieure d'os et d'une couche supérieure de cartilage de type hyalin. Cette étape présente l'avantage d'apporter au niveau de la lésion un tissu cartilagineux sain



Figure 32 : Mosaïque-plastie d'une articulation arthrosique.

<https://clinique-orthopedique-paris.com/traitement-arthrose>

vivant, il est utilisé pour traiter des lésions de 2 à 3 cm². Cependant, au niveau des interstices entre les blocs ostéo-chondraux, il se forme un fibro-cartilage, et, à terme, l'arthrose se redéveloppe au sein de l'articulation lésée.

En derniers recours et uniquement pour les articulations présentant un stade d'arthrose très avancé, la mise en place d'une prothèse pourra être envisagée (figure 33). Cette solution n'est néanmoins pas applicable à toutes les articulations, et la durée de vie des prothèses est limitée à, environ, une quinzaine d'années. En effet, selon la nature du matériau de la prothèse implantée (titane,

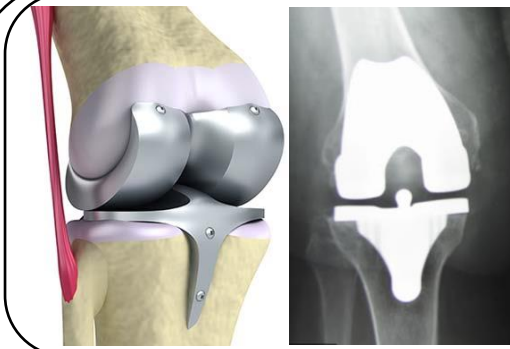


Figure 33 : Représentation d'une prothèse de genou et cliché radiographique représentant une prothèse de genou.

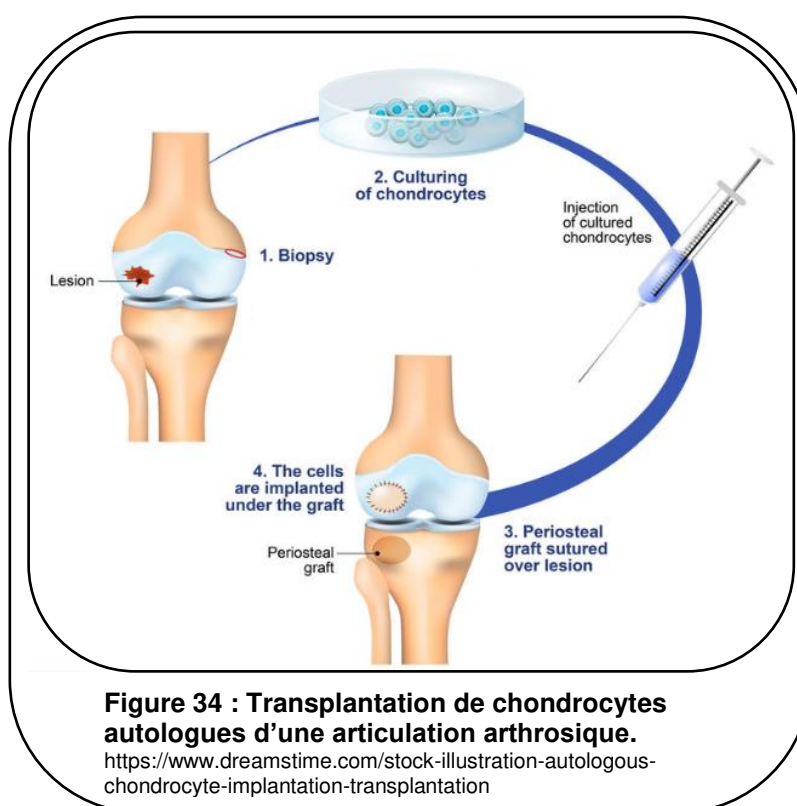
<https://www.mon-arthrose.com/arthrose-prothese-genou>
<http://www.yvesdjemag.com/les-protheses-du-genou>

céramique, cobalt, chrome, ...), des micro-particules peuvent être libérés dans le microenvironnement au fur et à mesure que la prothèse s'use. Ces micro-particules vont à leur tour entraîner une inflammation de la capsule articulaire, et notamment au niveau de la jonction entre la prothèse et l'os, pouvant entraîner une fracture qui sera due à une diminution locale de la densité osseuse (Rand *et al.*, 2003).

4.3.3. La thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire

D'autres traitements potentiels ont été mis au point grâce à la thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire. Ce type d'approche vise à remplacer les cellules pathologiques par des cellules saines, voire un tissu sain, afin de recréer un substitut cartilagineux capable d'exercer ses fonctions au sein de l'articulation. C'est en 1989 que la Transplantation de Chondrocytes Autologues (TCA) chez un modèle lagomorphe a montré la formation d'un néo-cartilage recouvrant 82% de la zone initialement lésée (Grande *et al.*, 1989). La TCA est l'approche la plus répandue concernant les thérapies cellulaires du cartilage chez l'Homme. Cette technique fut

mise au point par Brittberg et ses collaborateurs en 1994 (figure 34). Une première biopsie de cartilage sur une zone macroscopiquement saine et non portante de l'articulation arthrosique, puis les chondrocytes constituant le fragment de cartilage extrait sont isolés par digestion enzymatique. Les cellules sont ensuite amplifiées *in vitro* afin d'obtenir un



nombre suffisant de cellules pour pouvoir combler la lésion chondrale lors d'une seconde intervention chirurgicale. Les cellules sont ensuite réimplantées au niveau des zones lésées sous une membrane de périoste. Cependant, la TCA de première génération présente quelques inconvénients, essentiellement dus, d'une part, à leur coût, mais aussi, à l'amplification *in vitro* qui induit une dédifférenciation des chondrocytes, qui une fois réinjectés au niveau du site articulaire, généreront un fibrocartilage et non un cartilage de type hyalin. De plus, une fuite cellulaire importante

vers le liquide synovial est souvent observée lors de l'injection des chondrocytes en site lésionnel.

C'est pourquoi, plusieurs nouvelles générations de TCA évoluant vers l'IT ont vu le jour. Les améliorations concernent principalement le type cellulaire utilisé (chondrocytes, CSM de diverses origines comme la moelle osseuse, le sang de cordon ombilical, la gelée de Wharton, le tissu adipeux, voire des cellules souches pluripotentes induites), la redifférenciation ou la différenciation chondrogénique des cellules avec notamment l'utilisation de biomatériaux fonctionnalisés, ou non, de l'hypoxie et de facteurs chondrogéniques (TGF- β 1, BMP-2, TGF- β 3, insuline+BMP-2+hormone T3 (triiodothyronine) ...), de siRNA (Claus *et al.*, 2012 ; Freyria & Mallein-Gerin, 2012 ; Legendre *et al.*, 2013 ; Ollitrault *et al.*, 2015 ; Demoor *et al.*, 2014).

III. Amélioration des traitements contre l'arthrose : essor et intérêt des produits nutraceutiques

A. Les compléments alimentaires et les collagènes hydrolysés

Les traitements alternatifs comme les compléments alimentaires sont aujourd'hui de plus en plus commercialisés. Les deux produits les plus utilisés en nutraceutique sont la glucosamine et la CS, deux molécules faisant partie intégrante de la structure des agrécannes. Une étude a montré que la CS administré oralement diminue la douleur à court terme, tout en ayant un faible risque d'effet indésirable (Singh *et al.*, 2015). Dans une autre étude, il a été montré que la culture de chondrocytes en présence de glucosamine favorise la production de PG (Bassleer *et al.*, 1998). Cette étude suggère une action chondroprotectrice de la glucosamine utilisée entre 1 et 100 micro-grammes par millilitre. D'autres compléments alimentaires, comme la curcumine et la Boswellia, semblent intéressants. En effet, une étude montre que ces deux compléments alimentaires soulagent les symptômes de l'arthrose, tout en diminuant les risques d'effets indésirables gastro-intestinaux des anti-inflammatoires (Bannuru *et al.*, 2018). Une autre molécule permet de réduire la douleur et d'améliorer la fonction physique des patients, il s'agit du MSM (Kim *et al.*, 2006).

Les PROMERIM[®]30 et 60 font partie de ces compléments alimentaires. Leurs effets sur le métabolisme des chondrocytes équins et humains doivent être appréhendés dans le cadre du programme doctoral; ils sont issus de l'hydrolyse de peau de poisson, dont la MEC est majoritairement composée de collagène, particulièrement de l'isotype I. Le second extrait du laboratoire Dielen, le PROMERIM[®]40, qui doit être étudié, provient de l'hydrolyse de cartilage de roussette et d'hémisole, tissu dont la matrice extracellulaire est majoritairement composée de collagène de type II. La principale caractéristique des hydrolysats de collagène réside dans leur composition en acides aminés, qui est identique à celle du collagène, c'est

à dire riche en glycine et proline, deux acides aminés essentiels pour la stabilité et le renouvellement/la régénération du cartilage (Walrand *et al.*, 2008 ; Ohara *et al.*, 2010). De plus, le collagène hydrolysé favorise la synthèse du collagène de type II par des chondrocytes articulaires bovins (Oesser & Seifert, 2003).

Des travaux portant sur les hydrolysats de collagène ont également été menés afin de déterminer leur efficacité. En 1979, des études cliniques démontrent que 24% des patients n'ont plus de douleur et présentent une amélioration de leur état général, 44% observent une baisse de la douleur et un meilleur état général, lorsqu'ils prenaient des hydrolysats de collagène par voie orale. Ces résultats ont ensuite été confortés par des études similaires, en 1982, au cours desquelles 75% des patients montrent des améliorations à la douleur (Bello & Oesser, 2006). Un apport d'hydrolysats de collagènes pourrait donc être bénéfique pour limiter, voire même, restaurer la qualité du tissu cartilagineux. De nombreuses études ont montré que les hydrolysats de collagènes pourraient constituer un complément alimentaire intéressant afin de traiter les pathologies cartilagineuses (Bruyere *et al.*, 2012 ; Fujita *et al.*, 2002 ; Henrotin *et al.*, 2011).

Les compléments alimentaires sont généralement associés aux techniques de chirurgie pour aider au bon rétablissement des patients. Cependant, bien que la prise de compléments alimentaires au sens large puisse améliorer la condition de vie des patients, l'évolution négative de l'arthrose est inéluctable.

Les hydrolysats de collagène, dont l'étude est envisagée dans le présent programme, peuvent représenter une source de matrikines dont les principales activités biologiques sont déclinées ci-dessous.

1. Les matrikines ou matricryptines

L'activité des cellules au sein des tissus est modulée par un certain nombre de facteurs présents dans leur microenvironnement. En plus des facteurs solubles tels que les hormones, les cytokines ou les facteurs de croissance, les cellules reçoivent également des signaux provenant des macromolécules de la MEC environnante. Par ailleurs, certains signaux sont à l'origine de la dégradation des protéines de la MEC, comme les cytokines pro-inflammatoires, conduisant à la libération de peptides qui peuvent par eux-mêmes constituer de nouveaux signaux pour les cellules environnantes. Par conséquent, une boucle de régulation réelle existe dans le tissu

conjonctif, constitué par des peptides générés par la dégradation de la MEC et les cellules du tissu conjonctif. A la fin des années 1990, pour désigner des fragments biologiquement actifs issus de macromolécules de la MEC (fibronectine, laminines, vitronectine, collagènes, etc.) (Davis *et al.*, 2000), le terme matrikine ou matricryptine a été proposé. Les matrikines ou les matricryptines sont une nouvelle classe de ligands capables de signaler dans les cellules au travers des récepteurs tels que les récepteurs des facteurs de croissance. Il en existe deux classes : les matrikines "naturelles", qui signalisent directement à partir du milieu extracellulaire et les matrikines "cryptiques" (matricryptines) qui nécessitent un traitement protéolytique pour révéler le ligand ou pour libérer le ligand de sa protéine matricielle.

Depuis de nombreuses années, nombre d'implications ont été attribuées aux matrikines dans le contrôle des processus cellulaires normaux et tumoraux. Ainsi, des molécules dérivant de la laminine, de la fibronectine, de la décorine, ou encore du collagène, présentent des activités biologiques jusqu'alors insoupçonnées.

Les fragments cryptiques sont générés, le plus souvent, par protéolyse limitée d'une macromolécule sous l'action de diverses enzymes telles que les MMP ou les ADAMTS (Ricard-Blum & Salza, 2014). La production des matrikines est aussi régulée par un certain nombre de facteurs liés au contexte biologique (forces mécaniques, condition oxique, type cellulaire...). Il a été démontré que les sites matricryptiques avaient une affinité pour les intégrines, une famille de récepteurs, notamment pour les protéines de la MEC. C'est le cas particulièrement des sites RGD de la fibronectine et de la vitronectine qui peuvent ainsi gouverner des effets biologiques au sein des cellules (Davis *et al.*, 2000 ; Schenk & Quaranta, 2003).

Les premières observations d'effets biologiques de fragments de la MEC datent de 1986 lorsque fut caractérisée la chondrocalcine qui est le produit du clivage du procollagène II en collagène II actif (Van der Rest *et al.*, 1986). Par la suite, des effets liés au domaine C-terminal issu du collagène de type I ont été observés sur l'activation de son propre gène, ainsi que sur celui de la fibronectine, démontrant l'existence d'un rétrocontrôle (Aycock *et al.*, 1986). Cependant, ce n'est que lors de la mise en évidence de l'endostatine et de la restine que surgit l'idée selon laquelle les protéines matricielles, dans leur ensemble, possèderaient des fonctions allant au-delà de la structuration et du maintien de l'architecture tissulaire. Ces peptides, parfois de taille très réduite, ont été nommés matrikines ou matricryptines (Matri = matrice ; cryptines

venant de cryptique = masquées) et représentent des voies thérapeutiques potentielles très prometteuses.

De très nombreuses matrikines ont été identifiées à ce jour, d'autant plus que des molécules de la MEC peuvent être la source de plusieurs matrikines à l'origine de fonctions biologiques très diverses (Schenk & Quaranta, 2003). Par ailleurs, la proximité de séquences (désoxyribonucléotidique et en acides aminés) observée entre des molécules collagéniques de vertébrés (Mammaliens et poissons) laisse envisager des analogies fonctionnelles. A cet égard, il semble particulièrement intéressant d'analyser les effets biologiques de ces molécules d'origine marine sur des cellules humaines dans divers contextes physiopathologiques.

2. Les matrikines dérivant des collagènes

De très nombreuses matrikines sont issues des collagènes (tableau IV), notamment par l'action de collagénases et d'ADAMTS ou de pro-protéines convertases de la famille des furines (Ricard-Blum & Salza, 2014 ; Franzke *et al.*, 2009). Ces matrikines peuvent avoir des effets biologiques très variés, elles peuvent moduler la migration cellulaire, la prolifération, l'angiogenèse, mais aussi la différenciation cellulaire.

NC1 domain	Matrikine
NC1 α 1(IV)	Arresten
NC1 α 2(IV)	Canstatin
NC1 α 3(IV)	Tumstatin
NC1 α 4(IV)	Tetrastatin
NC1 α 5(IV)	Pentastatin
NC1 α 6(IV)	Hexastatin
NC1 α 1(XV)	Restin
NC1 α 1(XVIII)	Endostatin
NC1 α 1(XIX)	NC1 α 1(XIX)

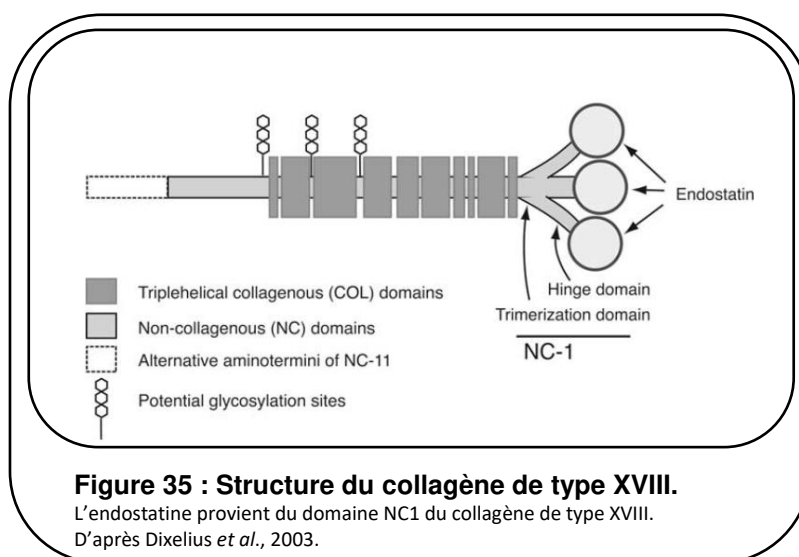
Tableau IV : Matrikines dérivées des différents domaines NC1 des chaînes de collagènes.
 Les principales matrikines dérivées du domaine NC1 des différentes chaînes de collagènes associées aux membranes basales. D'après Monboisse *et al.*, 2014.

2.1. Le collagène de type I

La séquence primaire de chaque chaîne alpha suit typiquement le schéma des répétitions Gly-X-Y, X et Y représentant typiquement respectivement la proline et l'hydroxyproline. L'abondance des résidus de glycine dans chaque chaîne de collagène α permet l'association étroite des chaînes, tandis que l'abondance de la proline et de l'hydroxyproline permet leur torsion serrée et leur site d'association avec d'autres composants de la MEC. Cette région d'environ 338 répétitions de triplets est appelée "domaine collagène" ou "motif triple hélice" (Exposito *et al.*, 2010). Le domaine collagène des chaînes fibrillaires α est flanqué de chaque côté par les domaines N-propeptides et C-propeptides à l'extrémité N et C de la chaîne, respectivement. Les fragments bioactifs de peptides de collagène sont généralement des séquences peptidiques du domaine collagène, ou des séquences de N- et C-propeptides. Il a été démontré que les fragments bioactifs du domaine collagénique et des C- et N-propeptides non collagéniques coordonnent des processus tels que l'angiogenèse, la réparation des tissus, la croissance des tumeurs et le développement des tissus (Ricard-Blum, 2011 ; Ricard-Blum & Vallet, 2019). Des fonctions spécifiques ont ainsi été mises en évidence pour les produits de clivages protéolytiques, comme par exemple celui du domaine C-terminal du collagène de type I mais aussi de l'isotype II (Van der Rest *et al.*, 1986). Certaines matrikines du collagène de type II favorisent la dégradation de la MEC cartilagineuse, et les auteurs de l'étude associent cet effet au processus de renouvellement naturel du cartilage (Jennings *et al.*, 2001).

2.2. Le collagène de type XVIII

L'endostatine est un fragment provenant du domaine NC1 du collagène de type XVIII dans sa région C-terminale (figure 35). Il existe trois isoformes de collagène XVIII : longue, moyenne et courte. Ces isoformes partagent le domaine C-terminal (NC1) contenant l'endostatine.



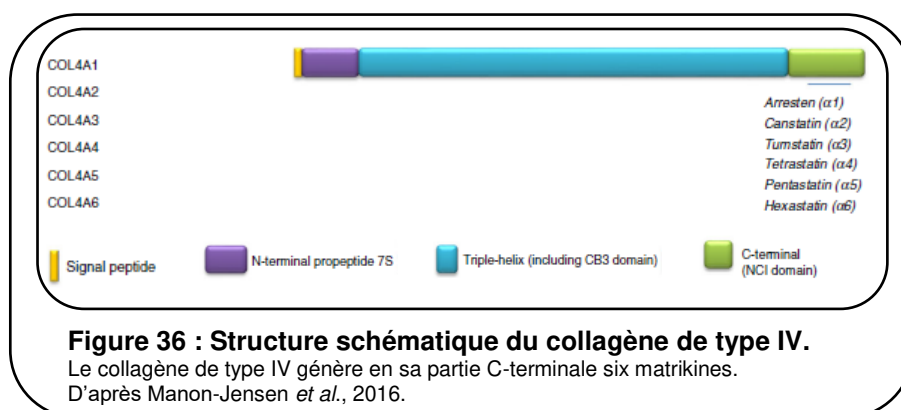
L'endostatine peut être générée à partir du collagène XVIII complet par l'action de diverses protéases, notamment les protéases à cystéine, les MMP et l'élastase, qui est une protéase à sérine (Felbor *et al.*, 2000, Ferreras *et al.*, 2000). La dégradation du collagène de type XVIII génère des fragments de 24 à 28 kDa contenant l'endostatine (20 kDa) (Walia *et al.*, 2015). Structurellement, l'endostatine est caractérisée par une conformation compacte riche en arginines qui sont exposées en surface (Hohenester *et al.*, 1998). Un certain nombre de ces résidus d'arginine servent de médiateurs pour la liaison à l'héparine / HS, qui peut être critique pour la fonction anti-angiogénique de l'endostatine (Kreuger *et al.*, 2002 ; Sasaki *et al.*, 1999). La molécule est stabilisée par deux ponts disulfures intramoléculaires (John & Forssmann, 2001 ; Ständker *et al.*, 1997). L'incubation prolongée de l'endostatine recombinante avec les protéases mentionnées ci-dessus indique que l'endostatine elle-même est stable en présence de MMP, mais qu'elle est dégradée par d'autres protéases. Ainsi, alors que l'activité des protéases est essentielle pour la génération de l'endostatine, l'activité des protéases régule également la stabilité de l'endostatine, et donc son activité. L'endostatine, libérée du collagène XVIII, se trouve dans trois compartiments différents : dans la paroi des vaisseaux sanguins (Miosge *et al.*, 1999), dans les plaquettes (Ma *et al.*, 2001) et en libre circulation dans le sang.

2.3. Le collagène de type XV

La restine est issue de la protéolyse du domaine NC10 du collagène de type XV. C'est un fragment de 22 kDa qui présente 60% d'homologie avec l'endostatine. La restine présente un grand répertoire de ligands communs à l'endostatine dans les protéines de la matrice extracellulaire (comme par exemple la laminine-1, le nidogène, le perlécan, ...) (Sasaki *et al.*, 2000). Cette matricryptine est capable d'inhiber la migration de cellules endothéliales mais son effet sur leur prolifération reste controversé. La restine exerce un effet anti-tumoral qui semble reposer sur ses propriétés anti-angiogéniques (Sasaki *et al.*, 2000 ; Xu *et al.*, 2002 ; Ramchandran *et al.*, 1999).

2.4. Le collagène de type IV

Les six chaînes α homologues du collagène de type IV comprennent un domaine 7S N-terminal, un domaine collagénique Gly-X-Y et un domaine non collagénique C-terminal. Trois molécules distinctes existent pour le collagène de type IV : $\alpha 1\alpha 2\alpha 1$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ et $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ (figure 36) (Manon-Jensen *et al.*, 2016). En raison des chaînes α distinctes qui existent pour le collagène de type IV, formées à partir de $\alpha 1$ - $\alpha 6$, la dégradation du collagène de type IV peut potentiellement donner naissance à une vaste gamme de matricryptines ou matrikines. Cependant, à ce jour, il n'existe que six peptides bioactifs connus, générés à partir du collagène de type IV (Manon-Jensen *et al.*, 2016 ; Ricard-Blum *et al.*, 2019). Ces peptides sont des fragments de domaines non collagéniques des chaînes $\alpha 1$ (arresten), $\alpha 2$ (canstatine), $\alpha 3$ (tumstatine), $\alpha 4$ (tétrastatine), $\alpha 5$ (pentastatine) et $\alpha 6$ (hexastatine).



2.4.1. L'arresten

L'arresten est issue de la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type IV, elle joue un rôle d'inhibition de l'angiogénèse dans le carcinome épidermoïde en se liant au complexe d'intégrine $\alpha 1\beta 1$ dans les cellules endothéliales (Ricard-Blum *et al.*, 2019 ; Aikio *et al.*, 2012). L'arresten possède différents effets, on retrouve ainsi des actions anti-angiogéniques (Colorado *et al.*, 2000), pro-apoptotiques (Nyberg *et al.*, 2005) ainsi qu'une diminution de la prolifération et de la migration.

2.4.2. La canstatine

La canstatine est formée à partir du fragment non collagénique de la chaîne $\alpha 2$, il a été démontré qu'elle joue un rôle dans la prolifération des cellules épithéliales au cours de la morphogénèse de la glande sous-mandibulaire. Il est important de noter que certaines MMP (et notamment la MT2 de la famille des MT-MMP (« Membrane Type Matrix Metalloproteinases »)) est responsable de la production de la canstatine qui va ensuite se lier aux récepteurs intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 3\beta 3$ et $\alpha 3\beta 5$ (Ricard-Blum and Vallet, 2019 ; Rebutini *et al.*, 2009). Il a également été suggéré que la canstatine améliore la migration des fibroblastes (Aikio *et al.*, 2012).

2.4.3. La tumstatine

La tumstatine est une matricryptine dérivée du domaine NC1 de la chaîne $\alpha 3$ dans le collagène de type IV. Elle signale par les intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$, $\alpha \nu\beta 5$ et est produite par protéolyse suite à l'action de la MMP-9 (Ricard-Blum and Vallet., 2019). La tumstatine augmente la prolifération et la migration des fibroblastes cardiaques de rat en se liant aux intégrines $\alpha \nu\beta 3$ et $\alpha \nu\beta 5$ (Yasuda *et al.*, 2017). D'autre part, la tumstatine exerce une action anti-angiogénique lors de la croissance tumorale *via* les intégrines $\alpha \nu\beta 3$ (Hamano *et al.*, 2003 ; Maeshima *et al.*, 2000). De plus, la tumstatine inhibe également l'angiogénèse en perturbant l'activité du VEGF dans les cellules endothéliales (Harkness *et al.*, 2017).

2.4.4. La tétrastatine

La tétrastatine est une matricryptine de la chaîne $\alpha 4$ et il a été démontré qu'elle exerçait des effets anti-tumoraux par association avec les intégrines $\alpha\beta 3$ et par inhibition de la voie de signalisation phosphoinositide 3-kinase (PI3K/Akt) (Lambert *et al.*, 2018). Une autre étude a fait état d'effets inhibiteurs *in vitro* de la tétrastatine sur la migration et la prolifération des cellules de mélanome humain, associés à un ciblage du peptide spécifique à la tumeur, car aucun effet n'a été observé sur la prolifération et la migration des fibroblastes dermiques (Brassart-Pasco *et al.*, 2012).

2.4.5. Les pentastatines

Les pentastatines 1, 2 et 3 sont des fragments peptidiques dérivés du domaine NC1 de la chaîne $\alpha 5$ du collagène de type IV (Monboisse *et al.*, 2014) et il a été démontré qu'elles se liaient aux intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ (Karagiannis & Popel, 2008 ; Koskimaki *et al.*, 2010). Parmi ces peptides, la pentastatine 1 exerce des effets anti-angiogéniques, comme démontré dans de multiples études (Karagiannis & Popel, 2007). Une étude a montré que la pentastatine 1 réduisait le taux de croissance des tumeurs *in vivo* dans un modèle de xénogreffe de cancer du poumon (Koskimaki *et al.*, 2010).

2.4.6. L'hexastatine

Comme la canstatine et la tumstatine, le domaine NC1 de la chaîne $\alpha 6$ du collagène IV, l'hexastatine, exerce une inhibition de l'angiogenèse et de la croissance cellulaire dans les tumeurs (Petitclerc *et al.*, 2000). Plus précisément, une étude réalisée en 2013 a montré que l'hexastatine était capable d'inhiber la migration et la survie des cellules endothéliales choroïdes de souris *via* PI3K-Akt/mTOR (Gunda *et al.*, 2013).

B. Les autres compléments alimentaires

En France, une liste répertorie tous les compléments alimentaires ayant fait l'objet d'une déclaration auprès de la DGCCRF (La Direction Générale de la

Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes), et ayant obtenu une attestation de déclaration de commercialisation, ce depuis le 26 avril 2016.

Chaque complément alimentaire est détaillé tant dans sa présentation, sa composition que ses conditions d'utilisation. Depuis le 26 avril 2016, on peut y dénombrer 1550 compléments alimentaires indiquant être utilisés dans le domaine des « articulations ». Bien évidemment, les compléments mis sur le marché avant cette date ne sont pas comptabilisés ici. Il existe donc une très large gamme de produits avec des composés et des composants bien différents qui relèvent souvent, soit de la phytothérapie, de l'oligothérapie ou encore de l'homéothérapie.

1. La phytothérapie

De nombreuses plantes ou herbes médicinales ont été testées, ci-après ne seront décrites que les majeures et les plus étudiées, il ne s'agit donc pas d'une liste exhaustive.

1.1. L'harpagophytum

L'harpagophytum est une plante de la famille des *Pedaliaceae*, aussi connue sous le nom de griffe du diable. Les racines de la plante sont utilisées par voie orale en médecine populaire pour traiter un large éventail de problèmes de santé, notamment l'indigestion, la fièvre, les réactions allergiques et les rhumatismes (Chantre *et al.*, 2000 ; Circosta *et al.*, 1984 ; Costa De Pasquale *et al.*, 1985 ; Kaszkin *et al.*, 2004). La griffe du diable est depuis longtemps considérée comme un médicament efficace contre l'arthrite. Wenegener et Lüpke ont démontré l'efficacité et la sécurité de Doloteffin™, un extrait aqueux de griffe du diable, dans un essai multicentrique de 12 semaines mené sur 75 patients souffrant d'arthrite de la hanche ou du genou (Wegener & Lüpke, 2003). L'extrait a été efficace chez la plupart des patients, avec des améliorations cliniques de la douleur à la palpation (45,5% des patients), de la limitation de la mobilité (35% des patients) et du crépitement articulaire (25,4% des patients). L'étude a été réalisée sur 259 patients à qui l'on a administré un extrait sec de griffe du diable (960 mg/jour) pendant 8 semaines. Les auteurs ont rapporté une réduction significative de la douleur et de la raideur globale, ainsi que des améliorations significatives de la fonction et des scores moyens de douleur pour la main, le poignet, le coude, l'épaule, la hanche, le genou et le dos (Warnock *et al.*,

2007). De manière constante, on a récemment observé que l'harpagoside contenu dans l'harpagophytum pouvait inhiber la production d'IL-6 à partir de chondrocytes humains primaires arthrosiques (Haseeb *et al.*, 2017). En outre, il est prouvé que l'association de l'extrait de griffe du diable (3 % d'harpagoside) à d'autres agents, tels que l'extrait de bromélaïne, le chlorhydrate de glucosamine, la CS et le MSM, est capable d'empêcher la destruction *in vivo* du cartilage dans l'articulation du genou de rat (Ucuncu *et al.*, 2015). Prises ensemble, ces études précliniques et cliniques suggèrent que la griffe du diable est une alternative prometteuse pour le traitement de l'arthrose.

1.2. La scrophulaire (*Scrophularia*)

Les iridoïdes isolés de cette plante ont des effets anti-inflammatoires en inhibant l'activité du facteur de transcription NF- κ B (Zhang *et al.* 2014b). Le potentiel anti-inflammatoire de divers scropoliosides isolés de scrophulaire contre l'activité NF- κ B induite par le LPS, l'expression de l'ARNm des cytokines, la sécrétion de l'IL-1 β et l'activité de la COX-2 (Cyclooxygénase 2), enzyme convertissant l'acide arachidonique et prostaglandine H₂ et G₂, a été étudié (Zhu *et al.*, 2015). L'extrait d'acétate d'éthyle de *Scrophularia striata* inhibe la sécrétion d'IL-1 β , de TNF- α et de prostaglandine E2 (PGE2) dans les macrophages (Azadmehr *et al.*, 2013). Bien que moins étudiée que l'harpagophytum, la grande famille des scrophulaires présente donc là aussi un potentiel thérapeutique intéressant dans un contexte arthrosique.

1.3. Le Saule, *Salix alba*

Diverses espèces du genre *Salix*, ou saule source de salicine, étaient déjà couramment utilisées pour soulager la douleur dans l'antiquité (Appelboom, 2002 ; Vlachojannis *et al.*, 2009). L'effet anti-inflammatoire de l'extrait d'écorce de saule repose, au moins partiellement, sur sa capacité à antagoniser les monocytes activés, en bloquant l'activité des cytokines pro-inflammatoires (TNF α), d'enzymes comme COX-2 et des médiateurs (NF- κ B) (Bonaterra *et al.*, 2010). Un essai de deux semaines a démontré la capacité de l'extrait d'écorce de saule (à une dose équivalente à 240 mg de salicine/jour) à contrôler les symptômes des patients atteints d'arthrose, en particulier à réduire la douleur, bien qu'avec une efficacité plutôt modeste (Schmid *et al.*, 2001). Bien que la salicine ait traditionnellement été considérée comme le principe

actif, certains pensent que cette substance ne peut expliquer toute la gamme des effets du saule, et que d'autres substances phytochimiques qu'il contient, pourraient être impliquées, comme les polyphénols et les flavonoïdes, qui ont montré une activité inhibitrice sur COX-2 et une diminution de la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires *in vitro*, dans les monocytes humains et les macrophages différenciés (Bonaterra *et al.*, 2010 ; Khayyal *et al.*, 2011 ; Nahrstedt *et al.*, 2007 ; Drummond *et al.*, 2012 ; Shara & Stohs, 2015).

1.4. Le Curcuma

Plusieurs membres du genre *Curcuma* sont utilisés dans la médecine traditionnelle, le plus important étant le *Curcuma longa*, ou curcuma. Son rhizome est utilisé depuis des siècles comme épice alimentaire, ainsi que comme herbe ayurvédique appréciée pour ses propriétés anti-inflammatoires, d'où son utilité dans les cas d'arthrite, notamment la polyarthrite rhumatoïde (Sharma *et al.*, 2006b). Un mélange de Curcuma et *Boswellia* s'est révélé plus efficace qu'une dose standard de célécoxib (un inhibiteur sélectif de COX-2) dans le traitement de l'arthrose, améliorant à la fois objectivement et subjectivement l'état des patients, sans qu'aucune toxicité ne soit détectable (Kizhakkedath, 2013). Les extraits de *Curcuma domestica* se sont avérés utiles dans l'arthrose du genou, en réduisant la douleur et en préservant la fonctionnalité avec une efficacité équivalente à celle de l'ibuprofène, mais avec moins d'effets secondaires gastro-intestinaux (Kuptniratsaikul *et al.*, 2014). Le principe actif est le diferuloylméthane, un pigment phénolique jaune communément appelé curcumine, qui a une action bénéfique à multiples facettes dans divers domaines de la pathologie (diabète, cancer, inflammation, stress oxydatif), en raison de sa capacité à influencer favorablement diverses voies de signalisation et de médiateurs (Ghosh *et al.*, 2015).

1.5. La boswellia

La *Boswellia serrata* donne une gomme résineuse, appelée encens, efficace dans le traitement des troubles inflammatoires (Ammon, 2002), en particulier l'arthrite. Aujourd'hui, de nombreuses associations anti-arthrosiques contiennent de la boswellia. Une préparation de *B serrata* enrichie en principes actifs s'est avérée capable d'empêcher la dégradation du cartilage par la MMP-3 et de bloquer la

molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) et donc la réaction inflammatoire (Sengupta *et al.*, 2010). Une autre combinaison comprenant trois plantes (*Uncaria tomentosa*, *Boswellia* et *Lepidium meyenii*) a montré qu'elle entravait l'inflammation et protégeait le cartilage articulaire. Testée sur des chondrocytes arthrosiques, cette combinatoire bloque l'activation de NF- κ B déclenchée par l'IL-1 β abrogeant l'activité des enzymes liées à l'inflammation (iNOS, MMP-9 et MMP-13), entraînant une diminution du taux de production de NO et une baisse de la détérioration de la matrice cartilagineuse (moins de glycosaminoglycanes-GAG libérés); simultanément, une production accrue de protéines de structure (y compris l'agrécanne et le collagène de type II) a été détectée (Akhtar *et al.*, 2011).

2. L'oligothérapie

Jacques Ménérier est le premier en 1930 à utiliser le terme oligothérapie. Cette spécialité médicale est non reconnue, mais de plus en plus de personnes souffrant d'arthrose s'orientent vers ces traitements alternatifs. Le terme oligo-éléments désigne les éléments chimiques qui sont présents en quantité infime dans l'organisme (moins de 0,01% du poids du corps), ils ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent donc être absorbés. Parmi les oligoéléments, on retrouve : le fer, le zinc, le cuivre, le sélénium, l'iode, le manganèse, le molybdène, le bore, le chrome, le cobalt, le fluor et le vanadium. Certains de ces éléments chimiques ont été étudiés et peuvent avoir des effets bénéfiques sur l'organisme.

2.1. Le cuivre

Le cuivre est un oligo-élément clé, qui joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie physiologique et de l'antioxydation dans notre corps (Bost *et al.*, 2016 ; Skaar & Raffatellu, 2015). Le cuivre serait important pour l'immunité cellulaire et l'immunité humorale (Percival, 1998 ; Djoko *et al.*, 2015). Le métabolisme du cuivre est évidemment renforcé dans la réponse en phase aiguë en cas d'inflammation, d'infection et d'autres maladies (Tapiero *et al.*, 2003). En tant que site actif de la céruloplasmine (protéine transportant le cuivre dans le sang), le cuivre favorise la synthèse et la sécrétion de la céruloplasmine en stimulant la synthèse des cytokines inflammatoires et du facteur inductible par l'hypoxie (Linder, 2016 ; Uriu-Adams & Keen, 2005). Dans les tissus sains, en particulier le cartilage, le cuivre est un

composant important dans la synthèse des enzymes cellulaires, comme la superoxyde dismutase contenant du cuivre, la cytochrome oxydase et la lysyl oxydase (Fraga, 2005). En particulier, la lysyl oxydase, une amine oxydase dépendante du cuivre, s'est avérée être une enzyme clé dans la conformation du collagène favorisant ainsi la formation du cartilage (Huang *et al.*, 2016 ; Alshenibr *et al.*, 2017). Une carence en cuivre pourrait diminuer la solidité des os et augmenter l'incidence de l'arthrose (Medeiros, 2016).

2.2. Le zinc

De nombreuses études ont montré que le zinc, plutôt que d'être un métal de transition toxique, est un oligo-élément non toxique fondamental sur le plan nutritionnel (Fosmire, 1990). Il n'est ni cytotoxique, ni cancérigène, ni mutagène ni tératogène (Léonard *et al.*, 1986). En outre, les intoxications signalées par le zinc sont rares et principalement liées à une carence en cuivre (Plum *et al.*, 2010 ; Młyniec *et al.*, 2015 ; Merza *et al.*, 2015). Le zinc, après le fer, est le deuxième oligo-élément le plus répandu dans le corps humain (Vašák & Hasler, 2000). La quantité totale de zinc chez les adultes est d'environ 1,4 à 2,3 g, mais sa teneur varie considérablement d'un tissu à l'autre. 85% du zinc est localisé dans les muscles et les os, 11% dans la peau et le foie, et les 4% restants dans d'autres tissus du corps (Calesnick & Dinan, 1988). Une carence marginale, à modérée, entraîne un retard de croissance, un manque d'appétit, une immunité affaiblie, un stress oxydatif accru, tout comme la production de cytokines inflammatoires. Les autres symptômes comprennent des réactions cutanées, un retard dans la cicatrisation des plaies et une diminution de la capacité de reproduction (Prasad *et al.*, 1963, 2001, 2014 ; Tapiero & Tew, 2003 ; Lansdown *et al.*, 2007).

Il est un composant d'environ 10% des protéines humaines, y compris les facteurs de transcription et les enzymes clés qui régulent les processus cellulaires et les voies de signalisation cellulaire (Rink & Gabriel, 2001 ; Andreini *et al.*, 2006). La carence en zinc augmente les concentrations de cytokines inflammatoires et le stress oxydatif, induit l'apoptose et provoque un dysfonctionnement cellulaire. L'élément joue donc un rôle préventif contre la formation de radicaux libres et protège les structures biologiques contre les lésions au cours des processus inflammatoires (Powell, 2000 ; Tapiero & Tew, 2003 ; Stefanidou *et al.*, 2006 ; Chasapis *et al.*, 2012).

2.3. Le fer

Le fer est un oligo-élément essentiel, impliqué dans de nombreuses réactions biologiques, principalement par sa capacité à accepter ou à donner des électrons, et donc, à catalyser les réactions d'oxydoréduction. Le fer étant un élément essentiel, l'organisme le recycle et le conserve (Fleming & Ponka, 2012). Spontanément, des hémorragies se produisent dans les articulations, ainsi qu'en réponse à un stress mécanique ou à un traumatisme (Fischer *et al.*, 2011 ; Stephensen *et al.*, 2009) provoquant une dégénérescence articulaire par inflammation et lésion tissulaire directe, appelée arthropathie hémophile (Lafeber *et al.*, 2008 ; Valentino, 2010). Le fer peut être détecté dans les chondrocytes isolés après une courte période de culture en présence de fer ou d'hémoglobine (Choi *et al.*, 1981), ce qui influence négativement la vitesse de synthèse des PG (Kirkpatrick *et al.*, 1982). Cet effet inhibiteur est réversible en l'absence de signal pro-inflammatoire (Hooiveld *et al.*, 2003a). Pour exercer des effets nocifs durables sur le cartilage, il est nécessaire d'associer l'hémoglobine au fer avec de l'IL-1 β . L'effet durable résulte de l'apoptose des chondrocytes par la formation de radicaux hydroxyles. L'IL-1 β stimule les chondrocytes à produire du peroxyde d'hydrogène, qui est converti en radicaux hydroxyles dans des conditions catalytiques créées par le Fe²⁺ (Hooiveld *et al.*, 2003a, 2003b). La destruction du cartilage lors d'un saignement articulaire peut être atténuée par un traitement au déférasirox, un chélateur du fer (Nieuwenhuizen *et al.*, 2014).

2.4. Le sélénium

Le sélénium, principalement par son incorporation dans diverses sélénoprotéines, est impliqué dans un large éventail de processus biologiques dans le corps humain. Par exemple, le sélénium a des effets antioxydants, anti-inflammatoires. Il influence la signalisation intracellulaire, la différenciation, l'activation et la prolifération des cellules immunitaires (Rayman, 2012 ; Huang *et al.*, 2012). Un régime alimentaire à base de sélénium à 2 mg/kg par jour limite la dégénérescence des lésions du cartilage lorsqu'il est associé à des vitamines (A, C, E, B6, B2) dans des modèles animaux, éventuellement en limitant la formation des radicaux libres de l'oxygène (Kurz *et al.*, 2002). Cependant, à une dose plus élevée, le sélénium peut provoquer des diarrhées, des nausées et des vomissements (Hunsaker *et al.*, 2005).

IV. Objectifs généraux du projet de thèse

Le projet de recherche développé dans un cadre industriel résulte d'un partenariat entre le laboratoire académique BioTARgen et le laboratoire DIELEN. Cette thèse a permis le développement d'un projet de recherche visant à améliorer les stratégies thérapeutiques d'ingénierie tissulaire du cartilage chez les modèles humain et équin dans l'objectif de traiter ou prévenir les arthropathies humaines et équines. Elle vise notamment à étudier l'effet de collagènes hydrolysés d'origine marine, de peau et de cartilage (Promerim®30, 40 et 60) sur les principaux marqueurs de l'anabolisme et du catabolisme des chondrocytes du cartilage articulaire.

Ce travail doctoral s'organise principalement autour de trois axes :

Dans un premier temps, des isollements de chondrocytes humains et équins ont été réalisés. Parallèlement à ces isollements, et ce uniquement pour les chondrocytes articulaires équins, un banking des cellules a été réalisé.

Lors d'une première partie, le procédé d'obtention d'un substitut biologique cartilagineux développé initialement avec les chondrocytes articulaires humains et breveté a été transposé aux chondrocytes articulaires équins, avec, pour objectif principal, d'obtenir un organoïde néo-cartilagineux de type hyalin, même avec des chondrocytes dédifférenciés par passages de cultures monocouches et/ou ayant été congelés dans la bio-banque cellulaire.

Par la suite, les différents hydrolysats d'origine marine n'ayant jamais été utilisés *in vitro*, il a été nécessaire de s'assurer qu'il est possible de les dissoudre (Promérim®) afin de pouvoir les utiliser *in vitro* ultérieurement.

Lors d'une deuxième partie, nous avons étudié l'effet des hydrolysats de collagène sur les chondrocytes articulaires équins. Les extraits hydrolysés ont été testés afin de s'assurer, dans un premier temps, de l'innocuité des produits. Des tests de toxicité et d'activité métabolique ont ainsi été réalisés. Par ailleurs, lors de ces tests, nous avons utilisé les hydrolysats à différentes concentrations (gamme de concentration allant de 0,1 à 250 µg/mL) afin de déterminer les concentrations optimales d'utilisation.

Les chondrocytes en condition arthrosique présentent un faible potentiel de réparation intrinsèque et nombre d'entre eux entrent en sénescence. L'étude de la viabilité cellulaire nous a permis également de définir si les hydrolysats avaient un effet positif, négatif ou neutre sur l'activité métabolique des chondrocytes équins et humains. De la même manière, la sénescence a été évaluée. Ensuite, nous avons développé un modèle de culture d'organoïde néo-cartilagineux de type hyalin, dont le protocole de synthèse avait été développé dans la première partie, afin d'évaluer quel serait l'effet des Promérim® sur la nature du cartilage néo-formé, dans différents contextes. Cela a permis également de définir si les Promérim® pouvaient permettre d'améliorer la qualité du substitut cartilagineux en vue du développement d'une approche d'ingénierie tissulaire.

Pour ce faire, les chondrocytes ont étéensemencés au sein d'éponges de collagènes de types I/III, et cultivés en présence de facteur de croissance (BMP-2) et/ou d'un facteur pro-inflammatoire et pro-arthrosique (l'IL-1) (afin de mimer l'ensemble des stades évolutifs de l'arthrose du cartilage hyalin à l'arthrose tardive, tout en passant par le stade d'arthrose précoce). A l'issue de la culture, des études au niveau des taux moyens d'ARNm et protéiques des marqueurs phénotypiques spécifiques et non caractéristiques du cartilage hyalin ont été menées afin de déterminer la nature du cartilage produit au sein de l'organoïde. Parmi les marqueurs non caractéristiques du cartilage hyalin, les marqueurs hypertrophiques et osseux ont été évalués ainsi que l'expression de différentes protéases et de facteurs pro-inflammatoires.

Lors d'une troisième partie, nous avons procédé à l'étude de l'effet des Promérim® sur des organoïdes cartilagineux humains, de la même manière que nous l'avons fait avec les chondrocytes équins.

Outre le caractère appliqué de ces axes de recherche, les résultats qui découlent de ce projet permettront une meilleure compréhension des modes d'actions des hydrolysats de collagène. A terme, ce projet pourra être étendu à des études *in vivo*, pour évaluer l'effet des Promérim®, utilisés en tant que complément alimentaire, dans le traitement de lésions du cartilage articulaire chez l'Homme et chez le cheval. Une utilisation dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage pourra aussi être envisagée. En effet, chez l'Homme, l'impact économique de l'arthrose représente près de 2 milliards d'euros par an pour la France. Les enjeux économiques et sanitaires de

la recherche sur la thérapie cellulaire, l'ingénierie tissulaire du cartilage et la nutraceutique chez l'Homme et le cheval sont majeurs.

Résultats

I. Première partie : Article #1

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

Rodolphe Rakic, **Bastien Bourdon**, Magalie Hervieu, Thomas Branly, Florence Legendre, Nathalie Saulnier, Fabrice Audigié, Stéphane Maddens, Magali Demoor, Philippe Galéra.

1. Objectifs de l'article #1

Le cheval, tout comme l'Homme, est sujet aux affections locomotrices. Ces affections engendrent d'importantes pertes économiques pour l'ensemble de la filière équine, avec un impact financier de 2 milliards d'euros par an. Chez le modèle équin, l'arthrose se développe, le plus souvent, à partir de micro-lésions dues à des chocs, ou encore, une sursollicitation de l'articulation. Néanmoins, d'autres facteurs peuvent être à l'origine de l'arthrose équine, comme, par exemple, les facteurs génétiques, le surpoids de l'animal, Ainsi, les chevaux sportifs, véritables athlètes de haut niveau, sont d'autant plus soumis au risque de développer une arthrose.

Les thérapies cellulaire et tissulaire du cartilage sont des avancées majeures en terme de médecine régénératrice. La TCA, méthodologie dominante de ces thérapies cellulaires a permis d'aboutir à la « Matrix-induced autologous Chondrocyte Implantation » ou MACI, dernière génération de la TCA optimisant la différenciation en chondrocytes. Cette évolution ouvre de multiples stratégies et perspectives afin de stabiliser le phénotype chondrocytaire.

Fort du développement de ces technologies, le laboratoire a déposé un brevet en 2012, portant sur une stratégie de redifférenciation de chondrocytes articulaires humains arthrosiques dont la dédifférenciation a été accrue lors de leur amplification en monocouche inhérente aux stratégies de TCA. Différentes études ayant validé la faisabilité technique de la TCA chez le cheval, avec des effets bénéfiques à moyen terme, nous avons entrepris la redifférenciation des chondrocytes articulaires équins,

tout en étant conscients des nombreuses limites liées à ce modèle : limitation des outils moléculaires disponibles, approvisionnement cellulaire, ...

Cet article a donc visé à transposer le protocole de redifférenciation chondrocytaire, mis au point chez l'Homme, au modèle équin. La stratégie de redifférenciation des chondrocytes équins a consisté à les cultiver en 3D, en présence de BMP-2 dans un environnement hypoxique. Nous avons évalué l'expression, et la quantité protéique accumulée au sein de notre modèle d'organoïde cartilagineux, des molécules caractéristiques (*Col2a1*, *Acan*, ...) et atypiques (*Col1a1*, *Htra1*, *Mmp13*, ...) du cartilage articulaire hyalin néosynthétisées par les chondrocytes redifférenciés. Enfin, puisque certaines molécules non caractéristiques persistaient, principalement le collagène de type I et la protéase à sérine HtrA1, nous avons développé une stratégie d'interférence par l'ARN ciblant ces molécules afin de générer un substitut cartilagineux qui puisse être de la nature la plus hyaline possible.

2. Article #1



Article

RNA Interference and BMP-2 Stimulation Allows Equine Chondrocytes Redifferentiation in 3D-Hypoxia Cell Culture Model: Application for Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation

Rodolphe Rakic^{1,2}, Bastien Bourdon¹, Magalie Hervieu¹, Thomas Branly¹, Florence Legendre¹, Nathalie Saulnier², Fabrice Audigie³, Stéphane Maddens², Magali Demoor¹ and Philippe Galera^{1,*}

¹ Normandie Université, UNICAEN, Laboratoire Microenvironnement Cellulaire et Pathologies (MILPAT), équipe Microenvironnement des Pathologies Dégénératives et Fibrotiques (MIPDF), EA 4652/BIOTARGEN EA 7450, UFR Santé, Université de Caen Normandie, 14032 Caen, France; rodolphe.rakic@gmail.com (R.R.); bourdon.bas@laposte.net (B.B.); magalie.hervieu@gmail.com (M.H.); tbranly@gmail.com (T.B.); florence.legendre@unicaen.fr (F.L.); magali.demoor@unicaen.fr (M.D.)

² Vetbiobank, 1 Avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France; n.saulnier@vetbiobank.com (N.S.); s.maddens@vetbiobank.com (S.M.)

³ Imaging and Research Centre of Equine Locomotor Disorders (CIRALE, 14430 Goustranville, France), Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 94704 Maisons-Alfort, France; fabrice.audigie@vet-alfort.fr

* Correspondence: philippe.galera@unicaen.fr; Tel.: +33-9-6757-0191

Received: 20 July 2017; Accepted: 22 August 2017; Published: 24 August 2017

Abstract: As in humans, osteoarthritis (OA) causes considerable economic loss to the equine industry. New hopes for cartilage repair have emerged with the matrix-associated autologous chondrocyte implantation (MACI). Nevertheless, its limitation is due to the dedifferentiation occurring during the chondrocyte amplification phase, leading to the loss of its capacity to produce a hyaline extracellular matrix (ECM). To enhance the MACI therapy efficiency, we have developed a strategy for chondrocyte redifferentiation, and demonstrated its feasibility in the equine model. Thus, to mimic the cartilage microenvironment, the equine dedifferentiated chondrocytes were cultured in type I/III collagen sponges for 7 days under hypoxia in the presence of BMP-2. In addition, chondrocytes were transfected by siRNA targeting *Col1a1* and *Htra1* mRNAs, which are overexpressed during dedifferentiation and OA. To investigate the quality of the neo-synthesized ECM, specific and atypical cartilage markers were evaluated by RT-qPCR and Western blot. Our results show that the combination of 3D hypoxia cell culture, BMP-2 (Bone morphogenetic protein-2), and RNA interference, increases the chondrocytes functional indexes (*Col2a1/Col1a1*, *Acan/Col1a1*), leading to an effective chondrocyte redifferentiation. These data represent a proof of concept for this process of application, in vitro, in the equine model, and will lead to the improvement of the MACI efficiency for cartilage tissue engineering therapy in preclinical/clinical trials, both in equine and human medicine.

Keywords: chondrocyte; tissue engineering; equine model; dedifferentiation; matrix-associated autologous chondrocyte implantation (MACI); BMP-2; hypoxia; siRNA; *Col1a1*; *Htra1*; type II collagen

1. Introduction

Cartilage defects caused by traumas, focal lesions, or articular overstress, are the leading cause of osteoarthritis (OA) development. This incurable pathology generates pain, walking-related disability,

and high morbidity. The poor intrinsic cartilage self-repair is not able to prevent the ineluctable tissue degradation. Chondrocytes, the major cartilage cell type, synthesize an abundant extracellular matrix (ECM), mainly composed of two specific phenotypic markers (type II collagen and aggrecan). During OA, the primary chondrocyte response to the inflammatory microenvironment is a change in its normal secretome, leading to the decreased expression of cartilage specific markers and matrix metalloproteinases synthesis. ECM remodeling occurs, resulting in an ineluctable homeostasis loss. In parallel, chondrocytes dedifferentiate and express the fibrotic type I collagen, leading to fibrocartilage of poor quality.

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

In the past decades, advances in regenerative medicine have led to the emergence and improvement of new generations of therapies based on tissue engineering [5]. Among these approaches, matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI) has been established as an attractive and hopeful therapy [6,7] for treating cartilage defects in horses [8–10]. Such therapy combining the use of chondrocytes and biomaterials is minimally invasive and shows promising results for cartilage healing, both in humans and horses [11]. Although good outcomes have been reported, MACI still has some limitations and disadvantages. In particular, this technique requires a substantial number of chondrocytes that lose their phenotype during *in vitro* amplification, a phenomenon called dedifferentiation [12–14]. In this sense, during expansion in monolayers, the chondrocytes dedifferentiate into fibroblast-like cells, and stop expressing cartilage specific markers, such as type II collagen or aggrecan [15,16]. Concomitantly, they secrete catabolic mediators and regulators [17–19]. The imbalance between anabolism and catabolism leads to cell homeostasis disruption [20]. Furthermore, following long term culture, dedifferentiated chondrocytes produce fibrotic type I collagen in an exacerbated manner [13]. Consequently, the newly synthesized cartilage substitute does not own the same biomechanical and physiological properties compared to the hyaline articular cartilage [21].

Two major *in vitro* strategies have been investigated in order to optimize the mature chondrocyte phenotype for MACI: the maintenance of the mature chondrocyte phenotype during extensive cell culture [22], or the chondrocyte redifferentiation after extensive cell culture. The present study particularly focused on the improvement of the redifferentiation process by finely controlling some cellular microenvironment parameters, which are key regulators of chondrocytes' behaviour [22].

It was demonstrated that high cell density three-dimensional (3D) cultures, in combination with hypoxia, support redifferentiation of dedifferentiated articular chondrocytes. Hypoxia is known to act on type II and type X collagen expression [23]. Indeed, low oxygen tension during chondrocyte culture is able to stabilize cell phenotype by favoring the mature chondrocyte phenotype and preventing hypertrophy [24,25]. Additionally, cell culture with selective growth factors and cytokines appropriately supplemented, plays a major role in the regulation of anabolic and catabolic chondrocyte activities. In particular, members of the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily may exert a dual role on chondrocyte development. Among them, bone-morphogenetic-proteins (BMPs) such as BMP-2 is used as a pro-chondrogenic factor at low concentration [26], allowing the recovery of type II collagen and aggrecan syntheses by chondrocytes [27,28]. Although BMP-2 contributes to the redifferentiation of articular chondrocytes, it also simultaneously induces type I collagen chondrocyte expression [29]. This overexpression of both collagen isoforms prevents high biological quality of extracellular matrix (ECM) synthesis.

On the other hand, BMP-2 cellular responses can be affected by high-temperature requirement A serine peptidase 1 (Htra1), a serine protease. Indeed, Htra1 is able to inhibit TGF- β family signalling via proteolytic activity, and can play a role in BMP-mediated redifferentiation of chondrocytes [20,30,31]. Furthermore, among the catabolic events, the serine-protease Htra1 seems to have important roles in OA development, ECM remodelling and cell fate [30–34]. This is corroborated by the fact that Htra1 is expressed by chondrocytes, is up-regulated during OA, and is present at high levels in synovial fluid, and seems, as a consequence, to contribute to OA development and change in cartilage composition [35,36].

Autograft synthesis, based on chondrocyte redifferentiation mediated by BMP-2, leads to fibrotic and pro-catabolic cartilage substitutes. To limit this problem, specific inhibition of atypical markers of fibrocartilage is necessary. Some studies have shown that RNA interference can finely modulate the chondrocyte phenotype in vitro, but these investigations are all based on the fundamental aspect of cell biology, and not on the context of applied biology [37–39]. Here, we used a multifactorial strategy, based on the use of 3D cell culture in type I/III collagen sponges and BMP-2 stimulation under hypoxia condition [40]. To counteract the up-regulation of type I collagen induced by BMP-2, and the Htra1 induction in culture, we used a specific and transient RNA interference approach, targeting *Col1a1* and *Htra1* mRNA (Figure 1).

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

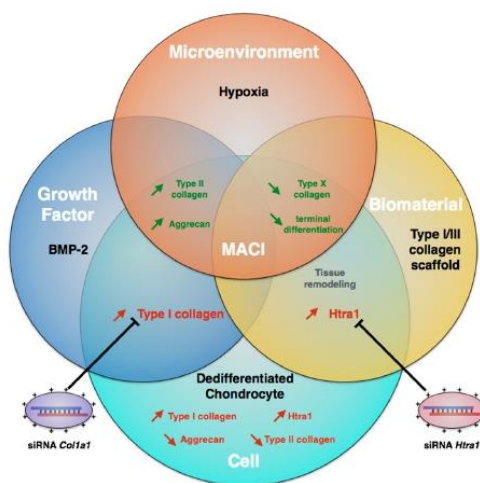


Figure 1. Improvement of BMP-2 (Bone morphogenetic protein-2) mediated matrix-associated autologous chondrocyte implantation (MACI) process based on RNA interference. MACI is a tissue engineering method involving different parameters: biomaterial, cells, and exogenous stimuli (growth factors and cellular microenvironment). To induce chondrocyte redifferentiation, chondrocytes are cultured in 3D-Hypoxia conditions and treated with BMP-2. To counteract side effects of BMP-2 mediated redifferentiation, RNA interference targeting *Col1a1* and *Htra1* can be used to avoid fibrotic and catabolic evolution of the MACI process. The red arrows represent the atypical comportment of chondrocyte and deleterious effects whereas green arrows represent positive effects on the specific expression of hyaline articular cartilage components.

2. Results

2.1. Loss of Equine Articular Chondrocyte Phenotype during Amplification

To evaluate chondrocyte phenotype recovery after amplification, eAC isolated from equine cartilage were cultured for 11 passages. During the subculture, eAC lose their classical polygonal shape after only 2 passages, and exhibit cytoplasmic elongations characteristic of fibroblastic-like cells (Figure 2A,B). Concomitantly, the doubling time of eAC decreases drastically by 3-fold at P3 compared to P0, and then remains constant until P7 (Figure 2C). During the sub-cultures, the cartilage specific markers were lost. Indeed, the relative mRNA levels of *Col2a1*, *Acan*, and *Sox9* decrease overall from P2 (Figure 2D–F; respectively 33-fold, 10-fold, and 5-fold between P0 and P2) as well as *Col10a1* (17-fold between P0 and P2) (Figure 2H). *Col2a1* mRNA level was strongly repressed after P2. In parallel, the steady-state amounts of the atypical *Col1a1* mRNA strongly increase (43-fold at P1 versus P0) (Figure 2G). Data were normalized to P0 cells in these experiments, and very weak amounts of *Col1a1* mRNA were nonetheless detected in primary cells (P0) in some cases. We supposed that enzymatic digestion for cell isolation induces a slight stress to chondrocytes, which express *Col1a1* mRNA de novo. However, no detection of type I collagen protein was observed in native cartilage protein extracts used as control (data not shown). The catabolic markers *Htra1* and *Mmp13* are transiently more highly expressed, from P4 to P6 (Figure 2J,K). Meanwhile, *Runx2* mRNA is strongly overexpressed after P4 (Figure 2I), whereas *Alpl* mRNA is not modulated (Figure 2L). Only primary eAC (P0) is able to express type II procollagen (Figure 2M).

2.2. Combination of 3D-Cell Culture, Hypoxia, and BMP-2 Treatment Allows the Recovery of Cartilage Specific Marker Expression by eAC, but Does Not Abolish the Fibrotic and Catabolic Components

Because the microenvironment strongly influences chondrocyte phenotype, our strategy intended to be closer to the cellular context observed in native hyaline articular cartilage. In the latter, oxygen tension oscillates between 6% and 1% O₂ [41]. Thus, after chondrocyte dedifferentiation, cells were cultured for 7 days in type I/III collagen sponges under hypoxia (2–4% O₂). First, we observed that only *Htra1* mRNA expression is significantly enhanced by 3D/hypoxia cell culture, compared to the 2D culture in normoxia (10-fold increase between 2D and 3D/hypoxia conditions) (Figure 3). Differences between monolayer cultured cells and 3D basal culture conditions show that the latter, which induces rapid *Htra1* mRNA increase, is reminiscent of its homology with stress-induced HTRA proteases family [42]. Moreover, 3D culture weakly enhances the transcription of *Col2a1*, *Acan*, and *Col1a1*, even though it is not statistically significant, without modulating the steady-state amount of *Col10a1* mRNA.

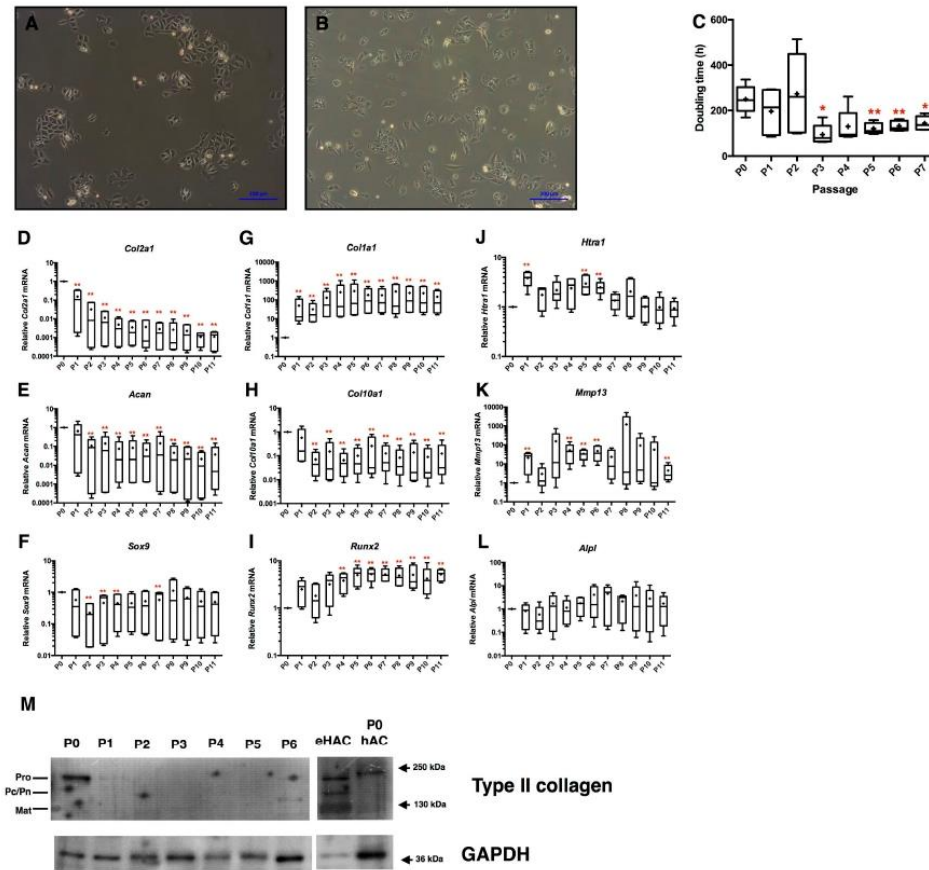


Figure 2. Equine articular chondrocytes become more proliferative and lose their specific expression profile during dedifferentiation. Phase-contrast microscopy of primary chondrocytes (A) and P3 chondrocytes (B) cultured in monolayers (magnification $\times 10$). eAC isolated from equine cartilage were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

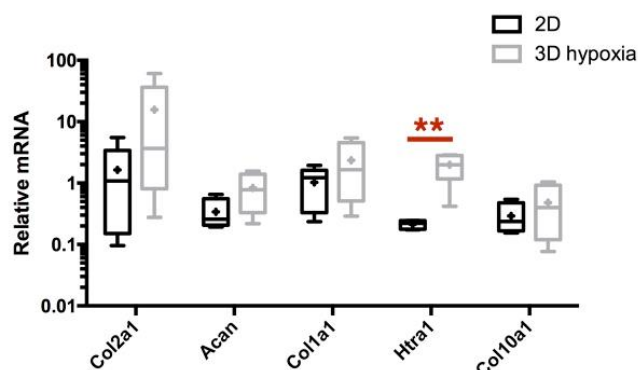


Figure 3. eAC 3D culture in type I/III collagen sponges under hypoxia induces some changes in the expression of cartilage markers of interest. After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were placed in hypoxia during 7 days (3D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

To try to allow for better recovery in the expression of chondrocyte-specific markers, eAC were incubated in the presence of BMP-2 (50 ng/mL) and 3D/hypoxia cultured cells were used as control (Ctrl). In these experimental conditions, BMP-2 strongly enhances the *Col2a1* and *Acan* mRNA expression (respectively 219-fold and 8-fold compared to D0), but also *Col1a1* mRNA (8-fold) (Figure 4A–C). The effect on *Col1a1* mRNA explains the low change of *Col2a1/Col1a1* ratio (5-fold increase) and *Acan/Col1a1* ratio (not significant) used as functional indexes of the cartilage ECM (Figure 4D,E). Interestingly, while relative *Htra1* mRNA increases during the 7-day period of culture ($p < 0.05$ for Ctrl compared to D0), the BMP-2 treatment is able to significantly decrease the steady-state amounts of *Htra1*, by 3-fold compared to Ctrl (Figure 4F). Likewise, the relative mRNA levels of *Col10a1* are repressed by BMP-2 treatment. Furthermore, no significant modulation of total protein content was observed upon BMP-2 incubation. Nevertheless, an increasing trend seems to be detectable (Figure S1).

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

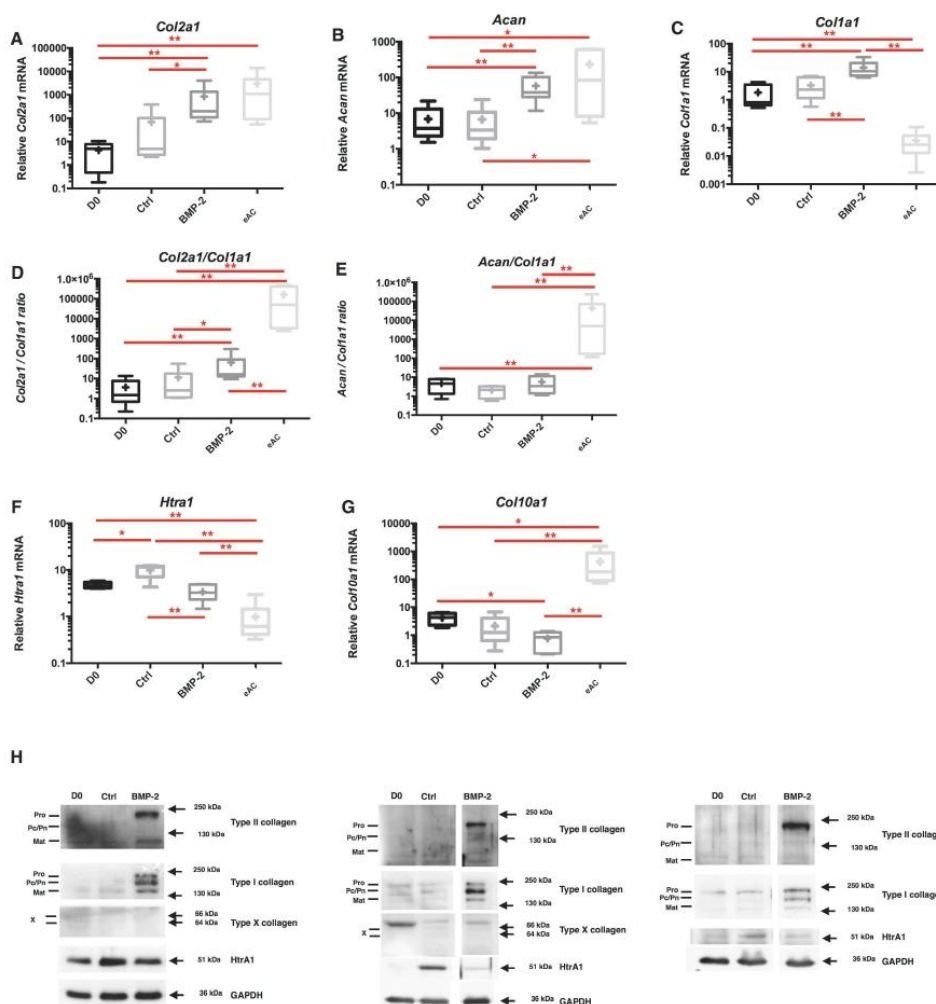


Figure 4. 3D culture, hypoxia and BMP-2 stimulation of eAC allow the expression recovery of cartilage specific markers. After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were incubated in hypoxia and treated with BMP-2 (BMP-2) (50 ng/mL)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

2.3. Design of siRNA

Due to the fibrotic and catabolic effects of BMP-2 induced MACI process in eAC, a strategy of RNA interference has been developed on the basis of the study performed with human articular chondrocytes [40]. However, to achieve the proof of concept in horse chondrocytes, there is need for a technological transfer towards the equine model. In fact, new designs of siRNA and dose-effects of each siRNA have been performed. Equine *Htra1* siRNA (si*Htra1*) has been previously designed and functionally tested, and the data demonstrate that it provokes an efficient inhibition of its target (Figure 5A and data not shown). More attention was devoted to *Col1a1* siRNA (si*Col1a1*) efficiency evaluation, due to the complex transcriptional and post-transcriptional regulation of this gene.

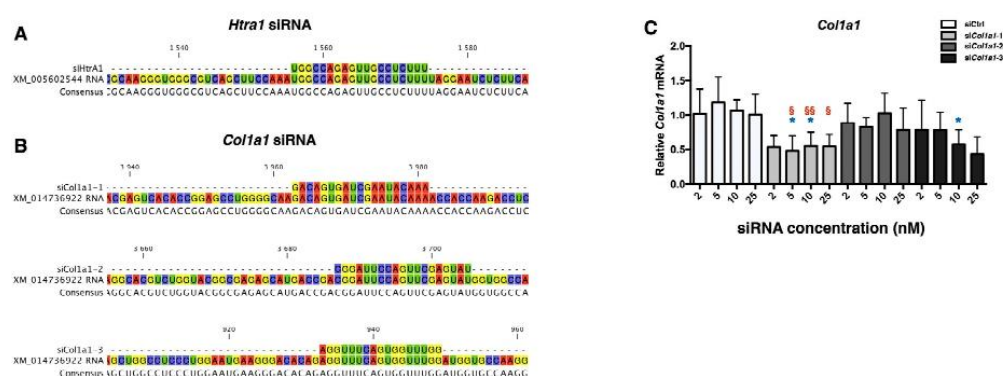


Figure 5. siRNA design and efficiency determination of *Col1a1* siRNA. Sequence alignment between *Htra1* siRNA (A) or the three *Col1a1* siRNA (B) and their respective mRNA targets are presented. XM_005602544: predicted *Equus caballus* Htra serine peptidase 1 (*Htra1*), mRNA NCBI reference sequence. XM_014736922: predicted *Equus caballus* collagen, type I $\alpha 1$ (COL1A1), mRNA NCBI reference sequence. Software: CLC sequence viewer. After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were transfected by different concentrations of three *Col1a1* siRNA in hypoxia and treated with BMP-2 (50 ng/mL) for 7 days (C). The relative expression of *Col1a1* mRNA was determined by RT-qPCR. Cells transfected with a negative control siRNA were used as control (siCtrl). All the results are normalized against BMP-2 treated cells without transfection, and are presented as the relative expression of each gene. The data represent three independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences between siCtrl and siCol1a1 transfected cells at the same siRNA concentration are determined using unpaired (* $p < 0.05$) or paired T-test (§ $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$).

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

2.4. RNA Interference Targeting Col1a1 Improves eAC Specific Phenotypic Profile during the MACI Process

si*Col1a1* transfection inhibits *Col1a1* mRNA expression with or without BMP-2 treatment, respectively 72% and 57% of inhibition, compared to the respective siCtrl conditions (Figure 6A). The experiments, taken one by one, have demonstrated that if more *Col1a1* mRNA is expressed in eAC,

then si*Col1a1* is more effective (Figure S3). By contrast, si*Col1a1* induced no significant effect on the relative expression of *Col2a1*, *Acan*, *Mmp13*, and *Htra1* (Figure 6B,C and Figure S4). The biological gain of *Col1a1* mRNA inhibition is visible on the functional indexes *Col2a1/Col1a1* and *Acan/Col1a1* (Figure 6D,E). Thus, the *Col2a1/Col1a1* ratio is increased by 27-fold under si*Col1a1* + BMP-2 treatment, compared to siCtrl without BMP-2 treatment, vs. 8-fold for the siCtrl eAC + BMP-2 condition. The same trend is also observed for the *Acan/Col1a1* ratio.

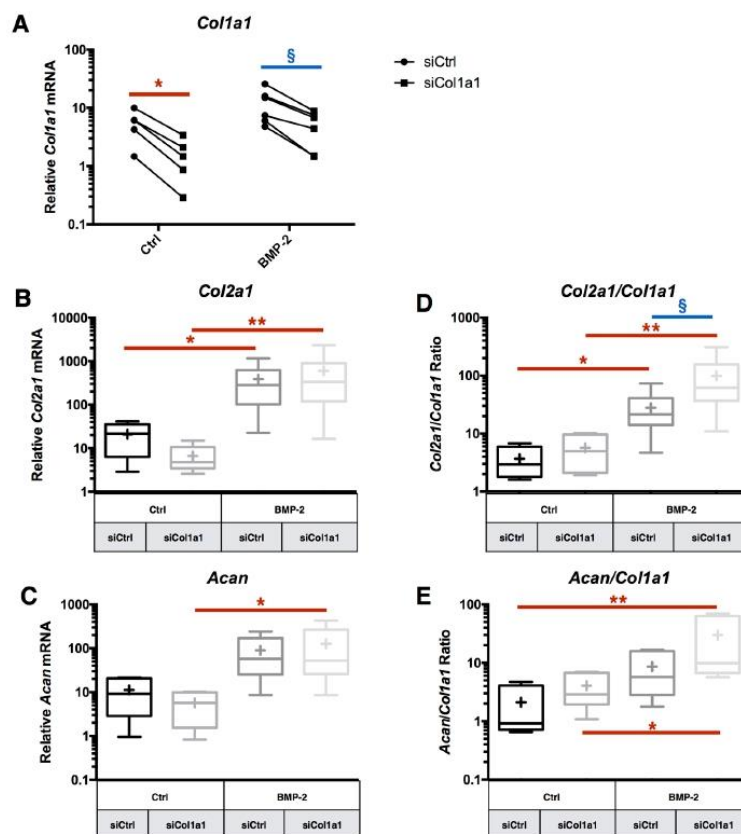


Figure 6. RNA interference targeting *Col1a1* is able to enhance transcriptome quality of chondrocytes. After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were transfected by 5 nM of *Col1a1* siRNA (si*Col1a1*) in hypoxia and treated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

2.5. RNA Interference Targeting *Htra1* Can Modulate the eAC Catabolic Process during Chondrocyte Redifferentiation

Htra1 siRNA treatment provokes a decrease on its mRNA in eAC compared to siCtrl treatment. Indeed, a 64% inhibition by the *Htra1* siRNA is observed when the cells are not treated with BMP-2, and 34% for BMP-2 treated cells (Figure 7A). Even if the siRNA inhibition of *Htra1* is present for the

independent experiments (except for one), it seems that this inhibition is lower when the cells are treated with BMP-2. This can be explained by the fact that BMP-2 already decreases *Htra1* mRNA at a comparable basal level of transcription observed in cells cultured as monolayers. Thus, a higher inhibition can be technically difficult to obtain in eAC. Additionally, no significant effect is detected on the relative mRNA expression of *Acan* and *Mmp13* mRNA after *siHtra1* transfection (Figure 7D and Figure S5). Interestingly, *siHtra1* induces a significant decrease of the relative amounts of *Col1a1* mRNA in the absence of BMP-2, and it provoked an inhibition of *Col2a1* mRNA, with or without BMP-2 (Figure 7B,C). Nevertheless, the functional indexes *Col2a1/Col1a1* and *Acan/Col1a1* are not significantly affected by the *siHtra1* treatment (Figure 7E,F).

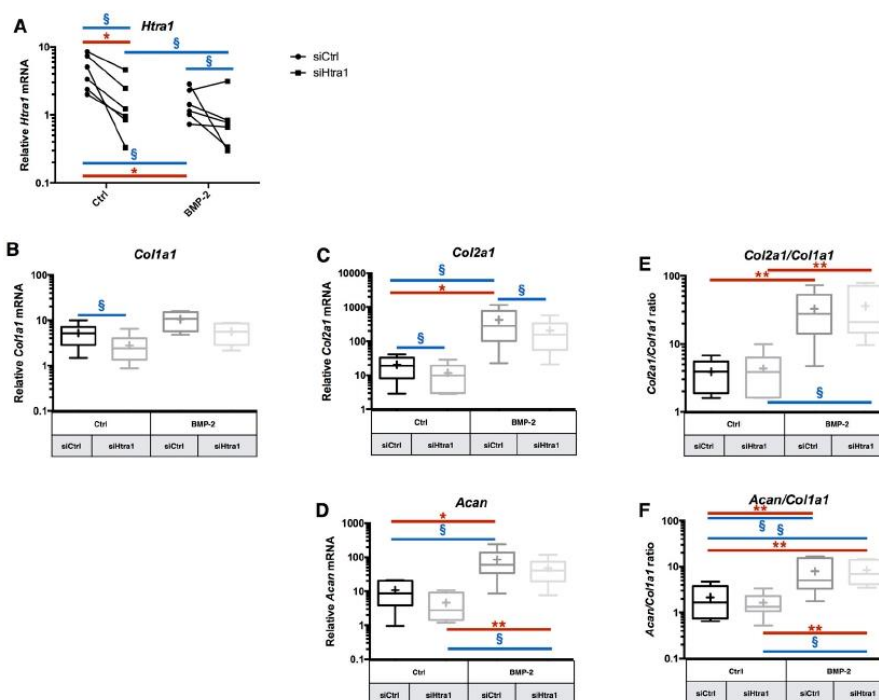


Figure 7. Effects of RNA interference targeting *Htra1* on the expression of this atypical marker during chondrocyte redifferentiation. After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were transfected by 5 nM of *Htra1* siRNA (*siHtra1*) in hypoxia and treated with BMP-2 (50 ng/mL) (BMP-2) or not (Ctrl) for 7 days. Relative mRNA expression of *Htra1* (A), *Col1a1* (B), *Col2a1* (C), and *Acan* (E) were determined by RT-qPCR. The quality indexes of the neocartilage *Col2a1/Col1a1* (D) and *Acan/Col1a1* (F) were also calculated. siCtrl represents cells transfected with a negative control siRNA. All the results are normalized versus eAC cultured in monolayer, and presented as the relative expression of each gene. Box plots represent five independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences are determined using the Mann–Whitney test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) or the Wilcoxon signed-rank test (§ $p < 0.05$).

2.6. RNA Interference during the MACI Process Increases the Quality of the ECM Synthesized by eAC

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

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

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

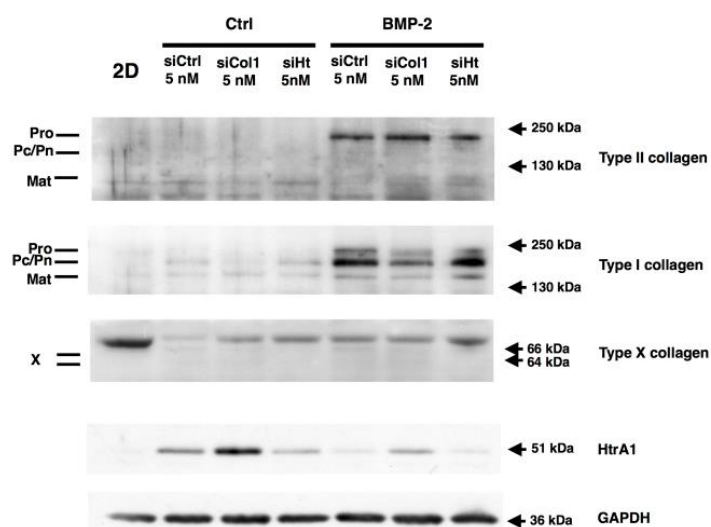


Figure 8. RNA interference targeting *Col1a1* and *Htra1* is able to decrease the expression of these atypical markers during chondrocyte redifferentiation. After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were transfected by 5 nM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

2.7. Chondrocyte Redifferentiation Mediated by BMP-2 Can Be Modulated by Both *Col1a1* and *Htra1* siRNAs

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

The double siRNA interference was efficient on their respective targets by strongly inhibiting atypical *Htra1* and *Col1a1* expressions mediated by BMP-2 (Figure 9A,B). Both siRNA treatments show no differences in the relative amounts of *Acan* and *Col2a1* compared to BMP-2 treated cells. The global quality of ECM markers is enhanced, as demonstrated, by the evaluation of *Acan/Col1a1* and *Col2a1/Col1a1* ratios, when we compare the double interference strategy + BMP-2 with BMP-2 treatment only (Figure 9D,F). At the protein level, the siRNAs effects are also effective on the global type I collagen and HtrA1 syntheses, thereby improving the quality of the neo-synthesized chondrocyte ECM (Figure 9I,J).

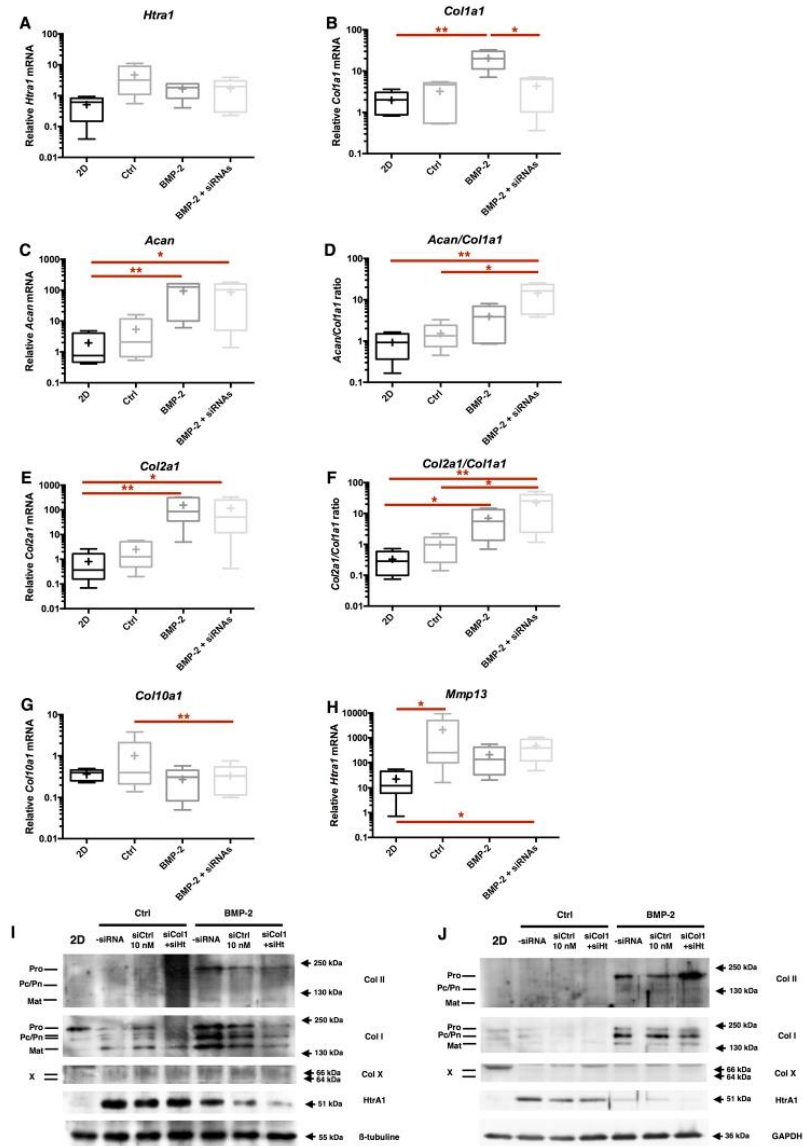


Figure 9. RNA interference targeting *Col1a1* and *Htra1* induces changes in BMP-2 eAC response. After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were transfected by 5 nM of both *Col1a1* siRNA and *Htra1* siRNA (siRNAs) in hypoxia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

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

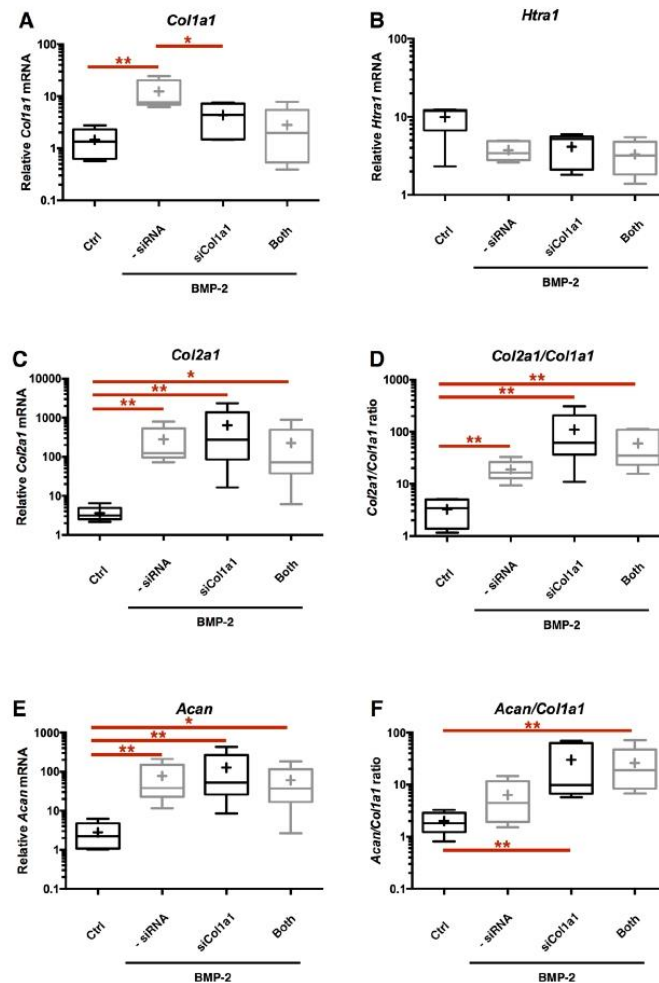


Figure 10. No benefit is detected in the *Col2a1/Col1a1* and *Acan/Col1a1* ratios during co-transfection of both *Col1a1-Htra1* siRNAs, compared to the *siCol1a1* alone. After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were placed in hypoxia and treated with BMP-2 (50 ng/mL) for 7 days. eAC were transfected with *siCol1a1*, a combination of *siCol1a1* and *siHtra1* (Both), or not transfected (-siRNA). Relative mRNA amounts of *Col1a1* (A), *Htra1* (B), *Col2a1* (C), and *Acan* (E) were determined by RT-qPCR. All the data are normalized versus eAC cultured in monolayer, and presented as the relative expression of each gene. The quality indexes of the neocartilage *Col2a1/Col1a1* (D) and *Acan/Col1a1* (F) are presented. Box plots represent five independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences are determined using the Mann–Whitney test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3. Discussion

Chondrocytes remain the best cell source used in cartilage tissue engineering. Although new advanced therapies based on MACI are actively developed, like the use of MSCs (Mesenchymal stromal cells), some basic knowledge must be developed for tissue engineering use [43]. Previous studies achieved in the laboratory show that MSCs can be a promising source, as they present a high chondrogenic potential; however, a high level of type I collagen synthesis is also detected [44]. For this reason, in the case of chondrocytes and MSCs, particular attention must be given to the fibrotic aspect for their use in cartilage tissue engineering.

It is in this perspective that our previous research was based on the inhibition of the fibrotic process during neocartilage substitute generation, *in vitro*, with cells of human origin [29,40,45]. In these studies with human chondrocytes, *in vivo* experiments were realized in the nude mouse model by subcutaneous implantation of neocartilage substitutes. Despite the encouraging results obtained, this animal model is not the most relevant. Indeed, subcutaneous location does not present the same oxic conditions compared to articular cartilage. Furthermore, we observed, during these experiments, some invasion of mouse fibroblasts into the implant. To consider pre-clinical trials for the human model, we must perform the validation process in *in vivo* experiments in a larger mammalian animal. Cartilage diseases of the horse, the accessibility of its joints and its similar cartilage physiopathology compared to human, from a structural and cellular point of view, indicate that this animal represents a better mammalian model for *in vivo* implantation studies, compared to murine models. The main objective of the present study was to ensure the proof of concept in chondrocytes from horse origin, which also represents an excellent large animal model, concerning pathologies of the musculoskeletal system and articular disorders.

The use of an equine model comes with some technical limitations, such as the lack of molecular and biological tools compared to human research. Nevertheless, genome homologies between human and horse, and the high sequencing quality of *Equus caballus*, allows for the technological transfer between these two species [46]. Our present study highlights some subtle cellular differences during experiments. We have noticed that eAC numbers, and their viability after isolation from the cartilage, are substantially increased, as well as their proliferation, and the RNA and protein contents of the cells, when compared to human cells. During experiments, certain cell strains were amplified up to P16 without loss of proliferation. The high proliferation potential of eAC can represent an advantage in the MACI process that requires a great number of cells. Interestingly, cryopreservation of eAC at early passages is possible, while it remains more difficult for human AC, especially for those obtained from OA donors. These characteristics are not only explained by the use of different mammalian models, but more likely, by the homogeneity of the cartilage biopsies coming from healthy young or adult horses. This has the advantage of limiting cell variability related to cellular ageing, which is hardly possible in human research, since most of the samples are obtained after knee replacement by prosthetic surgery on aged subjects [47].

In this study, we have analyzed the impact of chondrocyte amplification on the cartilage ECM synthesis capacity of eAC. This cellular phenomenon is one of the most important limitations in the MACI procedure. We show that deep changes in phenotype are observed up to P3, particularly with the loss of chondrocyte marker expression. The monolayer amplification of eAC also induces type I collagen synthesis and catabolic events enhancement, as previously demonstrated in the princeps article [12,13]. Even if the *Col1a1* transcription is increased, type I collagen protein synthesis has not been demonstrated. One possible explanation is, that it has been seen that type I collagen expression appears after 21 days in confluent monolayer cultures like for hAC [13]. In our study, the time lapse between two passages is not of a sufficient magnitude to allow for type I collagen secretion, due to the rapid cell confluency reached by the eAC. It must be noted that *Col10a1* mRNA is only expressed during early passages. These observations can be explained by the fact that the cartilage biopsies were collected in order to maximize the number of cells harvested. Hypertrophic and superficial zones of articular cartilage were not split. Some traces of hypertrophic chondrocytes probably persist after cell

isolation, but these cells enter in apoptosis during early amplification. Chondrocyte is a particular cell type that evolves in low oxygen tension. In addition to favoring the expression of chondrocyte markers, it has been shown that hypoxia inhibits terminal differentiation during chondrogenesis of MSC [23,24]. These findings can explain the absence of type X collagen expression during all our experiments.

During our chondrocyte redifferentiation experiments, we have used type I/III collagen scaffolds, a biomaterial already clinically used in MACI, but also in other tissue engineering therapies, including tooth, skin, and intestinal tissues [48–50]. Collagen sponges have the advantage of being easily adjustable to the thickness of the cartilage defect, and of preventing cellular loss by migration [51]. Moreover, it does not induce host reaction compared to type II collagen scaffolds [52], and 50% of this biomaterial is degraded after two weeks of implantation. Nevertheless, new advanced biomaterial innovations in MACI will have to take into account new functional supports which can interact with chondrocytes and control the delivery of growth factors or other biological actors [53].

To obtain the chondrocyte redifferentiation after monolayer cultures, 3D, and hypoxia, even though they both favor type II collagen synthesis [23], they do not allow for sufficient expression to lead to the conclusion that redifferentiation is optimal. We previously showed that IGF-I and TGF- β 1 can be used to favor type II collagen expression in dedifferentiated chondrocytes, but they also induce hypertrophic and/or fibrotic markers of cartilage [45,54]. However, BMP-2 seems to remain the best candidate for significantly enhancing mature chondrocyte phenotype during redifferentiation. Type I collagen up-regulation induced by BMP-2, and the dedifferentiation process, can be limited by an RNA interference strategy, since transfection of a *Col1a1* siRNA can greatly enhance the matrix cartilage quality, by increasing the *Col2a1/Col1a1* as well as *Acan/Col1a1* ratios. The inhibition concerned preferentially the type I procollagen form that may chronologically affect mature forms at a longer term after implantation.

Difficulties have been encountered in *Col1a1* siRNA design and experiments. Due to the sequence homologies between *Col1a1* and *Col2a1*, the strong up-regulation of *Col1a1* forced us to perform a fine design of the siRNA. Thus, a total of five siRNAs have been designed and tested, and only one *Col1a1* siRNA proves to be specifically efficient. To better understand the observed problems, alignments between *Col1a1* siRNA sequences and mRNA secondary structure predictions have been realized (Figure S7). It seems that the ineffective siRNA targets steric hindrance zones, making RNA interference difficult. To maximize siRNA efficiency, the secondary structure of mRNA targets must be considered with great care [55–57].

Even though the *Col1a1* siRNA proves to be efficient in redifferentiated eACs, another relevant type I collagen mRNA interference could be developed for a significant increase in the mRNA knockdown. This interference should also be based on the *Col1a2* mRNA inhibition, concomitantly or not with the *Col1a1* knockdown, which takes into account the stoichiometric point of view. This hypothesis is based on the fact that pro α 1 chains of type I collagen cannot associate with pro α 2 chains if the 2:1 stoichiometry is not respected; homotrimers of pro α 1(I) chains will be degraded as a result of intracellular degradation. This process should lead to greater efficiency compared to *Col1a1* mRNA interference alone [58]. Other approaches may likewise be investigated, such as the use of imperfectly matched siRNA, which demonstrates a better mRNA target silencing [59].

Concerning the serine protease HtrA1, another undesirable marker which was over-expressed in osteoarthritis and associated with chondrocyte dedifferentiation, interestingly, we unambiguously and originally demonstrated that BMP-2 induces its down-regulation. No previous studies reported in the literature describe such an effect, and HtrA1 inhibition mediated by this chondrogenic factor was not observed in our previous study on hAC [29]. The differences between these two studies can perhaps be explained by the fact that the human chondrocytes used came from aged donors. Data from the literature demonstrated that TGF- β 1 is able to induce HtrA1 [60], and that HtrA1 can interfere with BMP-2 signalling [61]. Nevertheless, our current studies carried out on equine bone marrow MSCs show that the concomitant BMP-2/TGF- β 1 treatment during chondrogenic differentiation induces a

strong inhibition of HtrA1 protein synthesis compared with untreated MSCs [62], such as BMP-2 in the eAC of the present investigation.

Htra1 siRNA interference, which was initially privileged because of the association of this serine protease to chondrocyte dedifferentiation and OA, was found to be highly effective. *siHtra1* inhibition, added to the BMP-2 effect on HtrA1 strongly limited its presence. In addition, due to the fact that HtrA1 can degrade hyaline cartilage ECM components, HtrA1 is indirectly implicated in pericellular matrix degradation of the chondrocyte [36], and induction of MMP-13 collagenase [60]. Even though the relationship between MMP-13 and HtrA1 cannot be significantly proved, analysis of each of our independent experiments seems to demonstrate that inhibition of HtrA1 by BMP-2 or *Htra1* siRNA always induces a parallel decrease of the steady-state amounts of *Mmp13* mRNA (Figure S8).

Even if the *Htra1* siRNA is efficient, and *Htra1* and *Col1a1* siRNA combination leads to a functional index increase, the use of this siRNA cocktail does not seem to be the most favorable strategy. Indeed, it appears that the use of both siRNA decreases all the ECM components of the neocartilage substitute, and provokes a partial loss of the BMP-2 benefit. An ambiguity in the BMP-2 effect on HtrA1 expression and *Htra1* inhibition on the global behavior of chondrocytes may be supposed, in the sense that HtrA1 could play a bifunctional role in chondrocyte phenotype. Tiaden et al. have shown that HtrA1 plays a crucial role in osteogenesis by the positive regulation of matrix mineralization with its catabolic activity [33], and shows that the concentration of HtrA1 protein in chondrocytes near bone callus during new bone formation is important, suggesting its implication in both chondrogenesis and endochondral ossification. However, it remains to be established if the *Htra1* RNA interference cannot specifically favor chondrocyte phenotype stabilization, as demonstrated in our present study, by preventing/counteracting its osteogenic positive effects in the context of bone repair.

Furthermore, investigation of experimental HtrA1 phenotype models, using in silico human database analysis by GenomeRNAi [63], shows that HtrA1 (PRSS11) can act as a down-regulator of the Wnt signalling pathway, following Wnt3A stimulation. This result has been extracted from RNAi screening studies on Wnt/ β -Catenin in different cell lines [64]. This signalling pathway has been described as an important actor of MSC fate, BMP-2 signalling, and terminal differentiation of chondrocyte [65,66].

The data from the literature, along with our results on *siHtra1* use, suggest that this serine protease, other than/with the exception of ECM remodelling and TGF- β response modulation, may play a role in chondrocyte phenotype stabilization, or the differentiation status. It would be interesting to study the impact of HtrA1 inhibition on the induction of chondrogenesis in MSCs, to try to elucidate the functional role of this serine protease in the mature chondrocyte phenotype.

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

4. Materials and Methods

4.1. eAC Isolation and Cell Culture

eAC were isolated from cartilage biopsy of healthy equine carpal or femoral condyle joints from 10 young mature or adult horses (4–10 years). All procedures described in the present study were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (ComEth ANSES/ENVA/UPEC, 94701 Maisons-Alfort, France; n° 15-023 (10 March 2015), n° 10-0051 (10 September 2014).

Healthy cartilage samples were cut into small slices (approximately 1–2 mm thickness, and 4–6 mm in diameter), and chondrocytes were isolated by sequential digestion for 45 min at 37 °C

with 2 mg/mL of protease from *Streptomyces griseus* type XIV (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) for non-specific hydrolysis of ECM proteins, and then overnight at 37 °C with 2 mg/mL of type I collagenase from *Clostridium histolyticum* (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), which removes collagenic components of the ECM. Both were prepared with high glucose (4.5 g/L) Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). The cell suspension was filtered through a 70 µM mesh nylon membrane, centrifuged, counted with trypan blue for viability evaluation, seeded in plastic vessels at a density of 2×10^4 cells/cm², and cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (ThermoFisher), 100 IU/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin, and 0.25 µg/mL of Fungizone, in an atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. During expansion, the medium was changed twice a week. For cell passages, at 90% confluence, chondrocytes were harvested by trypsinization with 0.05% trypsin/1 mM EDTA (ThermoFisher), counted with trypan blue for viability evaluation, and seeded again at 2×10^4 cells/cm² for the next passage.

4.2. eAC Dedifferentiation

eAC were amplified during 11 passages (P0–P11). For each passage, at 90% confluency, one cell culture flask was harvested for protein or RNA extraction, and the other for viability evaluation and cell counting. Equations used for doubling time determination was described by Martin Clynes [67]: time between two passages (h); N_0 : initial cells number; N_1 : cells number at the harvest; n : number of cells generation during; k : generation by time units; g : doubling time (h).

4.3. Cryopreservation

By contrast with human articular chondrocytes, the particularity of eAC lies in the possibility of cryopreservation. All chondrocytes cryopreservations were realized at P0 or P1. After counting, cells were centrifuged and suspended in cryopreserved medium (6 to 10×10^6 cells/mL) composed of 90% FBS and 10% dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich). Freezing was performed using CoolCell Cell Freezing Containers (Biocision, San Francisco, CA, USA) and stored in liquid nitrogen.

4.4. 3D Inclusion and Hypoxia Cell Culture

After thawing, cells were amplified up to P2. For redifferentiation studies, chondrocytes at P3 were included in scaffolds composed of native type I collagen (90–95%) and type III collagen (5–10%) from calf skin, manufactured by Symatèse Biomatériaux (Chaponost, France). Scaffolds were 2 mm thick and 5 mm in diameter. They were cross-linked using glutaraldehyde to increase their stability, and sterilized with β -radiation. Cell seeding into collagen sponges was performed by dropping 20 µL of the cell suspension on the scaffold (6×10^5 cells/scaffold) in 96-well culture plates, dried for 1 h at 37 °C under 5% CO₂, and incubated at 37 °C under 5% CO₂ for 16 h with 3D medium composed of DMEM + 2% FBS + 50 µg/mL of L-ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate (Sigma-Aldrich). The next day, scaffolds were transferred to 24-well plates, in 3D medium (600 µL/scaffolds) pre-equilibrated to 3% O₂ by bubbling, with or without 50 ng/mL of BMP-2 (rhBMP-2, inductOs, Wyeth Europa Ltd., Gatwick, UK). This point established the day 0 (D0). Cells were incubated in hypoxia (2–4% O₂) at 37 °C under 5% CO₂ for 7 days. Hypoxic cultures were performed in Plas-Labs basic multi-station glove box (Sigma-Aldrich). The medium was changed twice a week.

4.5. siRNA Transfection and In Silico Analysis

Design of siRNA (Supplemental Table S1) was performed by Eurogentec service, and matching was confirmed using NCBI's Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Sequences and BLAST results are presented in Figure 5A,B and represented with CLC Sequence Viewer 7.7 software (Qiagen, Manchester, UK). Mammalian siRNA duplexes' negative control was used as non-targeting siRNA (Qiagen). eAC were seeded into type I/III collagen scaffolds, as described earlier. At D0, eAC were transfected with a mix (150 µL/scaffolds) of INTERFERin (Polyplus-transfection), OptiMEM

(ThermoFisher), and small interfering RNA (siRNA) for 10 min at room temperature, according to the manufacturer's instructions. Quantities of 2, 5, 10, or 25 nM of siRNA were transfected. Then, the INTERFERin siRNA complex was slowly added to scaffolds disposed in 450 μ L of 3D medium, pre-equilibrated to 3% O₂ by bubbling, with or without 50 ng/mL of BMP-2. eAC were then cultured in hypoxia (2–4% O₂) for 7 days. The first medium change for siRNA medium elimination was performed two days after transfection.

4.6. RNA Extraction and RT-qPCR Analysis

Total RNA was extracted using Trizol Reagent according to the manufacturer's instructions. One microgram of RNA was reverse transcribed into cDNA using reverse transcriptase (MMLV, ThermoFisher) and oligodT (Eurogentec, Seraing, Belgium). RT-qPCR was performed on StepOnePlus Real-Time system (ThermoFisher) using Power SYBR Green PCR (ThermoFisher). Sequences of the primers used are listed in Supplemental Table S1. β -actin gene (*Actb*) was used as an endogenous reference gene. Relative gene expression was analyzed using the StepOnePlus software and calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, or the standard curve method, depending on the efficiency of *Actb* amplification and each target gene, and expressed as the mean of triplicate samples [68].

4.7. Protein Extraction and Western Blots

After treatment, scaffolds containing cells were rinsed once with ice-cold DPBS (Dulbecco's Phosphate-buffered saline) (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany), frozen, crushed and total proteins were extracted from cells using the RIPA (Radioimmunoprecipitation assay)-lysis buffer with protease inhibitors. Protein concentration was assessed according to the Bradford colorimetric assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A quantity of 15 μ g of total proteins were separated into 10% polyacrylamide gels containing 0.1% SDS (Sodium dodecyl sulfate), 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 2 h. Membranes were incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-human type I collagen (Novotec, Reuver, The Netherlands), rabbit anti-human type II collagen (Novotec), rabbit anti-human type X collagen (Abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-human HTRA1 (Millipore), rabbit anti-human β -tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), or rabbit anti-human GAPDH. The following day, membranes were washed three times, followed by an incubation with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Signals were visualized with the chemiluminescence method (ECL plus Western blotting detection reagent+, Santa Cruz Biotechnology) and developed on X-ray film (Santa Cruz Biotechnology).

4.8. Statistical Analysis

All experiments were replicated with cells from different specimens. Values are reported as means \pm SD or box plots. To evaluate if biological samples answer to a normalcy law, Kolmogorov–Smirnov test was assessed using Graphpad Prism software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Statistical analyses were performed using the Mann–Whitney *U*-test or unpaired *t*-test to determine any significant differences between two groups. Because the siRNA effect depends on the target basal expression of untreated control cases used for normalization, the Wilcoxon signed-rank test or paired *t*-test were also used. All statistical analyses were done using Prism v6 (Graphpad). The *p*-value of ≤ 0.05 was considered to be significant.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at www.mdpi.com/1422-0067/18/9/1842/s1.

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

Author Contributions: Rodolphe Rakic was implicated in the study design, in data collection/assembly and analysis, performed experiments, and in the writing of the manuscript; Bastien Bourdon, Magalie Hervieu, Thomas Branly, and Florence Legendre performed experiments, collected data, and analysed the data;

Florence Legendre designed, and provided materials and analysis tools; Rodolphe Rakic, Thomas Branly, Fabrice Audigé, and Nathalie Saulnier were involved in collecting cartilage-chondrocytes; Philippe Galera, Magali Demoor, Nathalie Saulnier, and Stéphane Maddens were involved in the study conception and design, in supervision of the study, in data analysis, and data interpretation; Philippe Galera, Nathalie Saulnier, and Stéphane Maddens participated in the writing of the manuscript and provided financial support. All authors read and approved the final manuscript.

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

Funding: This research was funded by the French National Research Agency (ANR) in connection with the Regional Council of Basse-Normandie through the ANR TecSan PROMOCART program to PG (917RB020 and 917RB072 respectively); the French Ministry of Research and Technology to Philippe Galera; two ERDF (European Regional Development Funds) grants to Philippe Galera and Magali Demoor (HIPPOCART 1 No. 2897/33535, 917RB148; HIPPOCART 917CB174); a Regional Council of Basse-Normandie program to PG and MD (HIPPOCART N° 2013-AGRI-236/13P07492, 917CB166); the Fonds Eperon to PG and MD (EQUISTEM, N80-2014, 917CB194); a ERDF and Regional Council of Basse-Normandie grant to PG and MD in the CPER Centaure grant (2015–2020, Centaure Biotechnologies 2015 N° 917CB213 & Centaure PREAMCH 2016-17). These funding sources had no involvement in the study design, collection, analysis, or in interpretation of the data, in the writing of the manuscript, or in the decision to submit the manuscript for publication. Rodolphe Rakic is a recipient from the French ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) and Vetbiobank, a CIFRE fellowship. TB was supported by a Ph.D. scholarship from the French Ministry of Research and Technology. Magalie Hervieu was supported by a PhD scholarship from the Regional Council of Basse-Normandie.

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. McIlwraith, C.W.; Frisbie, D.D.; Kawcak, C.E.; Fuller, C.J.; Hurtig, M.; Cruz, A. The OARSI histopathology initiative—Recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the horse. *Osteoarthr. Cartil.* **2010**, *18*, S93–S105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Oke, S.L.; McIlwraith, C.W. Review of the economic impact of osteoarthritis and oral joint-health supplements in horses. In Proceedings of the 56th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Baltimore, MD, USA, 4–8 December 2010; pp. 12–16.
4. 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](#)]
5. Marlovits, S.; Zeller, P.; Singer, P.; Resinger, C.; Vécsei, V. Cartilage repair: Generations of autologous chondrocyte transplantation. *Eur. J. Radiol.* **2006**, *57*, 24–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Bartlett, W.; Skinner, J.A.; Gooding, C.R.; Carrington, R.W.J.; Flanagan, A.M.; Briggs, T.W.R.; Bentley, G. Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: A prospective, randomised study. *J. Bone Jt. Surg. Br.* **2005**, *87*, 640–645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Brittberg, M. Autologous chondrocyte implantation—Technique and long-term follow-up. *Injury* **2008**, *39* (Suppl. S1), S40–S49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Moran, C.J.; Ramesh, A.; Brama, P.A.J.; O’Byrne, J.M.; O’Brien, F.J.; Levingstone, T.J. The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair. *J. Exp. Orthop.* **2016**, *3*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Nixon, A.J.; Rickey, E.; Butler, T.J.; Scimeca, M.S.; Moran, N.; Matthews, G.L. A chondrocyte infiltrated collagen type I/III membrane (MACI[®] implant) improves cartilage healing in the equine patellofemoral joint model. *Osteoarthr. Cartil.* **2015**, *23*, 648–660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Griffin, D.J.; Bonnevie, E.D.; Lachowsky, D.J.; Hart, J.C.A.; Sparks, H.D.; Moran, N.; Matthews, G.; Nixon, A.J.; Cohen, I.; Bonassar, L.J. Mechanical characterization of matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI[®]) grafts in an equine model at 53 weeks. *J. Biomech.* **2015**, *48*, 1944–1949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Orved, K.F.; Nixon, A.J. Cell-based cartilage repair strategies in the horse. *Vet. J.* **2016**, *208*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Benya, P.D.; Padilla, S.R.; Nimni, M.E. Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell* **1978**, *15*, 1313–1321. [[CrossRef](#)]

13. Marlovits, S.; Hombauer, M.; Truppe, M.; Vécsei, V.; Schlegel, W. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *J. Bone Jt. Surg. Br.* **2004**, *86*, 286–295. [[CrossRef](#)]
14. Claus, S.; Mayer, N.; Aubert-Foucher, E.; Chajra, H.; Perrier-Groult, E.; Lafont, J.; Piperno, M.; Damour, O.; Mallein-Gerin, F. Cartilage-Characteristic matrix reconstruction by sequential addition of soluble factors during expansion of human articular chondrocytes and their cultivation in collagen sponges. *Tissue Eng. Part C Methods* **2012**, *18*, 104–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Schnabel, M.; Marlovits, S.; Eckhoff, G.; Fichtel, I.; Gotzen, L.; Vécsei, V.; Schlegel, J. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthr. Cartil.* **2002**, *10*, 62–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kiani, C.; Chen, L.; Wu, Y.J.; Yee, A.J.; Yang, B.B. Structure and function of aggrecan. *Cell Res.* **2002**, *12*, 19–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lin, Z.; Fitzgerald, J.B.; Xu, J.; Willers, C.; Wood, D.; Grodzinsky, A.J.; Zheng, M.H. Gene expression profiles of human chondrocytes during passaged monolayer cultivation. *J. Orthop. Res.* **2008**, *26*, 1230–1237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Blaise, R.; Mahjoub, M.; Salvat, C.; Barbe, U.; Brou, C.; Corvol, M.-T.; Savouret, J.-F.; Rannou, F.; Berenbaum, F.; Bausero, P. Involvement of the Notch pathway in the regulation of matrix metalloproteinase 13 and the dedifferentiation of articular chondrocytes in murine cartilage. *Arthritis Rheum.* **2009**, *60*, 428–439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Pelttari, K.; Lorenz, H.; Boeuf, S.; Templin, M.F.; Bischel, O.; Goetzke, K.; Hsu, H.-Y.; Steck, E.; Richter, W. Secretion of matrix metalloproteinase 3 by expanded articular chondrocytes as a predictor of ectopic cartilage formation capacity in vivo. *Arthritis Rheum.* **2008**, *58*, 467–474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. 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](#)]
21. Huang, B.J.; Huey, D.J.; Hu, J.C.; Athanasiou, K.A. Engineering biomechanically functional neocartilage derived from expanded articular chondrocytes through the manipulation of cell-seeding density and dexamethasone concentration. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2016**, *11*, 2323–2332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Vinatier, C.; Mrugala, D.; Jorgensen, C.; Guicheux, J.; Noël, D. Cartilage engineering: A crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 307–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Duval, E.; Leclercq, S.; Elissalde, J.-M.; Demoor, M.; Galera, P.; Boumédiène, K. 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 Rheum.* **2009**, *60*, 3038–3048. [[PubMed](#)]
24. Lee, H.-H.; Chang, C.-C.; Shieh, M.-J.; Wang, J.-P.; Chen, Y.-T.; Young, T.-H.; Hung, S.-C. Hypoxia enhances chondrogenesis and prevents terminal differentiation through PI3K/Akt/FoxO dependent anti-apoptotic effect. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 2683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lafont, J.E.; Poujade, F.A.; Pasdéloup, M.; Neyret, P.; Mallein-Gerin, F. Hypoxia potentiates the BMP-2 driven COL2A1 stimulation in human articular chondrocytes via p38 MAPK. *Osteoarthr. Cartil.* **2016**, *24*, 856–867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Hautier, A.; Salentey, V.; Aubert-Foucher, E.; Bougault, C.; Beauchef, G.; Ronzière, M.-C.; de Sobamitsky, S.; Paumier, A.; Galera, P.; Piperno, M.; et al. Bone morphogenetic protein-2 stimulates chondrogenic expression in human nasal chondrocytes expanded in vitro. *Growth Factors* **2008**, *26*, 201–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Claus, S.; Aubert-Foucher, E.; Demoor, M.; Camuzeaux, B.; Paumier, A.; Piperno, M.; Damour, O.; Duterque-Coquillaud, M.; Galera, P.; Mallein-Gerin, F. Chronic exposure of bone morphogenetic protein-2 favors chondrogenic expression in human articular chondrocytes amplified in monolayer cultures. *J. Cell. Biochem.* **2010**, *111*, 1642–1651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Jiménez, G.; López-Ruiz, E.; Kwiatkowski, W.; Montañez, E.; Arrebola, F.; Carrillo, E.; Gray, P.C.; Izpisua Belmonte, J.C.; Choe, S.; Perán, M.; et al. Activin A/BMP2 chimera AB235 drives efficient redifferentiation of long term cultured autologous chondrocytes. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

29. Ollitrault, D.; Legendre, F.; Drougard, C.; Briand, M.; Bénateau, 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](#)]
30. Launay, S.; Maubert, E.; Lebeurrier, N.; Tennstaedt, A.; Campioni, M.; Docagne, F.; Gabriel, C.; Dauphinot, L.; Potier, M.C.; Ehrmann, M.; et al. Htra1-dependent proteolysis of TGF- β controls both neuronal maturation and developmental survival. *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 1408–1416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Graham, J.R.; Chamberland, A.; Lin, Q.; Li, X.J.; Dai, D.; Zeng, W.; Ryan, M.S.; Rivera-Bermúdez, M.A.; Flannery, C.R.; Yang, Z. Serine protease HTRA1 antagonizes transforming growth factor- β signaling by cleaving its receptors and loss of HTRA1 in vivo enhances bone formation. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e74094. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. 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 TGF- β family proteins. *Development* **2004**, *131*, 1041–1053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Tladen, A.N.; Breiden, M.; Mirsaidi, A.; Weber, F.A.; Bahrenberg, G.; Glanz, S.; Cinelli, P.; Ehrmann, M.; Richards, P.J. Human serine protease HTRA1 positively regulates osteogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mineralization of differentiating bone-forming cells through the modulation of extracellular matrix protein. *Stem Cells* **2012**, *30*, 2271–2282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Tladen, A.N.; Bahrenberg, G.; Mirsaidi, A.; Glanz, S.; Blüher, M.; Richards, P.J. Novel Function of Serine Protease HTRA1 in Inhibiting Adipogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells via MAP Kinase-Mediated MMP Upregulation. *Stem Cells* **2016**, *34*, 1601–1614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Grau, S.; Richards, P.J.; Kerr, B.; Hughes, C.; Caterson, B.; Williams, A.S.; Junker, U.; Jones, S.A.; Clausen, T.; Ehrmann, M. The role of human Htra1 in arthritic disease. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 6124–6129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Polur, I.; Lee, P.L.; Servais, J.M.; Xu, L.; Li, Y. Role of HTRA1, a serine protease, in the progression of articular cartilage degeneration. *Histol. Histopathol.* **2010**, *25*, 599–608. [[PubMed](#)]
37. Vonk, L.A.; Kragten, A.H.M.; Dhert, W.J.A.; Saris, D.B.F.; Creemers, L.B. Overexpression of hsa-miR-148a promotes cartilage production and inhibits cartilage degradation by osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* **2014**, *22*, 145–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Zhou, H.W.; Lou, S.Q.; Zhang, K. Recovery of function in osteoarthritic chondrocytes induced by p16INK4a-specific siRNA in vitro. *Rheumatology* **2004**, *43*, 555–568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Lianxu, C.; Hongti, J.; Changlong, Y. NF- κ Bp65-specific siRNA inhibits expression of genes of COX-2, NOS-2 and MMP-9 in rat IL-1 β -induced and TNF- α -induced chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* **2006**, *14*, 367–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Galera, P.; Ollitrault, D.; Legendre, F.; Demoor, M.; Mallein-Gerin, F.; Boumediene, K.; Herbage, B.; Duterque-Coquillaud, M.; Damour, O. Method for Obtaining Differentiated Articular Chondrocytes In Vitro or Ex Vivo, and Uses of Same. WO2012038668 A1, 29 March 2012.
41. Fermor, B.; Christensen, S.E.; Youn, I.; Cernanec, J.M.; Davies, C.M.; Weinberg, J.B. Oxygen, nitric oxide and articular cartilage. *Eur. Cell Mater.* **2007**, *13*, 56–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Clausen, T.; Southan, C.; Ehrmann, M. The HtraA family of proteases: Implications for protein composition and cell fate. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 443–455. [[CrossRef](#)]
43. Ringe, J.; Burmester, G.R.; Sittinger, M. Regenerative medicine in rheumatic disease-progress in tissue engineering. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2012**, *8*, 493–498. [[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. 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](#)]
46. Wade, C.M.; Giulotto, E.; Sigurdsson, S.; Zoli, M.; Gnerre, S.; Inslund, F.; Lear, T.L.; Adelson, D.L.; Bailey, E.; Bellone, R.R.; et al. Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science* **2009**, *326*, 865–867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

47. Tran-Khanh, N.; Hoemann, C.D.; McKee, M.D.; Henderson, J.E.; Buschmann, M.D. Aged bovine chondrocytes display a diminished capacity to produce a collagen-rich, mechanically functional cartilage extracellular matrix. *J. Orthop. Res.* **2005**, *23*, 1354–1362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Sumita, Y.; Honda, M.J.; Ohara, T.; Tsuchiya, S.; Sagara, H.; Kagami, H.; Ueda, M. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. *Biomaterials* **2006**, *27*, 3238–3248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Nakase, Y.; Hagiwara, A.; Nakamura, T.; Kin, S.; Nakashima, S.; Yoshikawa, T.; Fukuda, K.-I.; Kuriu, Y.; Miyagawa, K.; Sakakura, C.; et al. Tissue engineering of small intestinal tissue using collagen sponge scaffolds seeded with smooth muscle cells. *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 403–412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Suzuki, S.; Kawai, K.; Ashoori, F.; Morimoto, N.; Nishimura, Y.; Ikada, Y. Long-term follow-up study of artificial dermis composed of outer silicone layer and inner collagen sponge. *Br. J. Plast. Surg.* **2000**, *53*, 659–666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Russlies, M.; Behrens, P.; Wunsch, L.; Gille, J.; Ehlers, E.M. A cell-seeded biocomposite for cartilage repair. *Ann. Anat.* **2002**, *184*, 317–323. [[CrossRef](#)]
52. Cho, Y.-G.; Cho, M.-L.; Min, S.-Y.; Kim, H.-Y. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* **2007**, *7*, 65–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Lee, K.; Silva, E.A.; Mooney, D.J. Growth factor delivery-based tissue engineering: General approaches and a review of recent developments. *J. R. Soc. Interface* **2011**, *8*, 153–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Pujol, J.-P.; Chadjichristos, C.; Legendre, F.; Baugé, C.; Beauchef, G.; Andriamanalijaona, R.; Galera, P.; Boumédiène, K. Interleukin-1 and transforming growth factor- β 1 as crucial factors in osteoarthritic cartilage metabolism. *Connect. Tissue Res.* **2008**, *49*, 293–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Reynolds, A.; Leake, D.; Boese, Q.; Scaringe, S.; Marshall, W.S.; Khvorova, A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 326–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Shao, Y.; Chan, C.Y.; Maliyekkel, A.; Lawrence, C.E.; Roninson, I.B.; Ding, Y. Effect of target secondary structure on RNAi efficiency. *RNA* **2007**, *13*, 1631–1640. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Lorenz, R.; Bernhart, S.H.; Höner Zu Siederdissen, C.; Tafer, H.; Flamm, C.; Stadler, P.F.; Hofacker, I.L. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol. Biol.* **2011**, *6*, 26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. 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](#)]
59. Saxena, S.; Jónsson, Z.O.; Dutta, A. Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 44312–44319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Xu, L.; Golshirazian, I.; Asbury, B.J.; Li, Y. Induction of high temperature requirement A1, a serine protease, by TGF- β 1 in articular chondrocytes of mouse models of OA. *Histol. Histopathol.* **2014**, *29*, 609–618. [[PubMed](#)]
61. Wu, X.; Chim, S.M.; Kuek, V.; Lim, B.S.; Chow, S.T.; Zhao, J.; Yang, S.; Rosen, V.; Tickner, J.; Xu, J. HtrA1 is upregulated during RANKL-induced osteoclastogenesis, and negatively regulates osteoblast differentiation and BMP2-induced Smad1/5/8, ERK and p38 phosphorylation. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 143–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Branly, T.; Bertoni, L.; Contentin, R.; Rakic, R.; Gomez-Leduc, T.; Desancé, M.; Hervieu, M.; Legendre, F.; Jacquet, S.; Audigjé, 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.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Schmidt, E.E.; Pelz, O.; Buhlmann, S.; Kerr, G.; Horn, T.; Boutros, M. GenomeRNAi: A database for cell-based and in vivo RNAi phenotypes, 2013 update. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D1021–D1026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Tang, W.; Dodge, M.; Gundapaneni, D.; Michnoff, C.; Roth, M.; Lum, L. A genome-wide RNAi screen for Wnt/ β -catenin pathway components identifies unexpected roles for TCF transcription factors in cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 9697–9702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Day, T.F.; Guo, X.; Garrett-Beal, L.; Yang, Y. Wnt/ β -catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev. Cell* **2005**, *8*, 739–750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Tuan, R.S. Cellular signaling in developmental chondrogenesis: N-cadherin, Wnts, and BMP-2. *J. Bone Jt. Surg. Am.* **2003**, *85* (Suppl. S2), 137–141. [[CrossRef](#)]

67. Clynes, M. *Basic Cell Culture—A Practical Approach*; Davis, J.M., Ed.; IRL Press at Oxford University Press: Oxford, UK, 1996; p. 301, ISBN 0-199-63433-5.
68. Schmittgen, T.D.; Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1101–1108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2017 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/>).

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

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

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

2. Vetbiobank, Marcy l'Etoile, France.

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

*Corresponding author: philippe.galera@unicaen.fr

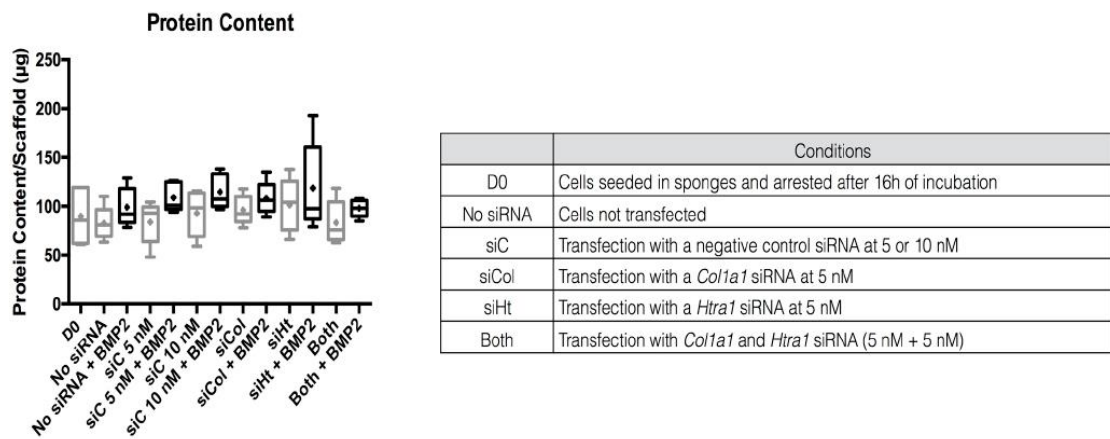


Figure S1: Total protein content after treatments. After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were transfected or not by 5 nM of *Col1a1* siRNA (siCol), *Htra1* siRNA (siHt) or both (Both) in hypoxia and treated or not with BMP-2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

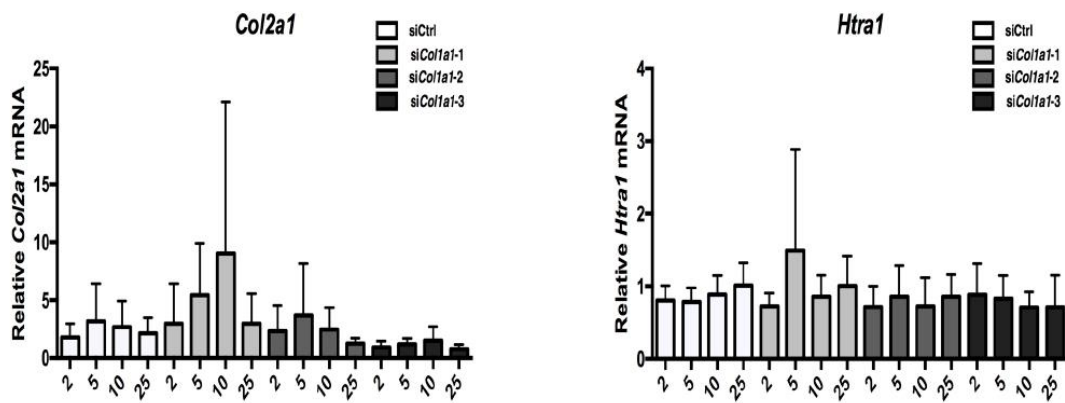


Figure S2: Effect of *Col1a1* siRNA on *Col2a1* and *Htra1*. Relative amounts of *Col2a1* and *Htra1* mRNA were determined by RTqPCR. Cells transfected with a negative control siRNA were used as control (siCtrl). All the results are normalized versus BMP-2 treated cells without transfection, and presented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

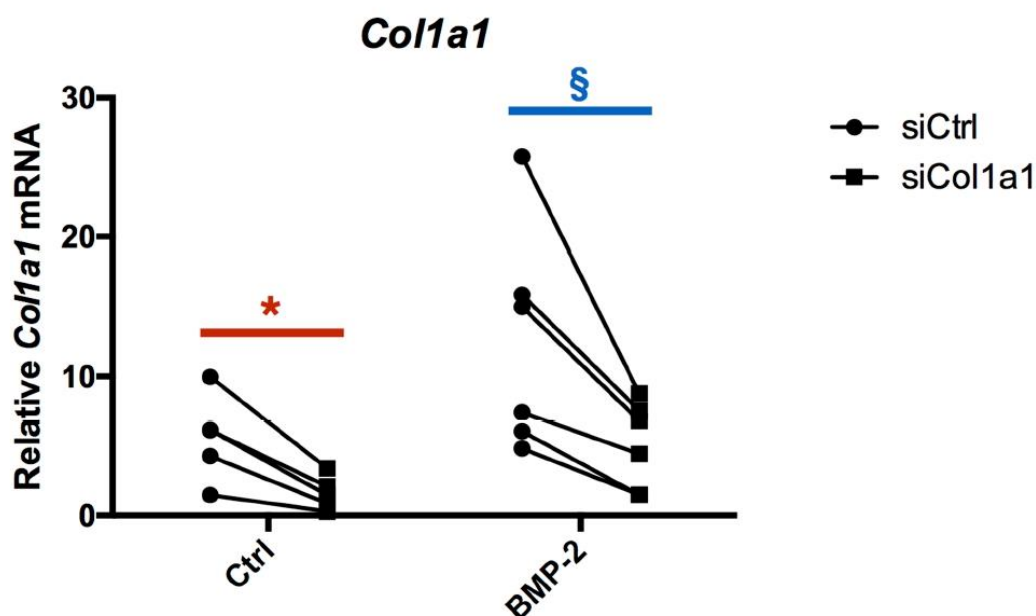


Figure S3: Linear representation of siCol1a1 effects on its target. After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were transfected with 5 nM of *Col1a1* siRNA (siCol1a1) in hypoxia and treated with BMP-2 (50 ng/ml) (BMP-2) or not (Ctrl) during 7 days. Relative mRNA levels of *Col1a1* were determined by RTqPCR. siCtrl represents cells transfected with a negative control siRNA. All the data are normalized versus eAC cultured in monolayer in normoxia, and presented as the relative expression of each gene. Box plots represent five independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences were determined using the Mann Whitney test (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001) or the Wilcoxon signed-rank test ([§]p < 0.05, ^{§§}p < 0.01, ^{§§§}p < 0.001).

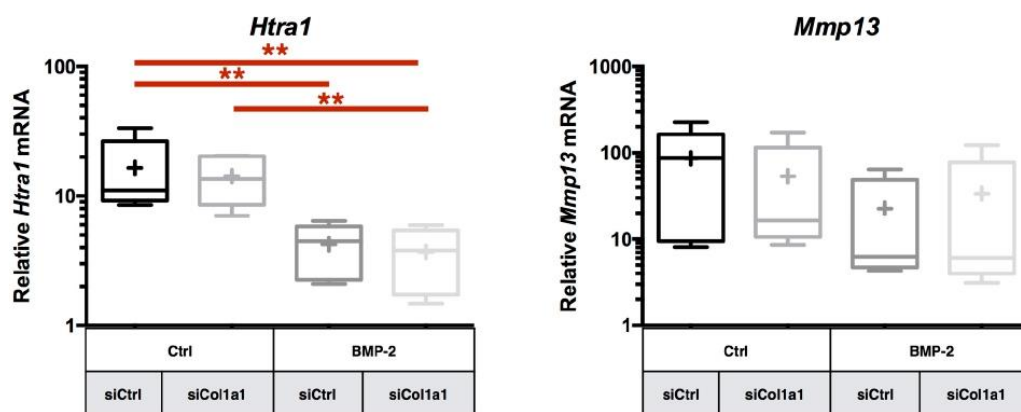


Figure S4: *Htra1* and *Mmp13* mRNA expression during RNA interference targeting *Col1a1*. After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were transfected by 5 nM of *Col1a1* siRNA (*siCol1a1*) in hypoxia and treated with BMP-2 (50 ng/ml) (BMP-2) or not (Ctrl) during 7 days. Relative mRNA of *Htra1* and *Mmp13* were determined. siCtrl represents cells transfected with a negative control siRNA. All the results are normalized with eAC cultured in monolayer in normoxia, and presented as the relative expression of each gene. Box plots represent five independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences were determined using the Mann Whitney test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) or the Wilcoxon signed-rank test ($^{\S}p < 0.05$, $^{\S\S}p < 0.01$, $^{\S\S\S}p < 0.001$). Only the Mann Whitney test gives some significance.

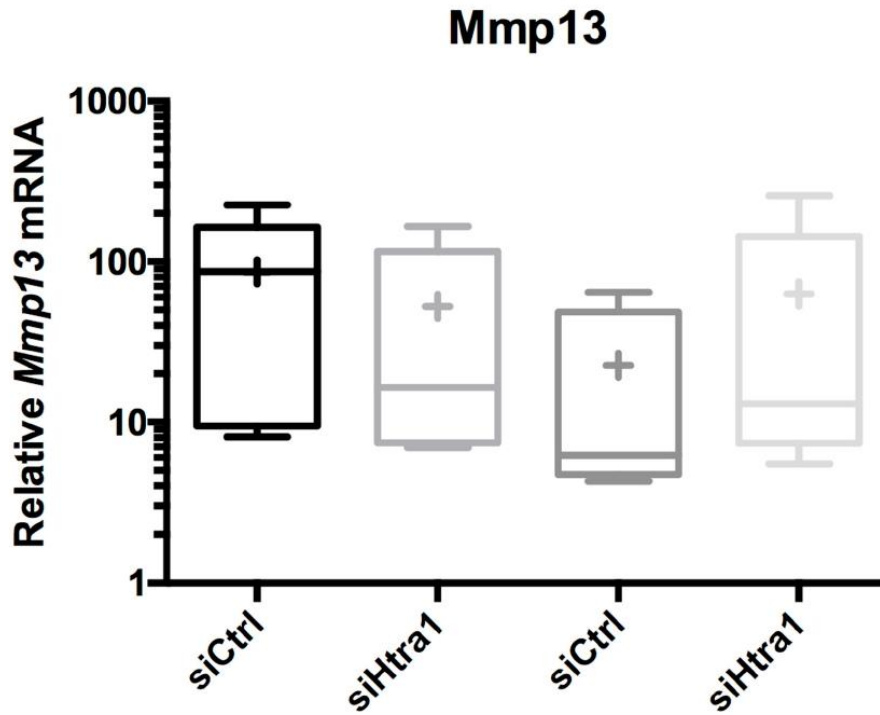


Figure S5: *Mmp13* mRNA expression during RNA interference targeting *Htra1*. After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were transfected by 5 nM of *Col1a1* siRNA (*siCol1a1*) in hypoxia and treated with BMP-2 (50 ng/ml) (BMP-2) or not (Ctrl) during 7 days. Relative mRNA amounts of *Htra1* and *Mmp13* were determined. siCtrl represents cells transfected with a negative control siRNA. All the results were normalized versus eAC cultured in monolayer in normoxia, and presented as the relative expression of each gene. Box plots represent five independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences were determined using the Mann Whitney test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) or the Wilcoxon signed-rank test ($^{\S}p < 0.05$, $^{\S\S}p < 0.01$, $^{\S\S\S}p < 0.001$).

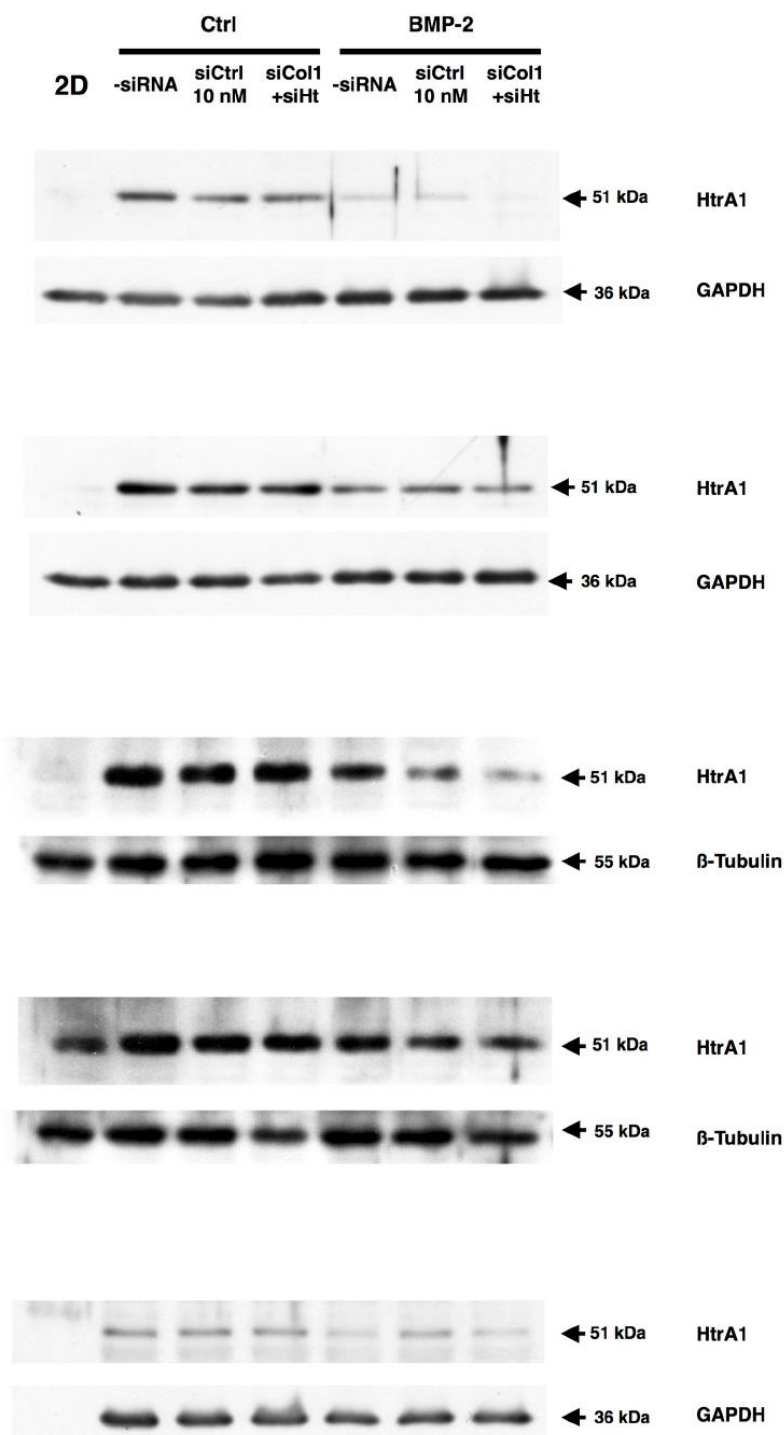


Figure S6: RNA interference targeting *Col1a1* and *Htra1* mRNA: Over-inhibition of Htra1 by the *siHtra1* treatment. After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges. Cells were transfected by 5 nM of *Col1a1* siRNA (*siCol1*) or *Htra1* siRNA (*siHt*) in hypoxia and treated or not with BMP-2 (50 ng/ml) during 7 days. siCtrl represents cells transfected with a negative control siRNA. 2D : P3 eAC cultured in monolayer in normoxia. Protein extracts were analyzed in Western-blot for type II, type I, type X collagens, and Htra1 versus GAPDH. Representative blots are shown (n = 5). Different levels of type II and type I collagen maturation forms are indicated such as type II procollagen (pro), with only C- or N- terminal propeptides (Pc/Pn) and the mature doubly cleaved form (mat). The 64 kDa type X collagen band represents signal peptide cleaved form.

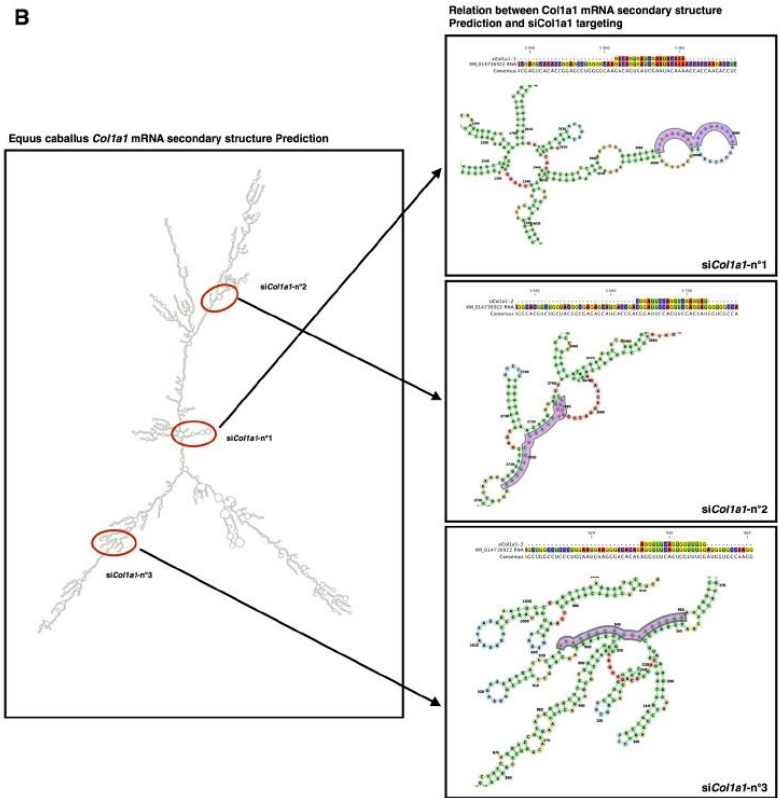
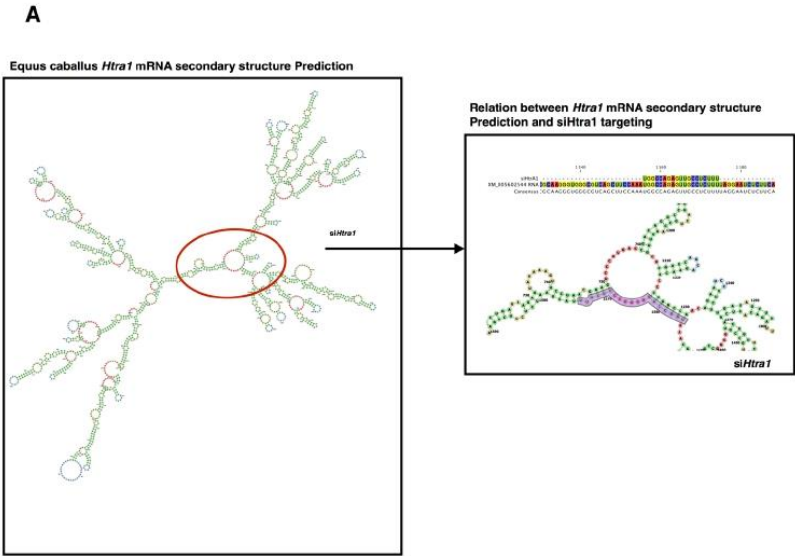


Figure S7: siRNA Effectiveness is correlated with RNA target secondary structure prediction. mRNA secondary structure predictions were determined *in silico* using ViennaRNA Package 2.0 (Lorenz *et al.*, 2011⁵³) with the minimum free energy prediction model. Sequence alignment between *Htra1* siRNA (A) or the three *Col1a1* siRNA (B) and their respective mRNA target. XM_005602544: Predicted *Equus caballus* HtrA serine peptidase 1 (HTRA1), mRNA NCBI reference sequence. XM_014736922: Predicted *Equus caballus* collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA NCBI reference sequence. Software: CLC sequence viewer. The coloring of nucleotide is provided automatically by forna only software according to the type of structural element they are in (i.e. stem, interior, hairpin, multi or exterior loop).

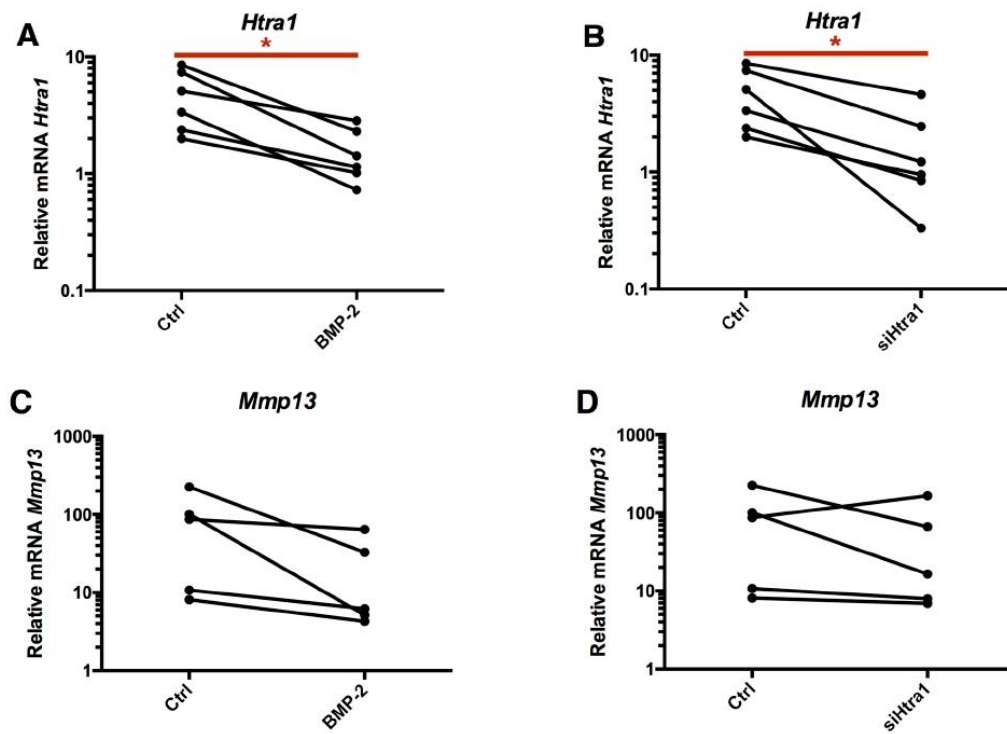


Figure S8: Correlation between *Htra1* and *Mmp13* mRNA amounts under BMP-2 and *siHtra1* treatments. After eAC dedifferentiation during 2 passages, cells were trypsinized and seeded in type I/III collagen sponges in hypoxia and treated with BMP-2 (50 ng/ml) (BMP-2) or not (Ctrl) during 7 days (A, C).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

A

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

B

Gene	Primer	sequence 5'-3'
<i>Actb</i>	forward	AGGCACCAGGGCGTGAT
	reverse	CTCTTGCTCTGGGCCTCGT
<i>Col1a1</i>	forward	TGCCGTGACCTCAAGATGTG
	reverse	CGTCTCCATGTTGCAGAAGA
<i>Col2a1</i>	forward	GGCAATAGCAGGTTACGTACA
	reverse	CGATAACAGTCTTGCCCCACTT
<i>Col10a1</i>	forward	GCACCCCAGTAATGTACACCTATG
	reverse	GAGCCACACCTGGTCATTTTC
<i>Acan</i>	forward	ACACGGATGGTGCCTCTTC
	reverse	CTCAGTCCACGGGTACGAT
<i>Runx-2</i>	forward	GCAGTCCCAAGCATTTCAT
	reverse	CACTCTGGCTTTGGGAAGAG
<i>Mmp13</i>	forward	TGAAGACCCGAACCCTAAACAT
	reverse	GAAGACTGGTGATGGCATCAAG
<i>Sox9</i>	forward	CAAGAAGGACCACCCGGACTA
	reverse	GGAGATGTGTCTGCTCCGT
<i>Alpl</i>	forward	GACATGACCTCCCAGGAAGA
	reverse	GCAGTGAAGGGCTTCTTGTC
<i>Htra1</i>	forward	GGACTTCATGTTCCCTCAA
	reverse	GTTCTGCTGAACAAGCAACA

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

3. Conclusion de l'article #1

Ce premier article a permis de transposer le protocole de redifférenciation, initialement mis au point chez l'Homme au modèle équin. Cette transposition a été facilitée par la mise en évidence de similitudes cellulaires entre ces deux modèles. De plus, la BMP-2 utilisée lors de la redifférenciation humaine a aussi été validée lorsqu'elle est utilisée sur des chondrocytes équins dédifférenciés.

Une spécificité et l'un des avantages des chondrocytes articulaires équins (CAE) vis-à-vis des chondrocytes articulaires humains (CAH) est la possibilité de pouvoir cryopréserver les cellules, donc de pouvoir créer une banque de cellules permettant une utilisation ultérieure, avec la possibilité de pouvoir réaliser de nombreuses études expérimentales et sur les mêmes lots cellulaires. En effet, alors qu'il n'est absolument pas possible de cryogéniser les CAH âgés, les CAE ont cette possibilité de pouvoir être biobanqués et réutilisés. De plus, les CAE présentent une forte capacité proliférative liée au fait que ces cellules ont été obtenues à partir de jeunes chevaux, rendant envisageables des stratégies de thérapie cellulaire et d'ingénierie tissulaire, dans le cadre de la MACI, par exemple. Cependant, la forte prolifération des CAE est concomitante à leur dédifférenciation. En effet, de forts taux d'ARNm codant pour des protéines typiques du cartilage articulaire hyalin sont observés lors des cultures en éponges de collagènes de type I/III, notamment sous l'effet de la BMP-2. Néanmoins, il a été nécessaire d'augmenter la quantité de cellulesensemencées dans les éponges afin de pouvoir obtenir une quantité suffisante de protéines. Lors de cette amplification cellulaire, les CAE, tout comme les CAH, ont aussi montré une dédifférenciation bien que les CAE isolés soient issus de sujets jeunes. Une différence notable avec les CAH est observable au niveau de la sénescence. Alors que cette dernière est élevée chez les CAH, aucune sénescence n'est observée, a priori jusqu'au 16^{ème} passage des CAE.

Les CAH et les CAE ont néanmoins montré de nombreuses homologues, similitudes, mais aussi, certaines différences biologiques ayant nécessité une adaptation de nos protocoles mis au point avec les cellules humaines. Notamment, la mise au point, le « design » et le test des siARN dirigés contre le collagène de type I équin ont dû être adaptés. Le collagène de type I est fortement exprimé par les chondrocytes équins, particulièrement sous l'effet de la BMP-2. De plus, dans le modèle équin, les transcrits codant pour le collagène de type II (*Col2a1*) et le collagène

de type I (*Col1a1*) présentent une forte homologie. Les études menées ont ainsi permis d'augmenter la spécificité, la précision et l'efficacité de la stratégie d'interférence par l'ARN qui a abouti à une diminution relativement efficace des taux moyens des transcrits codant le collagène de type I. En conséquence, le ratio *Col2a1/Col1a1*, indicateur fonctionnel du phénotype des chondrocytes, s'en est trouvé accru.

L'interférence par l'ARN ciblant *HTRA1* sur les CAH s'était révélée efficace. Cependant, il semble que cette approche soit devenue obsolète chez les CAE. En effet, les siARN ciblant *Htra1* se sont montrés efficaces pour prévenir la synthèse de la protéine Htra1, mais elles ne permettent pas d'augmenter, ni la qualité ni la synthèse de la MEC. De plus, les CAE ont présenté une réponse hétérogène à la suite de la mise en place de la stratégie d'interférence par l'ARN ciblant Htra1 en présence de la BMP-2 qui, de par elle-même, induit une inhibition importante de l'expression protéique d'Htra1. Au vu de cette inhibition induite par la BMP-2, une stratégie ciblant spécifiquement Htra1 ne semble alors plus nécessaire. Il restera néanmoins à définir plus précisément le rôle d'Htra1 qui pourrait posséder une fonction bien plus complexe dans la stratégie de dédifférenciation/redifférenciation et qui n'est pas décrit dans la littérature.

Cette étude présente néanmoins des limites persistantes. Dans un premier temps, nous n'avons pas réussi à totalement inhiber l'expression du collagène de type I en utilisant une stratégie d'interférence par l'ARN. En effet, il semble que lorsque les taux d'expression de ce marqueur sont extrêmement importants, cette stratégie atteint ses limites. Il n'est pas envisageable d'augmenter de manière inconsidérée la concentration des siRNA transfectés, faute de quoi des effets hors cibles sont systématiquement observés. La culture et la redifférenciation des CAE sont limitées dans le temps ; au-delà de quatorze jours de culture en éponges de collagène et en hypoxie, il devient difficile de maintenir un phénotype chondrocytaire hyalin indiquant que le statut de différenciation est instable. Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire, les cellules ne devront donc pas être redifférenciées sur le long terme *in vitro*. En revanche, la génération de cultures en micromasse de CAE à haute densité semble pouvoir permettre une incubation au-delà des quatorze jours allant jusqu'à vingt et un jours. De plus, ce modèle de culture étudié histologiquement a révélé la présence de protéoglycanes sulfatés proche d'une MEC cartilagineuse hyaline. En revanche, la haute densité cellulaire entraîne une forte densité de cellules au sein du tissu néosynthétisé qui demeure extrêmement élevée par rapport à un cartilage sain.

Cette étude a permis de transposer le protocole de redifférenciation des CAH aux CAE générant ainsi un organoïde cartilagineux. Ce protocole pourrait, tout comme chez l'Homme, représenter un « gold standard » dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage chez le cheval. Cette étude représente une preuve de concept pour appliquer la MACI *in vivo* dans le modèle équin et y envisager des essais cliniques. Des essais cliniques chez le cheval, modèle gros mammifère de choix dans le cadre des études sur l'arthrose, pourraient, en cas de réussite, permettre d'envisager des essais cliniques chez l'Homme par la suite.

II. Deuxième partie : Article #2

Marine collagen hydrolysates downregulate the synthesis of pro-catabolic and pro-inflammatory markers of osteoarthritis and favor collagen production and metabolic activity in equine articular chondrocyte organoids.

Bastien Bourdon, Romain Contentin, Frédéric Cassé, Chloé Maspimby, Sarah Oddoux, Antoine Noël, Florence Legendre, Nicolas Gruchy, Philippe Galéra.

1. Objectifs de l'article #2

Le cartilage articulaire hyalin est un tissu hautement spécialisé recouvrant les extrémités des pièces osseuses entre elles. Cependant, des micro-lésions et des pertes de substance chondrale peuvent apparaître avec le temps et peuvent résulter de nombreux facteurs tels que l'âge, le sexe, le surpoids, des facteurs génétiques, ... Ces lésions chondrales sont aussi observées chez le cheval. Le tissu cartilagineux équin possède des caractéristiques très similaires au cartilage humain (composition de la MEC, cellularité, épaisseur ou encore contraintes mécaniques subies par les articulations). Le cheval et l'Homme sont donc très proches en ce qui concerne le développement du processus arthrosique, ce qui en fait un modèle gros mammifère de choix. L'arthrose, qui est responsable de boîturies chez le cheval, engendre de larges pertes financières pour la filière équine, dues à la mise au repos des chevaux et aux coûts des traitements. Il n'y a d'ailleurs, tout comme chez l'Homme, aucun traitement curatif à ce jour chez le cheval. Il n'existe que des traitements palliatifs qui visent à diminuer les douleurs, l'inflammation, ou, au mieux, à limiter l'évolution du processus arthrosique qui s'avère être inéluctable. Les patients humains et les propriétaires d'équidés se tournent alors de plus en plus vers les compléments alimentaires d'origine naturelle.

Fort de ce constat, le laboratoire Dielen a mis au point un complément alimentaire issu de collagènes d'origine marine hydrolysés. Cette hydrolyse enzymatique consiste à digérer la peau de poissons, mais aussi le squelette de poissons cartilagineux grâce à un processus mis au point par le laboratoire Dielen. Ces compléments alimentaires, administrés *per os*, comprennent du Promérim®,

constitué d'hydrolysats de collagènes renfermant des matrikines générées lors de la digestion enzymatique. Des matrikines ont déjà été citées dans la littérature pour envisager de traiter les arthropathies, démontrant de potentiels effets positifs.

C'est dans ce contexte que nous avons testé l'effet des hydrolysats de collagènes d'origine marine sur des chondrocytes articulaires équins, afin de caractériser en partie leurs mécanismes d'action. Dans un premier temps, nous nous sommes assurés de l'innocuité de ces derniers, puis nous avons analysé leurs effets sur l'activité métabolique et la sénescence des chondrocytes. Afin de définir si ces derniers pouvaient jouer un rôle dans la redifférenciation chondrocytaire, les chondrocytes ont été mis en présence des hydrolysats en condition redifférenciante (en présence de BMP-2) et/ ou arthrosique (en présence d'IL-1). Ceci afin de définir si des hydrolysats de collagènes d'origine marine pouvaient exercer un rôle bénéfique dans la redifférenciation des chondrocytes articulaires équins.

2. Article #2



Article

Marine Collagen Hydrolysates Downregulate the Synthesis of Pro-Catabolic and Pro-Inflammatory Markers of Osteoarthritis and Favor Collagen Production and Metabolic Activity in Equine Articular Chondrocyte Organoids

Bastien Bourdon ^{1,2,†}, Romain Contentin ^{1,†}, Frédéric Cassé ¹, Chloé Maspimby ¹, Sarah Oddoux ², Antoine Noël ², Florence Legendre ¹, Nicolas Gruchy ^{1,3} and Philippe Galéra ^{1,*}

- ¹ Normandie University, UNICAEN, BIOTARGEN, 14000 Caen, France; bastien.bourdon@unicaen.fr (B.B.); contentinr@email.chop.edu (R.C.); frederic.casse@unicaen.fr (F.C.); chloe.maspimby@outlook.com (C.M.); florence.legendre@unicaen.fr (F.L.); nicolas.gruchy@unicaen.fr (N.G.)
- ² Dielen Laboratory, 50110 Tourlerville, France; sarah-oddoux@dielen.fr (S.O.); antoine-noel@dielen.fr (A.N.)
- ³ Department of Genetics, Normandy Center for Genomic and Personalized Medicine, Caen University Hospital, 14000 Caen, France
- * Correspondence: philippe.galera@unicaen.fr
- † Contributed equally to the work.



Citation: Bourdon, B.; Contentin, R.; Cassé, F.; Maspimby, C.; Oddoux, S.; Noël, A.; Legendre, F.; Gruchy, N.; Galéra, P. Marine Collagen Hydrolysates Downregulate the Synthesis of Pro-Catabolic and Pro-Inflammatory Markers of Osteoarthritis and Favor Collagen Production and Metabolic Activity in Equine Articular Chondrocyte Organoids. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 580. <https://doi.org/10.3390/ijms22020580>

Received: 12 November 2020

Accepted: 31 December 2020

Published: 8 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Articular cartilage experiences mechanical constraints leading to chondral defects that inevitably evolve into osteoarthritis (OA), because cartilage has poor intrinsic repair capacity. Although OA is an incurable degenerative disease, several dietary supplements may help improve OA outcomes. In this study, we investigated the effects of Dielen[®] hydrolyzed fish collagens from skin (Promerim[®]30 and Promerim[®]60) and cartilage (Promerim[®]40) to analyze the phenotype and metabolism of equine articular chondrocytes (eACs) cultured as organoids. Here, our findings demonstrated the absence of cytotoxicity and the beneficial effect of Promerim[®] hydrolysates on eAC metabolic activity under physioxia; further, Promerim[®]30 also delayed eAC senescence. To assess the effect of Promerim[®] in a cartilage-like tissue, eACs were cultured as organoids under hypoxia with or without BMP-2 and/or IL-1 β . In some instances, alone or in the presence of IL-1 β , Promerim[®]30 and Promerim[®]40 increased protein synthesis of collagen types I and II, while decreasing transcript levels of proteases involved in OA pathogenesis, namely *Htra1*, and the metalloproteinases *Mmp1-3*, *Adams5*, and *Cox2*. Both Promerim[®] hydrolysates also decreased Htra1 protein amounts, particularly in inflammatory conditions. The effect of Promerim[®] was enhanced under inflammatory conditions, possibly due to a decrease in the synthesis of inflammation-associated molecules. Finally, Promerim[®] favored in vitro repair in a scratch wound assay through an increase in cell proliferation or migration. Altogether, these data show that Promerim[®]30 and 40 hold promise as dietary supplements to relieve OA symptoms in patients and to delay OA progression.

Keywords: chondrocyte; equine model; matrix-associated autologous chondrocyte implantation (MACI); osteoarthritis; collagen; collagen hydrolysates; interleukin-1; catabolic markers; senescence; in vitro repair

1. Introduction

Articular cartilage is a highly specialized tissue covering the extremities of bones, thereby ensuring smooth joint movements as well as shock absorption. Hyaline articular cartilage is composed of an abundant extracellular matrix (ECM) and a main cell type, the chondrocyte, which is present in small quantities (1 to 2% of the cartilage volume) [1]. Chondrocytes synthesize an ECM composed of characteristic molecules, such as type II, IX, XI collagens and aggrecan, especially during embryonic stages, although these molecules also ensure the homeostasis of the tissue in adulthood, albeit with low turnover [2].

Hyaline cartilage synthesis can be promoted by growth factors, such as transforming growth factor- β (TGF- β) or bone morphogenic proteins (BMP) [3]. Cartilage is not innervated and is avascular; for this reason, chondrocytes subsist in hypoxia [4]. Oxygen is delivered to the cartilage via the synovial fluid, in part secreted by synoviocytes, or through diffusion from the subchondral bones; oxygen concentrations range from 1 to 10% depending on the depth of the tissue [5].

One of the hallmarks of osteoarthritis (OA) is the disruption of cartilage homeostasis [6–9], further aggravated by the poor intrinsic capacity of cartilage for self-repair [10]. Subsequently, cartilage degradation occurs, eventually exposing the subchondral bone, and leading to stiff and painful joints. In OA, catabolism is increased and anabolism is downregulated. Nevertheless, the first response following cartilage injury is a transient increase in chondrocyte proliferation, whereby chondrocytes form clusters and enhance their ECM production, particularly by synthesizing type I collagen [6,7,9]. However, type I collagen does not share the same biomechanical properties as typical cartilage collagens, and thus makes for a brittle cartilage matrix called fibrocartilage. Fibrocartilage no longer fulfills hyaline cartilage function and degrades more quickly. In an OA pro-inflammatory context, cytokines such as interleukin-1 (IL-1) and the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) cause tissue degradation by decreasing anabolism and inducing the expression/activation of proteases including metalloproteinases (MMPs) and aggrecanases [6,7]. Although the OA etiology is diverse, it is generally due to repeated shocks, and/or joint overload, combined with ageing. Other factors such as obesity and genetic factors may also be related to OA.

Humans and horses have very similar cartilage in many ways, particularly in terms of their biochemical composition, cell composition, and the thickness of articular cartilage [11]. In addition, like humans, horses can develop OA spontaneously. Moreover, humans and sport horses can experience comparable biomechanical stresses, and the causes of the onset of the OA process are very similar, namely sports activities and ageing. Numerous studies aimed at improving OA treatments in the equine model are therefore directly transposable to humans, and the horse represents the best large mammal model for pre-clinical studies in the context of osteo-articular disorders, particularly arthropathies. Additionally, the size of horse joints makes the horse an ideal model from an experimental point of view, because a large amount of cartilage can be recovered and in vivo experiments can be carried out in the horse. Joint injuries also represent the main cause of the decrease in physical performance and lameness in horses [12]. They generally lead to the premature cessation of the horse's sport career, incurring significant financial losses for the equine industry [13].

To date, there are no long-term solutions to treat OA, either in humans or in horses. For the management of OA, the use of a combination of pharmacological and non-pharmacological treatments is highly recommended. The main pharmacological treatments aim to reduce inflammation and pain through the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) and analgesics. For severe OA, intra-articular injections of corticosteroids or hyaluronan can be prescribed and, in the final stages of OA, especially in humans, only prosthetic surgery is efficient [14–16]. The use of nutraceuticals, or dietary supplements, represents an ongoing strategy for the management and prevention of OA as a complement to classical clinical therapies [17].

Horse owners are becoming increasingly interested in alternatives to traditional clinical approaches, such as nutritional supplements [18]. Numerous dietary supplements, such as glucosamine, chondroitin sulfate, and collagen hydrolysates represent promising therapeutic alternatives to favoring cartilage homeostasis when they are used alone or in combination [17,19–23]. The most common products used as nutraceuticals are chondroitin sulfate and glucosamine [17]. One study demonstrated that chondroitin sulfate improves pain symptoms in the short term, with a low risk of adverse events [22]. Chondrocyte culture in the presence of glucosamine may promote the production of proteoglycans [19]. Other food supplements, such as curcumin or frankincense (*Boswellia* sp.), also appear to hold promise [17,20,21]. Dietary supplements can be combined with surgical techniques

to help patients to recover properly. However, to date, no food supplement has been demonstrated to be able to regenerate hyaline articular cartilage.

Matrikines, which are bioactive peptides resulting from the degradation of the ECM, may be promising therapeutic possibilities for OA, because some of them have been described as playing a role in wound healing and in the synthesis of anabolic components in fibroblasts [24]. Other studies have shown that, in women with moderate knee osteoarthritis, daily oral intake of collagen peptides for 6 months reduces pain and increases mobility of the affected joint [25]. Promerim[®]30, made of fish skin collagens, is a main ingredient in the dietary supplement Osteocalm[®], which has proven, like other collagens (such as undenatured type II collagen (UC-II[®])), to be clinically effective for treating joint pain and stiffness associated with OA in humans [17,26,27]. Moreover, recent investigations show that enzymatically hydrolyzed collagens are absorbed and distributed to joint tissues and have analgesic and anti-inflammatory properties [28].

In the present study, we assessed the effects of three collagen hydrolysates of marine origin (derived from fish skin (Promerim[®]30 and Promerim[®]60) and fish cartilage (Promerim[®]40)) on the metabolism of chondrocytes cultured as cartilage organoids, as previously described [9,29,30]. The cartilaginous quality of the organoids and the effects of Promerim[®] were assessed through an extensive study of transcripts and protein amounts of typical and atypical markers of hyaline chondrocytes. Additionally, we characterized the effect of Promerim[®] on chondrocyte proliferation/viability and senescence. This study attempted to identify some of the molecular mechanisms that may be responsible for the potential beneficial effects of hydrolyzed collagens on chondrocyte metabolism.

2. Results

2.1. Promerim[®]30, 40, and 60 Have no Cytotoxic Effects on Equine Articular Chondrocytes, They Promote Their Metabolic Activity and Promerim[®]30 Downregulates Cellular Senescence

eACs were cultured as cell monolayers. At 80% confluency, Promerim[®]30, 40, or 60 was added at concentrations ranging from 0.1 µg/mL to 250 µg/mL. Then, eACs were grown either in normoxia or in hypoxia, in serum-free medium, or in the presence of 2% FCS for 72 h. Hypoxia and the serum-free media were used to mimic the in vivo microenvironment of chondrocytes as much as possible. Regardless of the oxia condition or the FCS concentration, none of the Promerim[®] hydrolysates, regardless of concentration, were cytotoxic for eACs (Figure 1 and Figure S1).

We then investigated the effect of Promerim[®] on the mitochondrial metabolic activity of eACs (XTT assay) in serum-free media. In hypoxia, regardless of the duration of the incubation and the concentration of Promerim[®]30, eAC mitochondrial activity remained unchanged, compared with the control 0% FCS condition (Figures 2A and 3A). On the other hand, Promerim[®]40 at 0.1 µg/mL, 0.5 µg/mL, 50 µg/mL, and 100 µg/mL for a 48 h incubation period led to a significant increase in the metabolic activity of eACs compared with the 0% FCS control (Figures 2B and 3B).

After 48 h of treatment with Promerim[®]60 used at 0.1 µg/mL, 0.5 µg/mL, 1 µg/mL, and 100 µg/mL, eAC metabolic activity increased significantly, compared with the 0% FCS control. We observed the same trend at the other concentrations of Promerim[®]60 for 48 h or for all the concentrations when Promerim[®]60 was added for 72 h, although the results were not significant (Figures 2C and 3C). We observed similar results when eACs were cultured in normoxia, especially for Promerim[®]40 and Promerim[®]60 at low and high concentrations after 48 h of incubation (Figures S2 and S3).

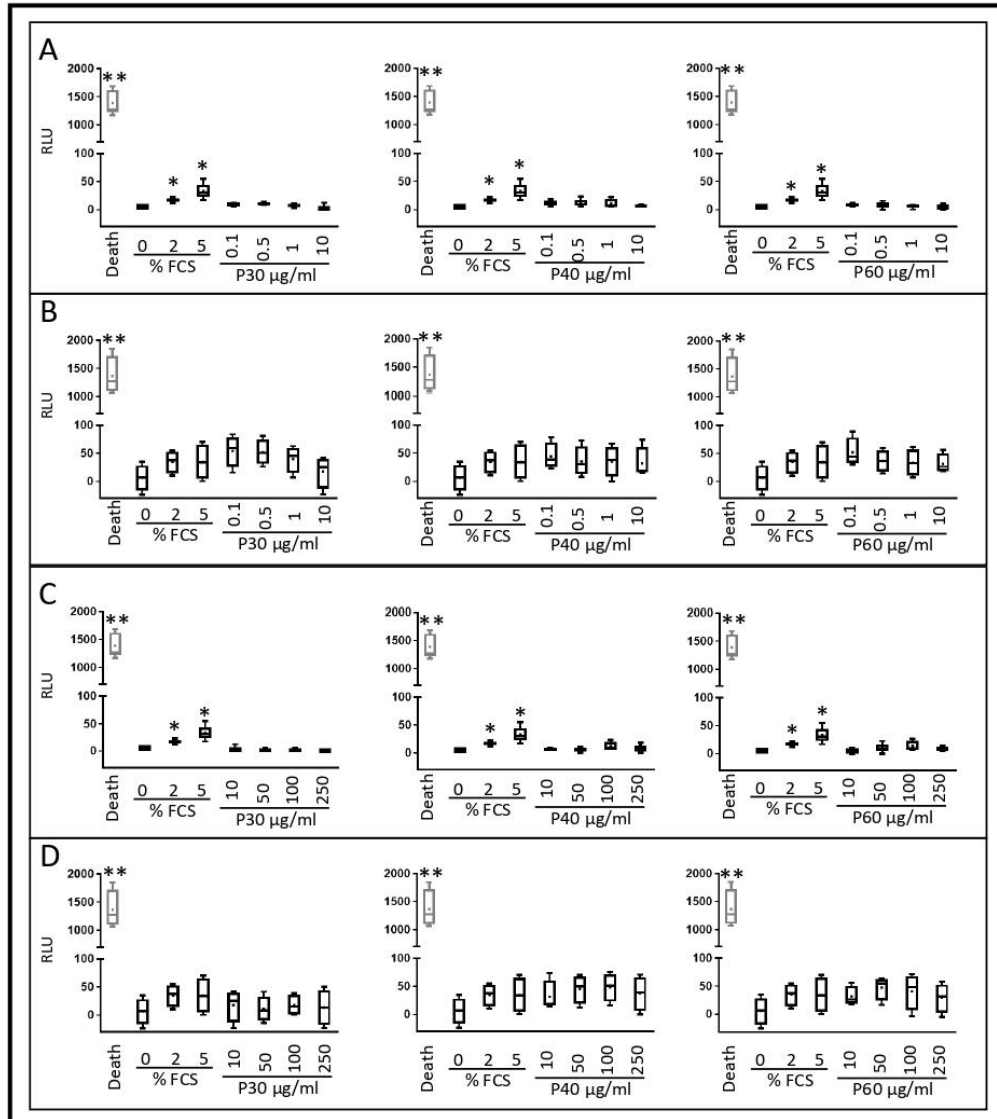


Figure 1. Promerim[®]30, 40, and 60 have no cytotoxic effect on equine articular chondrocytes cultured in hypoxia. Equine articular chondrocytes were amplified and seeded at P3. At 80% of confluency, the cells were treated with Promerim[®] hydrolysates at several concentrations (0.1, 0.5, 1, and 10 µg/mL) (**A,B**) and (10, 50, 100, 250 µg/mL) (**C,D**) in the absence (0% (**A,C**)) or presence of 2% fetal calf serum (FCS) (**B,D**) and then cultured for 72 h in hypoxia. Controls with 0, 2, and 5% of FCS were included, as well as a death control (triton-induced death). The levels of adenylate kinase were measured in the media after 72 h of culture (Toxilight kit, Interchim). Data are represented as box plots ($n = 5$). Statistical analyses were performed using the Mann–Whitney test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$), and the 2% and 0% FCS conditions were used as references. P30, P40, and P60: Promerim[®]30, Promerim[®]40, and Promerim[®]60.

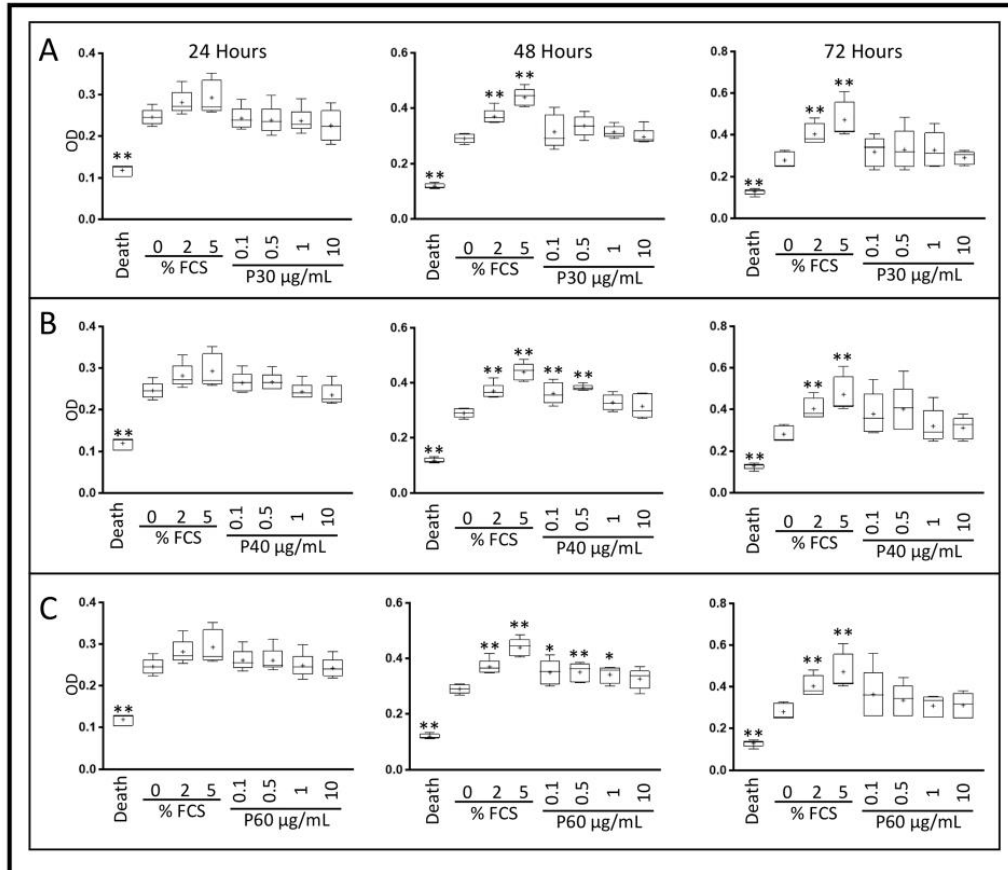


Figure 2. Effect of low concentrations of Promerim[®]30, 40, and 60 on the mitochondrial activity of equine articular chondrocytes cultured in the absence of serum. Equine articular chondrocytes were amplified and seeded at P3. At 80% of confluency, the cells were treated with Promerim[®]30 (A), 40 (B), 60 (C) at several concentrations (0.1, 0.5, 1, and 10 µg/mL) in the absence of FCS and then cultured for 24, 48 and 72 h in hypoxia. Controls with 0%, 2% and 5% of fetal calf serum (FCS), and a death control (triton-induced death) were included. The levels of formazan were measured (OD) in the media at the end of the incubation period (XTT kit, Roche). Data are represented as box plots ($n = 5$). Statistical analyses were performed using the Mann–Whitney test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) and the 0% FCS condition was used as a reference. P30, P40, and P60: Promerim[®]30, Promerim[®]40 and Promerim[®]60.

Because subsequent redifferentiation experiments were performed in the presence of 2% FCS, we also assessed the effects of Promerim[®] on eACs (metabolic activity, senescence) cultured in presence of 2% FCS and in hypoxia (Figures 4–6). The effect of normoxia was also evaluated (Figures S4 and S5).

In hypoxia, Promerim[®]30 increased eAC mitochondrial metabolic activity after 72 h of treatment, regardless of the concentration used, reaching levels similar to those observed with 5% FCS (Figures 4A and 5A). Regardless of its concentration of use, Promerim[®]40 started to increase eAC mitochondrial metabolic activity as early as 24 h of treatment. This increase was confirmed when eACs were cultured for 72 h in the presence of Promerim[®]40. A trend was also observed for 48 h of incubation in the presence of Promerim[®]40 (Figures 4B and 5B). Promerim[®]60, like Promerim[®]30, induced a significant increase in eAC metabolic activity when the incubation time lasted 72 h, although the same trend was observed for shorter incubation times (Figures 4C and 5C).

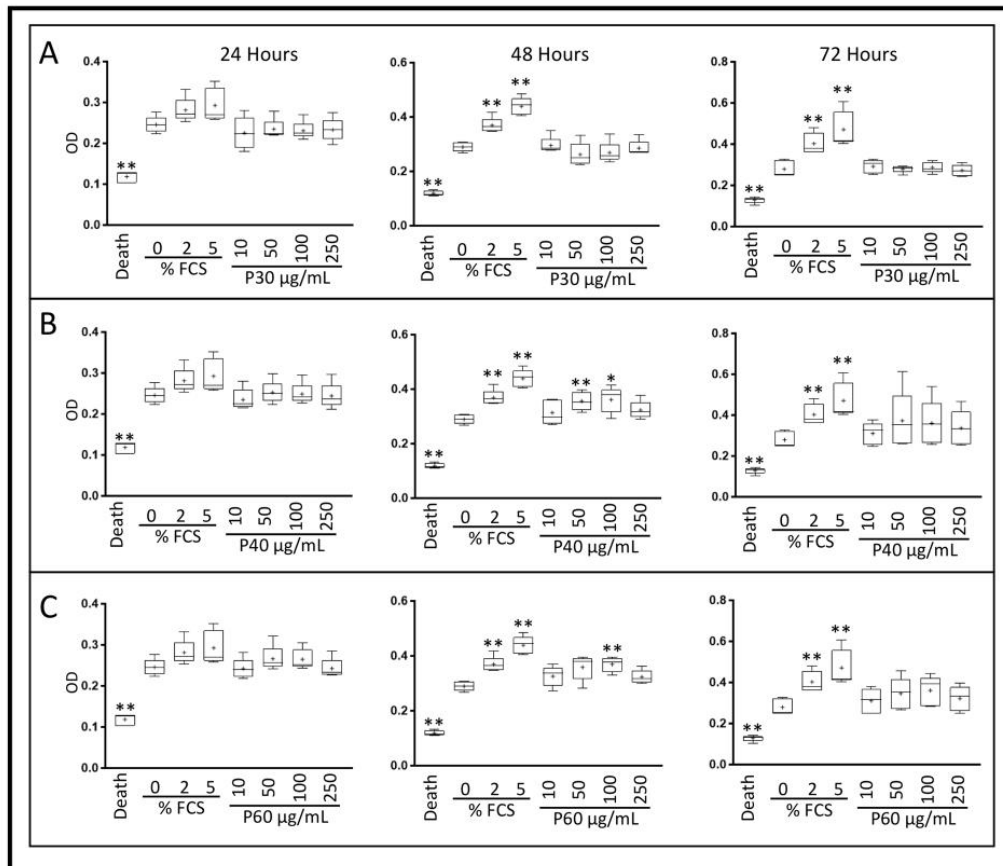


Figure 3. Effect of high concentrations of Promerim[®]30, 40, and 60 on the mitochondrial activity of equine articular chondrocytes cultured in the absence of fetal calf serum (FCS). Equine articular chondrocytes were amplified and seeded at P3. At 80% of confluency, the cells were treated with Promerim[®]30 (A), 40 (B), 60 (C) at several concentrations (10, 50, 100, and 250 µg/mL) in the absence of FCS and then cultured for 24, 48, and 72 h in hypoxia. Controls with 0%, 2% and 5% of FCS, and a death control (triton-induced death) were included. The levels of formazan were measured (OD) in the media after 24, 48 and 72 h of culture (XTT kit, Roche). Data are represented as box plots (*n* = 5). Statistical analyses were based on the Mann–Whitney test (* *p* < 0.05; ** *p* < 0.01) and the 0% FCS condition was used as a reference. P30, P40 and P60: Promerim[®]30, Promerim[®]40, and Promerim[®]60.

When eACs were cultured in normoxia, the Promerim[®] hydrolysates led to similar effects on eAC mitochondrial activity, although their kinetics of action changed slightly. We observed an increase in activity when eACs were cultured with Promerim[®]30 or Promerim[®]40 for 72 h and an increase as early as 24 h of incubation with Promerim[®]60 (Figures S4 and S5).

We then investigated the effect of Promerim[®] hydrolysates on eAC senescence. To do so, eACs were treated with Promerim[®]30, 40, or 60 used at 50 and 100 µg/mL for 72 h, and in the presence of 2% FCS either under hypoxia or in normoxia. Then, we assessed SA-β-galactosidase activity. In hypoxia, Promerim[®]30 significantly downregulated SA-β-galactosidase activity compared with the 2% FCS control (Figure 6A). Although no significant differences were observed when eACs were treated with Promerim[®]40 or 60, the activity of SA-β-galactosidase also tended to decrease. In normoxia (Figure 6B), the activity of SA-β-galactosidase was not significantly modulated, compared with the 2% FCS control. However, Promerim[®]30 used at 50 µg/mL tended to decrease the activity of

β -galactosidase. Altogether, these data show that Promerim[®]30, 40, and 60 are not cytotoxic for eACs; on the contrary, they favor eAC mitochondrial activity, and Promerim[®]30 inhibits cell senescence.

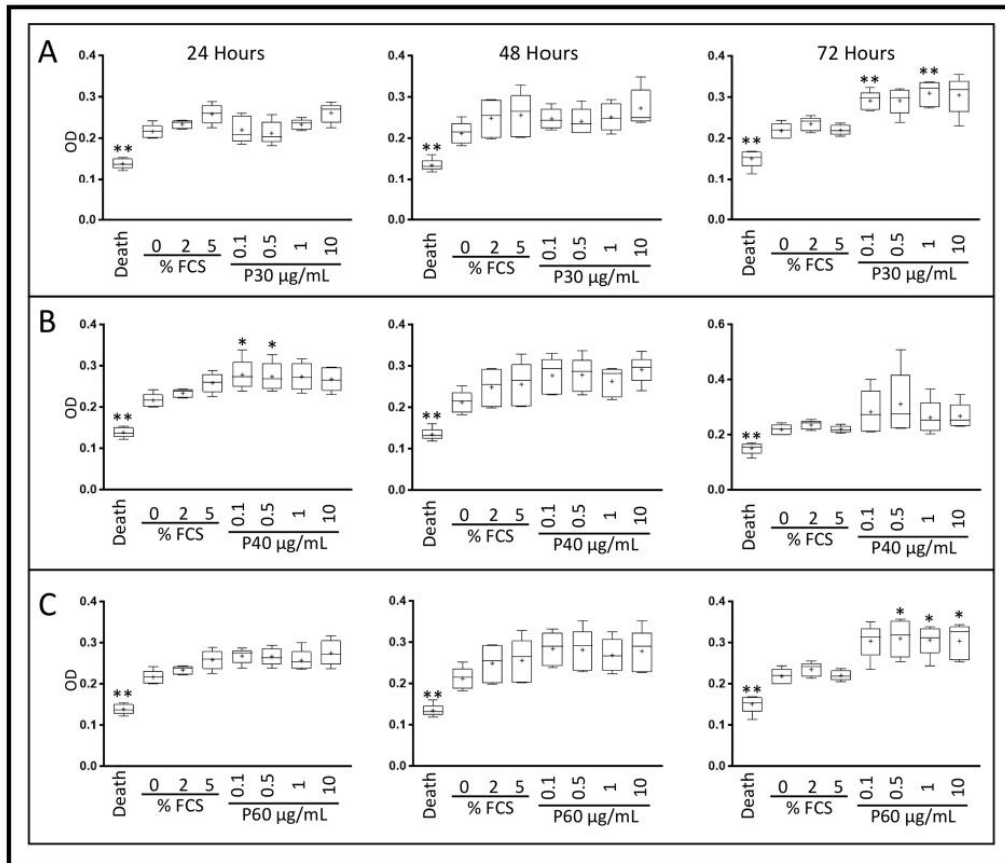


Figure 4. Effect of low concentrations of Promerim[®]30, 40, and 60 on the mitochondrial activity of equine articular chondrocytes cultured in the presence of 2% fetal calf serum (FCS). Equine articular chondrocytes were amplified and seeded at P3. At 80% of confluency, the cells were treated with Promerim[®]30 (A), 40 (B), 60 (C) at several concentrations (0.1, 0.5, 1, and 10 µg/mL) in the presence of 2% FCS and then cultured for 24, 48 and 72 h in hypoxia. Controls with 0%, 2% and 5% of FCS, and a death control (triton-induced death) were included. The levels of formazan were measured (OD) in the media at the end of the incubation period (XTT kit, Roche). Data are represented as box plots ($n = 5$). Statistical analyses were based on the Mann–Whitney test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) and the 0% FCS condition was used as a reference. P30, P40 and P60: Promerim[®]30, Promerim[®]40, and Promerim[®]60.

2.2. Effect of Promerim[®] Hydrolysates on the Expression of mRNAs Encoding Characteristic Biomarkers of Chondrocytes

Then, we assessed the effect of Promerim[®]30 and 40 when chondrocytes were cultured as cartilaginous organoids. In this culture model, chondrocytes evolve in a microenvironment similar to an in vivo context. Furthermore, the cells were cultured in the presence of BMP-2 to maintain a chondrogenic environment, or in the presence of IL-1 β to mimic the pro-inflammatory environment that occurs during OA. The combination of BMP-2 and IL-1 β was used to mimic an early stage of OA. Organoids were cultured in the presence of Promerim[®] hydrolysates at low concentrations (0.1 and 0.5 µg/mL) and at relatively

high concentrations (50 and 100 µg/mL) for 7 days. The control condition corresponds to organoids cultured in the presence of the 3D medium alone.

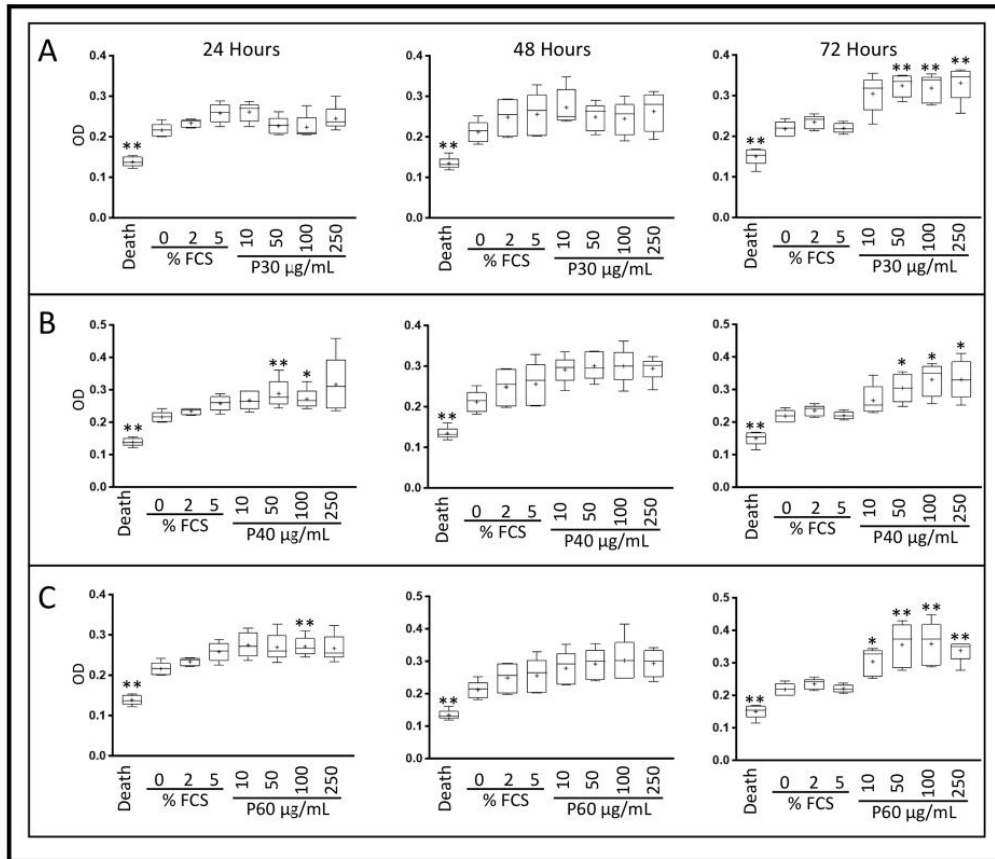


Figure 5. Effect of high concentrations of Promerim[®]30, 40, and 60 on the mitochondrial activity of equine articular chondrocytes cultured in the presence of 2% fetal calf serum (FCS). Equine articular chondrocytes were amplified and seeded at P3. At 80% of confluency, the cells were treated with Promerim[®]30 (A), 40 (B), 60 (C) at several concentrations (10, 50, 100, 250 µg/mL) in the presence of 2% of FCS and then cultured for 24, 48 and 72 h in hypoxia. Controls with 0%, 2% and 5% of FCS, and a death control (triton-induced death) were included. The levels of formazan were measured (OD) in the media at the end of the culture period (XTT kit, Roche). Data are represented as box plots (*n* = 5). Statistical analyses were based on the Mann–Whitney test (* *p* < 0.05; ** *p* < 0.01) and the 2% FCS condition was used as a reference. P30, P40 and P60: Promerim[®]30, Promerim[®]40, and Promerim[®]60.

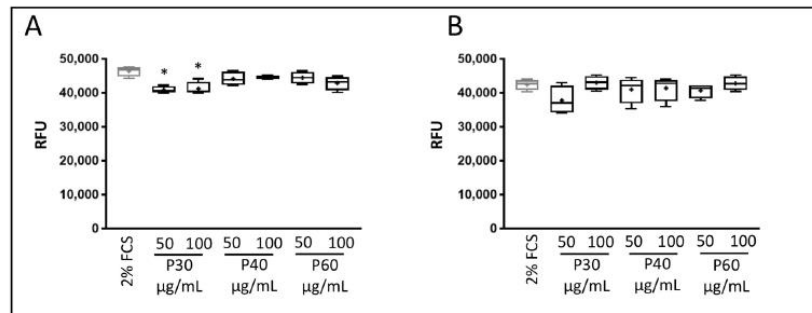


Figure 6. Effect of Promerim[®]30, 40, and 60 on the senescence of equine articular chondrocytes. Equine articular chondrocytes were amplified and seeded at P3. At 80% of confluency, the cells were treated with Promerim[®]30, 40, and 60 at two concentrations (50 and 100 µg/mL) in the presence of 2% fetal calf serum (FCS) and then cultured for 72 h in hypoxia (A) and normoxia (B). Controls with 2% FCS were performed. The levels of β-galactosidase were measured 3 days post-treatment. Data are represented as box plots (n = 4). Statistical analyses were based on the Mann–Whitney test (* p < 0.05) and the 2% FCS condition was used as a reference. P30, P40 and P60: Promerim[®]30, Promerim[®]40, and Promerim[®]60.

When Promerim[®]30 and 40 were used at 0.1 µg/mL and 0.5 µg/mL, respectively, the typical and atypical transcript levels of chondrocyte phenotypic markers both tended to increase (Figure 7). Promerim[®]30 at 0.5 µg/mL and Promerim[®]40 at 0.1 µg/mL had no effect on the steady-state amounts of the typical and atypical molecules. Thus, the *Col2a1:Col1a1* and *Col2a1:Col1a2* mRNA ratios remained unchanged compared with the control. Similar results were observed when Promerim[®]30 and 40 were used at 50 µg/mL and 100 µg/mL, except a decrease in *Acan* mRNA levels (Promerim[®]30 at 100 µg/mL, and Promerim[®]40 at both concentrations) (Figure 8). Interestingly, although Promerim[®] hydrolysates used at low concentrations had no significant effect on *Mmp3*, *Mmp1*, or *Htra1* transcript levels, they led to a decrease in the steady-state amounts of *Mmp1* and *Mmp3* when they were used at 50 µg/mL and 100 µg/mL. The *Htra1* and *Adamts5* mRNA levels were downregulated only when Promerim[®]30 was used at 100 µg/mL, and when Promerim[®]40 was used at 50 µg/mL (Figures 7 and 8). Only Promerim[®]40 tested at 50 µg/mL led to a decrease in mRNA levels of the proliferative marker *Ki67*, but also of *P53* and alinflammation-associated molecules (*Cox2*, *Inos*, and *P65*) (Figure 8).

In the presence of IL-1β, the use of Promerim[®]30 and 40 at 0.1 and 0.5 µg/mL led to an increase in *Col2a1* mRNA levels when compared to the IL-1β treated samples, whereas the mRNA levels of the other phenotypic markers remained unchanged (Figure 9). Thus, the *Col2a1:Col1a1* and *Col2a1:Col1a2* ratios also increased. On the contrary, when both Promerim[®] hydrolysate versions were tested at 50 and 100 µg/mL, the mRNA levels of the phenotypic markers remained unchanged compared with the eACs cultured in the presence of IL-1β only (Figure 10), even though *Col2a1* mRNA levels tended to increase slightly. The mRNA levels of proteases, as well as inflammatory markers, proliferative/senescence markers were not modulated by the addition of Promerim[®] at 0.1 and 0.5 µg/mL (Figure 9). Although a statistically significant decrease of the mRNA steady-state amounts of *Adamts5* was observed only when Promerim[®]30 was used at 100 µg/mL, Promerim[®]30 (50 and 100 µg/mL) and 40 (50 µg/mL) tended to decrease the mRNA levels of the proteases *Htra1*, *Mmp1* and *Adamts5* (Figure 10). mRNA levels of *Cox2* also tended to be downregulated, although only Promerim[®]30 used at 50 µg/mL led to a statistically significant decrease.

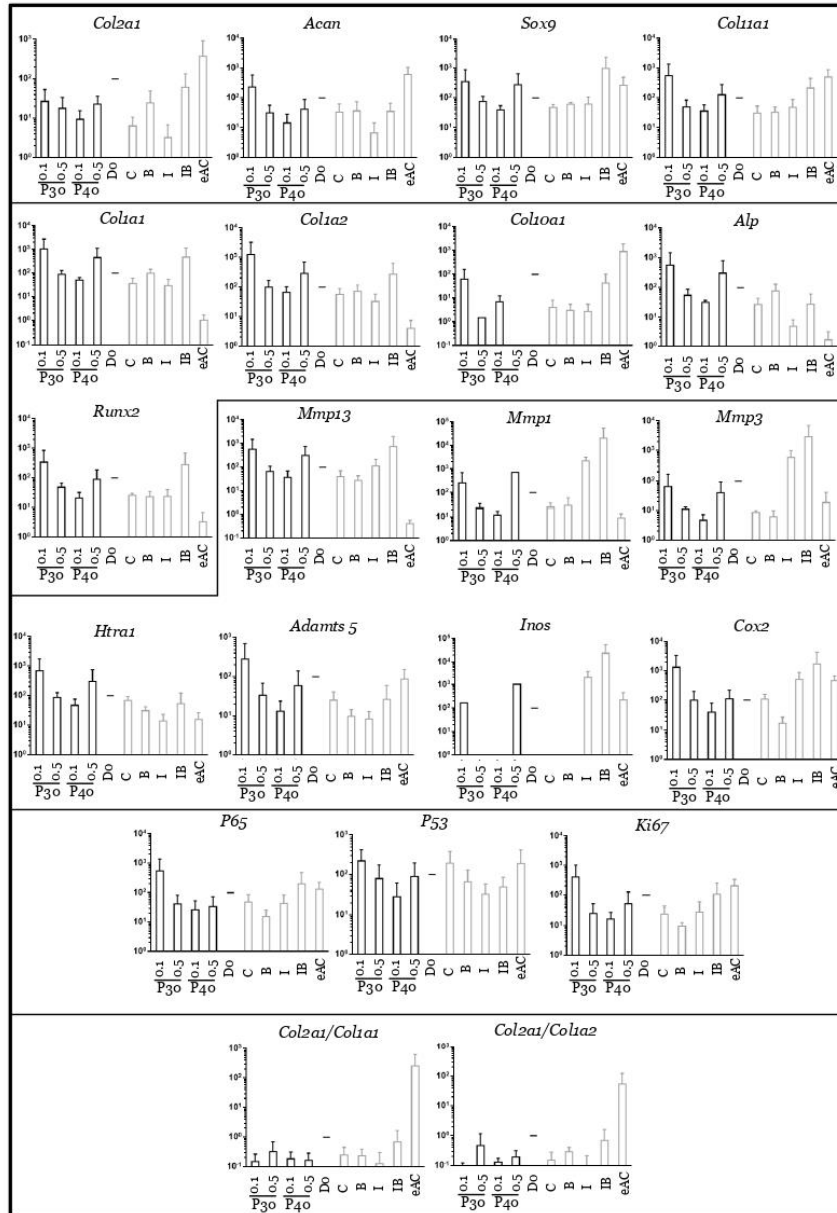


Figure 7. Comparison of mRNA expression in equine articular chondrocytes in the presence or absence of low concentrations of Promerim[®]30 and 40. Equine articular chondrocytes were grown in type I/III collagen sponges at the third passage (P3). They were incubated for 7 days in hypoxia in the absence (C: control) or presence of Promerim[®]30 or Promerim[®]40 (P30 and P40) (0.1 and 0.5 µg/mL), or BMP-2 (B), or IL-1 (I), or BMP-2 and IL-1 (IB). At the end of incubation period, their mRNA was extracted as described in Materials and Methods. The mRNAs were estimated using RT-qPCR after normalization with respect to the β-actin reference gene. Transcript expression is shown in arbitrary units. The *Col2a1:Col1a1* and *Col2a1:Col1a2* ratios are given. The results are shown as histograms and the significance of the values between the different treatments and the control (C) was tested using a Mann–Whitney test; *n* = 3. eAC: mRNA extracts obtained from equine articular chondrocytes released from cartilage after overnight enzymatic digestion were used as controls. D0: cells seeded in sponges and arrested after 16 h of incubation.

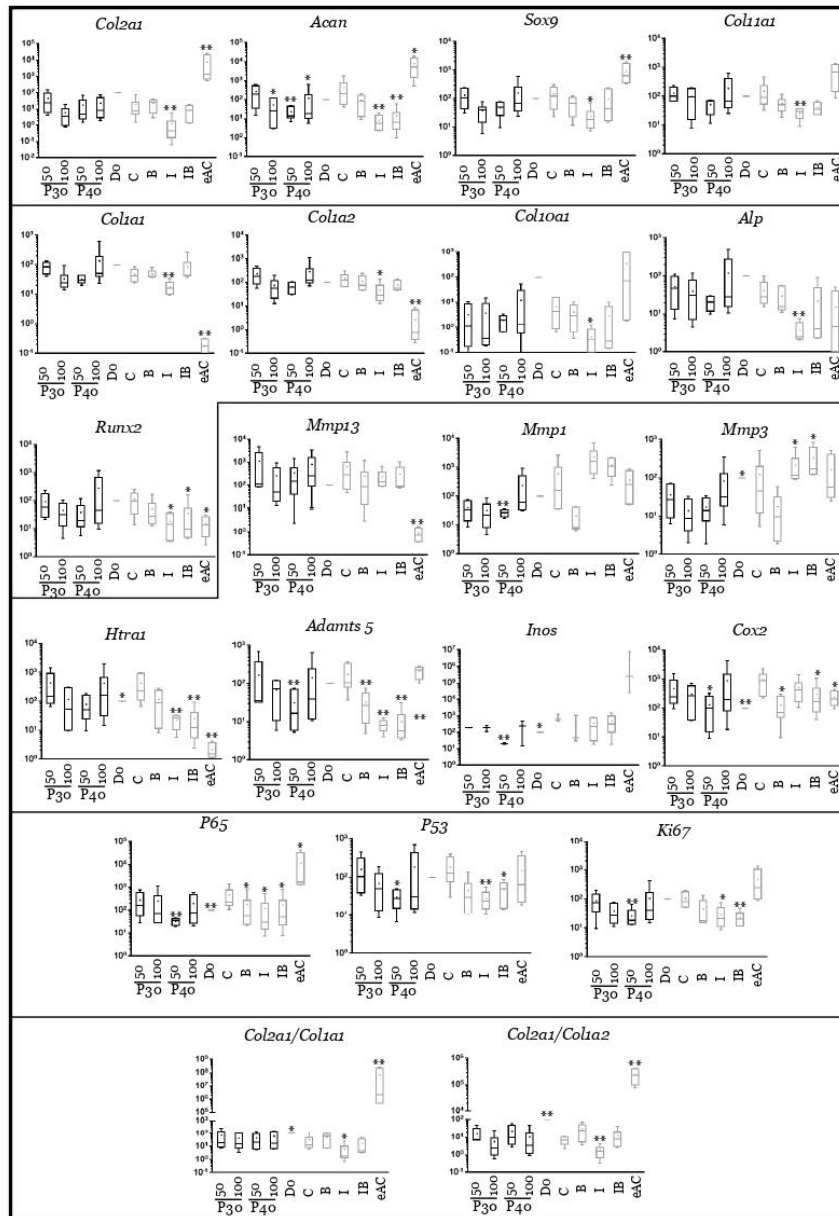


Figure 8. Comparison of mRNA expression in equine articular chondrocytes in the presence or absence of high concentrations of Promerim[®]30 and 40. Equine articular chondrocytes were grown in type I/III collagen sponges at the third passage (P3). They were incubated for 7 days in hypoxia in the absence (C: control) or presence of Promerim[®]30 or Promerim[®]40 (P30 and P40) (50 and 100 µg/mL), or BMP-2 (B), or IL-1 (I), or BMP-2 and IL-1 (IB). At the end of incubation period, their mRNA was extracted as described in Materials and Methods. The mRNAs were estimated using RT-qPCR after normalization with respect to the β-actin reference gene. Transcript expression is shown in arbitrary units. The *Col2a1:Col1a1* and *Col2a1:Col1a2* ratios are given. The results are shown as box plots (median, quartiles, extreme values) and the significance of the values between the different treatments and the control (C) was tested using a Mann–Whitney test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$); $n = 6$. eAC: mRNA extracts obtained from equine articular chondrocytes released from cartilage after overnight enzymatic digestion were used as controls. DO: cells seeded in sponges and arrested after 16 h of incubation.

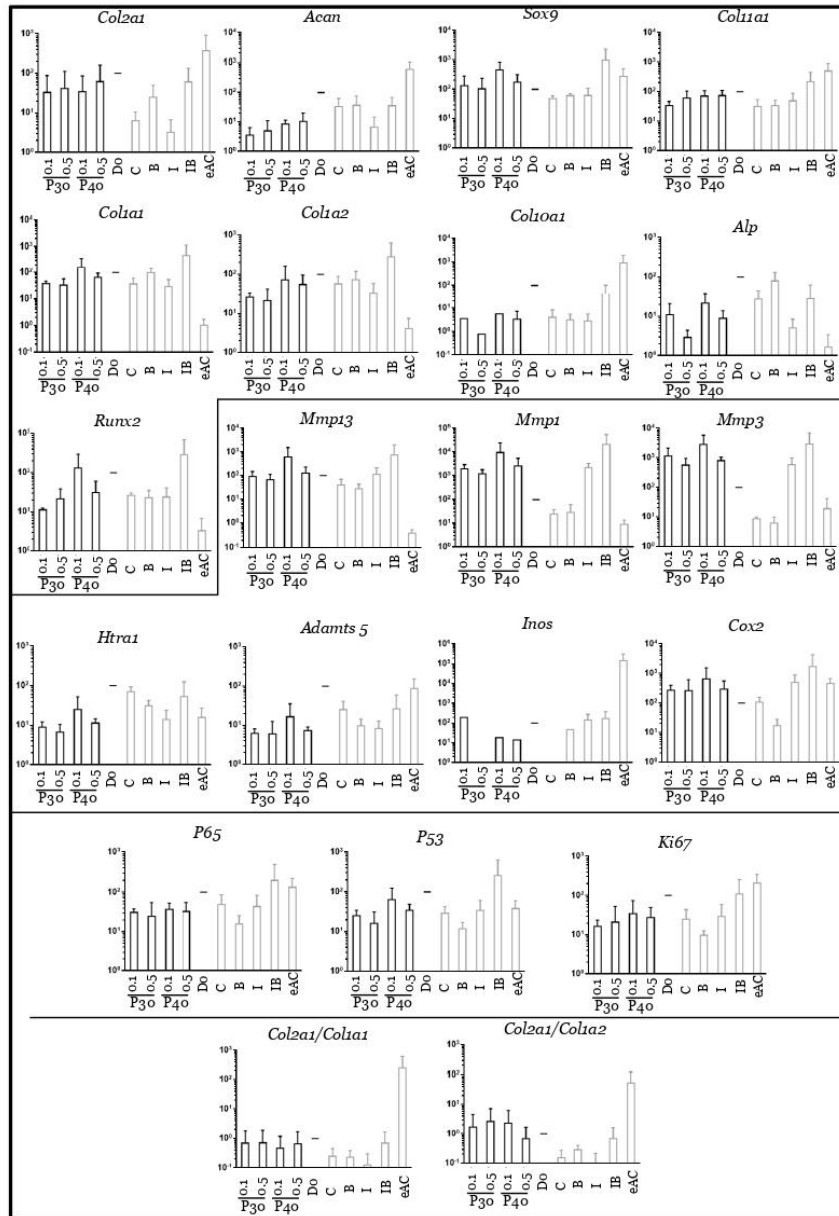


Figure 9. mRNA expression in equine articular chondrocytes treated with Promerim[®]30 and 40 used at low concentrations in the presence of IL-1. Equine articular chondrocytes were grown in type I/III collagen sponges at the third passage (P3). They were incubated for 7 days under hypoxia in the absence (C: control) or both the presence of IL-1 + P30 and IL-1 + P40, or BMP-2 alone (B), or IL-1 alone (I), or BMP-2 together with IL-1 (IB). The Promerim[®] were used at the concentrations of 0.1 and 0.5 µg/mL. The mRNAs were estimated using RT-qPCR after normalization with respect to the β-actin reference gene. Transcript expression is shown in arbitrary units. The *Col2a1:Col1a1* and *Col2a1:Col1a2* ratios are given. The results are shown as histograms and the significance of the values between the different treatments and the control case (IL-1) was tested using a Mann–Whitney test; *n* = 3. eAC: mRNA extracts obtained from equine articular chondrocytes released from cartilage after overnight enzymatic digestion were used as controls. DO: cells seeded in sponges and arrested after 16 h of incubation. P30 and P40: Promerim[®]30 and 40.

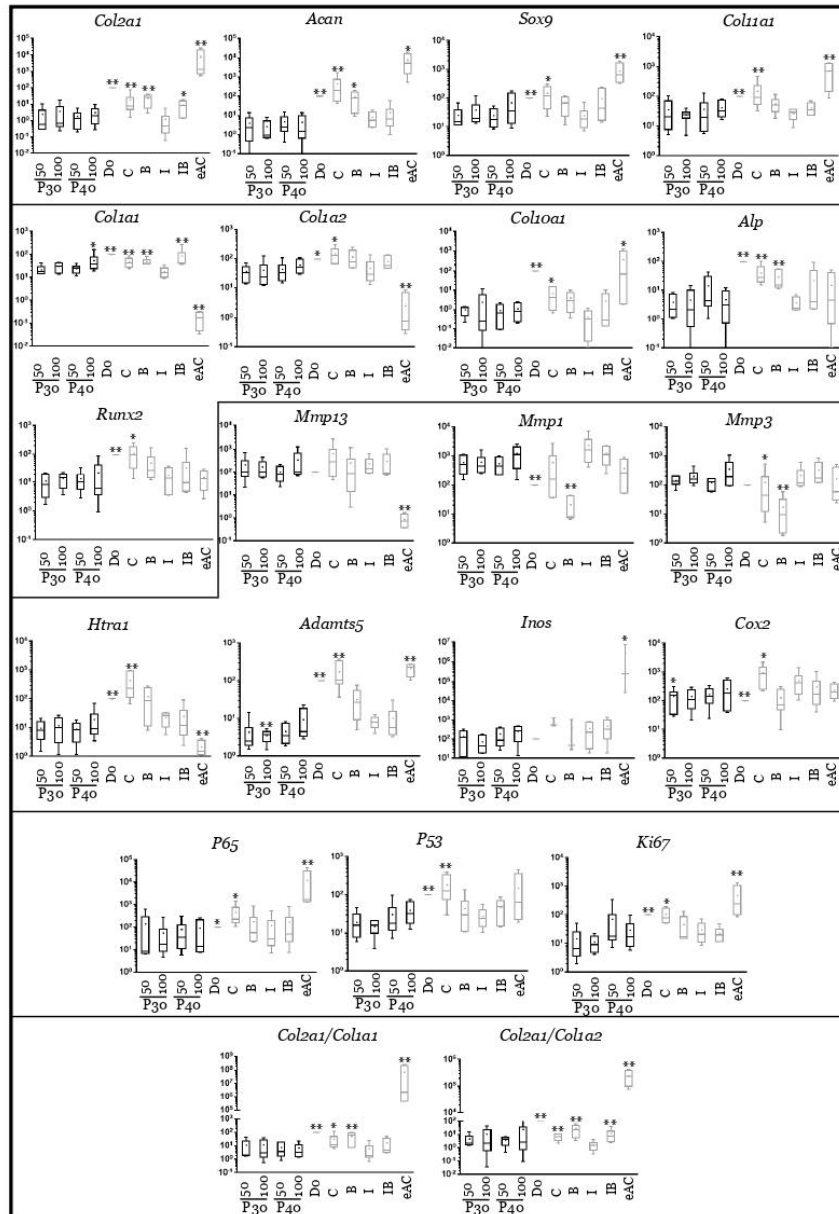


Figure 10. mRNA expression in equine articular chondrocytes treated with Promerim[®]30 and 40 used at high concentrations in the presence of IL-1. Equine articular chondrocytes were grown in type I/III collagen sponges at the third passage (P3). They were incubated during 7 days under hypoxia in the absence (C: control) or both the presence of IL-1 + P30 and IL-1 + P40, or BMP-2 alone (B), or IL-1 alone (I), or BMP-2 together with IL-1 (IB). The Promerim[®] were used at the concentrations of 50 and 100 µg/mL. The mRNAs were estimated using RT-qPCR after normalization with respect to the β-actin reference gene. Transcript expression is shown in arbitrary units. The *Col2a1:Col1a1* and *Col2a1:Col1a2* ratios are given. The results are shown as box plots (median, quartiles, extreme values) and the significance of the values between the different treatments and the control case (IL-1) was tested using a Mann–Whitney test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$); $n = 6$. eAC: mRNA extracts obtained from equine articular chondrocytes released from cartilage after overnight enzymatic digestion were used as controls. DO: cells seeded in sponges and arrested after 16 h of incubation. P30 and P40: Promerim[®]30 and 40.

Under chondrogenic differentiating conditions, in the presence of BMP-2, Promerim[®]30 and 40 led to a slight increase in *Col2a1* mRNA levels, only when they were added at 0.5 µg/mL when compared to the BMP-2 treated samples (Figure 11). The mRNA levels of the other phenotypic markers, and also of *Col1a1* and *Col1a2*, were unchanged upon the addition of the Promerim[®]30 or 40 used at 0.1, 50, and 100 µg/mL (Figure 11 and Figure S6). Thus, the ratios *Col2a1:Col1a1* and *Col2a1:Col1a2* tended to increase, compared with the BMP-2 control, only when Promerim[®]30 and 40 were used at 0.5 µg/mL. Promerim[®]30 and 40 (0.1 and 0.5 µg/mL) tended to increase the mRNA levels of the proteases *Mmp3*, *Adamts5*, and *Htra1* (for Promerim[®]30, only at 0.1 µg/mL for the latter). *Cox2* and *Ki67* mRNA amounts also increased. At concentrations of 50 µg/mL, only Promerim[®]40 led to an increase in *Mmp1*, *Adamts5*, *P65*, and *Cox2* (Figure S6). At 100 µg/mL, compared with the BMP-2 condition, neither Promerim[®] led to any modulation of the mRNA levels of the proteases, and inflammation- and proliferation-associated molecules studied.

Finally, in pre-arthritis conditions, in the presence of both IL-1β and BMP-2, Promerim[®] hydrolysates at low concentrations (0.1 and 0.5 µg/mL) decreased the mRNA levels of most of the atypical phenotypic molecules studied, notably *Col1a1*, *Col1a2*, and those encoding the proteases, when compared to the IL-1β + BMP-2 control (Figure 12). Nevertheless, even though *Col2a1* mRNA levels were not modulated by Promerim[®]30 or 40, *Col11a1*, *Sox9*, and *Acan* mRNA levels tended to decrease. The mRNA levels of the proliferation-associated molecules *ki67*, but also *p53*, the inflammation-associated molecules *Cox2* and *p65*, and the hypertrophic markers (*Col10a1*, *Mmp13*, *Runx2*, and *Alp*) decreased slightly. In contrast, when both Promerim[®]30 and 40 were added at the highest concentrations (50 and 100 µg/mL), all the effects detected at low Promerim[®] concentrations were lost, because none of the mRNA of all the markers studied remained modulated (Figure S7).

2.3. Effect of Promerim[®] Hydrolysates on the Protein Expression of Type II and I Collagens and Htra1

We then assessed the quality of the neo-synthesized extracellular matrix of the organoids by monitoring the protein levels of type IIB, II, and I collagens, as well as the serine protease Htra1. We used eACs at P3 to better observe a possible increase in type II collagen isoforms, because eACs cultured in control conditions produced a very low amount of type II collagen, as previously reported [31]. Promerim[®]30 did not show a striking increase in the synthesis of the type II collagen isoforms, regardless of its concentration (Figures 13A,B and 14A,B). Nevertheless, in the presence of IL-1β, Promerim[®]30 systematically led to a slight increase in type IIB collagen expression, compared with the IL-1β treatment. Additionally, without BMP-2 or IL-1β, Promerim[®]30 (0.5, 50, and 100 µg/mL) led to an increase in type I collagen protein amounts (Figures 13B and 14A,B). Although in the presence of BMP-2, Promerim[®]30 had no obvious effect, it was able to systematically counteract the decrease of the type I collagen protein amounts observed in the presence of IL-1β. In combination with both BMP-2 and IL-1β, Promerim[®]30 (0.1, 0.5, and 50 µg/mL) also increased type I collagen protein levels. IL-1β practically systematically decreased Htra1 expression (Figures 13A–C and 14A–D). The inflammatory conditions mimicked by incubation in the presence of IL-1β favored the effect of the Promerim[®]30 on the downregulation of Htra1 expression.

Altogether, these data suggest that Promerim[®]30 holds promise for enhanced extracellular matrix accumulation in an inflammatory microenvironment.

Regarding Promerim[®]40 at 0.1 µg/mL, used alone or in combination with IL-1β, type IIB collagen protein levels remained unchanged and expression was very weak. Type I collagen protein amounts increased when Promerim[®]40 was used alone or in combination with IL-1β. Htra1 protein levels tended to decrease when Promerim[®]40 was combined with IL-1β or with the combination of both IL-1β and BMP-2, compared with the respective controls.

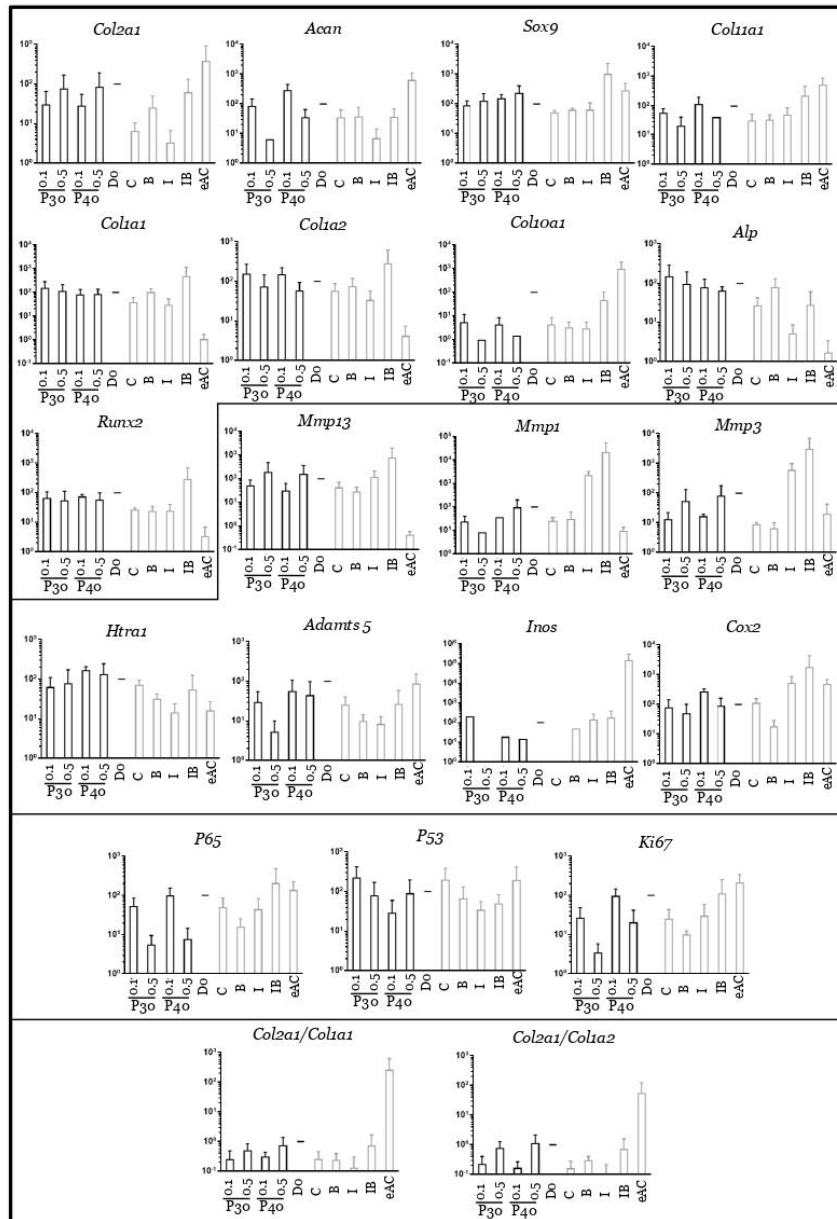


Figure 11. mRNA expression in equine articular chondrocytes treated with low concentrations of Promerim[®]30 and 40 in the presence of BMP-2. Equine articular chondrocytes were grown in type I/III collagen sponges at the third passage (P3). They were incubated during 7 days under hypoxia in the absence (C: control) or both the presence of BMP-2 + P30 and BMP-2 + P40, or BMP-2 alone (B), or IL-1 alone (I), or BMP-2 and IL-1 (IB). The Promerim[®] were used at the concentrations of 0.1 and 0.5 µg/mL. The mRNAs were estimated using RT-qPCR after normalization with respect to the β-actin reference gene. Transcript expression is shown in arbitrary units. The *Col2a1:Col1a1* and *Col2a1:Col1a2* ratios are given. The results are shown as histograms and the significance of the values between the different treatments and the control case (BMP-2) was tested using a Mann–Whitney test; *n* = 3. eAC: mRNA extracts obtained from equine articular chondrocytes released from cartilage after overnight enzymatic digestion were used as controls. DO: cells seeded in sponges and arrested after 16 h of incubation. P30 and P40: Promerim[®]30 and 40.

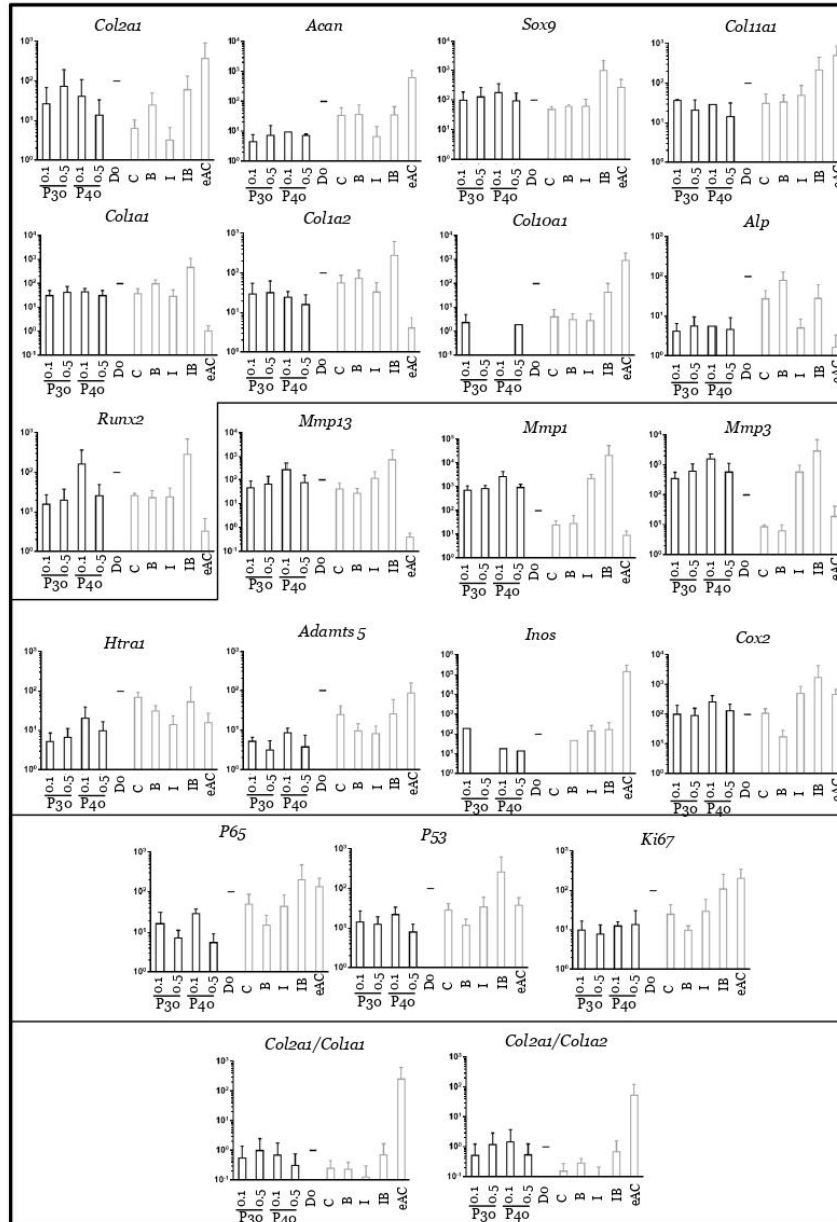


Figure 12. mRNA expression in equine articular chondrocytes treated with low concentrations of Promerim[®]30 and 40 in the presence of both IL-1 and BMP-2. Equine articular chondrocytes were grown in type I/III collagen sponges at the third passage (P3). They were incubated for 7 days under hypoxia in the absence (C: control) or both the presence of P30 + IL-1 + BMP-2 and P40 + IL-1 + BMP-2, or BMP-2 alone (B), or IL-1 alone (I), or BMP-2 together with IL-1 (IB). The Promerim[®] were used at the concentrations of 0.1 and 0.5 µg/mL. The mRNAs were estimated using RT-qPCR after normalization with respect to the β-actin reference gene. Transcript expression is shown in arbitrary units. The *Col2a1:Col1a1* and *Col2a1:Col1a2* ratios are given. The results are shown as histograms and the significance of the values between the different treatments and the control case (IL-1 + BMP-2) was tested using a Mann–Whitney test; *n* = 3. eAC: mRNA extracts obtained from equine articular chondrocytes released from cartilage after overnight enzymatic digestion were used as controls. D0: cells seeded in sponges and arrested after 16 h of incubation. P30 and P40: Promerim[®]30 and 40.

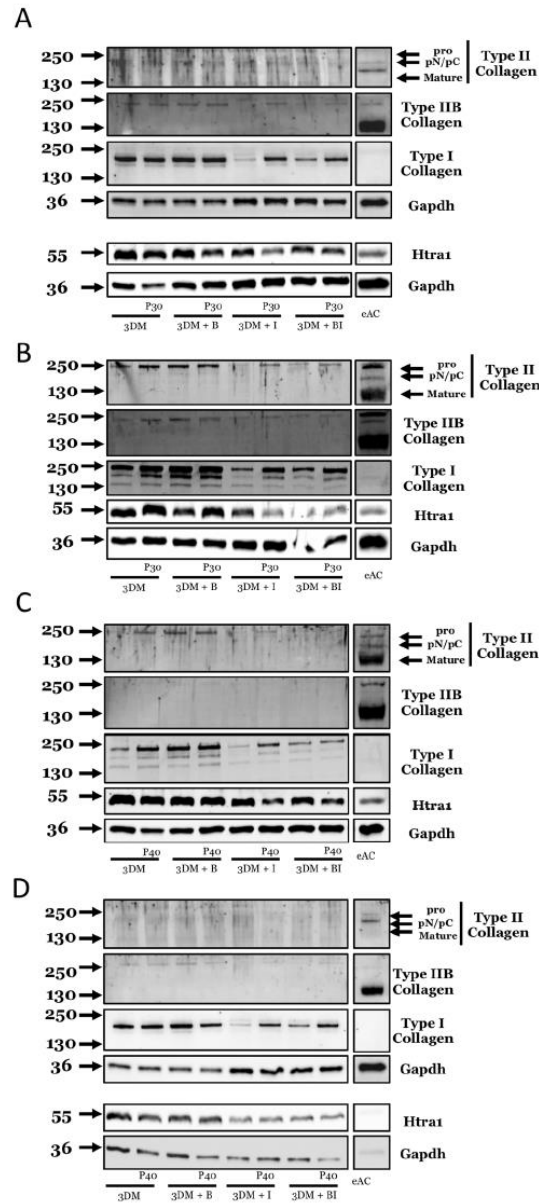


Figure 13. Effect of low concentrations of Promerim[®] on chondrocyte protein expression of types II and I collagens and Htra1. Equine articular chondrocytes (eACs) at P3 were inoculated in collagen sponges with different treatments: 3D control culture medium (3DM), B (BMP-2), I (IL-1), B + I (BMP-2 + IL-1), P30 (Promerim[®]30), P40 (Promerim[®]40). (A) P30 at 0.1 µg/mL; (B) P30 at 0.5 µg/mL; (C) P40 at 0.1 µg/mL; (D) P40 at 0.5 µg/mL. Protein expression of equine articular chondrocytes was evaluated after 7 days of 3D culture in the presence and absence of treatment. The total protein extracts were separated by electrophoresis in 10% acrylamide gel in denaturing condition. The molecular weights expressed in kDa are shown on the left part of the panels and the antibodies used on the right part of the panels. Representative blots from different eAC strains are shown (at least $n = 3$). eAC: protein extracts obtained from equine articular cartilage are used as controls.

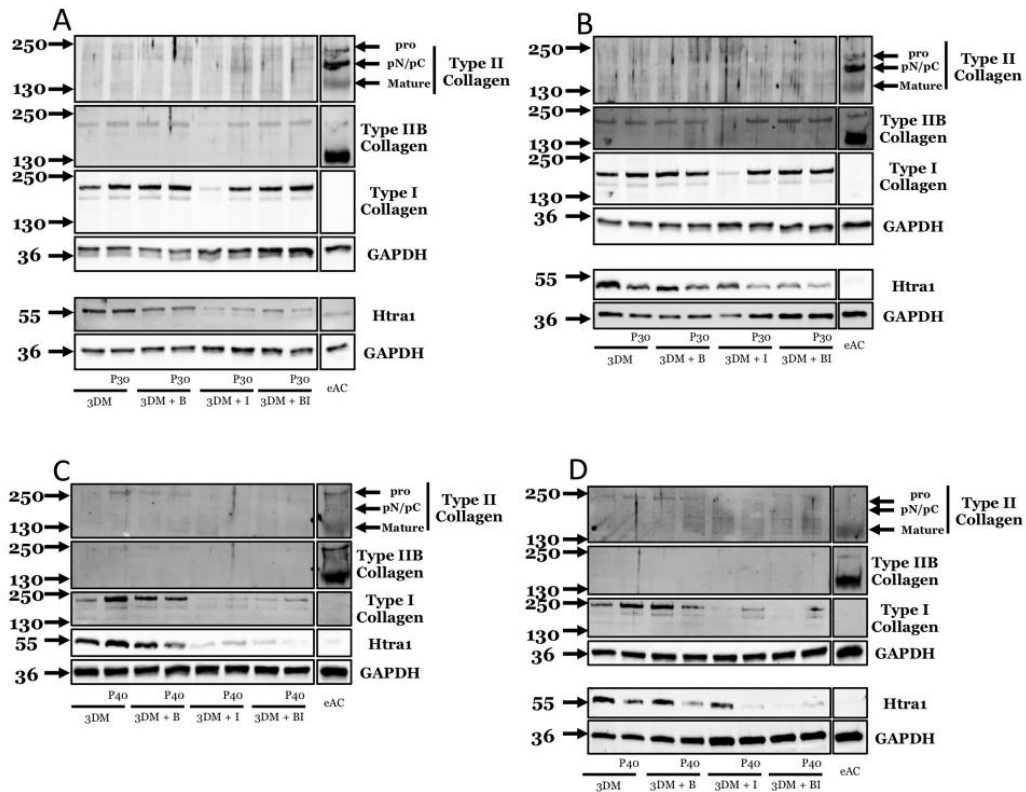


Figure 14. Effect of high concentrations of Promerim[®] on chondrocyte protein expression of types II and I collagens and Htra1. Equine articular chondrocytes (eACs) at P3 were inoculated in collagen sponges with different treatments: 3D control culture medium (3DM), B (BMP-2), I (IL-1), B + I (BMP-2 + IL-1), P30 (Promerim[®]30), P40 (Promerim[®]40). (A) P30 at 50 µg/mL; (B) P30 at 100 µg/mL; (C) P40 at 50 µg/mL; (D) P40 at 100 µg/mL. Protein expression of equine articular chondrocytes was evaluated after 7 days of 3D culture in the presence and absence of treatment. The total protein extracts were separated by electrophoresis in 10% acrylamide gel in denaturing condition. The molecular weights expressed in kDa are shown on the left part of the panels and the antibodies used on the right part of the panels. Representative blots from different eAC strains are shown (at least $n = 3$). eAC: protein extracts obtained from equine articular cartilage are used as controls.

When Promerim[®]40 was used at 0.5 µg/mL, we did not observe any variation in type II collagen or Htra1 protein amounts (Figure 13D). Type I collagen synthesis was increased when Promerim[®]40 was concomitantly added with IL-1β alone or in association with BMP-2.

Promerim[®]40 used at 50 µg/mL or 100 µg/mL did not seem to modulate type II collagen expression (Figure 14C,D). On the other hand, when used alone, Promerim[®]40 at 50 µg/mL strongly increased type I collagen expression. Finally, Promerim[®]40 led to a decrease in Htra1 protein amount in the presence IL-1β.

Promerim[®]40 used at 100 µg/mL, alone or in combination with IL-1β or IL-1β + BMP-2, upregulated the type I collagen accumulation (Figure 14D). On the other hand, a decrease in type I collagen synthesis was observed when Promerim[®]40 was combined with BMP-2.

2.4. *Promerim[®]30 and 40 Promote Proliferation, Whereas Promerim[®]60 Promotes Migration of eACs*

Enhancing proliferation of eACs and promoting the migration of eAC/progenitors to the chondral lesion areas is of particular interest to try to delay OA outcomes. The effects of Promerim[®]30, 40, and 60 on the proliferation/migration of eACs was assessed using a wound healing assay. At 48 h post-scratching, eACs treated with Promerim[®]40 and 60 colonized the wound areas to a higher extent compared with eACs cultured with the control medium containing 2% FCS (control) (Figure 15A). Thus, the cell confluence in the wound area increased significantly when eACs were treated with Promerim[®]40 and 60 (Figure 15B). Although the results were not statistically significant, the same trend was observed when eACs were cultured with Promerim[®]30. Whereas the increase in the confluence when eACs were incubated in the presence of Promerim[®]30 and 40 seemed to be due to an increase in cell proliferation, Promerim[®]60 seemed to favor migration, because we observed spindle-shaped eACs, characteristic of migrating cells (Figure 15C).

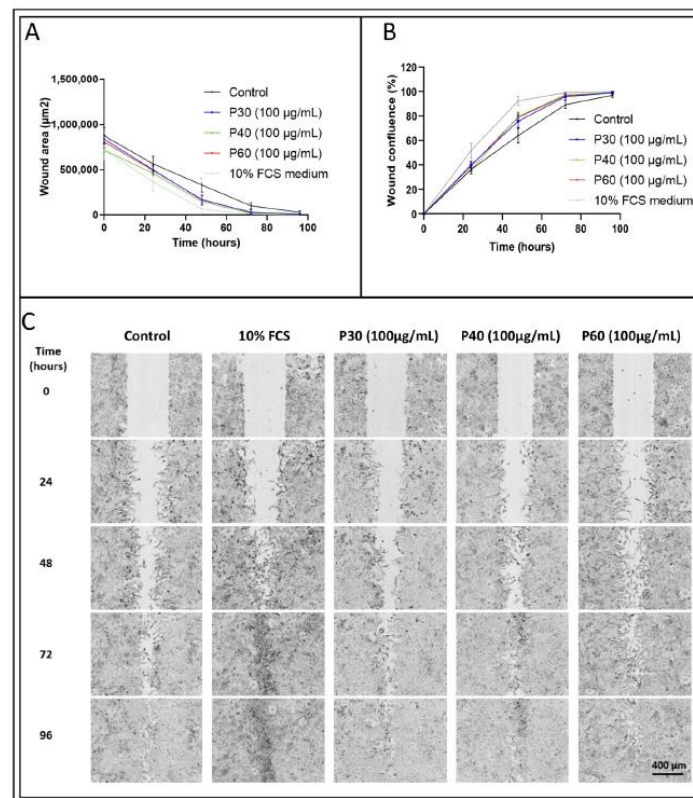


Figure 15. Wound-filling analysis following a scratch wound assay. Equine articular chondrocytes (eACs) were seeded at P2. At 90% of confluency, a scratch wound assay was performed using a WoundMaker[™] kit (Essen BioScience) and then the treatments were added. eACs were incubated in the presence of a culture medium containing 2% fetal calf serum (FCS) (Control), and P30, P40, or P60 at 100 µg/mL. The cells were also incubated in the presence of 10% FCS. The wound areas (A) were monitored until 96 h of incubation, and the wound confluences (B) were calculated using the ImageJ software. Every 24 h, photographs (C) of the wound were taken with Incucyte. The significance of the values between the different treatments and the control case was tested using a two-way ANOVA followed by Bonferroni test for multiple comparisons ($n = 4$). P30, P40 and P60: Promerim[®]30, Promerim[®]40, and Promerim[®]60.

3. Discussion

Numerous nutraceuticals have been studied to relieve discomfort associated with articular disorders, including OA [17,32]. There are hundreds of food supplements available on the market to treat OA. Among them are the most frequently used active ingredients, such as collagen hydrolysates [33], *Curcuma longa* and curcumin extracts [34,35], and *Boswellia serrata* [36,37], which have demonstrated highly and clinically significant short-term reduction in pain [38]. Others, such as undenatured type II collagen [39], avocado and unsaponifiable soy [40], glucosamine, and chondroitin have shown statistically significant improvements in pain management [22,41,42], but their clinical significance has not been clearly identified, because long-term effects on inflammation and matrix regeneration still remain to be demonstrated [38]. Studies have also shown that, in women suffering from moderate knee OA, daily oral intake of collagen peptides for 6 months reduces pain and increases the mobility of the affected joint [25]. Additionally, McAlindon and collaborators performed double-blind clinical trials on 29 individuals aged 49 years and older with severe to moderate OA of the knee. Patients were treated with collagen hydrolysates versus placebo and showed an increase in the quality of the ECM quality after 24 weeks of treatment [15]. These results are in agreement with those we observed in vitro and confirm that the use of collagen hydrolysates in the treatment of OA is relevant.

Collagen hydrolysates belong to one of the most interesting class of nutraceuticals to improve OA condition or delay its outcomes, especially through the downregulation of the inflammation and degradation molecules [28]. The use of collagen hydrolysates in vivo dates back to a 2000 study that reported that collagen hydrolysates were able to reduce pain in patients with knee or hip OA, and increase the blood concentration of hydroxyproline [43]. Since then, different sources of collagens have been studied. For example, chicken collagen hydrolysates keep inflammation and ECM degradation in check in mice, and improve joint mobility in humans [44,45]. Likewise, shark collagen hydrolysates can act on whole joint tissues to counteract OA outcomes in rabbits [46]. Collagen hydrolysates used in our present study were derived from enzymatic hydrolysis into peptides that are more easily absorbed and have a strong affinity with water [47]. The marine environment is very specific—fish evolve in cold, salty environments, and can be subjected to high pressures. These elements differ from collagens derived from farmed land animals (cattle, pigs) and give them different physico-chemical properties due to their amino acid composition. Collagens of marine origin have antibacterial, antioxidant, neuroprotective, and anti-aging properties [48–51]. In addition, marine peptides are believed to promote skin healing in rats [52]. Further in vitro studies to assess the effect of these hydrolysates on cartilage matrices remain to be performed. In this study, we studied the effect of three collagen hydrolysates of marine origin (Promerim[®]30 and Promerim[®]60 from fish skin, and Promerim[®]40 from fish cartilage) on the metabolic activity, senescence, and phenotype of eACs, and on the subsequent quality of cartilaginous organoids.

We first showed that Promerim[®] hydrolysates are not cytotoxic for eACs. Cell viability tests also allowed us to choose four preferential Promerim[®] concentrations to investigate their effects on eAC phenotypes. Promerim[®] concentrations of 0.1 and 0.5 µg/mL were sufficient to obtain an increase in eAC cell metabolic activity. We also selected higher concentrations (X500; X1000) to assess whether the effects of Promerim[®] depended directly on their concentrations, which was an essential question because Promerim[®] hydrolysates are intended to be taken by mouth as a dietary supplement. During digestion, oligopeptides are further metabolized into bioactive di- and tri-peptides in the gastrointestinal tract, and are then released into the bloodstream [53]. Although it is well-known that peptides from dietary supplements can be found in the bloodstream, the concentration of the dietary supplement that actually circulates in the body is unknown. For example, upon oral ingestion of gelatin hydrolysates derived from porcine skin, chicken feet, and cartilage after 12 h of fasting, the peptide form of hydroxyproline increases significantly and reaches a maximum level (20–60 nmol/mL of plasma) after 1–2 h, and then decreases

to half the maximum level 4 h after ingestion [48]. The main constituents of food collagen peptides in human serum and plasma have been identified as Pro-Hyp. In addition, small but significant amounts of Ala-Hyp, Ala-Hyp-Gly, Pro-Hyp-Gly, Leu-Hyp, Ile-Hyp, and Phe-Hyp have been detected [54]. Here, we demonstrated that regardless of their tested concentration, both Promerim[®] hydrolysates were able to increase collagen production and metabolism activity, and decrease catabolism at the mRNA level (see below). Thus, the effect of Promerim[®] is maintained in a large range of concentrations, which makes them relevant as food supplements.

OA is an evolutive disease characterized by sequential events. Following an initiating event, intra-articular inflammation occurs. Then, as a first response, chondrocytes increase their proliferation and ECM production composed of atypical collagen molecules, notably type I collagen. Finally, chondrocytes become senescent, undergo apoptosis, and cartilage ECM is inevitably degraded. These events accompany an imbalance in anabolism and catabolism, with an upregulation of several matrix metalloproteinases, aggrecanases, and serine proteases. Among serine proteases, Htra1 is upregulated in synovial fluid and articular cartilage in patients with OA and rheumatoid arthritis. *Htra1* mRNA levels can increase seven-fold in OA cartilage compared with healthy cartilage [55]. Htra1 plays a pivotal role in the emergence of OA because it degrades directly and indirectly, particularly via the upregulation of metalloproteinases, ECM molecules, and inhibits anabolic signaling by antagonizing the receptor of the TGF- β family [56]. Here, we demonstrated for the first time that the pro-osteoarthritic IL-1 β downregulates Htra1 in articular chondrocytes. However, another cytokine, IFN- γ , has been reported to significantly inhibit basal and LPS-induced Htra1 expression in macrophages and fibroblasts, two cell types mainly involved in Htra1 synthesis in rheumatoid arthritis, through activation of the p38 MAPK pathway and subsequent activation and binding of STAT1 to the *Htra1* promoter [57].

Promerim[®] hydrolysates seem to have promising effects to prevent or delay, at least in part, OA pathogenesis. They antagonize the initial steps of OA pathogenesis by decreasing inflammation and inhibiting proteases. Promerim[®] hydrolysates were able to decrease the expression of *Cox2*, as well as proteases such as *Mmp-1*, *-3*, *Adamts5*, and *Htra1*, confirming previous reports. For example, collagen hydrolysates, associated with curcuminoid extracts, exhibit anti-inflammatory properties when added to in vitro cultures of bovine and human chondrocytes [58]. Other dietary supplements, such as methionine, unsaponifiable extracts of avocado, soybean, and plant flavonoids and bioflavonoids also have anti-inflammatory properties, notably through the modulation of the NFkappaB or oxidative stress pathways [59–62]. Many dietary supplements have been described as acting on the EPA/DHA (eicosapentaenoic acid/docosahexaenoic acid) pathway, leading to the synthesis of prostaglandin E₂ (PGE₂) and LT4 pro-inflammatory factors, such as fish oil, ginger, or devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) [63–65]. Various supplements are also described as simply playing an antioxidant role, such as glycosaminoglycans, frankincense, plant flavonoids and bioflavonoids [66–70]. On the contrary, we had previously shown that shell extracts of marine origin promote the catabolic pathway of human dermal fibroblasts, or the activity of MMP-1 in chondrocytes [71,72]. Nevertheless, the composition of the Promerim[®] is very different from shell extracts—it does not contain high concentrations of marine minerals. We assume that the effects of Promerim[®], at least in part, derive from matrikines. Indeed, the hydrolysates tested here are of marine origin. During specific enzymatic digestion, protein fragments are released and they can then be the source of small bioactive peptides, also called matrikines [73], that may be the main players that make dietary supplements promising sources in rheumatology and for the treatment of OA to favor chondral defect healing. For example, some matrikines have been described as playing a role in wound healing and in the synthesis of anabolic components of fibroblasts [24]. In particular, the GHK tripeptide present in types I, V, and XI collagen is known to stimulate collagen and proteoglycan synthesis [23]. Altogether, our data demonstrate a promising role of Promerim[®] in the prevention of the initial events triggering OA. In fact, OA is a degenerative pathology that most often evolves from micro-lesions.

The results obtained in the present study prompted us to believe that hydrolysates could have effects at different stages of OA, such as in the earliest stages of OA by limiting the loss of chondral substance, limiting degradation by proteases, and promoting collagen syntheses. Promerim[®] could also have an effect when the microenvironment becomes inflammatory, where the articular cartilage suffers from deleterious damage. We showed that when chondrocytes evolve in a pro-inflammatory environment (through addition of IL-1), marine collagen hydrolysates may prevent the dedifferentiation of equine articular chondrocytes, limiting their senescence, and they also ensure the maintenance of ECM synthesis. Thus, Promerim[®] favors collagen production and metabolism, especially in an inflammatory environment, and these collagen hydrolysates may therefore delay OA progression throughout the entire pathological process, from the earliest to the latest stages. Previous studies have also demonstrated an increase in the synthesis of type II collagens or proteoglycans when collagen hydrolysates are added to bovine chondrocytes (derived from bovine skin) that were cultured *in vitro* [74,75]. Other supplements have demonstrated an increase in the synthesis of proteins characteristic of hyaline cartilage. These include glycosaminoglycans [76], olive oil [77], or unsaponifiable extracts of avocado and soybean [78]. Other products of marine origin can stimulate the synthesis of type I and III collagens, as well as that of sulfated glycosaminoglycans (GAGs) on human fibroblasts [79].

The increase in ECM production (especially collagens) induced by Promerim[®]30 and 40 in control and pro-inflammatory conditions, as observed on Western blots, can be attributed to a decrease in the expression and activity of several proteases. Nevertheless, in some conditions, Promerim[®] hydrolysates also upregulated the mRNA steady-state amounts of ECM molecules, notably the collagens. Thus, in addition to inhibiting catabolism, Promerim[®] favors anabolism. The mechanism of action of the upregulation of anabolism remains to be elucidated, even though the downregulation of Htra1 may be partly responsible. In particular, Htra1 plays a double role—on the one hand, it degrades the ECM and on the other hand, it degrades the receptors of the TGF- β family [56]. TGF- β signaling pathways play a major role in maintaining chondrocyte differentiation [80,81]. This increase in Htra1 expression detected upon the development of OA is thought to be due to the activation of discoidin domain receptor-2 (DDR-2), which is a cell surface receptor that, when negatively regulated, leads to an increase in ECM degradation [82,83]. Further studies could be carried out to determine whether the Promerim[®] has an effect on these receptors.

Chondrocyte senescence is a major event in OA pathogenesis, which precedes the later stages of OA, and subchondral bone exposure in particular. Senescence can be induced by a range of factors, such as age, being overweight, mechanical or oxidative stress, dedifferentiation, or apoptotic phenomena [84–88]. Studies have shown that the suppression of senescent chondrocytes delays the progression of induced OA in mice [89]. Thus, Promerim[®]30 may help delay OA evolution because it is able to inhibit eAC senescence.

Because we had already demonstrated the ability of marine-origin products to slightly enhance cell migration and *in vitro* repair [79], we addressed the question of whether Promerim[®] hydrolysates were able to promote eAC migration, which is of *in vivo* interest. Thus, we carried out a wound-healing assay when eAC were cultured in the presence of Promerim[®]. Even though these results will require further investigation to define the mode of action of Promerim[®], the increase in confluence in the wound area when eACs were cultured in presence of Promerim[®]30 and 40 seemed to be due to an increase in cell proliferation. This increase is consistent with the increase in metabolic activity—related in part to proliferation—observed in the XTT assays. On the contrary, Promerim[®]60 seemed to favor migration, because we observed spindle-shaped eACs, characteristic of migrating cells. Therefore, Promerim[®] 60 may favor migration of the chondrocytes to the chondral defect, and eventually enhance cartilage synthesis to fill the defect, whereas Promerim[®]30 and 40 may be useful for enhancing the proliferation and the reservoir of chondrocytes located near the cartilage defect.

To reconstitute cartilage of hyaline quality, cartilage cell-based therapies using chondrocytes or mesenchymal stem cells (MSCs) derived from several tissues have been developed [9,90]. These techniques were initially based on the autologous chondrocyte implantation (ACI) procedure developed by Brittberg and colleagues [91]. Basically, these approaches can be divided into two steps: amplification and subsequent differentiation/redifferentiation of the cells. Over time, these techniques have been improved in several aspects (use of chondrogenic 3D biomaterials, hypoxia, cell sourcing, etc.). Several cell sources have been used, such as chondrocytes or stem cells from various adult/neonatal tissues, as well as several differentiation protocols [30,31,92]. Nevertheless, despite the high quality of the in vitro synthesized cartilage substitute, they are not strictly identical to in vivo healthy hyaline cartilage. Thus, differentiation strategies can be improved. In this context, Promerim[®] represents a good candidate to foster hyaline-like ECM production. Western blot experiments revealed that both Promerim[®]30 and 40 increase collagen biosynthesis in control conditions, demonstrating that they could be chondrogenic, such as BMP-2. Interestingly, both Promerim[®]30 and 40 systematically counteracted the inhibitory effects of IL-1 β on collagen protein amounts, with levels at least reaching those observed in control conditions and even those of eAC cultures treated with pro-chondrogenic BMP-2. Therefore, Promerim[®] may be useful during the two phases of the ACI procedure to increase the proliferation/amplification of cells and foster their synthesis during the differentiation/redifferentiation step, while inhibiting their senescence (Promerim[®] 30). Furthermore, collagen hydrolysates may be of interest to enhance MSC chondrogenesis, all the more so if these hydrolysates are as active as some of the members of the TGF- β family [92–97].

We showed here that Promerim[®] is not cytotoxic for eACs, but enhances their metabolic activity, even inhibiting their senescence (Promerim[®]30 only). The Promerim[®] hydrolysates also favored ECM accumulation in organoids, increasing collagen production while possibly decreasing its catabolism. Interestingly, the beneficial effects of Promerim[®] were enhanced under pro-inflammatory conditions. This study is the first to demonstrate the beneficial effects of marine collagen hydrolysates to counteract each step of the OA pathogenesis. Hence, in vivo, Promerim[®] may enhance the first response of chondrocytes to chondral injuries and further delay OA progression. Furthermore, because Promerim[®] downregulates several proteases, ECM degradation may also be delayed.

4. Materials and Methods

4.1. Collagen Hydrolysates

Promerim[®] peptides are produced by enzymatic hydrolysis characterized by the control of hydrolysis time, acidity (pH), and temperature. There is no chemical process of hydrolysis. Promerim[®] are hydrolysates of fish skin and cartilage proteins composed of collagen peptides. These are oligopeptides, that is, small peptides characterized by low molecular weights below 1500 Dalton. They are composed of 2, to a maximum of 15 amino acids. The minimum amount of hydroxyproline is 5 g/100 g and the two major amino acids are proline (9 g/100 g) and glycine (21 g/100 g).

4.2. Isolation and Cell Culture

Equine articular chondrocytes (eAC) were isolated from cartilage biopsy of healthy equine metacarpal joint from adult horses (4–10 years). Chondrocytes derived from 12 different horses were used in this study. All procedures described in the present study were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (ComEth ANSES/ENVA/UPEC, 94 701 Maisons-Alfort, France; n° 15-023 (10 March 2015), n° 10-0051 (10 September 2014)). Healthy equine cartilage was cut into small slices, then sequentially incubated with type XIV protease *Streptomyces griseus* (2 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) for 45 min at 37 °C and type I collagenase from *Clostridium histolyticum* (2 mg/mL) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) overnight, at 37 °C. The suspension was filtered through a 70 μ m mesh nylon membrane and centrifuged, and eAC

were counted in the presence of trypan blue to assess their viability. eAC were seeded in plastic flasks at a density of 2×10^4 cells/cm² and cultured in DMEM-high glucose (HG, 4.5 g/L BioWest, Nuaillé, France) supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS) (Eurobio Scientific, Courtaboeuf, France). In addition, antibiotics and antifungal were added in all the media used (100 IU/mL of penicillin, 100 µg/mL of erythromycin, and 0.25 mg/mL of fungizone (Eurobio Scientific, Courtaboeuf, France).

4.3. XTT Assay

After the third passage (P3), eAC were seeded in a 96-well plate at a density of 2×10^4 cells/cm², then cultured with DMEM HG with 10% FCS for 72 h (37 °C, 5% CO₂) to allow the cells to adhere and reach 80% confluence. The cells were then treated with different concentrations (0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100, and 250 µg/mL) of Promerim[®]30, 40, or 60. The Promerim[®] were diluted in series either in DMEM HG supplemented with 2% FCS or in serum-free DMEM HG (0% FCS). As controls, eAC were also cultured without Promerim[®] in DMEM HG in the absence of serum or supplemented with 2% or 5% FCS. Experiments were performed under normoxia (21% O₂) or in chondrocyte physiologic conditions in hypoxia at 3% O₂. Cell metabolism activity was assessed 24 h, 48 h, or 72 h after the addition of the treatments. At the end of each culture period, XTT assay was performed according to the manufacturer's instructions (Roche, Bale, Switzerland). Optical density (OD) measurements were made at 490 nm, and the background (690 nm) was subtracted. Measurements were made with a microplate reader (Spark control Magellan, TECAN[®]). All experiments were performed in triplicate, and are presented as the mean of five experiments.

4.4. Toxilight Assay

eAC were cultured under the same conditions as for the XTT assays. After 72 h of treatment, for each condition, 80 µL of the culture medium was transferred to a 96-well plate. One hundred µL of AK Reagent working solution (Interchim[®] Bioluminescence Cytotoxicity Assay Kit, Interchim, Montluçon, France) were added in each well and incubated for 5 min at room temperature. The bioluminescence was then measured by a microplate reader (TECAN[®]). All experiments were carried out in triplicate and are presented as the mean of five experiments.

4.5. β-Galactosidase Activity

β-galactosidase activity was measured using the Cell Biolabs Cell Senescence Assay Kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA). eAC were seeded at 2×10^4 cells/cm² in the presence of DMEM HG (2% FCS). At 80% of confluency, the Promerim[®]30, 40, or 60 were added (50 or 100 µg/mL, in normoxia or hypoxia). Then, the media were removed, eAC were washed with PBS 1X. The 1X cell lysis buffer containing PMSF (5 µL/mL) was added to the eAC. The lysates were recovered and centrifuged at 300 g (10 min, 4 °C). The supernatants were then transferred to a 96-well plate and incubated (16 h, 37 °C) in the presence of the substrate of the β-galactosidase (reaction buffer). Finally, the stop solution was added, and the fluorescence was measured at 465 nm. All experiments were performed in triplicate, and are presented as the mean of four experiments.

4.6. eAC Redifferentiation

At the third passage, eAC were seeded into type I/III collagen sponges (Symatèse Biomatériaux, Chaponost, France) at a density of 8×10^5 cells/sponges in the presence of 3D medium (DMEM HG, 2% FCS + ascorbic acid (A2p) (5 µL/mL) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) and antibiotics). These collagen sponges (100% of collagen, 2 mm thickness, 5 mm diameter, corresponding to a volume of 0.04 cm³, approximately 100 µm pore size) are composed of native type I collagen (90–95%) and type III collagen (5–10%) from calf skin; they are crosslinked with glutaraldehyde to increase their stability and then sterilized with β-radiation, and they do not swell after rehydration [30,89,90]. After 16 h of seeding, treatments with Promerim[®] (30, 40, 60) were added at several concentrations (0.1,

0.5, 50, or 100 µg/mL) in the presence or absence of recombinant human BMP-2 (50 ng/mL, Inductos[®]) and/or Interleukin-1β (IL-1β; 10 ng/mL; Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Germany). The media were renewed after three days of treatment. After seven days of incubation, the sponges were rinsed with PBS and placed at −80 °C until their protein or total RNA extractions.

4.7. RNA Isolation and RT-qPCR

Total RNAs were extracted using the TRIzol Reagent[®] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). One microgram of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using iScript[®] reverse transcript supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Samples were diluted (1/100) in DEPC-water, and real-time PCR was performed on the CFX96 Touch (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using the “SYBR[®] Green supermix” (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The sequences of the primers used are indicated in Supplementary Table S1. Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method expressed as the mean of triplicate samples. Each sample was normalized to β -Actin and PPIA house-keeping genes.

4.8. Western Blots

Sponges were crushed and lysed with RIPA containing a cocktail of protease inhibitors, as previously described [31]. The protein concentration was evaluated by a Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Then, 12 µg of total proteins were separated in 10% polyacrylamide gels containing 0.1% SDS, and transferred to a polyvinylidene membrane (PVDF, Bio-Rad, Hercules, CA, 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 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 IIB collagen (Covalab, Villeurbanne, France), rabbit anti-human type X collagen (Abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-human Htra1 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA), rabbit anti-human GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), and mouse anti-human tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). The following day, membranes were washed in TBST, and incubated with the secondary antibody (HRP-conjugated goat anti-rabbit or mouse IgG antibody (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA, USA)). After a washing step, membranes were incubated with the Clarity Western ECL (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and signals visualized with the Chemidoc (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

4.9. Scratch Wound Assay

eAC were seeded in monolayers (P2) at a density of 20,000 cells per well in 96-well ImageLock plates (Essen BioScience, Michigan, USA) and were cultured for three days to form a confluent monolayer. A WoundMakerTM (Essen BioScience) was used to create uniform and reproducible wounds in all wells (four wells per condition) according to the manufacturer's instructions. Then, the treatments were added, and the wound areas were monitored until 96 h, thanks to the IncuCyte ZOOM living cell imaging system (Essen BioScience). Wound surface area and cell confluence were measured using ImageJ software.

4.10. Statistical Analysis

All experiments were repeated at least four times with eAC from different horses. Values are presented as mean ± SD or as boxplots. Statistical analyses were performed using the Mann–Whitney U-test to determine significant differences between two groups, or using a two-way ANOVA followed by a Bonferonni test for multiple comparisons. Statistical analyses were done using Prism (Graphpad, San Diego, CA, USA). A *p*-value of ≤0.05 was considered to be significant.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/2/580/s1>, Figure S1: Promerim[®] 30, 40, and 60 have no cytotoxic effect on equine articular chondrocytes in normoxia; Figure S2: Effect of low concentrations of Promerim[®] 30, 40, and 60 on the mitochondrial activity of equine articular chondrocytes cultured in normoxia in the absence of serum; Figure S3: Effect of high concentrations of Promerim[®] 30, 40, and 60 on the mitochondrial activity of equine articular chondrocytes cultured in normoxia in the absence of fetal calf serum; Figure S4: Effect of low concentrations of Promerim[®] 30, 40, and 60 on the mitochondrial activity of equine articular chondrocytes cultured in normoxia in the presence of 2% fetal calf serum (FCS); Figure S5: Effect of high concentrations of Promerim[®] 30, 40, and 60 on the mitochondrial activity of equine articular chondrocytes cultured in normoxia in the presence of 2% fetal calf serum (FCS); Figure S6: mRNA expression in equine articular chondrocytes treated with high concentrations Promerim[®] 30 and 40 in the presence of BMP-2; Figure S7: mRNA expression in equine articular chondrocytes treated with Promerim[®] 30 and 40 at high concentrations in the presence of both IL-1 and BMP-2; Figure S8: Complete gel and PVDF membranes analyzed in the western-blot; Figure S9: Under- and over-exposure of the blots presented in Figure 13; Figure S10: Complete gel and PVDF membranes analyzed in the western-blot; Figure S11: Under- and over-exposure of the blots presented in Figure 14; Table S1: Sequences of the primers used in RT-qPCR.

Author Contributions: Conceptualization: P.G.; Methodology: B.B., R.C., C.M., F.C., F.L., N.G., P.G.; Formal analysis: B.B., R.C., F.C., C.M., F.L., N.G., P.G.; Software: B.B., R.C.; Validation: B.B., R.C., N.G., P.G.; Investigation: B.B., R.C., F.C., C.M., S.O., A.N., N.G., P.G.; Resources: B.B., R.C., F.C., S.O., A.N., P.G.; Data Curation: B.B., R.C., C.M., P.G.; Writing—Original Draft Preparation: B.B., R.C., P.G.; Writing—Review & Editing: P.G.; Visualization: B.B., R.C., C.M., N.G., P.G.; Supervision: P.G.; Project Administration: B.B., R.C., F.L., P.G.; Funding Acquisition: P.G., A.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the French ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) and DIELEN laboratory (to P.G. and A.N.; N° 014CJ052), by the Regional Council of Normandy through a RIN Innovation program and the European Community (ERDF (European Regional Development Funds)) to P.G. (OSTEOCART N° 014CJ042) and by the French Government. B.B. is a recipient of a PhD scholarship from the French ANRT and DIELEN, a CIFRE fellowship. R.C. and C.M. were recruited as a research engineer and a master 2 research student respectively, positions funded by the Regional Council of Normandy and the European Community (ERDF). All the funding sources had absolutely no involvement in the study design, collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to submit the manuscript for publication.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Anses/ENVA/UPEC NAME (94 701 Maisons-Alfort, France; n° 15-023 (10 March 2015), n° 10-0051 (10 September 2014).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in Supplementary Materials.

Conflicts of Interest: Mr. Bourdon was employed in the framework of a CIFRE thesis co-financed by L'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) and by the Dielen laboratory which provided the marine hydrolysates investigated in this study. S. Oddoux and A. Noel are employees of the Dielen laboratory. None of the academic authors received any remuneration from the company.

References

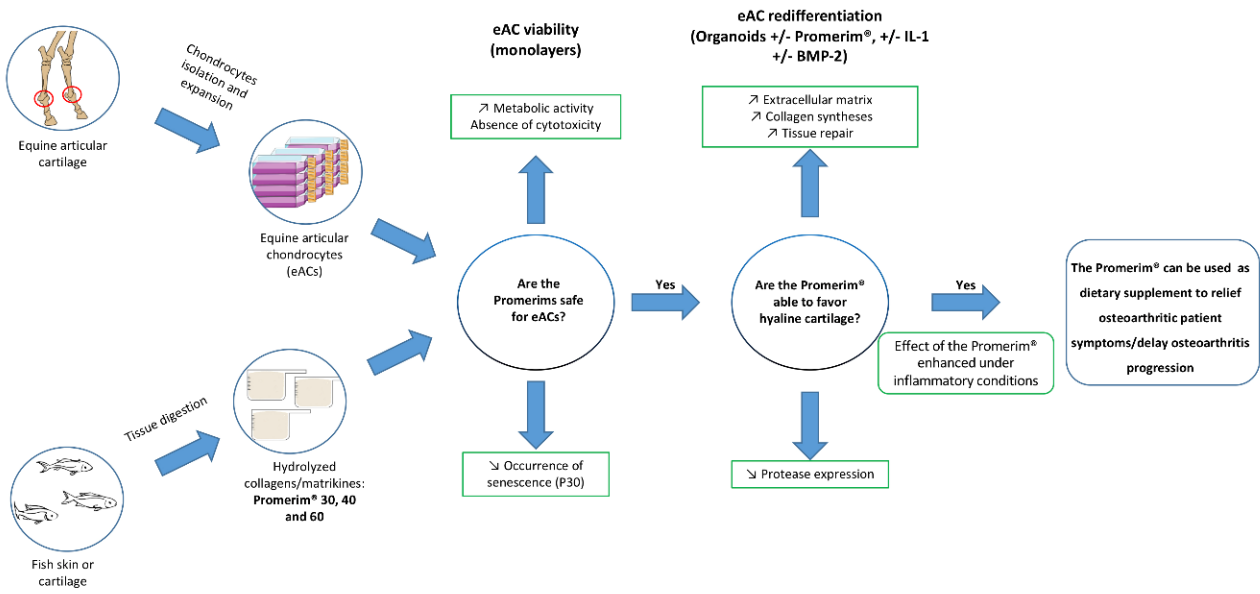
1. Aigner, T.; Cook, N.J.L.; Gerwin, S.S.; Glasson, S.; Laverty, C.B.; Little, W.; McIlwraith, C.W.; Kraus, V.B. Histopathology Atlas of Animal Model Systems—Overview of Guiding Principles. *Osteoarthr. Cartil.* **2010**, *18*, 2–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Aigner, T.; Stöve, J. Collagens major 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](#)]
3. Claus, S.; Aubert-Foucher, E.; Demoor, M.; Camuzeaux, B.; Paumier, A.; Piperno, M.; Damour, O.; Duterque-Coquillaud, M.; Galéra, P.; Mallein-Gerin, F. Chronic exposure of bone morphogenetic protein-2 favors chondrogenic expression in human articular chondrocytes amplified in monolayer cultures. *J. Cell. Biochem.* **2010**, *111*, 1642–1651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Loboda, A.; Jozkowicz, A.; Dulak, J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors—Similar but not identical. *Mol. Cells* **2010**, *29*, 435–442. [[CrossRef](#)]

5. Silver, I.A. Measurement of pH and ionic composition of pericellular sites. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1975**, *271*, 261–272.
6. Pujol, J.P.; Galera, P.; Redini, F.; Mauviel, A.; Loyau, G. Role of cytokines in osteoarthritis: Comparative effects of interleukin 1 and transforming growth factor-beta on cultured rabbit articular chondrocytes. *J. Rheumatol. Suppl.* **1991**, *27*, 76–79.
7. Pujol, J.P.; Chadjichristos, C.; Legendre, F.; Bauge, C.; Beauchef, G.; Andriamanalijaona, R.; Galera, P.; Boumediene, K. Interleukin-1 and transforming growth factor-beta 1 as crucial factors in osteoarthritic cartilage metabolism. *Connect. Tissue Res.* **2008**, *49*, 293–297. [[CrossRef](#)]
8. Pearle, A.D.; Warren, R.F.; Rodeo, S.A. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clin. Sports Med.* **2005**, *24*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. 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](#)]
10. Blanco, F.J.; Rego, I.; Ruiz-Romero, C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2011**, *7*, 161–169.
11. 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](#)]
12. Perkins, N.R.; Reid, S.W.; Morris, R.S. Effect of training location and time period on racehorse performance in New Zealand. 1. Descriptive analysis. *N. Z. Vet. J.* **2004**, *52*, 236–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Dolvik, N.I.; Klemetsdal, G. The effect of arthritis in the carpal joint on performance in Norwegian cold-blooded trotters. *Vet. Res. Commun.* **1996**, *20*, 505–512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Nelson, A.E.; Allen, K.D.; Golightly, Y.M.; Goode, A.P.; Jordan, J.M. A systematic review of recommendations and guidelines for the management of osteoarthritis: The Chronic Osteoarthritis Management Initiative of the U.S. Bone and Joint Initiative. *Semin. Arthritis Rheum.* **2014**, *43*, 701–712. [[CrossRef](#)]
15. McAlindon, T.E.; Bannuru, R.R.; Sullivan, M.C.; Arden, N.K.; Berenbaum, F.; Bierma-Zeinstra, S.M.; Hawker, G.A.; Henrotin, Y.; Hunter, D.J.; Kawaguchi, H.; et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **2014**, *22*, 363–388. [[CrossRef](#)]
16. McIlwraith, C.W.; Lattermann, C. Intra-Articular Corticosteroids for Knee Pain—What Have We Learned from the Equine Athlete and Current Best Practice. *J. Knee Surg.* **2019**, *32*, 9–25.
17. Castrogiovanni, P.; Trovato, F.M.; Loreto, C.; Nsir, H.; Szychlińska, M.A.; Musumeci, G. Nutraceutical Supplements in the Management and Prevention of Osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 2042. [[CrossRef](#)]
18. Murray, J.M.D.; Hanna, E.; Hastie, P. Equine dietary supplements: An insight into their use and perceptions in the Irish equine industry. *Ir. Vet. J.* **2018**, *71*, 4. [[CrossRef](#)]
19. Bassleer, C.; Rovati, L.; Franchimont, P. Stimulation of Proteoglycan Production by Glucosamine Sulfate in Chondrocytes Isolated from Human Osteoarthritic Articular Cartilage In Vitro. *Osteoarthr. Cartil.* **1998**, *6*, 427–434. [[CrossRef](#)]
20. Bannuru, R.R.; Osani, M.C.; Al-Eid, F.; Wang, C. Efficacy of Curcumin and Boswellia for Knee Osteoarthritis: Systematic Review and Meta-Analysis. *Semin. Arthritis Rheum.* **2018**, *48*, 416–429. [[CrossRef](#)]
21. Comblain, F.; Sanchez, C.; Lespoune, I.; Balligand, M.; Serisier, S.; Henrotin, Y. Curcuminoids Extract, Hydrolyzed Collagen and Green Tea Extract Synergically Inhibit Inflammatory and Catabolic Mediator's Synthesis by Normal Bovine and Osteoarthritic Human Chondrocytes in Monolayer. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0121654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Singh, J.A.; Noorbaloochi, S.; MacDonald, R.; Maxwell, L.J. Chondroitin for osteoarthritis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2015**, *1*, CD005614. [[PubMed](#)]
23. Maquart, F.X.; Monboisse, J.C. Extracellular matrix and wound healing. *Pathol. Biol.* **2014**, *62*, 91–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Maquart, F.X.; Pasco, S.; Ramont, L.; Hornebeck, W.; Monboisse, J.C. An introduction to matrikines: Extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity. Implication in tumor invasion. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2004**, *49*, 199–202. [[CrossRef](#)]
25. Jiang, J.X.; Yu, S.; Huang, Q.R.; Zhang, X.L.; Zhang, C.Q.; Zhou, J.L.; Prawitt, J. Collagen peptides improve knee osteoarthritis in elderly women: A 6-month randomized, double blind, placebo-controlled study. *Agro Food Ind. Hi Tech* **2014**, *25*, 19–23.
26. Lugo, J.P.; Saiyed, Z.M.; Lau, F.C.; Molina, J.P.; Pakdaman, M.N.; Shamie, A.N.; Udani, J.K. Undenatured type II collagen (UC-II®) for joint support: A randomized, double-blind, placebo-controlled study in healthy volunteers. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2013**, *10*, 48. [[CrossRef](#)]
27. Kilinc, B.E.; Oc, Y.; Alibakan, G.; Bilgin, E.; Kanar, M.; Eren, O.T. An Observational 1-Month Trial on the Efficacy and Safety of Promerim for Improving Knee Joint. *Clin. Med. Insights Arthritis Musculoskelet. Disord.* **2018**, *11*, 1179544118757496. [[CrossRef](#)]
28. Kumar, S.; Sugihara, F.; Suzuki, K.; Inoue, N.; Venkateswarathirukumara, S. A double-blind, placebo-controlled, randomised, clinical study on the effectiveness of collagen peptide on osteoarthritis. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *95*, 702–707. [[CrossRef](#)]
29. Galéra, P.; Ollitrault, D.; Legendre, F.; Demoor, M.; Mallein-Gerin, F.; Boumediene, K.; Herbage, B.; Duterque-Coquillaud, M.; Damour, O. Brevet Français FR 2965278 du 23/09/2010. Method for Obtaining Differentiated Articular Chondrocytes In Vitro or Ex Vivo and Uses of Same. Available online: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2012038668> (accessed on 8 January 2021).
30. 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](#)]

31. Rakic, R.; Bourdon, B.; Hervieu, M.; Branly, T.; Legendre, F.; Saulnier, N.; Audigié, F.; Maddens, S.; Demoor, M.; Galera, P. 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.* **2017**, *18*, 1842. [CrossRef]
32. Murray, C.; Marshall, M.; Rathod, T.; Bowen, C.J.; Menz, H.B.; Roddy, E. Population prevalence and distribution of ankle pain and symptomatic radiographic ankle osteoarthritis in community dwelling older adults: A systematic review and cross-sectional study. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0193662. [CrossRef] [PubMed]
33. De Luca, P.; Colombini, A.; Carimati, G.; Beggio, M.; De Girolamo, L.; Volpi, P. Intra-Articular Injection of Hydrolyzed Collagen to Treat Symptoms of Knee Osteoarthritis. A Functional In Vitro Investigation and a Pilot Retrospective Clinical Study. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 975. [CrossRef] [PubMed]
34. Sharma, C.; Kaur, J.; Shishodia, S.; Aggarwal, B.B.; Ralhan, R. Curcumin down regulates smokeless tobacco-induced NF-kappaB activation and COX-2 expression in human oral premalignant and cancer cells. *Toxicology* **2006**, *228*, 1–15. [CrossRef] [PubMed]
35. Kuptniratsaikul, V.; Dajpratham, P.; Taechaarpornkul, W.; Buntragulpoontawe, M.; Lukkanapichonchut, P.; Chootip, C.; Saengsuwan, J.; Tantayakom, K.; Laongpech, S. Efficacy and safety of *Curcuma domestica* extracts compared with ibuprofen in patients with knee osteoarthritis: A multicenter study. *Clin. Interv. Aging* **2014**, *9*, 451–458. [CrossRef] [PubMed]
36. Kizhakkedath, R. Clinical evaluation of a formulation containing *Curcuma longa* and *Boswellia serrata* extracts in the management of knee osteoarthritis. *Mol. Med. Rep.* **2013**, *8*, 1542–1548. [CrossRef]
37. Akhtar, N.; Miller, M.J.; Haqqi, T.M. Effect of a Herbal-Leucine mix on the IL-1 β -induced cartilage degradation and inflammatory gene expression in human chondrocytes. *BMC Complement. Altern. Med.* **2011**, *11*, 66. [CrossRef]
38. Liu, X.; Machado, G.C.; Eyles, J.P.; Ravi, V.; Hunter, D.J. Dietary supplements for treating osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Br. J. Sports Med.* **2018**, *52*, 167–175. [CrossRef]
39. Lugo, J.P.; Saiyed, Z.M.; Lane, N.E. Efficacy and tolerability of an undenatured type II collagen supplement in modulating knee osteoarthritis symptoms: A multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutr. J.* **2016**, *15*, 14. [CrossRef]
40. DiNubile, N.A. A potential role for avocado- and soybean-based nutritional supplements in the management of osteoarthritis: A review. *Phys. Sportsmed.* **2010**, *38*, 71–81. [CrossRef]
41. DiNubile, N.A. Glucosamine and Chondroitin Sulfate: What Has Been Learned Since the Glucosamine/chondroitin Arthritis Intervention Trial. *Orthopedics* **2018**, *41*, 200–207. [CrossRef]
42. Dahmer, S.; Schiller, R.M. Glucosamine. *Am. Fam. Physician* **2008**, *78*, 471–476.
43. Moskowitz, R.W. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Semin. Arthritis Rheum.* **2000**, *30*, 87–99. [CrossRef] [PubMed]
44. Kashiuchi, S.; Miyazawa, R.; Nagata, H.; Shirai, M.; Shimizu, M.; Sone, H.; Kamiyama, S. Effects of administration of glucosamine and chicken cartilage hydrolysate on rheumatoid arthritis in SKG mice. *Food Funct.* **2019**, *10*, 5008–5017. [CrossRef] [PubMed]
45. Schauss, A.G.; Stenehjem, J.; Park, J.; Endres, J.R.; Clewell, A. Effect of the novel low molecular weight hydrolyzed chicken sternal cartilage extract, BioCell Collagen, on improving osteoarthritis-related symptoms: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 4096–4101. [CrossRef] [PubMed]
46. Pivnenko, T.N.; Sukhoverkhova, G.; Epshtein, L.M.; Somova-Isachkova, L.M.; Timchenko, N.F.; Besednova, N.N. Experimental morphological study of the therapeutic effect of shark cartilage preparation in a model of infective allergic arthritis. *Antibiot. Khimioter.* **2005**, *50*, 20–23.
47. Fan, L.; Cao, M.; Gao, S.; Wang, T.; Wu, H.; Peng, M.; Zhou, X.; Nie, M. Preparation and characterization of sodium alginate modified with collagen peptides. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *93*, 380–385. [CrossRef] [PubMed]
48. Ennaas, N.; Hammami, R.; Goma, A.; Bédard, F.; Biron, É.; Subirade, M.; Beaulieu, L.; Fliss, I. Collagencin, an antibacterial peptide from fish collagen: Activity, structure and interaction dynamics with membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *473*, 642–647. [CrossRef]
49. Wang, L.; An, X.; Yang, F.; Xin, Z.; Zhao, L.; Hu, Q. Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). *Food Chem.* **2008**, *108*, 616–623. [CrossRef]
50. Xu, L.; Dong, W.; Zhao, J.; Xu, Y. Effect of marine collagen peptides on physiological and neurobehavioral development of male rats with perinatal asphyxia. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 3653–3671. [CrossRef]
51. Tanaka, M.; Koyama, Y.; Nomura, Y. Effects of collagen peptide ingestion on UV-B-induced skin damage. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, *73*, 930–932. [CrossRef]
52. Zhang, Z.; Wang, J.; Ding, Y.; Dai, X.; Li, Y. Oral administration of marine collagen peptides from Chum Salmon skin enhances cutaneous wound healing and angiogenesis in rats. *J. Sci. Food Agric.* **2011**, *91*, 2173–2179. [CrossRef] [PubMed]
53. Osawa, Y.; Mizushige, T.; Jinno, S.; Sugihara, F.; Inoue, N.; Tanaka, H.; Kabuyama, Y. Absorption and metabolism of orally administered collagen hydrolysates evaluated by the vascularly perfused rat intestine and liver in situ. *Biomed. Res.* **2018**, *39*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
54. Iwai, K.; Hasegawa, T.; Taguchi, Y.; Morimatsu, F.; Sato, K.; Nakamura, Y.; Higashi, A.; Kido, Y.; Nakabo, Y.; Ohtsuki, K. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6531–6536. [CrossRef] [PubMed]
55. Hu, S.I.; Carozza, M.; Klein, M.; Nantermet, P.; Luk, D.; Crowl, R.M. Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 34406–34412. [CrossRef] [PubMed]

56. 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](#)]
57. Hou, Y.; Lin, H.; Zhu, L.; Liu, Z.; Hu, F.; Shi, J.; Yang, T.; Shi, X.; Guo, H.; Tan, X.; et al. The Inhibitory Effect of IFN- γ on Protease HTRA1 Expression in Rheumatoid Arthritis. *J. Immunol.* **2014**, *193*, 130–138. [[CrossRef](#)]
58. Comblain, F.; Dubuc, J.E.; Lambert, C.; Sanchez, C.; Lespoune, L.; Serisier, S.; Henrotin, Y. Identification of Targets of a New Nutritional Mixture for Osteoarthritis Management Composed by Curcuminoids Extract, Hydrolyzed Collagen and Green Tea Extract. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0156902. [[CrossRef](#)]
59. Kon, E.; Filardo, G.; Drobnic, M.; Madry, H.; Jelic, M.; Van Dijk, N.; Della Villa, S. Non-surgical management of early knee osteoarthritis. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **2012**, *20*, 436–449. [[CrossRef](#)]
60. Shakibaei, M.; John, T.; Schulze-Tanzil, G.; Lehmann, I.; Mobasheri, A. Suppression of NF-kappaB activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 1434–1445. [[CrossRef](#)]
61. Murakami, A.; Song, M.; Katsumata, S.; Uehara, M.; Suzuki, K.; Ohigashi, H. Citrus nobiletin suppresses bone loss in ovariectomized ddY mice and collagen-induced arthritis in DBA/1J mice: Possible involvement of receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis regulation. *Biofactors* **2007**, *30*, 179–192. [[CrossRef](#)]
62. Ahmed, S. Green tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate in arthritis: Progress and promise. *Arthritis Res. Ther.* **2010**, *12*, 208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Boe, C.; Vangsness, C.T. Fish Oil and Osteoarthritis: Current Evidence. *Am. J. Orthop.* **2015**, *44*, 302–305. [[PubMed](#)]
64. Frondoza, C.G.; Sohrabi, A.; Polotsky, A.; Phan, P.V.; Hungerford, D.S.; Lindmark, L. An in vitro screening assay for inhibitors of proinflammatory mediators in herbal extracts using human synovioocyte cultures. *Vitr. Cell. Dev. Biol. Anim.* **2004**, *40*, 95–101. [[CrossRef](#)]
65. Fiebich, B.L.; Muñoz, E.; Rose, T.; Weiss, G.; McGregor, G.P. Molecular targets of the antiinflammatory Harpagophytum procumbens (devil's claw): Inhibition of TNF α and COX-2 gene expression by preventing activation of AP-1. *Phytother. Res.* **2012**, *26*, 806–811. [[CrossRef](#)]
66. Kahan, A.; Uebelhart, D.; De Vathaire, F.; Delmas, P.D.; Reginster, J.Y. Long-term effects of chondroitins 4 and 6 sulfate on knee osteoarthritis: The study on osteoarthritis progression prevention, a two-year, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* **2009**, *60*, 524–533. [[CrossRef](#)]
67. Siddiqui, M.Z. *Boswellia serrata*, a potential anti-inflammatory agent: An overview. *Indian J. Pharm. Sci.* **2011**, *73*, 255–261.
68. Visioli, F.; De La Lastra, C.A.; Andres-Lacueva, C.; Aviram, M.; Calhau, C.; Cassano, A.; D'Archivio, M.; Faria, A.; Favé, G.; Fogliano, V.; et al. Polyphenols and human health: A prospectus. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51*, 524–546. [[CrossRef](#)]
69. Fraga, C.G.; Oteiza, P.I. Dietary flavonoids: Role of epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51*, 813–823. [[CrossRef](#)]
70. González, R.; Ballester, I.; López-Posadas, R.; Suárez, M.D.; Zarzuelo, A.; Martínez-Augustin, O.; Sánchez de Medina, F. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51*, 331–362. [[CrossRef](#)]
71. Latire, T.; Legendre, F.; Bouyoucef, M.; Marin, F.; Carreiras, F.; Rigot-Jolivet, M.; Lebel, J.M.; Galéra, P.; Serpentine, A. Shell extracts of the edible mussel and oyster induce an enhancement of the catabolic pathway of human skin fibroblasts, in vitro. *Cytotechnology* **2017**, *69*, 815–829. [[CrossRef](#)]
72. Bouyoucef, M.; Rakic, R.; Gómez-Leduc, T.; Latire, T.; Marin, F.; Leclercq, S.; Carreiras, F.; Serpentine, A.; Lebel, J.M.; Galéra, P.; et al. Regulation of Extracellular Matrix Synthesis by Shell Extracts from the Marine Bivalve *Pecten maximus* in Human Articular Chondrocytes—Application for Cartilage Engineering. *Mar. Biotechnol.* **2018**, *20*, 436–450. [[CrossRef](#)]
73. Sivaraman, K.; Shanthi, C. Matrikines for therapeutic and biomedical applications. *Life Sci.* **2018**, *214*, 22–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Oesser, S.; Seifert, J. Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell Tissue Res.* **2003**, *311*, 393–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Oesser, S.; Adam, M.; Babel, W.; Seifert, J. Oral administration of (14)C labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1891–1895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Kirkham, S.G.; Samarasinghe, R.K. Review article: Glucosamine. *J. Orthop. Surg.* **2009**, *17*, 72–76. [[CrossRef](#)]
77. Musumeci, G.; Trovato, F.M.; Pichler, K.; Weinberg, A.M.; Loreto, C.; Castrogiovanni, P. Extra-virgin olive oil diet and mild physical activity prevent cartilage degeneration in an osteoarthritis model: An in vivo and in vitro study on lubricin expression. *J. Nutr. Biochem.* **2013**, *24*, 2064–2075. [[CrossRef](#)]
78. Henrotin, Y.E.; Sanchez, C.; Deberg, M.A.; Piccardi, N.; Guillou, G.B.; Msika, P.; Reginster, J.Y. Avocado/soybean unsaponifiables increase aggrecan synthesis and reduce catabolic and proinflammatory mediator production by human osteoarthritic chondrocytes. *J. Rheumatol.* **2003**, *30*, 1825–1834.
79. Latire, T.; Legendre, F.; Bigot, N.; Carduner, L.; Kellouche, S.; Bouyoucef, M.; Carreiras, F.; Marin, F.; Lebel, J.M.; Galéra, P.; et al. Shell extracts from the marine bivalve *Pecten maximus* regulate the synthesis of extracellular matrix in primary cultured human skin fibroblasts. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e99931. [[CrossRef](#)]
80. Grimaud, E.; Heymann, D.; Rédini, F. Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2002**, *13*, 241–257. [[CrossRef](#)]
81. Joyce, M.E.; Roberts, A.B.; Sporn, M.B.; Bolander, M.E. Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J. Cell Biol.* **1990**, *110*, 2195–2207. [[CrossRef](#)]

82. Xu, L.; Li, Y. A Molecular Cascade Underlying Articular Cartilage Degeneration. *Curr. Drug Targets* **2020**, *21*, 838–848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Manning, L.B.; Li, Y.; Chickmagalur, N.S.; Li, X.; Xu, L. Discoidin Domain Receptor 2 as a Potential Therapeutic Target for Development of Disease-Modifying Osteoarthritis Drugs. *Am. J. Pathol.* **2016**, *186*, 3000–3010. [[CrossRef](#)]
84. Loeser, R.F.; Collins, J.A.; Diekman, B.O. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2016**, *12*, 412–420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Loeser, R.F. Aging and osteoarthritis: The role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthr. Cartil.* **2009**, *17*, 971–979. [[CrossRef](#)]
86. Tomiyama, T.; Fukuda, K.; Yamazaki, K.; Hashimoto, K.; Ueda, H.; Mori, S.; Hamanishi, C. Cyclic compression loaded on cartilage explants enhances the production of reactive oxygen species. *J. Rheumatol.* **2007**, *34*, 556–562.
87. Cha, B.H.; Lee, J.S.; Kim, S.W.; Cha, H.J.; Lee, S.H. The modulation of the oxidative stress response in chondrocytes by Wip1 and its effect on senescence and dedifferentiation during in vitro expansion. *Biomaterials* **2013**, *34*, 2380–2388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Henrotin, Y.E.; Bruckner, P.; Pujol, J.P. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* **2003**, *11*, 747–755. [[CrossRef](#)]
89. Jeon, O.H.; Kim, C.; Laberge, R.M.; Demaria, M.; Rathod, S.; Vasserot, A.P.; Chung, J.W.; Kim, D.H.; Poon, Y.; David, N.; et al. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 775–781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Dewan, A.K.; Gibson, M.A.; Elisseeff, J.H.; Trice, M.E. Evolution of autologous chondrocyte repair and comparison to other cartilage repair techniques. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 272481. [[CrossRef](#)]
91. 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](#)]
92. Contentin, R.; Demoor, M.; Concar, M.; Desancé, M.; Audigié, F.; Branly, T.; Galéra, P. Comparison of the Chondrogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow and Umbilical Cord Blood Intended for Cartilage Tissue Engineering. *Stem Cell Rev. Rep.* **2020**, *16*, 126–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Raabe, O.; Reich, C.; Wenisch, S.; Hild, A.; Burg-Roderfeld, M.; Siebert, H.C.; Arnhold, S. Hydrolyzed fish collagen induced chondrogenic differentiation of equine adipose tissue-derived stromal cells. *Histochem. Cell Biol.* **2010**, *134*, 545–554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. 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.* **2017**, *5*, 611–630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Branly, T.; Contentin, R.; Desancé, M.; Jacquet, T.; Bertoni, L.; Jacquet, S.; 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](#)]
96. Desancé, M.; Contentin, R.; Bertoni, L.; Gomez-Leduc, T.; Branly, T.; Jacquet, S.; Betsch, J.M.; Batho, A.; Legendre, F.; Audigié, F.; et al. Chondrogenic Differentiation of Defined Equine Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord Blood for Use in Cartilage Repair Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 537. [[CrossRef](#)]
97. Rakic, R.; Bourdon, B.; Demoor, M.; Maddens, S.; Saulnier, N.; Galéra, P. Differences in the intrinsic chondrogenic potential of equine umbilical cord matrix and cord blood mesenchymal stromal/stem cells for cartilage regeneration. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 13799. [[CrossRef](#)]



Marine collagen hydrolysates downregulate the synthesis of pro-catabolic and pro-inflammatory markers of osteoarthritis and favor collagen production and metabolic activity in equine articular chondrocyte organoids

Bastien Bourdon^{1,2†}, Romain Contentin^{1†}, Frédéric Cassé¹, Chloé Maspimby¹, Sarah Oddoux², Antoine Noël², Florence Legendre¹, Nicolas Gruchy^{1,3} & Philippe Galéra^{1*}.

1. Normandie Univ, UNICAEN, BIOTARGEN, 14000 Caen, France.
2. Dielen laboratory, 50110 Tourlaville, France.
3. Department of Genetics, Normandy Center for Genomic and Personalized Medicine, Caen University Hospital, 14000 Caen, France.

†Contributed equally

*Correspondence: philippe.galera@unicaen.fr

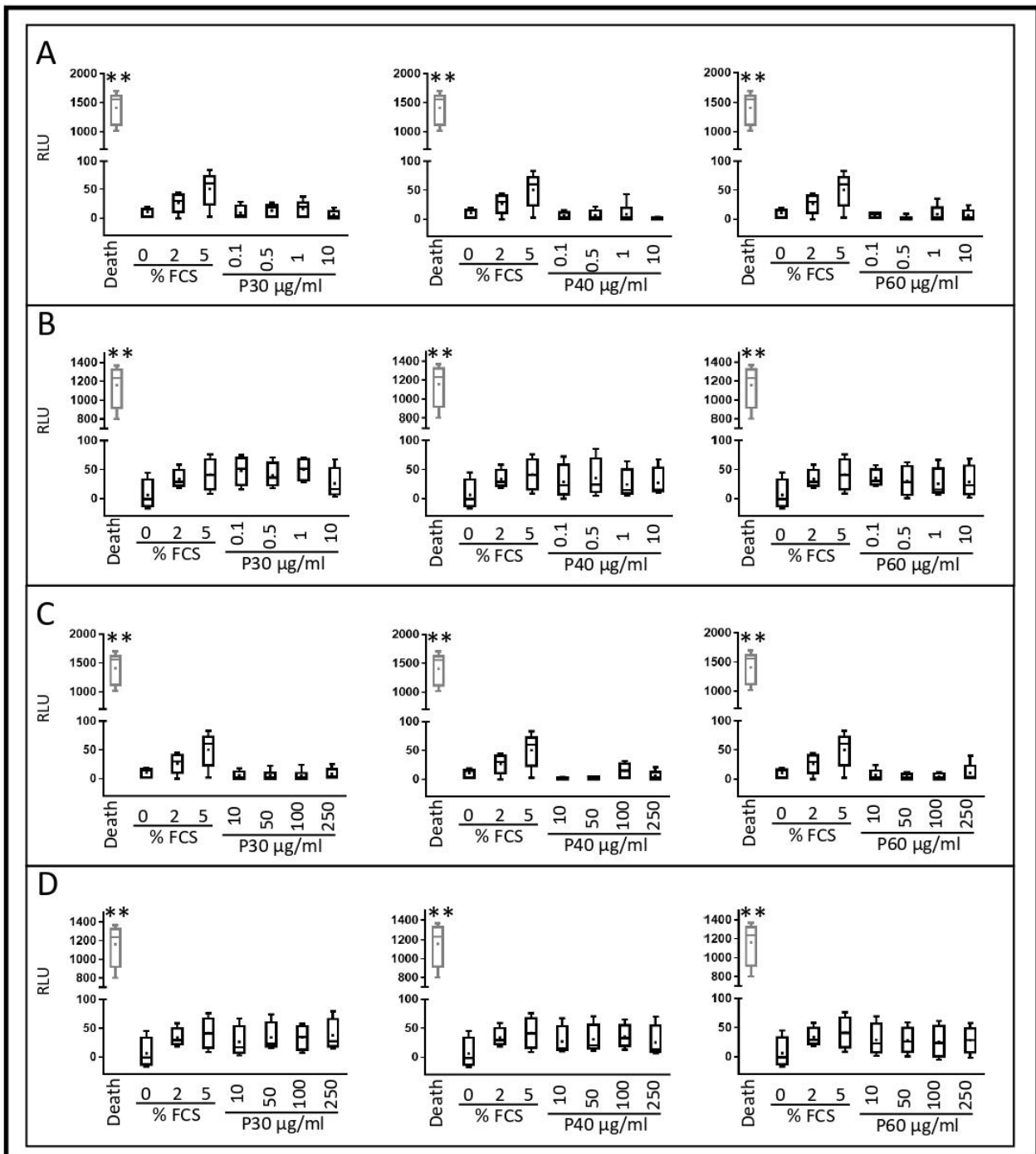


Figure S1: Promerim® 30, 40, and 60 have no cytotoxic effect on equine articular chondrocytes in normoxia.

Equine articular chondrocytes were amplified and seeded at P3. At 80% of confluency, the cells were treated with Promerim® hydrolysates at several concentrations (0.1, 0.5, 1 and 10 µg/ml) (A and B) and (10, 50, 100 and 250 µg/ml) (C and D) in the absence of FCS (A and C) or the presence of 2% fetal calf serum (FCS) (B and D) and then cultured for 72 h in normoxia. Controls with 0, 2 and 5% of FCS were included, as well as a death control (triton-induced death). The levels of adenylate kinase were measured in the media after 72 h of culture (Toxilight kit, Interchim). Data are represented as box-plots (n= 5). Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test (* p<0.05) and the 0% and 2% FCS conditions were used as references. P30, P40 and P60: Promerim® 30, Promerim® 40 and Promerim® 60.

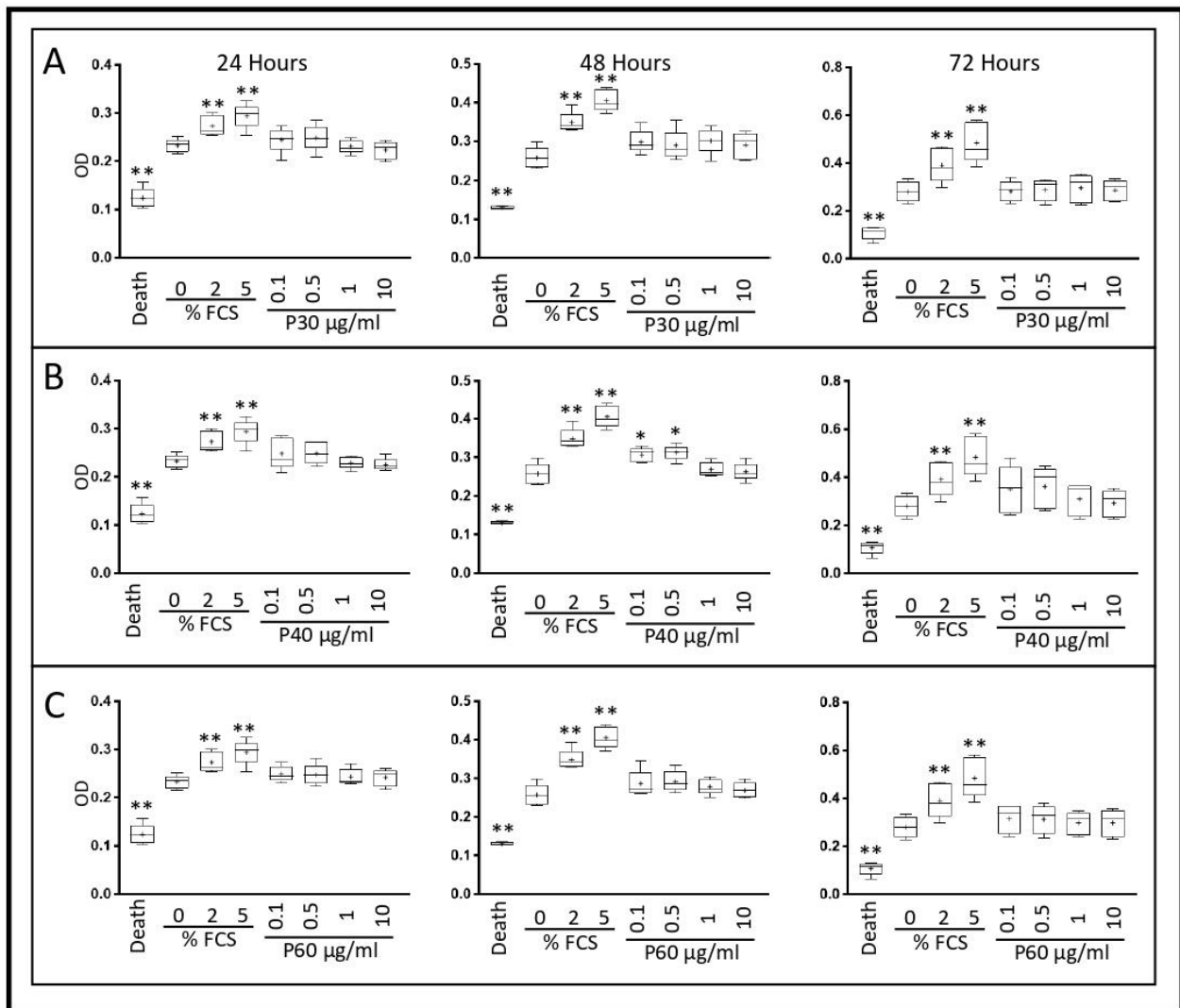


Figure S2: Effect of low concentrations of Promerim® 30, 40, and 60 on the mitochondrial activity of equine articular chondrocytes cultured in normoxia in the absence of serum.

Equine articular chondrocytes were amplified and seeded at P3. At 80% of confluency, the cells were treated with the Promerim® 30 (A), 40 (B), 60 (C) at several concentrations (0.1, 0.5, 1 and 10 µg/ml) in the absence of FCS and then cultured for 24, 48 and 72 h in normoxia. Controls with 0%, 2% and 5% of FCS, and a death control (triton-induced death) were included. The levels of formazan were measured (OD) in the media after 24, 48 and 72 h of culture (XTT kit, Roche). Data are represented as box-plots (n= 5). Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test (* p<0.05; ** p<0.01) and the 0% FCS condition was used as a reference. P30, P40 and P60: Promerim® 30, Promerim® 40 and Promerim® 60.

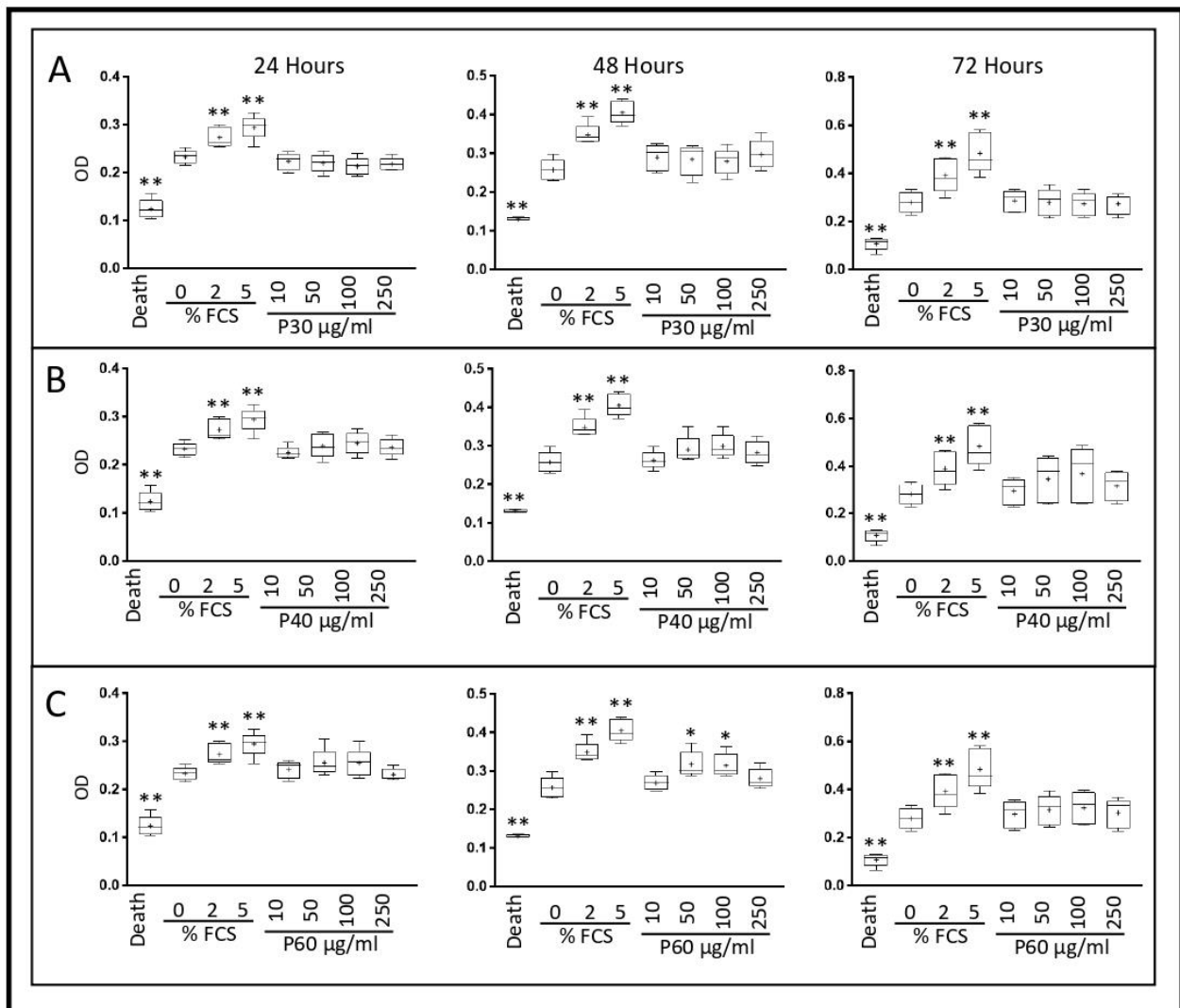


Figure S3: Effect of high concentrations of Promerim® 30, 40, and 60 on the mitochondrial activity of equine articular chondrocytes cultured in normoxia in the absence of fetal calf serum.

Equine articular chondrocytes were amplified and seeded at P3. At 80% of confluency, the cells were treated with Promerim® 30(A), 40 (B) and 60 (C) at several concentrations (10, 50, 100, 250 µg/ml) in the absence of FCS and then cultured for 24, 48 and 72 h in normoxia. Controls with 0%, 2% and 5% of FCS, and a death control (triton-induced death) were included. The levels of formazan were measured (OD) in the media at the end of the incubation period (XTT kit, Roche). Data are represented as box-plots (n= 5). Statistical analyses were based on the Mann-Whitney test (* p<0.05; ** p<0.01) and the 0% FCS condition was used as a reference. P30, P40 and P60: Promerim® 30, Promerim® 40 and Promerim® 60.

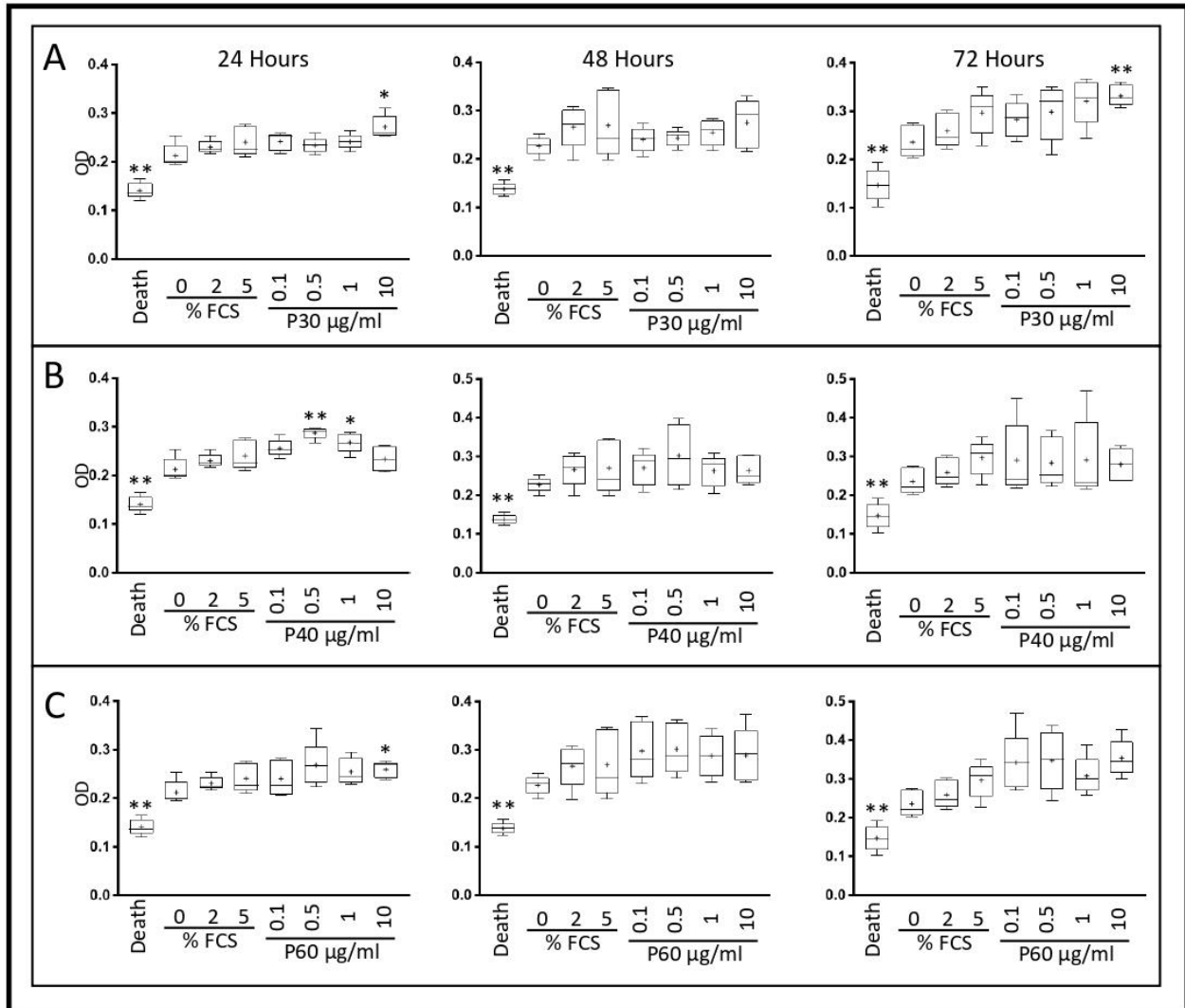


Figure S4: Effect of low concentrations of Promerim® 30, 40, and 60 on the mitochondrial activity of equine articular chondrocytes cultured in normoxia in the presence of 2% fetal calf serum (FCS).

Equine articular chondrocytes were amplified and seeded at P3. At 80% of confluency, the cells were treated with Promerim® 30 (A), 40 (B), 60 (C) at several concentrations (0.1, 0.5, 1 and 10 µg/ml) in the presence of 2% FCS and then cultured for 24, 48 and 72 h in normoxia. Controls with 0%, 2% and 5% of FCS, and a death control (triton-induced death) were included. The levels of formazan in the media at the end of the culture period (XTT kit, Roche). Data are represented as box-plots (n= 5). Statistical analyses were based on the Mann-Whitney test (* p<0.05; ** p<0.01) and the 0% FCS condition was used as a reference. P30, P40 and P60: Promerim® 30, Promerim® 40 and Promerim® 60.

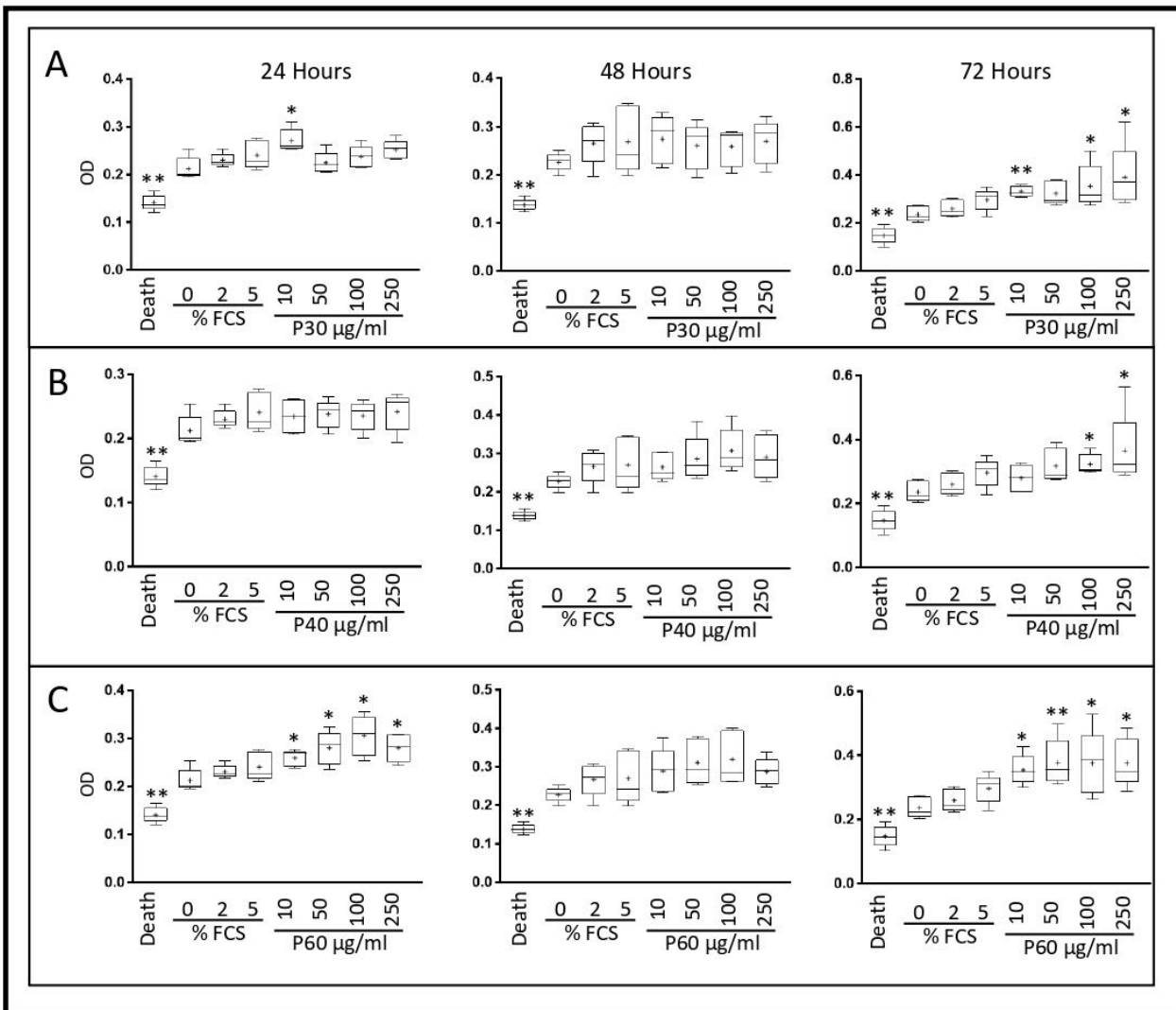


Figure S5: Effect of high concentrations of Promerim® 30, 40, and 60 on the mitochondrial activity of equine articular chondrocytes cultured in normoxia in the presence of 2% fetal calf serum (FCS).

Equine articular chondrocytes were amplified and seeded at P3. At 80% of confluency, the cells were treated with the Promerim® 30 (A), 40 (B), 60 (C) at several concentrations (10, 50, 100, 250 µg/ml) in the presence of 2% of FCS and then cultured for 24, 48 and 72 h in normoxia. Controls with 0%, 2% and 5% of FCS, and a death control (triton-induced death) were included. The levels of formazan were measured (OD) in the media at the end of the incubation period (XTT kit, Roche). Data are represented as box-plots (n= 5). Statistical analyses were based on the Mann-Whitney test (* p<0.05; ** p<0.01) and the condition 2% FCS was used as a reference. P30, P40 and P60: Promerim® 30, Promerim® 40 and Promerim® 60.

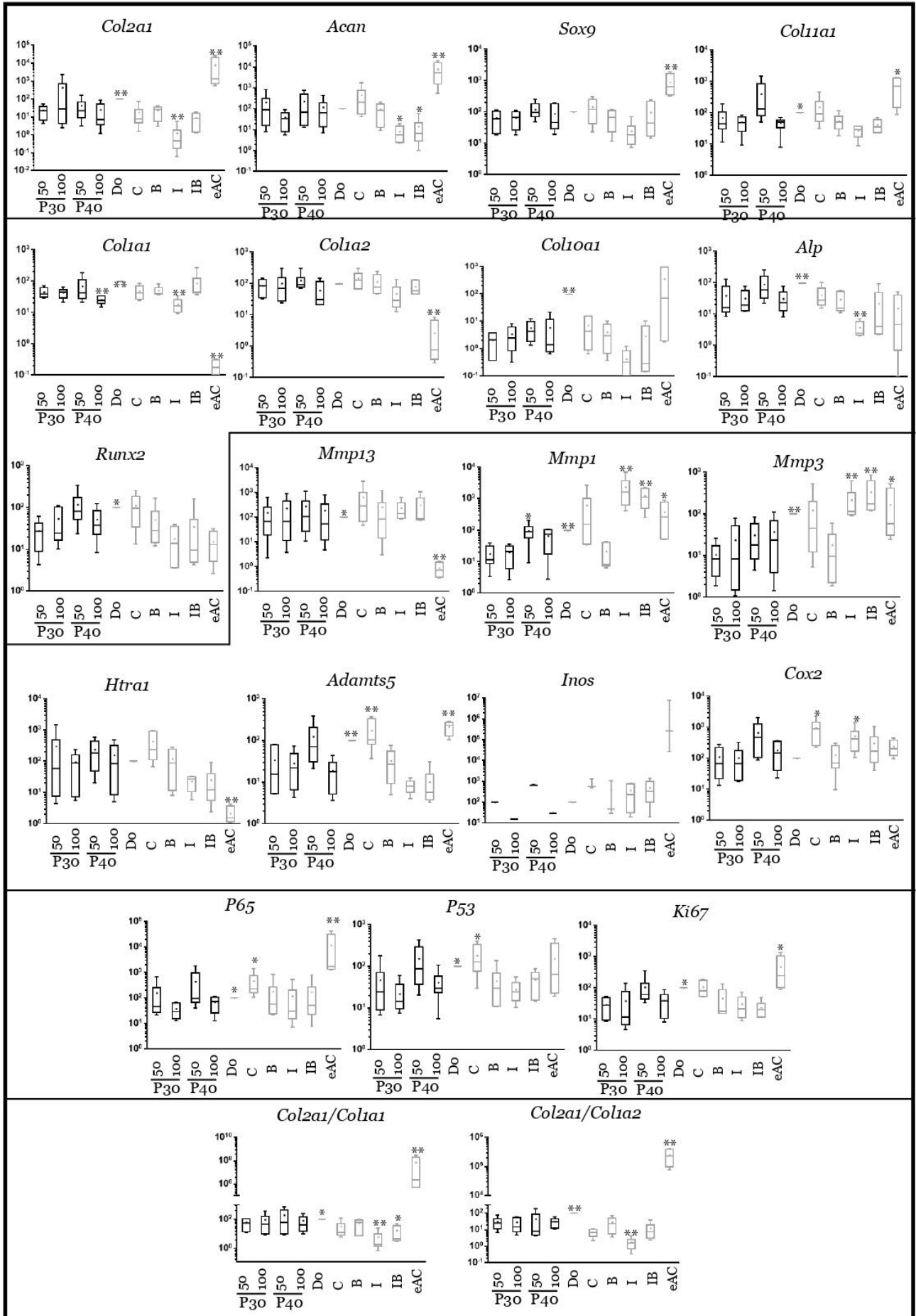


Figure S6: mRNA expression in equine articular chondrocytes treated with high concentrations Promerim® 30 and 40 in the presence of BMP-2.

Equine articular chondrocytes were grown in type I/III collagen sponges at the third passage (P3). They were incubated for 7 days under hypoxia in the absence (C: control) or both the presence of BMP-2+P30 and BMP-2+P40, or BMP-2 alone (B), or IL-1 alone (I), or BMP-2 and IL-1 (IB). The Promerim® were used at the concentrations of 50 and 100 µg/ml. The mRNAs were estimated using RT-qPCR after normalization with respect to the β-actin reference gene. Transcripts expression is shown in arbitrary units. The *Col2a1:Col1a1* and *Col2a1:Col1a2* ratios are given. The results are shown as box-plots (median, quartiles, extreme values) and the significance of the values between the different treatments and the control case (BMP-2) was tested using a Mann-Whitney test (* p < 0.05; **p < 0.01); n= 6. eAC: mRNA extracts obtained from equine articular chondrocytes released from cartilage after overnight enzymatic digestion were used as controls. DO: cells seeded in sponges and arrested after 16 h of incubation. P30 and P40: Promerim® 30 and Promerim® 40.

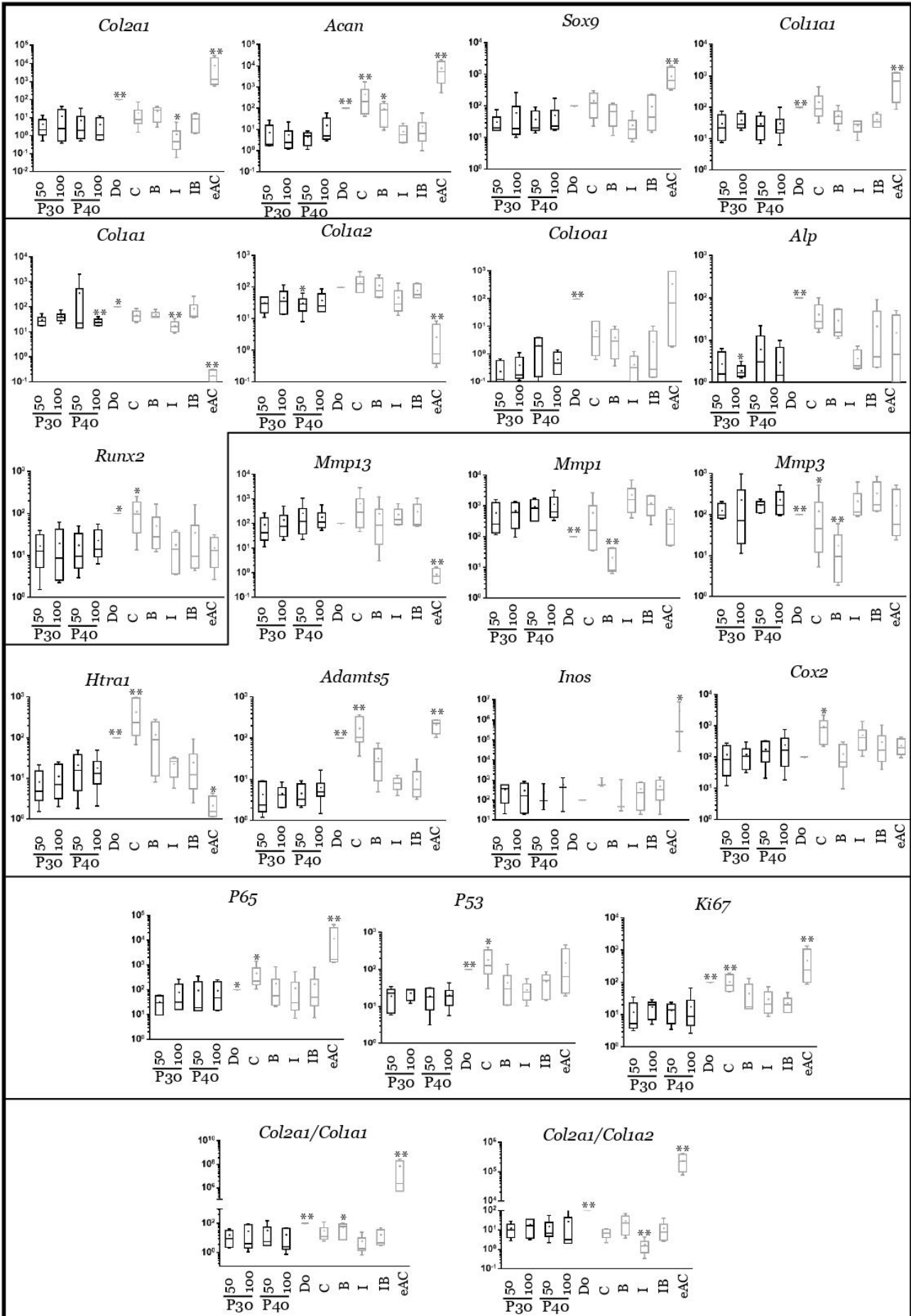


Figure S7: mRNA expression in equine articular chondrocytes treated with Promerim® 30 and 40 at high concentrations in the presence of both IL-1 and BMP-2.

Equine articular chondrocytes were grown in type I/III collagen sponges at the third passage (P3). They were incubated during 7 days under hypoxia in the absence (C: control) or both the presence of P30+IL-1+BMP-2 and P40+IL-1+BMP-2, or BMP-2 alone (B), or IL-1 alone (I), or BMP-2 together with IL-1 (IB). The Promerim® were used at the concentrations of 50 and 100 µg/ml. The mRNAs were estimated using RT-qPCR after normalization with respect to the β-actin reference gene. Transcript expression is shown in arbitrary units. The *Col2a1:Col1a1* and *Col2a1:Col1a2* ratios are given. The results are shown as box-plots (median, quartiles, extreme values) and the significance of the values between the different treatments and the control case (IL-1+BMP-2) was tested using a Mann-Whitney test (*p < 0.05; **p < 0.01); n= 3. eAC: mRNA extracts obtained from equine articular chondrocytes released from cartilage after overnight enzymatic digestion were used as controls. D0: cells seeded in sponges and arrested after 16 h of incubation. P30 and P40: Promerim®30 and 40.

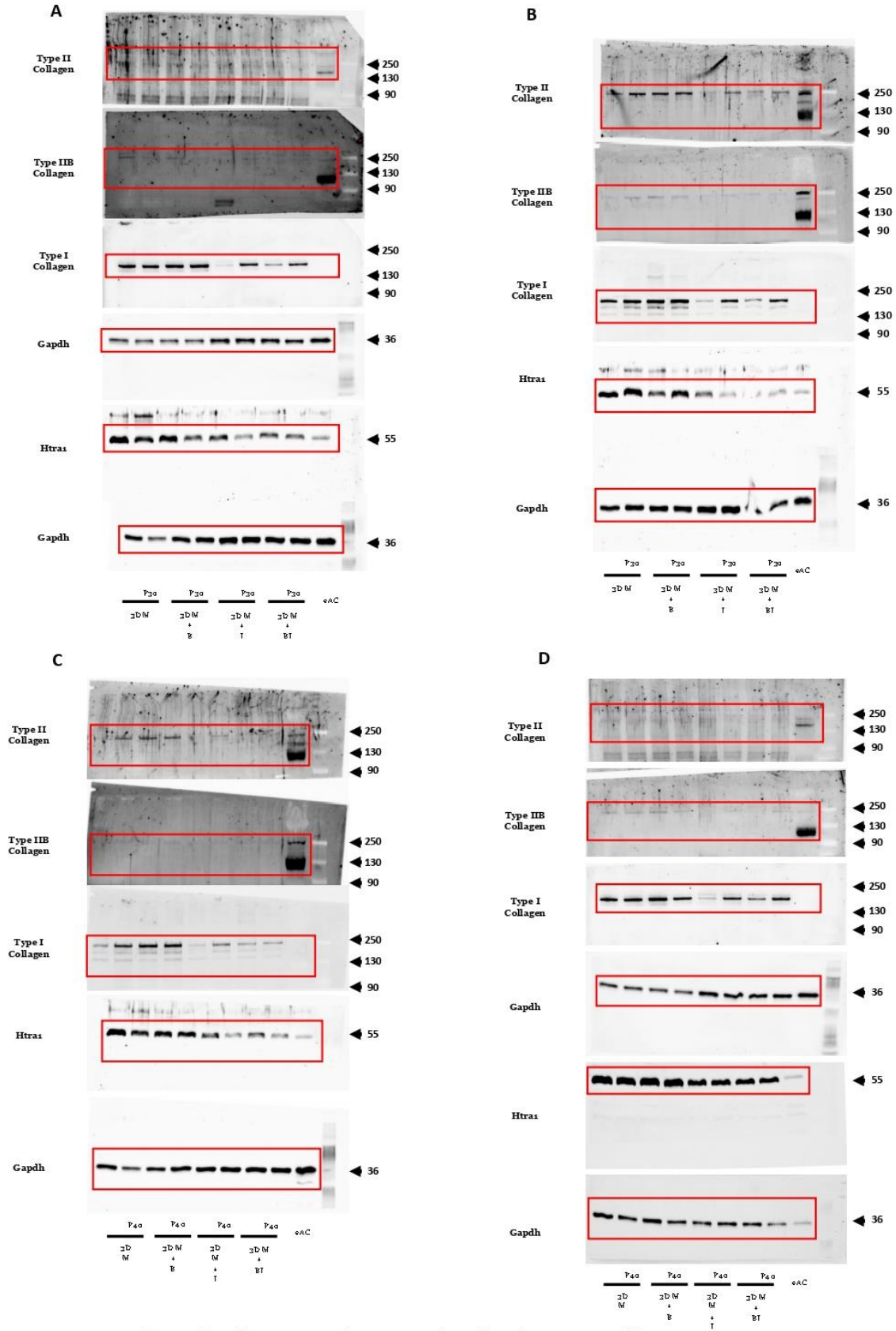


Figure S8: Complete gel and PVDF membranes analyzed in the western-blot.

For the western-blot presented in figure 13, respectively A, B, C and D, the complete images of the membranes captured with Chemidoc MP Imaging System (Bio-Rad) are shown. The molecular weight marker (MW kDa) is indicated on the right for the images shown. The cropped images are highlighted in the red lines.

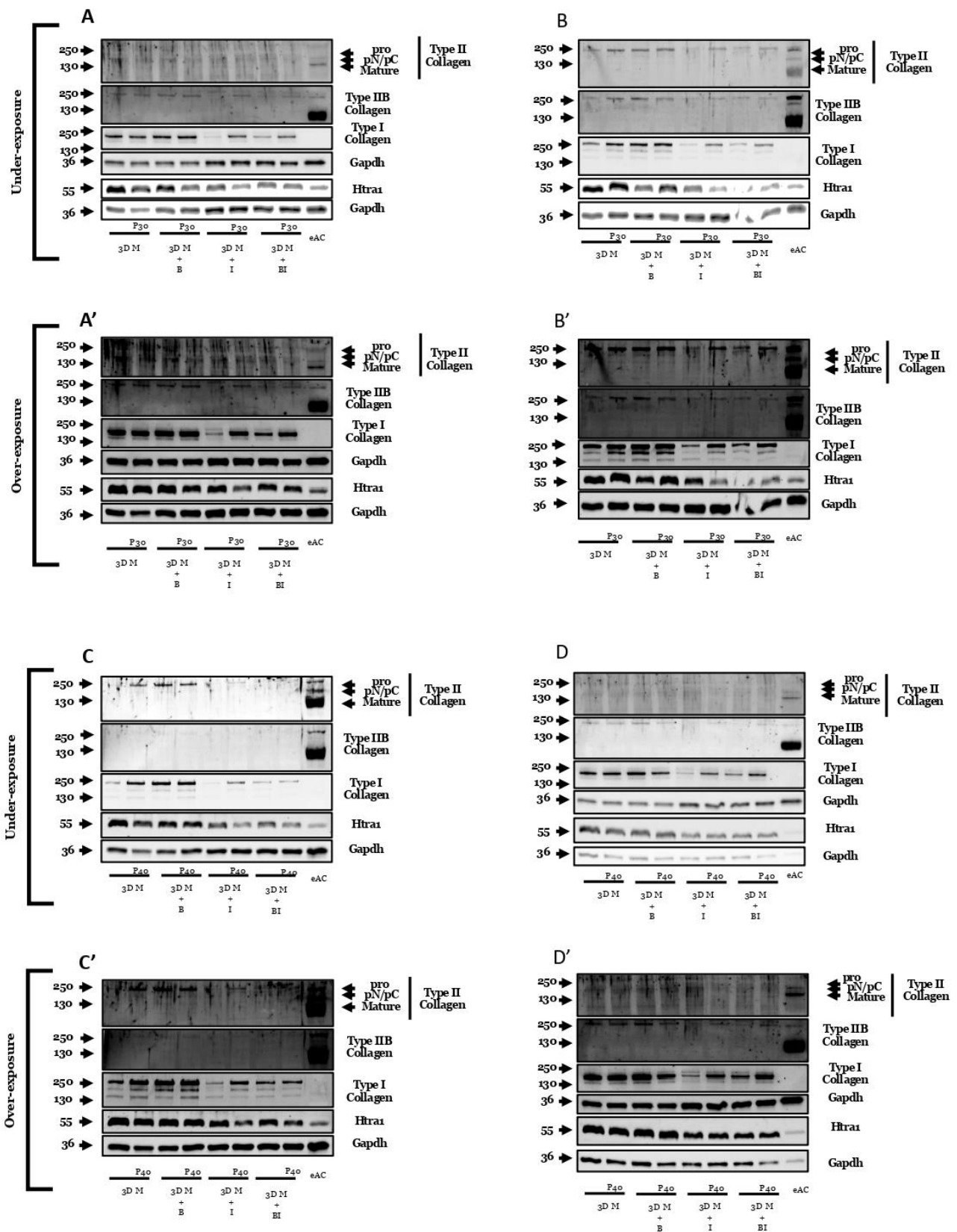


Figure S9: Under- and over-exposure of the blots presented in figure 13.

Under-exposure (A, B, C, D) and over-exposure (A', B', C', D') are shown. The molecular weight marker (MW kDa) is indicated on the left for the images presented.

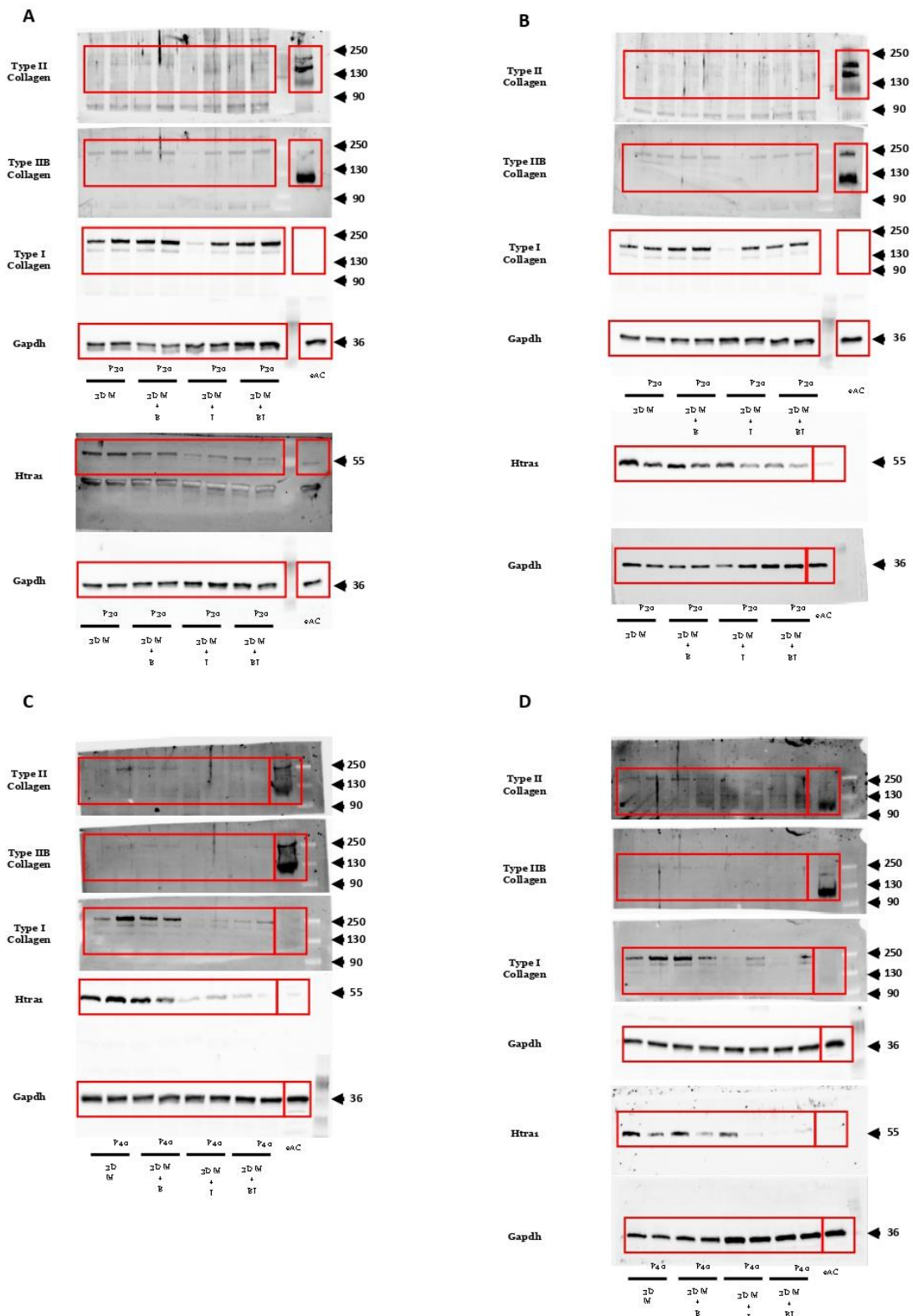


Figure S10: Complete gel and PVDF membranes analyzed in the western-blot.

For the western-blot presented in figure 14, respectively A, B, C and D, the complete images of the membranes captured with Chemidoc MP Imaging System (Bio-Rad) are shown. The molecular weight marker (MW kDa) is indicated on the right for the images shown. The cropped images are highlighted in the red lines.

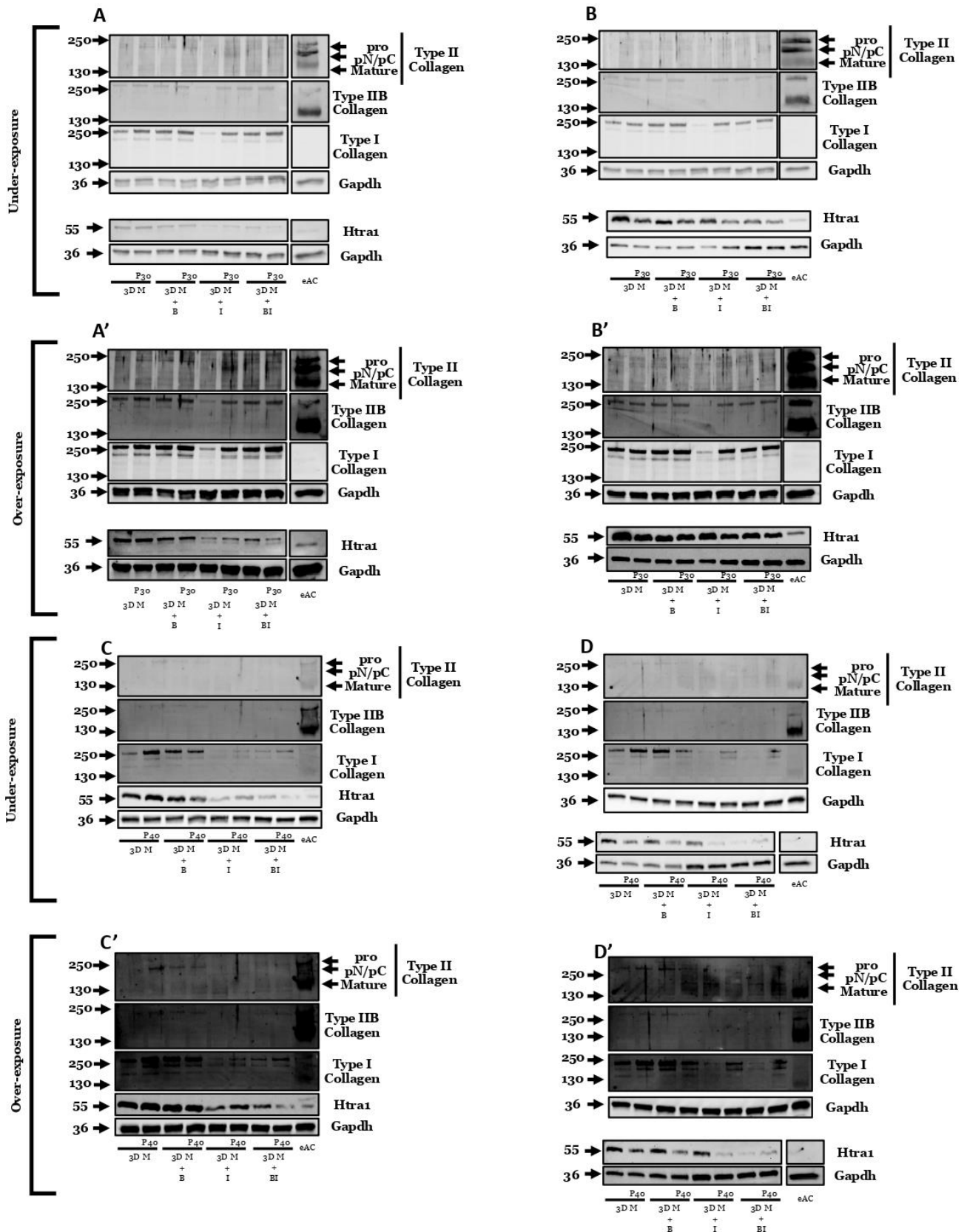


Figure S11: Under- and over-exposure of the blots presented in figure 14.

Under-exposure (A, B, C, D) and over-exposure (A', B', C', D') are shown below. The molecular weight marker (MW kDa) is indicated on the left for the images presented.

Gene	Forward sequence	Reverse sequence
<i>Acan</i>	TGT CAA CAA CAA TGC CCA AGA C	CTT CTT CCG CCC AAA GGT CC
<i>B-Actin</i>	GAT GAT GAT ATC GCC GCG CTC	TGC CCC ACG TAT GAG TCC TT
<i>Adams5</i>	AAG GGA CAC CAT GTG GCA AA	CCC ACA TGA GCG AGA ACA CT
<i>Alpl</i>	GAC ATG ACC TCC CAG GAA GA	GCA GTG AAG GGC TTC TTG TC
<i>Col1a1</i>	TGC CGT GAC CTC AAG ATG TG	CGT CTC CAT GTT GCA GAA GA
<i>Col1a2</i>	CCA GAG TGG AGC AGC GGT TA	GGG ATG TTT TCA GGT TGA GCC
<i>Col2a1</i>	GGC AAT AGC AGG TTC ACG TAC A	CGA TAA CAG TCT TGC CCC ACT T
<i>Col10a1</i>	GCA CCC CAG TAA TGT ACA CCT ATG	GAG CCA CAC CTG GTC ATT TTC
<i>Col11a1</i>	TTG CTG ATG GGA AGT GGC AT	GCT GCT TTG GGG TCA CCT AT
<i>Cox2</i>	CGA GGT CCA GCT TTC ACC A	GCG GAT ACA CCT CGC CAT T
<i>Htra1</i>	GGA CTT CAT GTT TCC CTC AA	GTT CTG CTG AAC AAG CAA CA
<i>Inos</i>	TTT GGC TGG TCC CCC GAT TT	GCC AGC GTT TCC GAT TTT CC
<i>Ki67</i>	AAG CTG CAC GTT CAT GGA GA	ACC CAC AGT TCT TCC TCC GA
<i>Mmp1</i>	CGA AGG GAA CCC TCG GTG GGA	TGG CCT GGT CCA CAT CTG CTC
<i>Mmp3</i>	GAG GAA ATG AGG AAC AAG CGG	GAG GGA AAC CCA GAG TGT GGA
<i>Mmp13</i>	TGA AGA CCC GAA CCC TAA ACA T	GAA GAC TGG TGA TGG CAT CAA G
<i>P53</i>	CAC CTG AGG TTG GCT CTG AC	GCA CAA ACA CGC ACC TCA AA
<i>P65</i>	CAC GGA TAC CAC CAA GAC CC	GTC TGG ATG CGC TGA CTG AT
<i>Ppia</i>	CCC TAC CGT GTT CTT CGA CA	GTG AAG TCA CCA CCC TGA CA
<i>Runx2</i>	GCA GTT CCC AAG CAT TTC AT	CAC TCT GGC TTT GGG AAG AG
<i>Sox9</i>	CAA GAA GGA CCA CCC GGA CTA	GGA GAT GTG TGT CTG CTC CGT

Supplementary table 1. Sequences of the primers used in RT-qPCR.

3. Conclusion de l'article #2

Dans cette étude, nous avons étudié l'effet d'hydrolysats de collagènes issus de la peau et de cartilage de poissons sur des chondrocytes articulaires équins. Dans un premier temps, nous avons montré que les hydrolysats étudiés, les Promérim® 30, 40 et 60, ne sont pas toxiques et n'induisent pas la mort des CAE. Par la suite, nous avons observé des effets positifs des hydrolysats sur les CAE, en augmentant l'activité métabolique mitochondriale des CAE, mais aussi, en diminuant la sénescence. Ces deux facteurs sont essentiels afin de limiter le développement de l'arthrose. En effet, une augmentation de l'activité métabolique ainsi qu'une diminution de la sénescence peuvent laisser espérer une durée de vie plus importante des chondrocytes qui serait couplée à une meilleure synthèse protéique. Or, nous savons que, lors du processus arthrosique, les chondrocytes, qui possèdent une faible activité métabolique, n'arrivent pas à compenser les pertes de substance chondrale subies par le tissu.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux synthèses d'un large panel de transcrits et de protéines afin d'identifier si les hydrolysats permettent de limiter l'inflammation, la dégradation tissulaire ou encore augmenter la synthèse de protéines matricielles caractéristiques du cartilage hyalin. Dans certains cas, seuls ou en présence d'IL-1 β , les Promérim®30 et Promérim®40 augmentent la synthèse des collagènes de types I et II, tout en diminuant les niveaux de transcription des protéases impliquées dans la pathogenèse de l'arthrose, à savoir *Htra1* et les métalloprotéases *Mmp-1* et *-3*. Les deux hydrolysats de collagènes ont également diminué l'expression protéique d'HtrA1. L'effet du Promérim® se trouve renforcé dans des conditions pro-inflammatoires, peut-être en raison d'une diminution de la synthèse des molécules associées à l'inflammation. Enfin, le Promérim® a favorisé le comblement de blessures réalisées *in vitro*, grâce à une augmentation de la prolifération ou de la migration cellulaire observable notamment pour le Promérim® 40, et, dans une moindre mesure, pour les Promérim® 30 et 60.

Finalement, ces données démontrent que les Promérim® 30 et 40 semblent prometteurs en tant que compléments alimentaires pour soulager les symptômes de l'arthrose chez les chevaux et pour potentiellement retarder la progression de l'arthrose au travers de leurs effets sur les protéases induites lors de l'arthrose, sur la synthèse des protéines matricielles et sur le processus de réparation de blessure *in vitro*.

Le cheval étant un modèle gros mammifère de choix, des études *in vivo* chez ce modèle apparaissent pertinentes afin de conforter ou infirmer les résultats obtenus *in vitro*.

III. Troisième partie : Article #3

Marine collagen hydrolysates promote collagen synthesis, viability and proliferation while downregulating the synthesis of pro-catabolic markers in human articular chondrocytes.

Bourdon Bastien, Cassé Frédéric, Gruchy Nicolas, Cambier Pierre, Leclercq Sylvain, Oddoux Sarah, Noël Antoine, Lafont Jérôme, Contentin Romain, Galéra Philippe.

1. Objectifs de l'article #3

Les hydrolysats de collagènes ont pour finalité d'envisager le (co)-traitement préventif ou curatif de l'arthrose chez l'Homme. Les précédents travaux réalisés avec les chondrocytes équins ont révélé un potentiel prometteur des hydrolysats en tant que complément alimentaire. Nous avons donc poursuivi notre étude sur le potentiel « thérapeutique » des Promérim® dans le cadre de l'arthrose en évaluant leurs effets sur des CAH. Nous avons utilisé le même schéma expérimental, à savoir, dans un premier temps, vérifier la non-cytotoxicité des hydrolysats lorsqu'ils sont mis en présence des CAH. Ensuite, nous avons analysé l'effet des hydrolysats sur la viabilité des CAH, notamment sur la prolifération et la sénescence. Ces deux éléments sont essentiels lors du développement du processus arthrosique afin de synthétiser une MEC plus abondante et ainsi néosynthétiser un tissu cartilagineux, en lieu et place du tissu dégradé lors des stades les plus précoces de l'arthrose. Par la suite, nous avons étudié le transcriptome des CAH sous l'effet des hydrolysats de collagènes et leur effet sur la synthèse protéique, en suivant notamment les isotopes collagéniques I, II et IIB, permettant d'appréhender la nature de la MEC néosynthétisée. Nous avons choisi de réaliser ces expérimentations en présence (ou en absence) d'IL-1 β afin de mimer le caractère inflammatoire présent lors du processus arthrosique. Le but étant de caractériser les effets des hydrolysats de collagènes et d'identifier si les Promérim® possèdent des effets limitant le catabolisme et/ou augmentant l'anabolisme matriciel.

2. Article #3



Article

Marine Collagen Hydrolysates Promote Collagen Synthesis, Viability and Proliferation While Downregulating the Synthesis of Pro-Catabolic Markers in Human Articular Chondrocytes

Bastien Bourdon ^{1,2}, Frédéric Cassé ¹, Nicolas Gruchy ^{1,3}, Pierre Cambier ¹, Sylvain Leclercq ⁴, Sarah Oddoux ², Antoine Noël ², Jérôme E. Lafont ⁵, Romain Contentin ^{1,†} and Philippe Galéra ^{1,*,†}

¹ BIOTARGEN, UNICAEN, Normandie University, 14000 Caen, France; bastien.bourdon@unicaen.fr (B.B.); frederic.casse@unicaen.fr (F.C.); nicolas.gruchy@unicaen.fr (N.G.); 21507655@etu.unicaen.fr (P.C.); contentinr@email.chop.edu (R.C.)

² Dielen Laboratory, 50110 Tourlaville, France; sarah-oddoux@dielen.fr (S.O.); antoine-noel@dielen.fr (A.N.)

³ Normandy Center for Genomic and Personalized Medicine, Department of Genetics, Caen University

Hospital, 14000 Caen, France

⁴ Service de Chirurgie Orthopédique, Clinique Saint-Martin, 14000 Caen, France; sylvainleclercq60@gmail.com

⁵ CNRS UMR 5305, Laboratory of Tissue Biology and Therapeutic Engineering, University Claude Bernard Lyon 1, Univ Lyon, 69367 Lyon, France; jerome.lafont@ibcp.fr

* Correspondence: philippe.galera@unicaen.fr

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Bourdon, B.; Cassé, F.; Gruchy, N.; Cambier, P.; Leclercq, S.; Oddoux, S.; Noël, A.; Lafont, J.E.; Contentin, R.; Galéra, P. Marine Collagen Hydrolysates Promote Collagen Synthesis, Viability and Proliferation While Downregulating the Synthesis of Pro-Catabolic Markers in Human Articular Chondrocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3693. <https://doi.org/10.3390/ijms22073693>

Academic Editor: Seung-Hong Lee

Received: 24 February 2021

Accepted: 28 March 2021

Published: 1 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Cartilage is a non-innervated and non-vascularized tissue. It is composed of one main cell type, the chondrocyte, which governs homeostasis within the cartilage tissue, but has low metabolic activity. Articular cartilage undergoes substantial stresses that lead to chondral defects, and inevitably osteoarthritis (OA) due to the low intrinsic repair capacity of cartilage. OA remains an incurable degenerative disease. In this context, several dietary supplements have shown promising results, notably in the relief of OA symptoms. In this study, we investigated the effects of collagen hydrolysates derived from fish skin (Promerim[®]30 and Promerim[®]60) and fish cartilage (Promerim[®]40) on the phenotype and metabolism of human articular chondrocytes (HACs). First, we demonstrated the safety of Promerim[®] hydrolysates on HACs cultured in monolayers. Then we showed that Promerim[®] hydrolysates can increase the HAC viability and proliferation, while decreasing HAC SA- β -galactosidase activity. To evaluate the effect of Promerim[®] on a more relevant model of culture, HAC were cultured as organoids in the presence of Promerim[®] hydrolysates with or without IL-1 β to mimic an OA environment. In such conditions, Promerim[®] hydrolysates led to a decrease in the transcript levels of some proteases that play a major role in the development of OA, such as Htra1 and metalloproteinase-1. Promerim[®] hydrolysates downregulated Htra1 protein expression. In contrast, the treatment of cartilage organoids with Promerim[®] hydrolysates increased the neosynthesis of type I collagen (Promerim[®]30, 40 and 60) and type II collagen isoforms (Promerim[®]30 and 40), the latter being the major characteristic component of the cartilage extracellular matrix. Altogether, our results demonstrate that the use of Promerim[®] hydrolysates hold promise as complementary dietary supplements in combination with the current classical treatments or as a preventive therapy to delay the occurrence of OA in humans.

Keywords: human chondrocytes; matrix-associated autologous chondrocyte implantation (MACI); osteoarthritis; collagen; collagen hydrolysates; interleukin-1; catabolic markers; senescence; in vitro repair

1. Introduction

Articular cartilage (AC) is the tissue that covers the ends of the bones in diarthrodial joints. AC is mainly composed of an abundant extracellular matrix (ECM) synthesized by a small proportion of chondrocytes (1–3% of the tissue volume) [1–3]. The AC ECM contains

several collagens and proteoglycans that provide the tissue with resistance to mechanical loads and shear forces. The most abundant collagens are type II (IIB and IIA isoforms), IX and XI collagens, whereas the most abundant proteoglycan is aggrecan [4]. AC resides in a hypoxic environment and has a very low intrinsic capacity for self-repair [5–7]. Thus, chondral defects inevitably lead to osteoarthritis (OA) [8]. Moreover, OA has a multifactorial etiology which encompasses aging, obesity, traumas, genetic predispositions, hormonal status [9–11]. Thus, 300 million people worldwide suffer from OA, including approximately 30.8 million people in the United States and 70 million people in Europe [12,13].

OA is a degenerative disease that leads to AC degradation. The disruption of cartilage homeostasis, which is tightly regulated by anabolic and catabolic factors, is one of the main features of OA [3,14,15]. However, soon after cartilage injury, chondrocytes transiently proliferate and synthesize a fibrous ECM composed of atypical molecules, notably type I collagen [14,15]. The synthesized fibrocartilage does not have the same biomechanical properties as hyaline cartilage. Hence, fibrocartilage is rapidly degraded and the subchondral bone undergoes friction, which causes pain.

Inflammatory factors such as interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) play a major role in the progression of the OA process by enhancing the synthesis of ECM-degrading factors such as collagenases, aggrecanases, etc. [14,16,17]. Inflammation, in addition to disrupting cartilage homeostasis, also affects whole joint tissues (synovium, joint ligaments, synovial membrane, bone, etc.), further contributing to OA symptoms.

To date, there is no long-term treatment to regenerate cartilage tissue. At the onset of OA, the therapeutic strategy aims to reduce the pain, stiffness or inflammation using analgesics, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and steroids such as corticosteroids. Intra-articular injections of hyaluronan (HA), glucocorticoids or platelet rich plasma (PRP) attenuate OA symptoms and increase the quality of life of the patient, but only for a transient period after injection [18–20]. In the most advanced stages of OA, prosthetic surgery is the only recommended treatment [21,22].

The emergence of complementary therapeutics, such as dietary supplements, appears to be an interesting solution [23]. Collagen hydrolysates have been proposed as nutraceuticals to limit or even restore the quality of cartilage tissue in patients with OA. Further, many studies have shown that collagen hydrolysates may constitute a promising dietary supplement to treat cartilage pathologies [24–26]. In 1982, a study showed that oral ingestion of hydrolyzed collagen enhanced symptom improvement in 75% of patients [27,28]. More recently, Jiang and colleagues [29] showed that daily oral intake of collagen peptides for 6 months reduces pain and increases joint mobility in women with moderate knee OA. The use of collagen hydrolysates as dietary supplements may represent an alternative strategy for the management and prevention of OA.

In the present study, we first evaluated the effects of three collagen hydrolysates derived from fish skin (Promerim[®]30 and Promerim[®]60) and fish cartilage (Promerim[®]40) on the viability of human articular chondrocytes (HACs) grown as monolayers. The proliferation, viability and senescence of HACs were assessed both in normoxia and hypoxia. Then, we grew HAC as organoids, as previously, to investigate the effect of Promerim[®] on hyaline-like cartilage cultured *in vitro* [15,30,31]. The cartilage quality of the organoids was assessed through studies of gene and protein expressions of hyaline chondrocyte markers. This study identified some molecular mechanisms that may be responsible for the beneficial effects of hydrolyzed collagens on the metabolism of human chondrocytes.

2. Results

2.1. Promerim[®] 30, 40 and 60 Show No Cytotoxic Effects on HACs, Promote Their Viability, Proliferation and Inhibit Cell Senescence

To evaluate the safety of Promerim[®] hydrolysates, HACs were cultured in monolayer and at 80% confluency were treated with Promerim[®] 30, 40 or 60 at concentrations ranging from 0.1 to 250 µg/mL. Then, the HACs were grown for 72 h, either in a normoxic or hypoxic environment in serum-free media or in the presence of 2% FCS. The hypoxic and the serum-free conditions were used to mimic as much as possible the in vivo chondrocyte microenvironment. We also assessed the safety of Promerim[®] hydrolysates when HACs were cultured in the presence of 2% FCS, used for optimizing the subsequent organoid culture conditions. The results showed that Promerim[®] hydrolysates had no cytotoxic effects on HAC regardless of the oxic conditions or serum concentrations used (Figures 1 and 2).

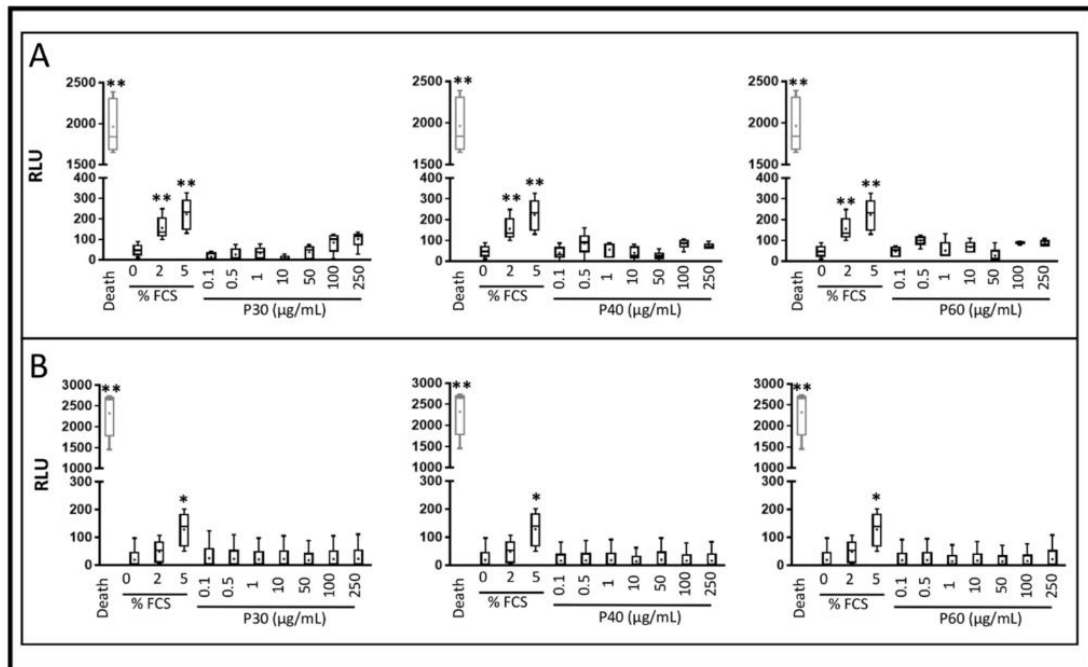


Figure 1. Cytotoxicity of Promerim[®] 30, 40 and 60 on human articular chondrocytes. Human articular chondrocytes at P2 and 80% confluency were treated in the absence of FCS, with 0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100 or 250 µg/mL of Promerim[®] hydrolysates for 72 h in hypoxia (A) or normoxia (B). Controls with 0, 2 and 5% FCS were performed as well as a positive control of 100% cell death (Triton-induced death). Results are summarized in box plots ($n = 5$) showing the mean (cross) and the median (line) of relative light units (RLU) corresponding to the levels of adenylate kinase measured in the media. Statistical analyses were performed using the Mann–Whitney test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) compared with the 0% FCS condition.

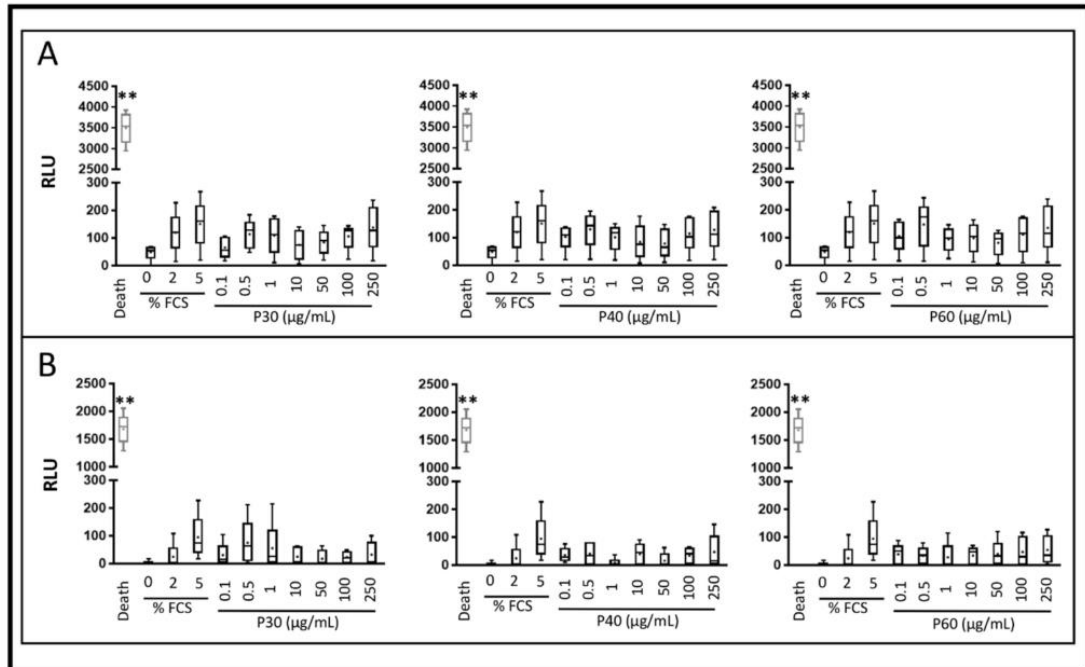


Figure 2. Cytotoxicity of Promerim[®]30, 40 and 60 on human articular chondrocytes. Human articular chondrocytes at P2 and 80% confluency were treated in the presence of 2% FCS, with 0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100 or 250 µg/mL Promerim[®] hydrolysates for 72 h in hypoxia (A) or normoxia (B). Controls with 0, 2 and 5% FCS were performed as well as a positive control of 100% cell death (Triton-induced death). Results are summarized in box plots ($n = 5$) showing the mean (cross) and the median (line) of relative light units (RLU) corresponding to the levels of adenylate kinase measured in the media. Statistical analyses were performed using the Mann–Whitney test (** $p < 0.01$) compared with the 2% FCS condition.

We then studied the effect of Promerim[®] on the viability and proliferation of HACs in serum-free media or in the presence of 2% FCS.

In hypoxia and without serum, Promerim[®]30 did not induce any variation in HAC viability and proliferation, compared with the 0% FCS condition (Figure 3A). On the other hand, HAC viability and proliferation increased after 24, 48 and 72 h of treatment with low concentrations of Promerim[®]40 (0.1, 0.5, 1 µg/mL) and after 24 and 48 h of treatment with high concentrations of Promerim[®]40, respectively at 100 and 250 µg/mL (Figure 3B). Promerim[®]60 used at low concentrations (0.5 and 1 µg/mL) increased HAC viability and proliferation after 24 and 48 h of treatment, and only after 48 h of treatment when Promerim[®]60 was used at a higher concentration (100 µg/mL) (Figure 3C).

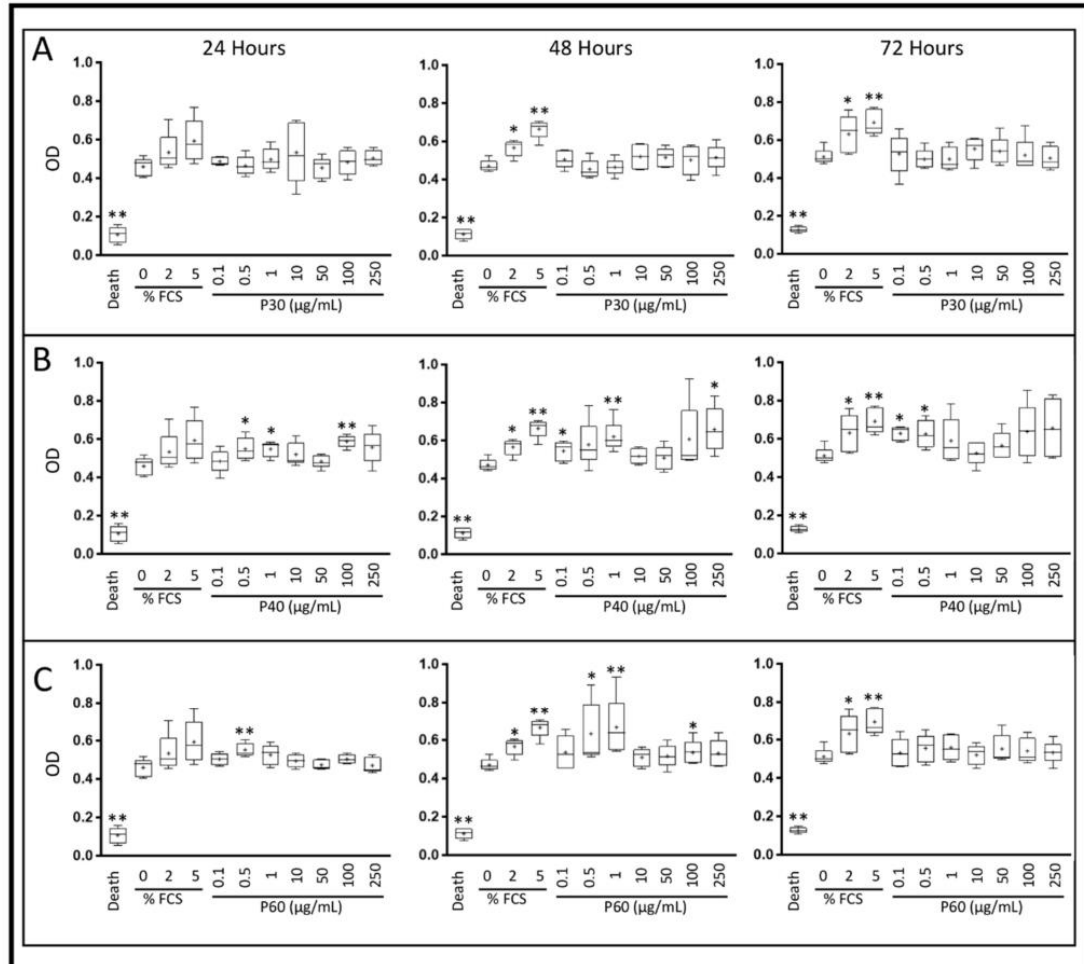


Figure 3. Effect of Promerim[®] hydrolysates on the viability and proliferation of human articular chondrocytes. Human articular chondrocytes at P2 and 80% confluency were treated in the absence of FCS, with 0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100 or 250 µg/mL Promerim[®]30 (A), 40 (B) and 60 (C) for 24, 48 or 72 h in hypoxia. Controls with 0%, 2% and 5% of FCS, and a positive control of 100% cell death (Triton-induced death) were performed. Formazan levels, which are correlated with the viability and proliferation, were measured in the media after 24, 48 or 72 h of treatment. Results are summarized in box plots ($n = 5$) showing the mean (cross) and the median (line) of optical density (OD). Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) compared with the 0% FCS condition.

In the presence of 2% FCS and in hypoxia, Promerim[®]30 and 40 used at concentrations ranging from 0.1 to 10 µg/mL tended to increase HAC viability and proliferation, but there was no statistically significant difference, regardless of the Promerim[®] hydrolysate used, between the treatment times of for 24, 48 and 72 h (Figure 4A–C).

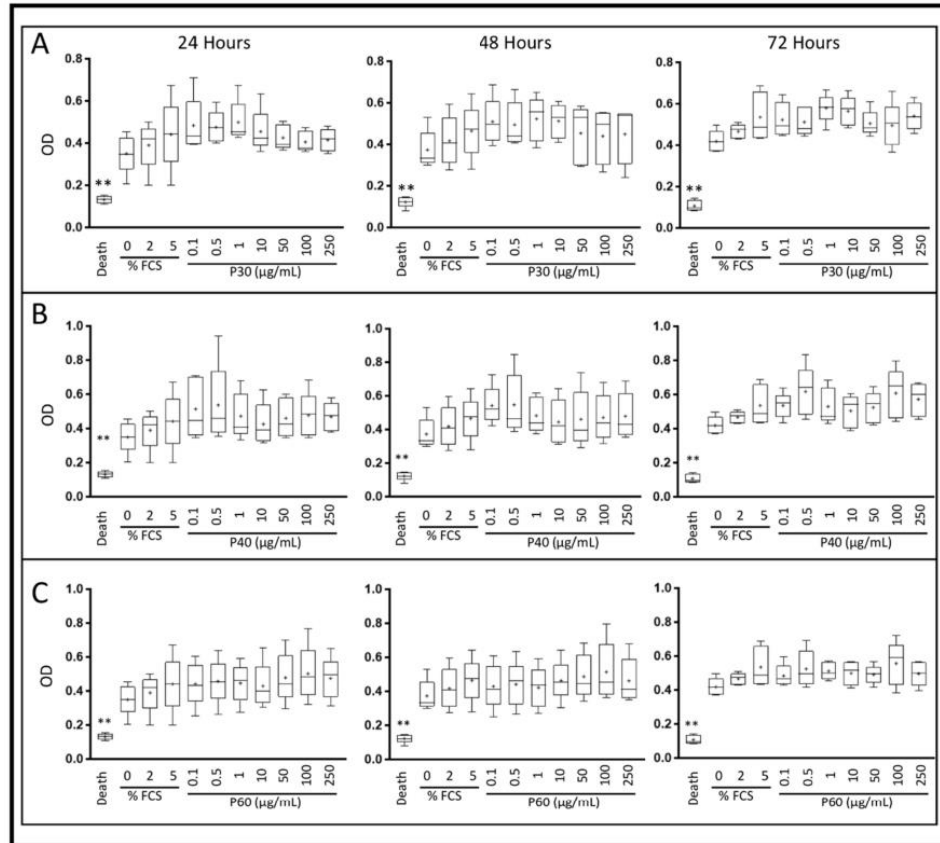


Figure 4. Effect of Promerim[®] hydrolysates on the viability and proliferation of human articular chondrocytes. Human articular chondrocytes at P2 and 80% confluency were treated in the presence of 2% FCS, with 0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100 or 250 µg/mL Promerim[®]30 (A), 40 (B) or 60 (C) for 24, 48 or 72 h in hypoxia. Controls with 0%, 2% and 5% FCS, and a positive control of 100% cell death (Triton-induced death) were performed. Formazan levels, which are correlated with viability and proliferation, were measured in the media after 24, 48 or 72 h of treatment. Results are summarized in box plots ($n = 5$) showing the mean (cross) and the median (line) of optical density (OD). Statistical analyses were performed using the Mann–Whitney test (** $p < 0.01$) compared with the 2% FCS condition.

In normoxia and in serum-free culture conditions, Promerim[®]30 did not induce any variation in HAC viability and proliferation (Figure S1A). In contrast, Promerim[®]40 induced an increase in the viability and proliferation at high concentrations (100 and 250 µg/mL) after 24 h of treatment, at low concentrations (0.1 to 1 µg/mL) after 48 h and at high and low concentrations at 72 h of treatment (Figure S1B). Promerim[®]60 showed an overall trend for increased viability and proliferation (Figure S1C). However, a significant increase was observed at 48 h for concentrations of 0.5 and 250 µg/mL and at 72 h for 0.5 µg/mL. In normoxic conditions and in the presence of 2% FCS, there was no significant increase in the viability and proliferation. On the other hand, an overall trend of increase was observed for Promerim[®]40 and 60 after 24 and 48 h of treatment (Figure S2A–C).

To investigate the effects of Promerim[®] on HAC senescence, the cells were cultured in monolayer and treated with Promerim[®]30, 40 or 60 at 0.1, 0.5, 50 or 100 µg/mL for 72 h, in the presence of 2% FCS, either in hypoxia or in normoxia. Then, SA-β-galactosidase activity was assessed to evaluate senescence. In hypoxic conditions, Promerim[®]40 and 60 significantly decreased the activity of SA-β-galactosidase when were used at 0.1 µg/mL (Figure 5A), but this effect was not statistically significant when Promerim[®]40 and 60

were used at higher concentrations (50 and 100 µg/mL) (Figure 5B). Promerim[®]30 used at 0.1 µg/mL with HACs cultured in hypoxia tended to decrease the activity of SA-β-galactosidase, whereas the other concentrations did not affect senescence. In normoxia, Promerim[®]40 used at 0.1 µg/mL significantly decreased SA-β-galactosidase activity (Figure S3A). On the contrary, Promerim[®]30 and 60 did not affect HAC senescence regardless of their concentrations (Figure S3A,B).

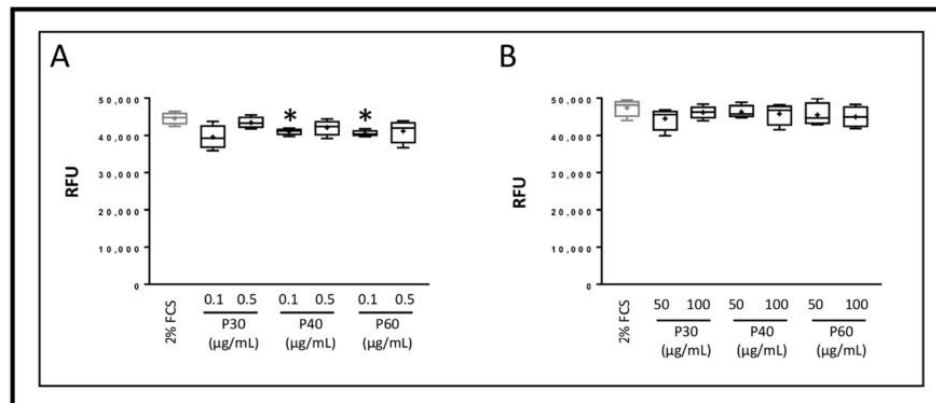


Figure 5. Effect of Promerim[®]30, 40 and 60 on the senescence of human articular chondrocytes. Human articular chondrocytes at P2 and 80% confluency were treated in the presence of 2% FCS, with Promerim[®]30, 40 or 60 (P30, P40 or P60) at 0.1 and 0.5 µg/mL (A), 50 and 100 µg/mL (B) for 72 h in hypoxia. Controls with 2% FCS were performed (Ctrl) and the levels of β-galactosidase were measured 3 days post-treatment. Results are summarized in box plots (*n* = 4) showing the mean (cross) and the median (line) of relative fluorescence units (RFU) corresponding to the levels of SA-β-galactosidase activity. Statistical analyses were performed using the Mann–Whitney test (* *p* < 0.05) and the control condition was used as the reference.

In conclusion, our results show that Promerim[®]30, 40 and 60 are not cytotoxic for HACs. Promerim[®]30 and 40 promoted HAC viability and proliferation at high and low concentrations and all Promerim[®] hydrolysates decreased senescence only at a concentration of 0.1 µg/mL.

2.2. Effect of Promerim[®] on the Expression of mRNAs Typical and Atypical of Articular Chondrocytes

We then evaluated the effects of Promerim[®]30, 40 and 60 on the phenotype of HACs cultured as organoids for 7 days in hypoxia to mimic the *in vivo* microenvironment of cartilage [15,30,31]. In addition, the HACs were also treated with IL-1β to mimic the pro-inflammatory environment observed during OA. The effects of Promerim[®] were assessed at high concentrations (50 and 100 µg/mL) and low concentrations (0.1 and 0.5 µg/mL) with or without IL-1β.

When Promerim[®]30 and 60 were used at 50 and 100 µg/mL as well as at 0.1 and 0.5 µg/mL, the steady state transcript levels of chondrocyte phenotypic markers were not statistically different from the control condition (Figures 6 and 7, Figures S4 and S5), except a decrease in the *PRG4* mRNA level with Promerim[®]30 at 50 µg/mL. Among the atypical phenotypic markers, only the *COL1A2* mRNA level increased upon treatment with Promerim[®]40 at 50 µg/mL (Figure 6). Therefore, the *COL2A1:COL1A2* ratio decreased (Figure 6). On the contrary, Promerim[®]30 and 40 at 100 µg/mL tended to increase the *COL2A1:COL1A2* mRNA ratio (Figure 7).

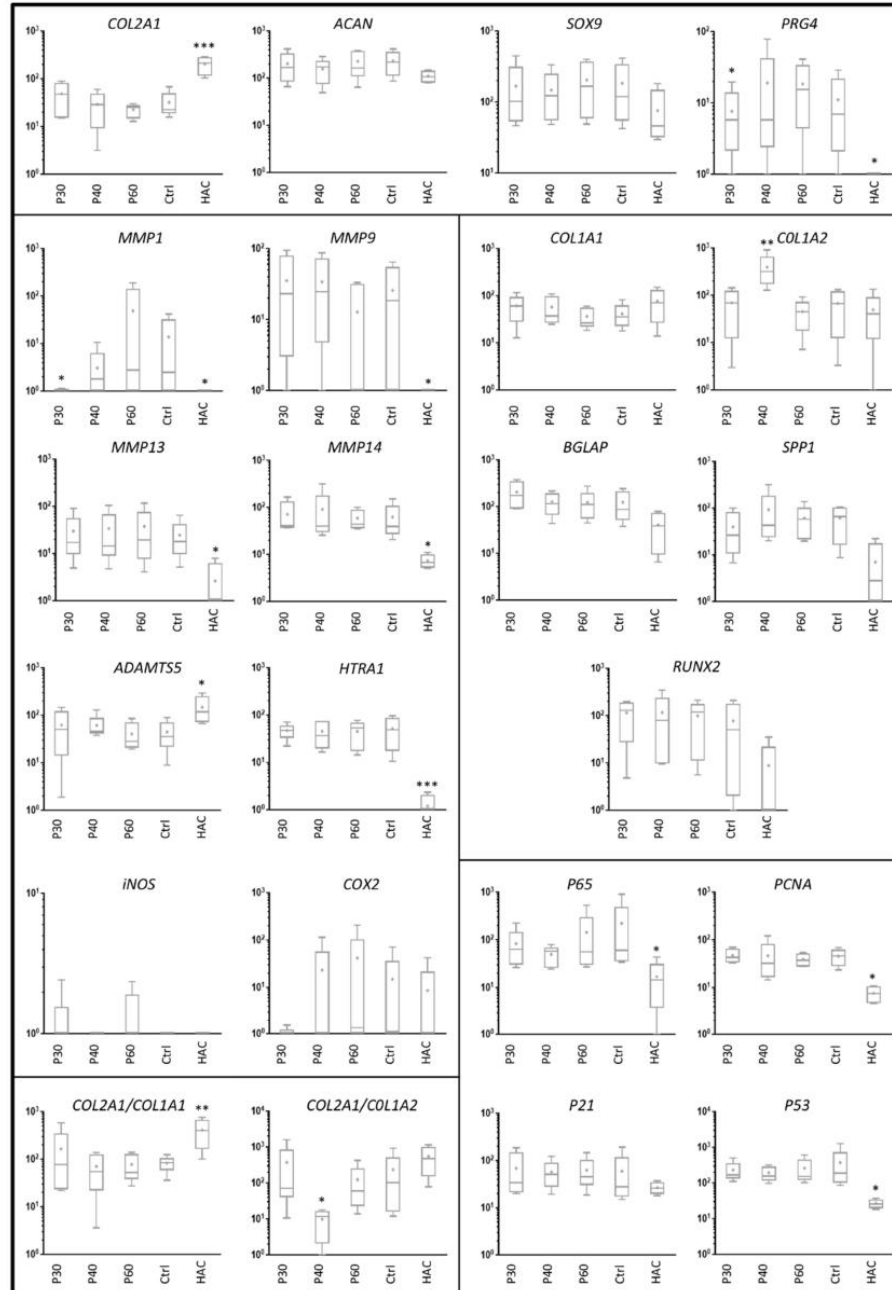


Figure 6. Effect of high concentrations of Promerim[®]30, 40 and 60 on gene expression profile in human articular chondrocytes. Human articular chondrocytes were grown in type I/III collagen sponges at (P2) for 7 days in hypoxia in the absence (Ctrl: control) or presence of 50 µg/mL Promerim[®]30, 40 or 60 (P30, P40, P60). Results are summarized in box plots ($n = 5$) showing the mean (cross) and the median (line) of relative mRNA expression estimated using RT-qPCR and normalized to the β -ACTIN and PPIA reference genes. The COL2A1:COL1A1 and COL2A1:COL1A2 ratios are given. HAC: mRNA obtained from human articular chondrocytes at P0 were used as controls. Statistical analyses were performed using the two-way ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparison post-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) compared with the control condition.

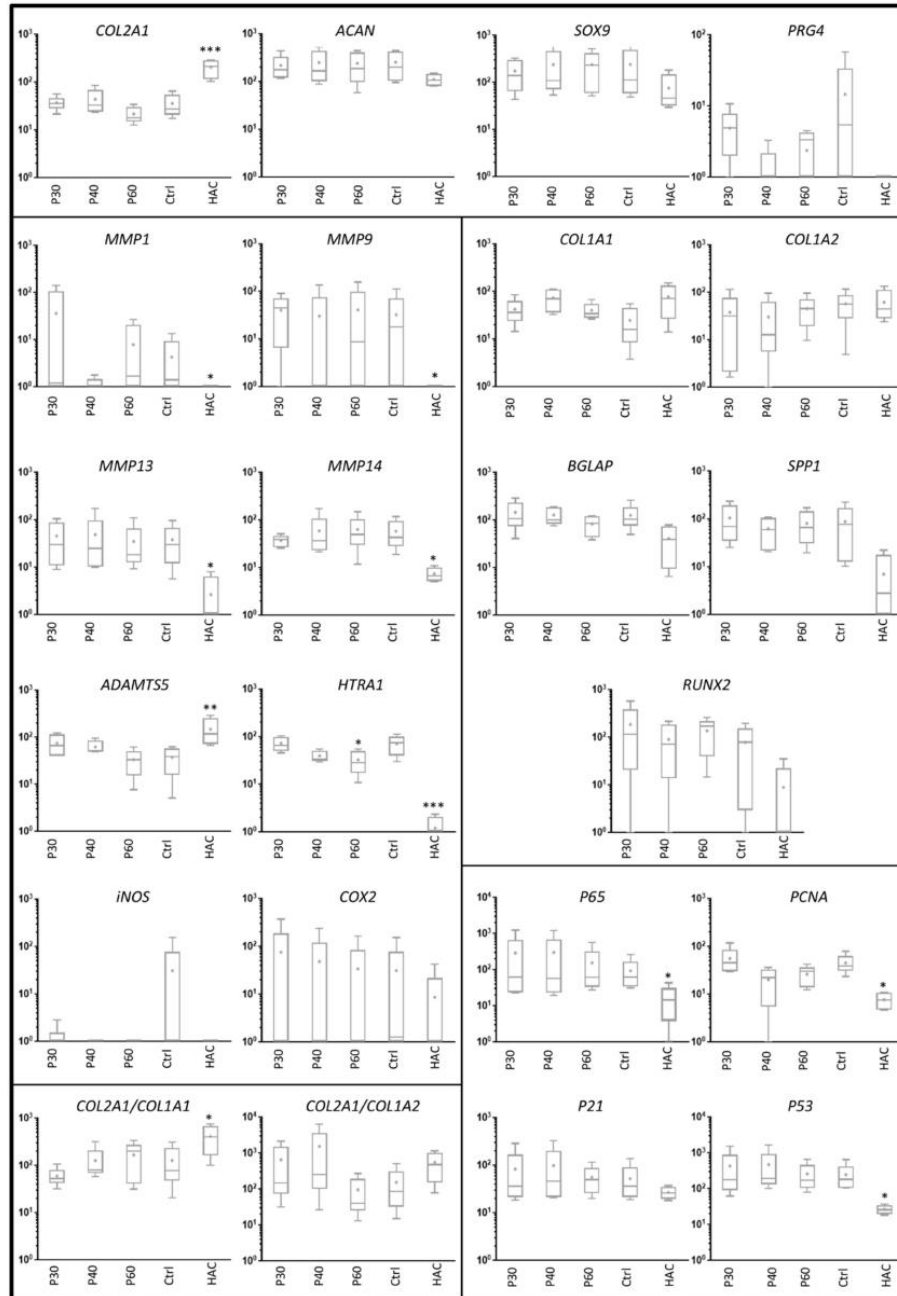


Figure 7. Effect of high concentrations of Promerim[®]30, 40 and 60 on gene expression profile in human articular chondrocytes. Human articular chondrocytes were grown in type I/III collagen sponges at (P2) for 7 days in hypoxia in the absence (Ctrl: control) or presence of 100 µg/mL Promerim[®]30, 40 or 60 (P30, P40, P60). Results are summarized in box plots ($n = 5$) showing the mean (cross) and the median (line) of relative mRNA expression estimated using RT-qPCR and normalized to the β -ACTIN and PPIA reference genes. The COL2A1:COL1A1 and COL2A1:COL1A2 ratios are given. HAC: mRNA obtained from human articular chondrocytes at P0 were used as controls. Statistical analyses were performed using the two-way ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparison post-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) compared with the control condition.

Because proteases play a major role in OA outcomes, we then investigated their mRNA steady state amounts. Promerim[®]30 (50 µg/mL) decreased *MMP1* mRNA levels and Promerim[®]40 (100 µg/mL) also tended to decrease *MMP1* mRNA amounts (Figures 6 and 7). Promerim[®]60 (100 µg/mL) decreased *HTRA1* mRNA levels (Figure 7). The mRNA levels of the other proteases studied were not modulated in the other Promerim[®] treatments. The mRNA levels of inflammation-associated molecules (*INOS*, *COX2* and *p65*), proliferative/senescence (*PCNA*, *P53* and *P21*) and hypertrophic markers (*MMP13*, *MMP14*, *BGLAP*, *SPP1* and *RUNX2*) were not statistically modulated either (Figures 6 and 7, Figures S4 and S5).

When IL-1 β was used to mimic a pro-inflammatory environment, the mRNA levels of typical and atypical HAC markers remained unchanged (Figures 8 and 9), except for *PRG4* and *COL1A1* mRNA levels, which increased when Promerim[®]60 was used at 100 µg/mL and at 50 and 100 µg/mL, respectively (Figures 8 and 9). Promerim[®]30, 40 and 60 at 100 µg/mL tended to increase the levels of the *COL2A1:COL1A1* mRNA ratio compared with the IL-1 β treated samples. It was particularly statistically significant for Promerim[®]30 (Figure 9). Promerim[®] hydrolysates, regardless of their concentrations, did not have significant effects on *HTRA1*, *MMP1*, *ADAMTS5*, *INOS*, *COX2* and *p65* mRNA levels (Figures 8 and 9, Figures S6 and S7). Similar results were observed with low or high concentrations of Promerim[®] on the mRNA levels of hypertrophic markers (*MMP13*, *MMP14*, *BGLAP*, *SPP1* and *RUNX2*) as well as proliferation/senescence-associated molecules (*PCNA*, *P53* and *P21*) (Figures 8 and 9, Figures S6 and S7), except with Promerim[®]60 used at 50 and 100 µg/mL which induced a significant increase in *PCNA* mRNA levels (Figures 8 and 9).

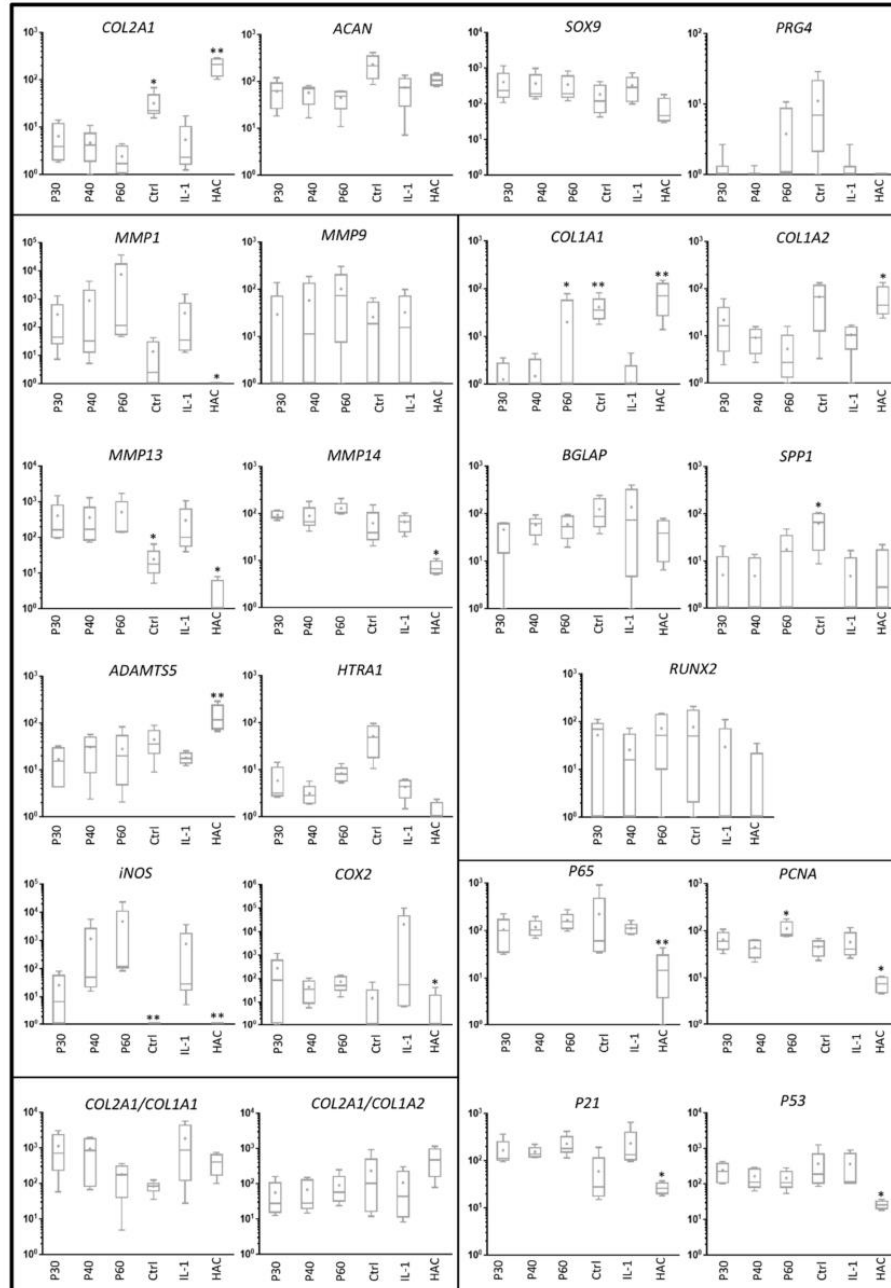


Figure 8. Effect of high concentrations of Promerim[®]30, 40 and 60 on gene expression profile in human articular chondrocytes. Human articular chondrocytes were grown in type I/III collagen sponges at (P2) for 7 days in hypoxia treated with or without IL-1 β (10 ng/mL) in the presence of 50 μ g/mL Promerim[®]30, 40 or 60 at (P30, P40, P60). Results are summarized in box plots ($n = 5$) showing the mean (cross) and the median (line) of relative mRNA expression estimated using RT-qPCR and normalized to the β -ACTIN and PPIA reference genes. The COL2A1:COL1A1 and COL2A1:COL1A2 ratios are given. HAC: mRNA obtained from human articular chondrocytes at P0 were used as controls, Ctrl: chondrocytes were grown in type I/III collagen sponges in the absence of IL-1 and Promerim[®]. Statistical analyses were performed using the two-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison post-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) compared with the IL-1 condition.

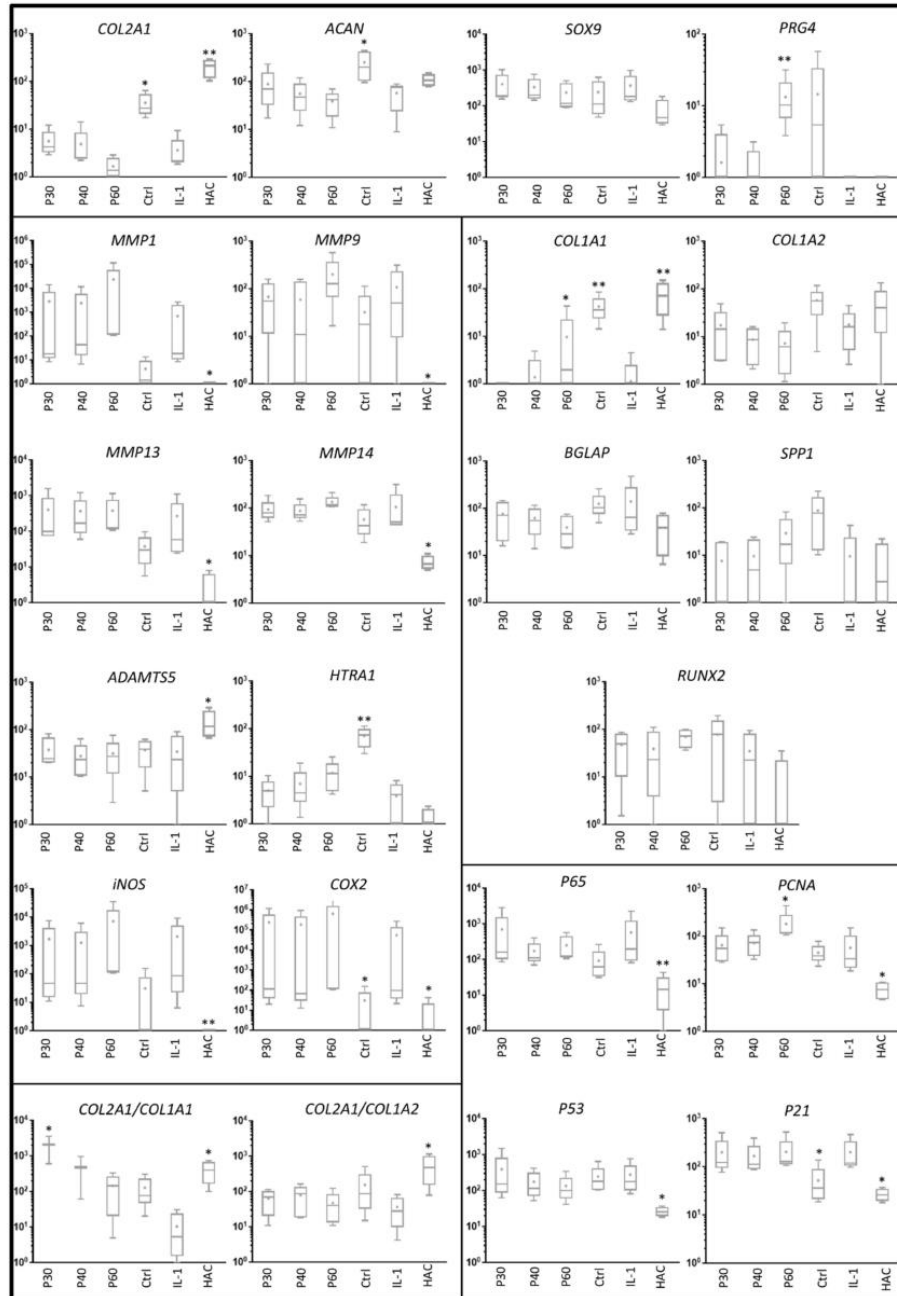


Figure 9. Effect of high concentrations of Promerim[®]30, 40 and 60 on gene expression profile in human articular chondrocytes. Human articular chondrocytes were grown in type I/III collagen sponges at (P2) for 7 days in hypoxia treated with or without IL-1 β (10 ng/mL) or the presence of 100 μ g/mL Promerim[®]30, 40 or 60 at (P30, P40, P60). Results are summarized in box plots ($n = 5$) showing the mean (cross) and the median (line) of relative mRNA expression estimated using RT-qPCR and normalized to the β -ACTIN and PPIA reference genes. The COL2A1:COL1A1 and COL2A1:COL1A2 ratios are given. HAC: mRNA obtained from human articular chondrocytes at P0 were used as controls, Ctrl: chondrocytes were grown in type I/III collagen sponges in the absence of IL-1 and Promerim[®]. Statistical analyses were performed using the two-way ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparison post-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) compared with the IL-1 condition.

Altogether, our results show that Promerim[®]30, 40 and 60 used at low concentrations (0.1 and 0.5 µg/mL) do not modulate the mRNA levels of chondrocyte phenotype markers, proteases or inflammation and proliferation molecules. Interestingly, higher concentrations of Promerim[®]30 and 60 can induce a significant decrease in protease (i.e., *MMP1* and *HTRA1*) mRNA levels, respectively. Additionally, under pro-inflammatory conditions, Promerim[®]30, 40 and 60 tended to increase the *COL2A1:COL1A1* mRNA ratio and Promerim[®]60 increased *PCNA* mRNA amounts.

2.3. Effect of Promerim[®] Hydrolysates on the Expression of Type II and I Collagen Proteins and Htra1

We then evaluated the impact of Promerim[®] treatments on the newly synthesized ECM in our cartilaginous organoids, by assaying the protein levels of types IIB, II, I and X collagens as well as the serine protease Htra1.

First, Promerim[®]30 did not induce a significant modulation in type II collagen synthesis at any concentration, except at 0.1 µg/mL which led to an increase in total type II and IIB collagen (Figure 10A and Figures S8A, S17A and S18A). Additionally, Promerim[®]30 (50 µg/mL) alone increased the protein level of type IIB collagen (Figure 10A and Figure S17A). Promerim[®]40 alone at 0.1 and 0.5 µg/mL slightly increased the type II and IIB collagens expression, and at 0.1 µg/mL in the presence of IL-1, it enhanced both type II collagen isoforms (Figures S8B and S18B). On the contrary, Promerim[®]40 and 60 at 50 and 100 µg/mL did not modulate the protein accumulation of the type II and IIB collagens, as well as Promerim[®] 60 at low concentrations (Figure 10B,C, Figures S8B,C, S17B,C and S18B,C). Moreover, the treatment with IL-1β led to a slight decrease in type IIB collagen protein amounts, which was not counteracted by Promerims[®] (Figure 10A–C and Figure S17A–C). When Promerim[®] hydrolysates were used at high concentrations, Promerim[®]30 (50 and 100 µg/mL) and Promerim[®] 40 (50 µg/mL) were the only Promerims[®] able to increase the type I collagen protein amounts (Figure 10A–C and Figure S17A–C), whereas no modulations were observed with Promerim[®]60 (Figure 10C and Figure S17C). At lower concentrations, Promerim[®]30 (0.1 µg/mL) and 40 (0.1 and 0.5 µg/mL), alone or in presence of IL-1β, increased the type I collagen protein amounts (Figures S8A,B and S18A,B). Promerim[®]60 used at low concentrations slightly increased the type I collagen protein amount (Figures S8C and S18C).

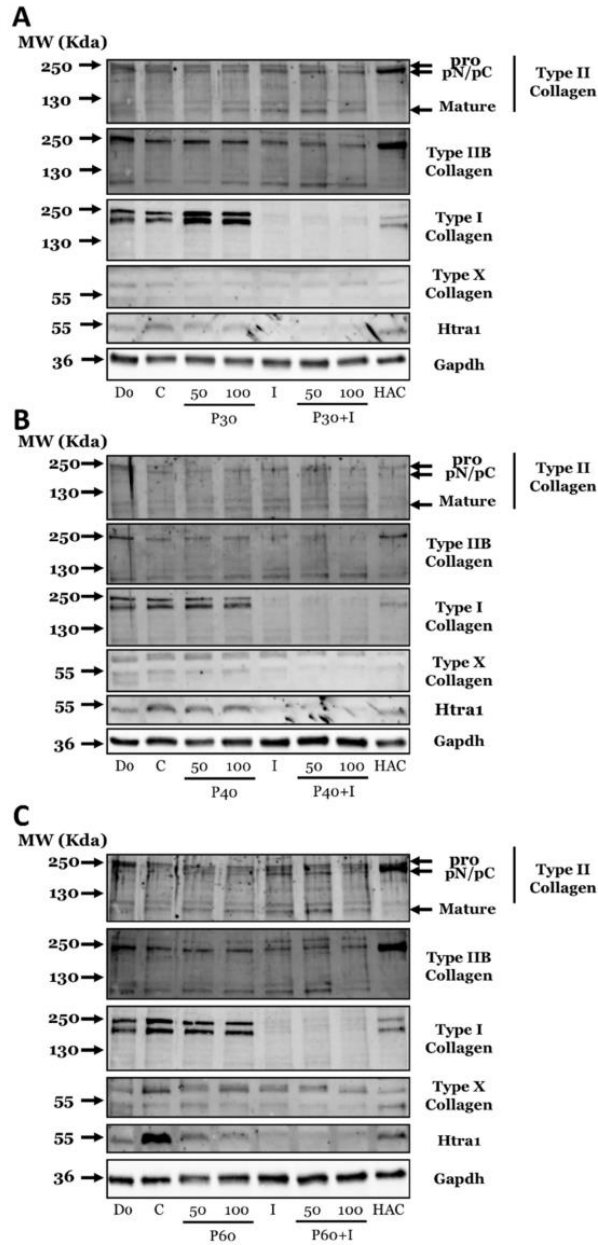


Figure 10. Effect of high concentrations of Promerim[®] hydrolysates on collagens and HtrA1 protein expression of human articular chondrocytes. Human articular chondrocytes at P2 were inoculated in collagen sponges and treated for 7 days in the absence or presence of IL-1 β (10 ng/mL) with Promerim[®]30 (A), 40 (B) or 60 (C) at 50 and 100 μ g/mL. The 3D control culture medium was used as control (Ctrl), I (IL-1), P30 (Promerim[®]30), P40 (Promerim[®]40), P60 (Promerim[®]60). Cells seeded in sponges stopped at day 0 (D0) and protein extracts obtained from human articular cartilage (HAC) are also shown. The molecular weights expressed in kDa are shown on the left-hand side of the panels and the target proteins on the right-hand side of the panels. Images show representative immunoblots from different HAC strains (at least $n = 3$). Full membranes are shown in Figure S11 as well as under-exposed and over-exposed blots in Figures S12 and S13, respectively.

In parallel, we investigated the protein levels of the serine protease Htra1, and we observed a decrease when organoids were cultured in the presence of Promerim[®]30 (50 and 100 µg/mL) (Figure 10A and Figure S17A). This observed decrease was weaker with Promerim[®]40 (Figure 10B and Figure S17B) and much more pronounced with Promerim[®]60 (Figure 10C and Figure S17C). In addition, we found no modulation of Htra1 at lower concentrations Promerim[®]30, 40 and 60 (Figures S8A–C, S14A–C, S15A–C, S16A–C and S18A–C). In the presence of IL-1 β , which downregulated Htra1 expression, the three Promerim[®] hydrolysates did not further modulate this effect (Figure 10, Figures S8, S17 and S18).

Finally, we followed type X collagen expression. The 59 kDa form of type X collagen expected in denatured-reduced conditions, expressed in OA cartilage [32] migrated around 55 kDa. The type X collagen protein amounts remained very low whatever the Promerim[®] hydrolysate and concentration used, meaning that collagen hydrolysates did not modulate this hypertrophic biomarker in these experimental conditions (Figure 10 and Figure S17).

Altogether, our results show that Promerim[®]30, 40 and 60 at high concentrations (50 and 100 µg/mL) downregulate Htra1 protein expression. Interestingly, Promerim[®]30 (0.1 µg/mL) and 40 (0.1 and 0.5 µg/mL) increased both type II and IIB collagens expression whereas Promerim[®]30 at 50 µg/mL enhanced collagen IIB isoform. Similarly, Promerim[®]40 under pro-inflammatory condition also enhances type II and IIB collagen syntheses at 0.1 µg/mL. Promerim[®]30 at high concentration and Promerim[®]60 at low concentration induced increase of type I collagen expression. In the presence or absence of IL-1 both Promerim[®]30 and 40 at low concentration enhanced type I collagen biosynthesis.

2.4. Promerim[®]30 and 40 Promote Proliferation, Whereas Promerim[®]60 Promotes Migration

It is of particular interest to favor the proliferation of HACs and promote the migration of HAC and/or progenitor cells to the cartilage lesion in an attempt to delay the outcome of OA. The effects of Promerim[®]30, 40 and 60 on the proliferation/migration of HACs were evaluated using a wound healing test in a 2% FCS environment, as well as in an inflammatory or non-inflammatory environment. In physiological experimental conditions, poor in FCS (2%), Promerim[®]30 (50 and 100 µg/mL) did not increase the speed of wound confluence compared with the control medium (Figure 11A). From 48 to 120 h post-scratch, Promerim[®]40 tended to slightly increase cell confluence in the wound area at concentrations of 50 and 100 µg/mL compared with the control condition, but the wound area was not homogeneously filled in (Figure 11B and Figure S9). Interestingly, when HACs were treated with Promerim[®]60 at 100 µg/mL, wound confluence quickly (from 10 h to 48 h post-scratch) tended to be higher than the control and the 10% FCS medium condition (Figure 11C). Afterwards (from 48 to 120 h post-scratch), the wound confluence reached a plateau and dropped lower than that of the 10% FCS condition, but remained higher than the control condition (2% FCS). At 120 h post-scratch, although the wound area was not confluent, spindle-shaped HACs had homogeneously colonized the initial wound (Figure S9). To study the effects of Promerim[®] in an inflammatory environment, we added IL-1 β to the culture medium. Promerim[®]30 at 50 µg/mL increased the cell confluence in the wound area, as a function of time, compared with the IL-1 β treatment condition (Figure 11D and Figure S10). On the other hand, Promerim[®]40 did not seem to have any effect on wound healing in a pro-inflammatory environment compared with HACs treated with IL-1 β only (Figure 11E and Figure S10). Promerim[®]60 did not increase wound confluence, but at 72 h post-scratch, although the wound area was not confluent, it was homogeneously filled with spindle-shaped HACs, suggesting migration of HACs rather than proliferation (Figure 11F and Figure S10).

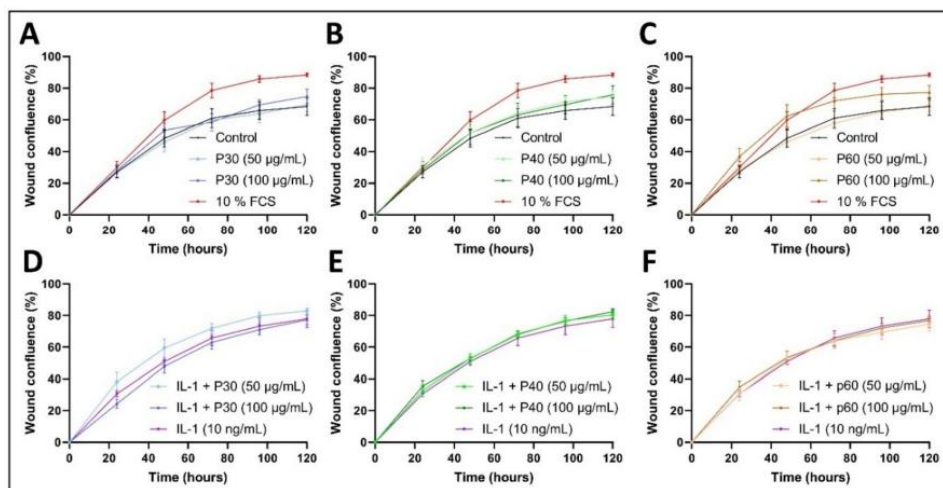


Figure 11. Wound filling analysis following a scratch wound assay. Human articular chondrocytes (HACs) were seeded at P2. At 90% confluency, a scratch wound assay was performed using a WoundMaker™ kit (Essen BioScience) and then the treatments were added. HACs were incubated in the presence of a culture medium containing 2% FCS (Control), and P30, P40, or P60 at 50 and 100 µg/mL without (A–C) or with IL-1 (D–F). The wound confluences were calculated using ImageJ software. P30, P40 and P60: Promerim®30, Promerim®40 and Promerim®60 ($n = 4$).

Altogether these data suggest that Promerim®40 (basal condition) and Promerim®30 (under inflammatory conditions) promote proliferation, whereas Promerim®60 promotes migration with or without inflammatory conditions, even though migratory kinetics are faster under inflammatory conditions.

3. Discussion

Numerous of food supplements are available without prescription in pharmacies and health food stores to treat OA [23,33]. Among the most frequently used active elements, collagen hydrolysates [34], *Boswellia serrata*, *Curcuma longa* [35] and curcumin extract [36,37], have demonstrated clinically significant short-term reduction in pain [38]. Other nutraceuticals, such as glucosamine and chondroitin, avocado and unsaponifiable soy [39] or undenatured type II collagen [40], have been shown to significantly relieve discomfort associated with OA [41–43], but their mechanisms and long-term effects on cartilage regeneration and inflammation are still uncertain [38]. The efficacy of collagen hydrolysates has been studied in human clinical trials. In one trial with women suffering from moderate knee OA, daily oral intake of collagen peptides for 6 months increased the mobility of the affected joint and reduced pain [29]. Other clinical trials also showed improvement in joint functionality and discomfort with a daily intake of collagen hydrolysate-based nutritional supplements for periods ranging from 3 months to one year [24,44,45]. Thus, collagen hydrolysates seem to be able to reduce OA symptoms or delay its outcomes through mechanisms that mainly involve the decrease of cartilage degradation or inflammation [46].

In the present study, we evaluated the effects of three collagen hydrolysates derived from fish skin (Promerim®30 and Promerim®60) and fish cartilage (Promerim®40) on the viability, proliferation, senescence and the phenotype of HACs grown as cartilaginous organoids.

We firstly demonstrated that Promerim® hydrolysates have no cytotoxic effects on HACs. We then investigated HAC viability and proliferation since the downregulation of both these two mechanisms, mitochondrial dysfunction, and damage are classic hallmarks of aging [47]. In OA, mitochondrial dysfunction may alter AC metabolism, function and

viability, and hence contribute to cartilage degeneration [7,48–50]. These dysfunctions have an impact on chondrocyte anabolism and growth responses. In addition, they exacerbate oxidative stress and apoptosis of chondrocytes, as well as the inflammatory responses induced by IL-1 β and TNF α on ECM catabolism [7,47–49]. Here, we demonstrated that Promerim[®] hydrolysates can increase the viability and proliferation, which make them useful to improve chondrocyte metabolism.

During OA pathogenesis, the senescence of chondrocytes is a key element that plays a significant role in the pathological process and precedes the stages prior to subchondral bone exposure. Numerous factors such as obesity, age, mechanical failure, oxidative stress as well as, at the cellular level, dedifferentiation or apoptotic processes can induce senescence [51–55]. Studies have reported that disease severity of patients with knee OA correlates with senescence-associated β -galactosidase activity [56], and the suppression of senescent chondrocytes delays the progression of induced OA in a mouse model [57]. Thus, by inducing a decrease in HAC senescence, Promerim[®] may help delay the progression of OA.

OA is a progressive disease characterized by sequential steps, which start after an initiating event that induces an increase in intra-articular inflammation followed by the induction of several enzymes, such as aggrecanases, matrix metalloproteinases and serine proteases such as Htra1. Htra1 is upregulated in the synovial fluid and AC in patients with OA and rheumatoid arthritis and plays a critical role in disease development [58]. For example, it contributes, directly or indirectly via the upregulation of metalloproteinases, to the degradation of ECM components, and inhibits anabolic signaling by antagonizing the receptors of the chondrogenic TGF- β family [59]. Here, we demonstrated that when a pro-OA environment is mimicked with IL-1 β treatment, Htra1 is systematically downregulated in HACs grown as 3D organoids. Interestingly, Promerim[®] (Promerim[®]30 and 60) induced a decrease in *HTRA1* and *MMP1* transcript levels, which is of particular interest to limit cartilage degradation that occurs in OA and to favor anabolism, notably by potentially restoring TGF- β signaling.

In our study, the mRNA levels of *COL2A1*, *ACAN* and *COL1A1* were decreased in the presence of IL-1, whereas those of some inflammation mediators, *iNOS* and *COX2*, and of some proteases (*MMP1* and *MMP13*) were enhanced. By contrast, the level of *ADAMTS5*, known to degrade aggrecan during OA, remained unchanged. Our results suggest that the human articular chondrocytes we used remained sensitive to IL-1, at least in part, even though IL-1 receptor desensitization could have occurred when chondrocytes were exposed for a long period to pro-inflammatory signals (human articular chondrocytes used in our study were isolated from OA old patients). It is highly probable that IL-1 effects on HtrA1 expression may vary according to the evolution of the OA process. One can hypothesize that during the early steps of OA, IL-1 enhances HtrA1 expression whereas at the latest stages of this pathology, the cytokine is responsible of the downregulation of this protease, through the involvement of IL-1 receptors desensitization or implication of receptors displaying high or low affinity towards the ligand, responsible for such an ambivalent role of IL-1. Therefore, our results highlight the complexity of the pro-inflammatory microenvironment associated to the numerous cytokines involved in OA pathogenesis. Further studies are needed to fully elucidate the mechanisms by which HtrA1 is upregulated during OA, whereas IL-1 downregulates its expression.

Several cell-based therapies using chondrocytes or mesenchymal stem cells (MSCs) have been developed to reconstitute cartilage of hyaline quality [15,60]. These techniques initially based on the autologous chondrocyte implantation (ACI) procedure developed by Brittberg et al. [60] have been improved by several modifications (hypoxic conditions, culture in 3D biomaterials, use of chondrogenic factors, using different cell sources including MSCs, etc.). However, the quality of the in vitro synthesized cartilage organoid is not strictly identical to healthy hyaline cartilage in vivo. We have previously shown that treatment with *Pecten maximus* extracts on monolayer cultures of chondrocytes or cartilaginous organoids promotes chondrocyte redifferentiation and phenotype mainte-

nance [61]. In this context, Promerim[®] is a good treatment for promoting hyaline-like ECM production and improving differentiation, as recently demonstrated for equine articular chondrocytes (eACs) [62]. In the present study, we demonstrated that the Promerim[®] 30 and 40 hydrolysates have the potential to increase collagen protein accumulation (both type II and IIB isoforms as well as type I collagen), even if the conditions to favor these effects differ according to the type of Promerim[®]. Promerim[®]30 and 40 at low concentration increased the collagen protein amounts when organoids were cultured in the presence of IL-1 β . This increase in collagen accumulation can be attributed to the decrease in the expression and activity of several proteases, notably Htra1 with its direct and indirect roles on ECM degradation/synthesis, and for transcriptional upregulation, at least for increases in type I and II collagen protein amounts.

Thus, Promerim[®]30 may be useful during the ACI procedure to increase ECM synthesis during the differentiation/redifferentiation steps, while inhibiting their senescence, and may be useful *in vivo* for favoring cartilage anabolism at the onset of OA. Promerim[®]40 and 60 may also be useful to delay OA and/or inhibit cartilage degradation when the inflammatory microenvironment occurs, if these results are, of course, confirmed *in vivo*. The efficacy of Promerim[®]40 and 60 may also be enhanced by their ability to inhibit chondrocyte senescence.

We previously investigated *in vitro* cell migration and repair using molecules of marine origin with positive effects [62,63]. Therefore, we studied whether Promerim[®] hydrolysates can promote healing of chondral lesions mimicked *in vitro*. Scratch wound assays were performed on HACs in a healthy microenvironment or in pro-inflammatory conditions by incubating the HACs in the presence of IL-1 β . Promerim[®]40 and 60 led to an increase in cell confluence in the wound area in the absence of IL-1 β . This increase was consistent with the enhancement of the viability and proliferation observed in XTT tests. In an inflammatory microenvironment, Promerim[®]30 increased cell confluence in the wound area. Promerim[®]40 in the basal conditions and Promerim[®]30 under inflammatory context seemed to promote proliferation rather than migration, because the wound area was initiated at the edges of the wound, the wound area never became a homogenous layer, and wound confluence did not reach a plateau at the end of the experiments. In contrast, although an increase in PCNA mRNA was observed, Promerim[®]60 seemed to promote migration rather than proliferation, because the wound area was homogeneously filled in with spindle-shaped cells, and wound confluence proceeded quickly and reached a plateau before confluence was complete. Therefore, Promerim[®] hydrolysates may enhance proliferation and migration of chondrocytes in *in vivo* chondral lesions.

Many nutraceuticals have an antioxidant effect or promote the synthesis of prostaglandin E2 (PGE2) and LT4 pro-inflammatory factors [64–67]. We have demonstrated that shell extracts of marine origin increase MMP-1 activity in HACs as well as the catabolism of human dermal fibroblasts [61,68]. However, such effects may be different for Promerim[®] hydrolysates due to their qualitative nature, because shell extracts contain high concentrations of marine minerals. Protein fragments released during enzymatic digestion, as in Promerim[®], can generate bioactive peptides assimilated to matrikines [69]. Indeed, matrikines are currently of major interest in rheumatology and particularly in OA for chondral defect repair [70].

We showed in this study that Promerim[®] hydrolysates have no cytotoxic effect on HACs, but promote HAC viability and proliferation, and even decrease HAC senescence. Interestingly, Promerim[®] hydrolysates in cartilaginous organoids increased collagen production and also favored ECM production, which subsequently improved the quality of cartilaginous organoids. Furthermore, Promerim[®]30 and Promerim[®]60 downregulated several proteases and may have beneficial effects by delaying ECM degradation and inflammation. Overall, Promerim[®] hydrolysates hold promise as nutraceuticals with promising effects to prevent or delay OA pathogenesis.

The equine sector also suffers from large financial losses due to OA and tendinopathies in racehorses. Indeed, the OA degenerative pathology is the source of lameness in horses

and causes the early termination of their racing career. Human and horse cartilage share many similarities and the nature of their chondral lesions are also similar. We have carried out similar studies in an equine AC model [62] and have shown that Promerim[®]30, 40 and 60 are able to induce an increase of eAC viability and proliferation. In the present study on HACs, Promerim[®]30 did not increase HAC viability and proliferation. Additionally, whereas only Promerim[®]30 decreased eAC senescence, Promerim[®]40 and 60 were also able to decrease the senescence of HACs. In our study on eACs, Promerim[®] hydrolysates decreased the mRNA levels of a larger panel of proteases, notably Mmp3 and Adamts5. Furthermore, when we treated eAC organoids with Promerim[®], the increase in collagen protein amounts was sharper. In particular, the pro-inflammatory microenvironment systematically enhanced the effect of Promerim[®]. Thus, Promerim[®] seems to be less effective on HACs than on eACs in the treatment of OA. We do not attribute the discrepancy of Promerim[®] affects to species differences but rather to the nature of the cells, and more especially the age of the cell sources used for the experiments. In our previous study on eACs we isolated eACs from young healthy horses (between 4 and 10 years old), whereas the HACs used in the present study come from older patients that had undergone hip replacement surgery. Thus, eACs were isolated from hyaline cartilage, whereas HACs were isolated from OA cartilage, thus exposed for a long period to very high levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α . These cytokines likely hyperactivate dedifferentiation and catabolic behaviors, preventing any further positive chondrogenic effect. Therefore, although Promerim[®] may be useful at later stages of OA in some instances, these hydrolysates are likely more beneficial at the onset of OA, before the first symptoms occur, as a preventive treatment, or eventually as a companion treatment to current surgical techniques.

4. Materials and Methods

4.1. Collagen Hydrolysates

Promerim[®] marine peptides are produced by enzymatic hydrolysis characterized by the control of hydrolysis time, acidity (pH), and temperature. No chemical process of hydrolysis was used. Promerim[®] correspond to hydrolysates of fish skin and cartilage proteins composed of collagen peptides. These are oligopeptides, that is, small peptides characterized by low molecular weights below 1500 Dalton. They are composed of 2, to a maximum of 15 amino acids. The minimum amount of hydroxyproline is 5 g/100 g and the two major amino acids are proline (9 g/100 g) and glycine (21 g/100 g). Promerims[®] are produced by the Dielen Laboratory (Tourlaville, France).

4.2. Human Articular Chondrocyte Culture

HACs were isolated from osteoarthritic femoral head cartilage obtained from total femoral arthroplasty (40 different patients). The study was performed in full accordance with the local ethics committee guidelines and all the cartilage samples were collected after written and informed consent of the donors according to French legislation. All the experimental protocols were approved by the French Ministry of Higher Education and Research (Ethics Committee for Research on Human Samples CODECOH: DC 2014–2325, 20 October 2015).

The cartilage was separated from the subchondral bone and cut into small pieces using a sterile razor blade. Cartilage pieces were washed twice with preheated phosphate buffer saline (PBS) at 0.1 M, and digested for 45 min at 37 °C with 20 mg of protease from *Streptomyces griseus* type XIV (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) per gram of cartilage tissue. The cartilage was rinsed twice with PBS, and then incubated overnight at 37 °C with 20 mg of type I collagenase from *Clostridium histolyticum* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) per gram of cartilage tissue. The protease solutions were prepared at 2 mg/mL in high-glucose (4.5 g/L) Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Eurobio Scientific, Courtaboeuf, France) supplemented with 100 IU/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 0.25 μ g/mL amphotericin B (Eurobio Scientific, Courtaboeuf, France).

The next day, the cell suspension was filtered through a 70 μm cell strainer, centrifuged at $300\times g$ for 10 min and plated in culture flasks at a density of 20,000 cells/ cm^2 . Cells were cultured in chondrocyte growth medium containing DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Eurobio Scientific, Courtaboeuf, France), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 100 IU/mL penicillin and 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amphotericin B in humidified atmosphere at 37 °C, 5% CO_2 . The medium was changed twice a week until reaching 95% confluency. For the first cell passage (P1), chondrocytes were collected by trypsinization with 0.05% trypsin/1 mM EDTA (Eurobio Scientific, Courtaboeuf, France), counted, centrifuged at $300\times g$ for 10 min and plated in culture flasks at a density of 20,000 cells/ cm^2 .

4.3. 3D Model for Chondrocyte Redifferentiation

Sponges 2 mm thick and 5 mm in diameter composed of native type I collagen (90–95%) and type III collagen (5–10%) from calf skin (Symatèse Biomatériaux, Chaponost, France) were used for redifferentiation studies. Briefly, at 95% confluency, HACs from P1 were harvested by trypsinization with 0.05% trypsin/1 mM EDTA (Eurobio Scientific, Courtaboeuf, France), counted, centrifuged at $300\times g$ for 10 min and seeded onto the sponges as previously described [31,32]. The next day, cells were incubated in DMEM supplemented with antibiotics, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid-2-phosphate and 2% FCS in the presence or absence of IL-1 β (10 ng/mL) and/or Promerims[®]. 3D cultures were maintained in hypoxia (3% O_2) at 37 °C and 5% CO_2 in a sealed chamber for 7 days, and the media were changed on day 3. At the end of the experiment, sponges were washed twice in preheated PBS and frozen at -80 °C until future analysis.

4.4. Chondrocyte Toxicity Assay

HACs were seeded at passage 2 (P2) in 96-well plates at a density of 20,000 cells/ cm^2 . When 80% confluency was reached, the cells were treated in the absence or presence of FCS (2%), with 0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100 or 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Promerim[®] hydrolysates for 72 h in hypoxia or normoxia. After 72 h, 80 μL of the supernatant was collected to measure the levels of adenylate kinase (AK) released from damaged cells with a cytotoxicity detection kit (ToxiLight[™] bioassay kit, Interchim, Montluçon, France). The maximum chondrocyte death rate was induced in sister wells exposed to Triton X-100 for 10 min. Bioluminescence was measured using a Spark[®] multimode microplate reader (Tecan[®]) in white flat-bottom 96-well plates.

4.5. HAC Viability and Proliferation Measurement

HACs were seeded at P2 in 96-well plates at a density of 20,000 cells/ cm^2 . When 80% confluency was reached, the cells were treated in the absence or presence of FCS (2%), with 0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100 or 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Promerim[®] hydrolysates for 24, 48 and 72 h in hypoxia or normoxia. At the end of the experiment, viability and proliferation were determined using the cell proliferation kit II XTT (Roche). Briefly, 50 μL of XTT labelling reagents was added per well and incubation took place for 1.25 h at 37 °C in a cell culture incubator. Absorbance was measured directly in the culture plate using a Spark[®] multimode microplate reader (Tecan[®]) at 450 nm with a reference wavelength at 600 nm.

4.6. Senescence-Associated β -Galactosidase Quantification

HACs were seeded at P2 in 96-well plates at a density of 20,000 cells/ cm^2 . When 80% confluency was reached, the cells were treated in the presence of FCS (2%), with 0.1, 0.5, 50 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Promerim[®] hydrolysates for 72 h in hypoxia or normoxia. At the end of the experiment, the β -galactosidase activity was measured using the 96-well cellular senescence assay (SA β -Gal Activity) kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) as described by the manufacturer. Briefly, after one wash with cold PBS, cells were lysed in lysis buffer at 4 °C for 5 min and centrifuged at $13,000\times g$ for 10 min. Supernatants were transferred to 96-well plates and incubated at 37 °C for 16 h with the assay reagents. The reaction mixture was transferred into a white flat-bottom 96-well plate and with the addition of the stop

solution. The fluorescence was measured using a Spark[®] multimode microplate reader (Tecan[®]) at 465 nm with a wavelength excitation at 360 nm.

4.7. RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR

Total RNA was extracted in 250 µl of RNA-Solv[®] Reagent (Omega Biotek, Norcross, GA, USA) per sponge according to the manufacturer instructions. After removal of the potential genomic DNA using DNase I (Fisher, Illkrich, France) for 10 min followed by inactivation with EDTA for 10 min at 65 °C, total RNA (1 µg) from each sample was reverse-transcribed into cDNA using the iScript[™] Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Quantitative real-time PCR was performed on a CFX96 touch Real Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA). The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to calculate, with CFX Manager[™] software 3.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), the relative gene expression with the β -ACTIN and PPIA genes as endogenous reference genes. The sequences of the primers (Eurogentec, Liège, Belgium) used are listed in Supplementary Table S1.

4.8. Protein Extractions

Sponges containing chondrocytes were frozen and ground and the subsequent extraction of the total proteins was performed using RIPA-lysis buffer supplemented with a cocktail of protease inhibitors (phenylmethylsulfonyl fluoride, pepstatin A, aprotinin and leupeptin) and the phosphatase inhibitor sodium orthovanadate for 45 min at 4 °C as previously described [62]. Protein concentration was determined according to the Bradford procedure (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

4.9. Western-Blot

Protein extracts (12 µg per sample) were resolved on 10% polyacrylamide gels (TGX Stain Free Fast Cast Acrylamide Kit 10%, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Trans-Blot Turbo RTA Midi PVDF Transfer Kit, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Membranes were incubated with 10% non-fat milk powder in Tris-buffered saline with 0.1% Tween (TBST) for 1 h to block unspecific binding sites. Then, membranes were incubated overnight at 4 °C under agitation with antibodies listed in Supplementary Table S2. The next day, membranes were washed with TBST and incubated for 1 h with the corresponding secondary HRP-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG antibody (Jackson ImmunoResearch). Proteins were visualized with an enhanced Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Protein expression was measured by quantifying the density of immunoblots bands calculated relative to GAPDH using ImageJ[®] (NIH Image, Bethesda, MD, USA), and expressed as arbitrary units (AU).

4.10. Scratch Wound Assay

HACs were seeded (P2) at a density of 20,000 cells/cm² in 96-well ImageLock plates (Essen BioScience, Michigan, USA) and were cultured for five days to form a confluent monolayer. A WoundMaker[™] (Essen BioScience, MI, USA) was used to create uniform and reproducible wounds in all wells (four wells per condition) according to the manufacturer's instructions. After two washes with preheated PBS, Promerim[®] hydrolysates were added with or without IL-1 β (10 ng/mL) in the presence of FCS (2%), and the wound areas were monitored until 120 h, using the IncuCyte ZOOM living cell imaging system (Essen BioScience, MI, USA). The wound healing area was measured using ImageJ[®] software by subtracting the area occupied by the cells from the initial wound surface.

4.11. Statistical Analysis

All experiments were repeated at least three times with HACs from different patients. Values are presented as mean \pm SD or as boxplots. Statistical analyses were performed using the Mann–Whitney U-test to determine significant differences between two groups,

or using a two-way ANOVA followed by a Bonferonni test for multiple comparisons. Statistical analyses were done using Prism (Graphpad, San Diego, CA, USA). A p -value of ≤ 0.05 was considered to be significant.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22073693/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, P.G.; methodology, B.B., R.C., P.C., F.C., J.E.L., S.L., N.G. and P.G.; formal analysis, B.B., R.C., F.C., P.C., N.G. and P.G.; software, B.B., R.C. and F.C.; validation, B.B., R.C., F.C., N.G. and P.G.; investigation, B.B., R.C., F.C., P.C., S.O., A.N., N.G. and P.G.; resources, B.B., R.C., F.C., J.E.L., S.L., S.O., A.N. and P.G.; data curation, B.B., R.C., F.C., P.C. and P.G.; writing—original draft preparation, B.B., R.C., F.C. and P.G.; writing—review and editing, P.G.; visualization, B.B., R.C., P.C., F.C., N.G. and P.G.; supervision, P.G.; project administration, B.B., R.C., F.C. and P.G.; funding acquisition, P.G. and A.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the French ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) and DIELEN laboratory (to P.G. and A.N.; N° 014CJ052), by the Regional Council of Normandy through a RIN Innovation program and the European Community (ERDF (European Regional Development Funds)) to P.G. (OSTEOCART N° 014CJ042) and by the French Government. B.B. is a recipient of a PhD scholarship from the French ANRT and DIELEN, a CIFRE fellowship. R.C. and P.C. were recruited as a research engineer and a master 2 research student respectively, positions funded by the Regional Council of Normandy and the European Community (ERDF). All the funding sources had absolutely no involvement in the study design, collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to submit the manuscript for publication.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the French ministry of higher education and research (ethics committee for research with human samples CODECOH: DC 2014–2325, 20 October 2015).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in Supplementary Materials.

Conflicts of Interest: Bourdon was employed in the framework of a CIFRE thesis co-financed by L'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) and by the Dielen laboratory which provided the marine hydrolysates investigated in this study. S. Oddoux and A. Noel are employees of the Dielen laboratory. None of the academic authors received any remuneration from the company.

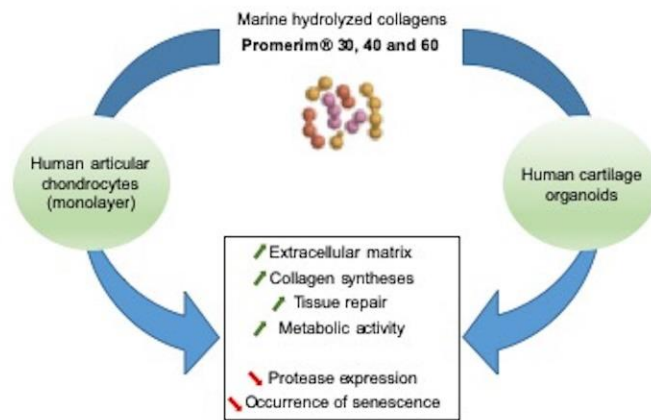
References

1. Aigner, T.; Cook, N.; Gerwin, S.S.; Glasson, S.; Laverty, C.B.; Little, W.; McIlwraith, C.W.; Kraus, V.B. Histopathology atlas of animal model systems—Overview of guiding principles. *Osteoarthr. Cartil.* **2010**, *18*, 2–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Fox, A.J.S.; Bedi, A.; Rodeo, S.A. The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. *Sports Health* **2009**, *1*, 461–468.
3. Pearle, A.D.; Warren, R.F.; Rodeo, S.A. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clin. Sports Med.* **2005**, *24*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. 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.* **2005**, *55*, 1569–1593. [[CrossRef](#)]
5. Shoulders, M.D.; Raines, R.T. Collagen structure and stability. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 929–958. [[CrossRef](#)]
6. Bruckner, P.; van der Rest, M. Structure and function of cartilage collagens. *Microsc. Res. Tech.* **1994**, *28*, 378–384. [[CrossRef](#)]
7. Blanco, F.J.; Rego, I.; Ruiz-Romero, C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2011**, *7*, 159–161. [[CrossRef](#)]
8. Mobasheri, A.; Kalamegam, G.; Musumeci, G.; Batt, M.E. Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. *Maturitas* **2014**, *78*, 188–198. [[CrossRef](#)]
9. Sharma, L.; Kapoor, D.; Issa, S. Epidemiology of osteoarthritis: An update. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2006**, *18*, 147–156. [[CrossRef](#)]
10. Qin, B.; Yang, M.; Fu, H.; Ma, N.; Wei, T.; Tang, Q.; Hu, Z.; Liang, Y.; Yang, Z.; Zhong, R. Body mass index and the risk of rheumatoid arthritis: A systematic review and dose-response meta-analysis. *Arthritis Res. Ther.* **2015**, *17*, 86. [[CrossRef](#)]

11. Sparks, J.A.; Barbaiya, M.; Tedeschi, S.K.; Leatherwood, C.L.; Tabung, F.K.; Speyer, C.B.; Malspeis, S.; Costenbader, K.H.; Karlson, E.W.; Lu, B. Inflammatory dietary pattern and risk of developing rheumatoid arthritis in women. *Clin. Rheumatol.* **2019**, *38*, 243–250. [[CrossRef](#)]
12. Cisternas, M.G.; Murphy, L.; Sacks, J.J.; Solomon, D.H.; Pasta, D.J.; Helmick, C.G. Alternative methods for defining osteoarthritis and the impact on estimating prevalence in a US population-based survey. *Arthritis Care Res.* **2016**, *68*, 574–580. [[CrossRef](#)]
13. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* **2019**, *393*, e44. [[CrossRef](#)]
14. Pujol, J.P.; Galera, P.; Redini, F.; Mauviel, A.; Loyau, G. Role of cytokines in osteoarthritis: Comparative effects of interleukin 1 and transforming growth factor-beta on cultured rabbit articular chondrocytes. *J. Rheumatol. Suppl.* **1991**, *27*, 76–79.
15. 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](#)]
16. Pujol, J.P.; Chadichristos, C.; Legendre, F.; Bauge, C.; Beauchef, G.; Andriamanalijaona, R.; Galera, P.; Boumediene, K. Interleukin-1 and transforming growth factor-beta 1 as crucial factors in osteoarthritic cartilage metabolism. *Connect. Tissue Res.* **2008**, *49*, 293–297. [[CrossRef](#)]
17. Schett, G.; Elewaut, D.; McInnes, I.B.; Dayer, J.M.; Neurath, M.F. How cytokine networks fuel inflammation: Toward a cytokine based disease taxonomy. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 822–824. [[CrossRef](#)]
18. Pham, T. Les injections intra-articulaires de hanche dans la coxarthrose: Corticoïdes, hyaluronan. *Rev. Rhum.* **2009**, *76*, 356–360. [[CrossRef](#)]
19. Ayhan, E.; Kesmezacar, H.; Akgun, I. Intraarticular injections (corticosteroid, hyaluronic acid, platelet rich plasma) for the knee osteoarthritis. *World J. Orthop.* **2014**, *5*, 351–361. [[CrossRef](#)]
20. Grunke, M.; Schulze-Koops, H. Successful treatment of inflammatory knee osteoarthritis with tumour necrosis factor blockade. *Ann. Rheum. Dis.* **2006**, *65*, 555–556. [[CrossRef](#)]
21. Nelson, A.E.; Allen, K.D.; Golightly, Y.M.; Goode, A.P.; Jordan, J.M. A systematic review of recommendations and guidelines for the management of osteoarthritis: The Chronic Osteoarthritis Management Initiative of the U.S. Bone and Joint Initiative. *Semin. Arthritis Rheum.* **2014**, *43*, 701–712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. McAlindon, T.E.; Bannuru, R.R.; Sullivan, M.C.; Arden, N.K.; Berenbaum, F.; Bierma-Zeinstra, S.M.; Hawker, G.A.; Henrotin, Y.; Hunter, D.J.; Kawaguchi, H.; et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarth. Cartil.* **2014**, *22*, 363–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Castrogiovanni, P.; Trovato, F.M.; Loreto, C.; Nsir, H.; Szychlińska, M.A.; Musumeci, G. Nutraceutical supplements in the management and prevention of osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 2042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Bruyère, O.; Zegels, B.; Leonori, L.; Rabenda, V.; Janssen, A.; Bourges, C.; Reginster, G.Y. Effect of collagen hydrolysate in articular pain: A 6-month randomized, double-blind, placebo controlled study. *Complement. Ther. Med.* **2012**, *20*, 124–130. [[CrossRef](#)]
25. Fujita, T.; Ohue, M.; Fujii, Y.; Miyauchi, A.; Takagi, Y. The effect of active absorbable algal calcium (AAA Ca) with collagen and other matrix components on back and joint pain and skin impedance. *J. Bone Miner. Metab.* **2002**, *20*, 298–302. [[CrossRef](#)]
26. Henrotin, Y.; Lambert, C.; Couchourel, D.; Ripoll, C.; Chiotelli, E. Nutraceuticals: Do they represent a new era in the management of osteoarthritis?—A narrative review for the lessons taken with five products. *Osteoarth. Cartil.* **2011**, *19*, 1–21. [[CrossRef](#)]
27. Bello, A.E.; Oesser, S. Collagen hydrolysate for the treatment of osteoarthritis and other joint disorders: A review of the literature. *Curr. Med. Res. Opin.* **2006**, *22*, 2221–2232. [[CrossRef](#)]
28. Götz, B. Well nourished cartilage does not grind. *Ärztliche Prax.* **1982**, *34*, 3130–3134.
29. Jiang, J.X.; Yu, S.; Huang, Q.R.; Zhang, X.L.; Zhang, C.Q.; Zhou, J.L.; Prawitt, J. Collagen peptides improve knee osteoarthritis in elderly women: A 6-month randomized, double blind, placebo-controlled study. *Agro Food Ind. Hi Tech* **2014**, *25*, 19–23.
30. Galéra, P.; Ollitrault, D.; Legendre, F.; Demoor, M.; Mallein-Gerin, F.; Boumediene, K.; Herbage, B.; Duterque-Coquillaud, M.; Damour, O. Brevet Français FR 2965278 du 23 September 2010. Method for Obtaining Differentiated Articular Chondrocytes in vitro or ex vivo and Uses of Same. WO 2012/038668, 29 March 2012.
31. 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](#)]
32. Legendre, F.; Ollitrault, D.; Gomez-Leduc, T.; Bouyoucef, M.; Hervieu, M.; Gruchy, N.; Mallein-Gerin, F.; Leclercq, S.; Demoor, M.; Galera, 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**, *7*, 3406. [[CrossRef](#)]
33. Murray, C.; Marshall, M.; Rathod, T.; Bowen, C.J.; Menz, H.B.; Roddy, E. Population prevalence and distribution of ankle pain and symptomatic radiographic ankle osteoarthritis in community dwelling older adults: A systematic review and cross-sectional study. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0193662. [[CrossRef](#)]
34. De Luca, P.; Colombini, A.; Carimati, G.; Beggio, M.; De Girolamo, L.; Volpi, P. Intra-articular injection of hydrolyzed collagen to treat symptoms of knee osteoarthritis. A functional in vitro investigation and a pilot retrospective clinical study. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 975. [[CrossRef](#)]

35. Kizhakkedath, R. Clinical evaluation of a formulation containing *Curcuma longa* and *Boswellia serrata* extracts in the management of knee osteoarthritis. *Mol. Med. Rep.* **2013**, *8*, 1542–1548. [[CrossRef](#)]
36. Sharma, C.; Kaur, J.; Shishodia, S.; Aggarwal, B.B.; Ralhan, R. Curcumin down regulates smokeless tobacco-induced NF-kappaB activation and COX-2 expression in human oral premalignant and cancer cells. *Toxicology* **2006**, *228*, 1–15. [[CrossRef](#)]
37. Kuptniratsaikul, V.; Dajpratham, P.; Taechaarpornkul, W.; Buntragulpoontawee, M.; Lukkanapichonchut, P.; Chootip, C.; Saengsuwan, J.; Tantayakom, K.; Laongpech, S. Efficacy and safety of *Curcuma domestica* extracts compared with ibuprofen in patients with knee osteoarthritis: A multicenter study. *Clin. Interv. Aging* **2014**, *9*, 451–458. [[CrossRef](#)]
38. Liu, X.; Machado, G.C.; Eyles, J.P.; Ravi, V.; Hunter, D.J. Dietary supplements for treating osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Br. J. Sports Med.* **2018**, *52*, 167–175. [[CrossRef](#)]
39. DiNubile, N.A. A potential role for avocado- and soybean-based nutritional supplements in the management of osteoarthritis: A review. *Phys. Sports Med.* **2010**, *38*, 71–81. [[CrossRef](#)]
40. Lugo, J.P.; Saiyed, Z.M.; Lane, N.E. Efficacy and tolerability of an undenatured type II collagen supplement in modulating knee osteoarthritis symptoms: A multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutr. J.* **2016**, *15*, 14. [[CrossRef](#)]
41. Singh, J.A.; Noorbaloochi, S.; MacDonald, R.; Maxwell, L.J. Chondroitin for osteoarthritis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2015**, *1*.
42. Dahmer, S.; Schiller, R.M. Glucosamine. *Am. Fam. Physician* **2008**, *78*, 471–476.
43. DiNubile, N.A. Glucosamine and Chondroitin Sulfate: What has been learned since the glucosamine/chondroitin arthritis intervention trial. *Orthopedics* **2018**, *41*, 200–207. [[CrossRef](#)]
44. De Almagro, C. The use of collagen hydrolysates and native collagen in osteoarthritis. *Am. J. Biomed. Sci. Res.* **2020**, *7*. [[CrossRef](#)]
45. McAlindon, T.E.; Nuite, M.; Krishnan, N.; Ruthazer, R.; Price, L.L.; Burstein, D.; Griffith, J.; Flechsenhar, K. Change in knee osteoarthritis cartilage detected by delayed gadolinium enhanced magnetic resonance imaging following treatment with collagen hydrolysate: A pilot randomized controlled trial. *Osteoarth. Cartil.* **2011**, *19*, 399–405. [[CrossRef](#)]
46. Kumar, S.; Sugihara, F.; Suzuki, K.; Inoue, N.; Venkateswarathirukumar, S. A double-blind, placebo-controlled, randomised, clinical study on the effectiveness of collagen peptide on osteoarthritis. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *95*, 702–707. [[CrossRef](#)]
47. Lotz, M.F. Effects of aging on articular cartilage homeostasis. *Bone* **2012**, *51*, 241–248. [[CrossRef](#)]
48. Maneiro, E.; Martín, M.A.; de Andres, M.C.; López-Armada, M.J.; Fernández-Sueiro, J.L.; del Hoyo, P.; Galdo, F.; Arenas, J.; Blanco, F.J. Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **2003**, *48*, 700–708. [[CrossRef](#)]
49. Blanco, F.J.; López-Armada, M.J.; Maneiro, E. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis. *Mitochondrion* **2004**, *4*, 715–728. [[CrossRef](#)]
50. Vaamonde-García, C.; Riveiro-Naveira, R.R.; Valcárcel-Ares, M.N.; Hermida-Carballo, L.; Blanco, F.J.; López-Armada, M.J. Mitochondrial dysfunction increases inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **2012**, *64*, 2927–2936. [[CrossRef](#)]
51. Loeser, R.F. Aging and osteoarthritis: The role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthr. Cartil.* **2009**, *17*, 971–979. [[CrossRef](#)]
52. Loeser, R.F.; Collins, J.A.; Diekman, B.O. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2016**, *12*, 412–420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Tomiyama, T.; Fukuda, K.; Yamazaki, K.; Hashimoto, K.; Ueda, H.; Mori, S.; Hamanishi, C. Cyclic compression loaded on cartilage explants enhances the production of reactive oxygen species. *J. Rheumatol.* **2007**, *34*, 556–562. [[PubMed](#)]
54. Cha, B.H.; Lee, J.S.; Kim, S.W.; Cha, H.J.; Lee, S.H. The modulation of the oxidative stress response in chondrocytes by Wip1 and its effect on senescence and dedifferentiation during in vitro expansion. *Biomaterials* **2013**, *34*, 2380–2388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Henrotin, Y.E.; Bruckner, P.; Pujol, J.P. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarth. Cartil.* **2003**, *11*, 747–755. [[CrossRef](#)]
56. Gao, S.G.; Zeng, C.; Li, L.J.; Luo, W.; Zhang, F.J.; Tian, J.; Cheng, C.; Tu, M.; Xiong, Y.L.; Jiang, W.; et al. Correlation between senescence-associated beta-galactosidase expression in articular cartilage and disease severity of patients with knee osteoarthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* **2016**, *19*, 226–232. [[CrossRef](#)]
57. Jeon, O.H.; Kim, C.; Laberge, R.M.; Demaria, M.; Rathod, S.; Vasserot, A.P.; Chung, J.W.; Kim, D.H.; Poon, Y.; David, N.; et al. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 775–781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Hu, S.I.; Carozza, M.; Klein, M.; Nantermet, P.; Luk, D.; Crowl, R.M. Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 34406–34412. [[CrossRef](#)]
59. Oka, C.; Tsujimoto, R.; Kajikawa, M.; Koshihara-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](#)]
60. 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](#)]
61. Bouyoucef, M.; Rakic, R.; Gómez-Leduc, T.; Latire, T.; Marin, F.; Leclercq, S.; Carreiras, F.; Serpentine, A.; Lebel, J.M.; Galéra, P.; et al. Regulation of Extracellular Matrix Synthesis by Shell Extracts from the Marine Bivalve *Pecten maximus* in Human Articular Chondrocytes—Application for Cartilage Engineering. *Mar. Biotechnol.* **2018**, *20*, 436–450. [[CrossRef](#)]

62. Bourdon, B.; Contentin, R.; Cassé, F.; Maspimby, C.; Oddoux, S.; Noël, A.; Legendre, F.; Gruchy, N.; Galera, P. Marine Collagen Hydrolysates Downregulate the Synthesis of Pro-Catabolic and Pro-Inflammatory Markers of Osteoarthritis and Favor Collagen Production and Metabolic Activity in Equine Articular Chondrocyte Organoids. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 580.
63. Latire, T.; Legendre, F.; Bigot, N.; Carduner, L.; Kellouche, S.; Bouyoucef, M.; Carreiras, F.; Marin, F.; Lebel, J.M.; Galéra, P.; et al. Shell extracts from the marine bivalve *Pecten maximus* regulate the synthesis of extracellular matrix in primary cultured human skin fibroblasts. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e99931. [[CrossRef](#)]
64. Siddiqui, M.Z. *Boswellia Serrata*, A potential anti-inflammatory agent: An overview. *Indian J. Pharm. Sci.* **2011**, *73*, 255–261.
65. Fraga, C.G.; Oteiza, P.I. Dietary flavonoids: Role of epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51*, 813–823. [[CrossRef](#)]
66. González, R.; Ballester, I.; López-Posadas, R.; Suárez, M.D.; Zarzuelo, A.; Martínez-Augustin, O.; Sánchez de Medina, F. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51*, 331–362. [[CrossRef](#)]
67. Boe, C.; Vangsnæs, C.T. Fish Oil and Osteoarthritis: Current Evidence. *Am. J. Orthop.* **2015**, *44*, 302–305.
68. Latire, T.; Legendre, F.; Bouyoucef, M.; Marin, F.; Carreiras, F.; Rigot-Jolivet, M.; Lebel, J.M.; Galéra, P.; Serpentine, A. Shell extracts of the edible mussel and oyster induce an enhancement of the catabolic pathway of human skin fibroblasts, in vitro. *Cytotechnology* **2017**, *69*, 815–829. [[CrossRef](#)]
69. Sivaraman, K.; Shanthi, C. Matrikines for therapeutic and biomedical applications. *Life Sci.* **2018**, *214*, 22–33. [[CrossRef](#)]
70. Maquart, F.X.; Pasco, S.; Ramont, L.; Hornebeck, W.; Monboisse, J.C. An introduction to matrikines: Extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity. Implication in tumor invasion. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2004**, *49*, 199–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Marine Collagen Hydrolysates Promote Collagen Synthesis, Viability and Proliferation While Downregulating the Synthesis of Pro-Catabolic Markers in Human Articular Chondrocytes

Bastien Bourdon ^{1,2}, Frédéric Cassé ¹, Nicolas Gruchy ^{1,3}, Pierre Cambier ¹, Sylvain Leclercq ⁴, Sarah Oddoux ², Antoine Noël ², Jérôme Lafont ⁵, Romain Contentin ^{1,†} and Philippe Galéra ^{1,*†}

¹ BIOTARGEN, Normandie University, UNICAEN 14000 Caen, France; bastien.bourdon@unicaen.fr (B.B.); frederic.casse@unicaen.fr (F.C.); nicolas.gruchy@unicaen.fr (N.G.); 21507655@etu.unicaen.fr (P.C.); contentinr@email.chop.edu (R.C.); philippe.galera@unicaen.fr (P.G.)

² Dielen laboratory, 50110 Tourlaville, France; sarah-oddoux@dielen.fr (S.O.); antoine-noel@dielen.fr (A.N.)

³ Department of Genetics, Normandy Center for Genomic and Personalized Medicine, Caen University Hospital, 14000 Caen, France

⁴ Service de Chirurgie Orthopédique, Clinique Saint-Martin, 14000 Caen, France; sylvainleclercq60@gmail.com

⁵ CNRS UMR 5305, Laboratory of Tissue Biology and Therapeutic Engineering, University Claude Bernard Lyon 1, Univ Lyon, 69367 Lyon, France; jerome.lafont@ibcp.fr

* Correspondence: philippe.galera@unicaen.fr

† These authors contributed equally to this work.

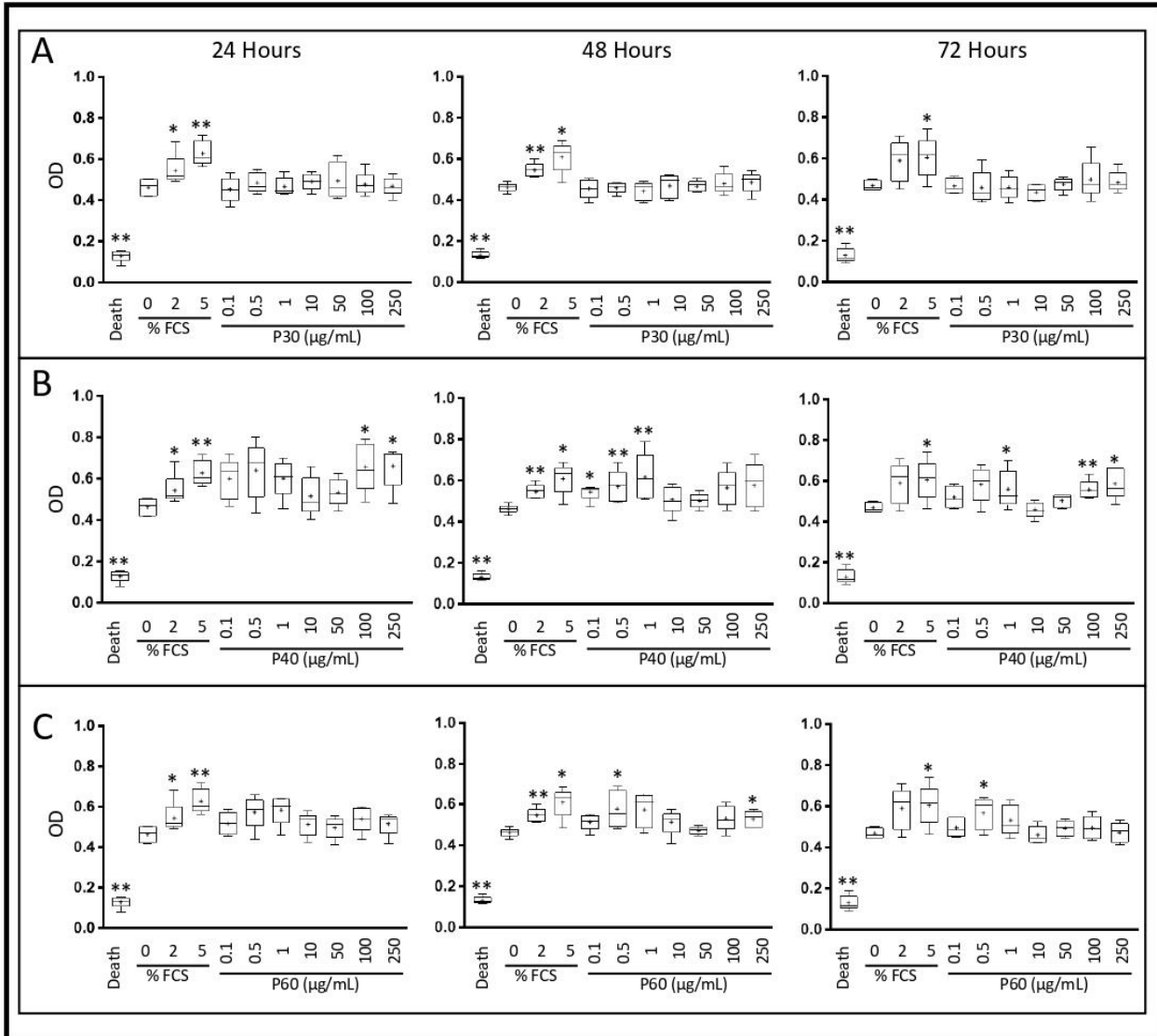


Figure S1: Effect of Promerim® hydrolysates on the viability and proliferation of human articular chondrocytes.

Human articular chondrocytes at P2 and 80% confluency were treated in the absence of FCS, with 0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100 or 250 µg/mL Promerim®30 (A), 40 (B) or 60 (C) for 24, 48 and 72 hours in normoxia. Controls with 0%, 2% and 5% FCS, and a positive control of 100% cell death (Triton-induced death) were performed. Formazan levels, which are correlated with viability and proliferation, were measured in the media after 24, 48 and 72 hours of treatment. Results are summarized in box-plots (n= 5) showing the mean (cross) and the median (line) of optical density (OD). Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test (* p<0.05; ** p<0.01) compared with the 0% FCS condition.

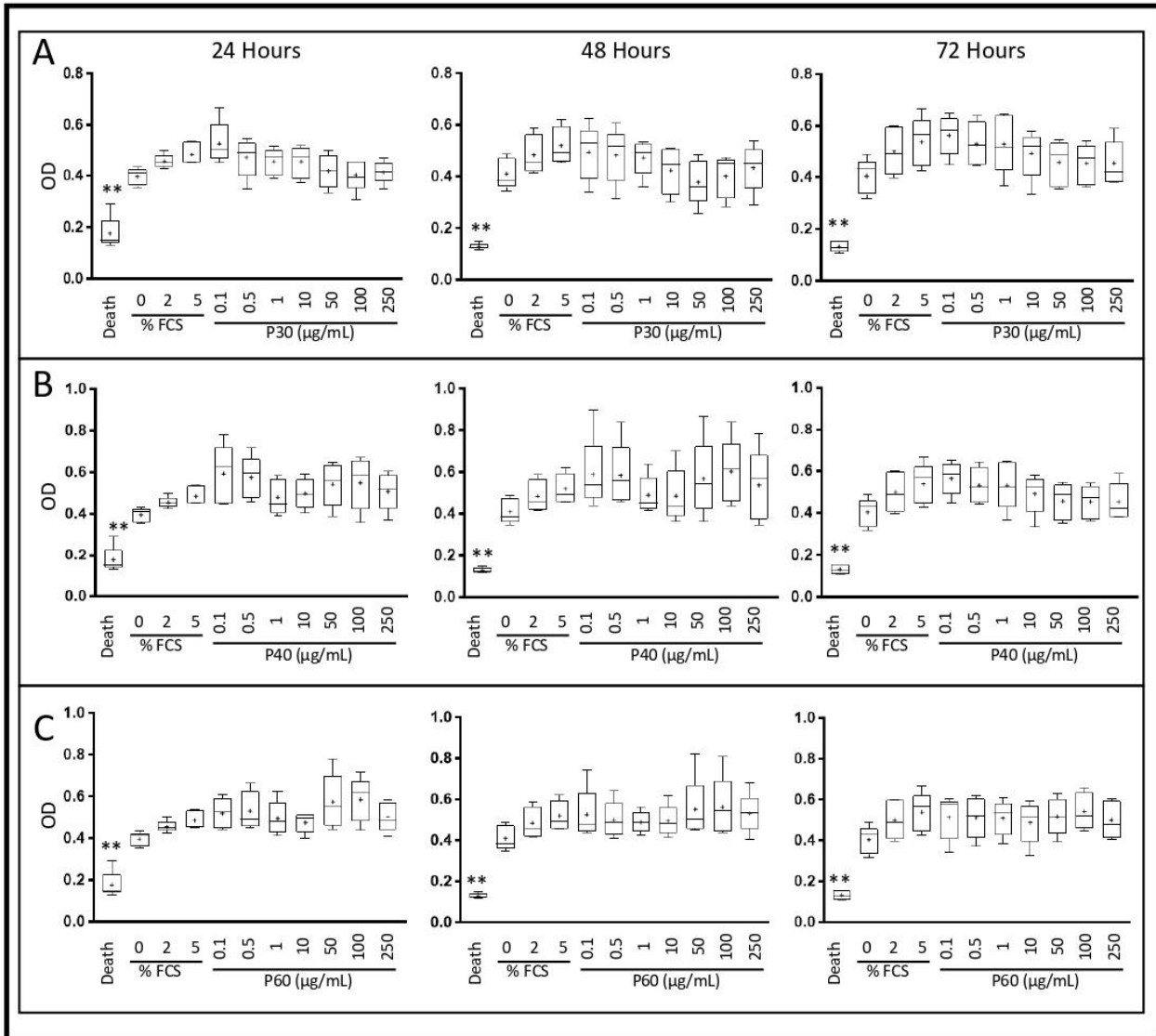


Figure S2: Effect of Promerim® hydrolysates on the viability and proliferation of human articular chondrocytes.

Human articular chondrocytes at P2 and 80% confluency were treated in the presence of 2% FCS, with 0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100 or 250 µg/mL Promerims®30 (A), 40 (B) and 60 (C) for 24, 48 and 72 hours in normoxia. Controls with 0%, 2% and 5% FCS, and a positive control of 100% cell death (Triton-induced death) were performed. Formazan levels, which are correlated with viability and proliferation, were measured in the media after 24, 48 and 72 hours of treatment. Results are summarized in box-plots (n= 5) showing the mean (cross) and the median (line) of optical density (OD). Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test (** p<0.01) compared with the 2% FCS condition.

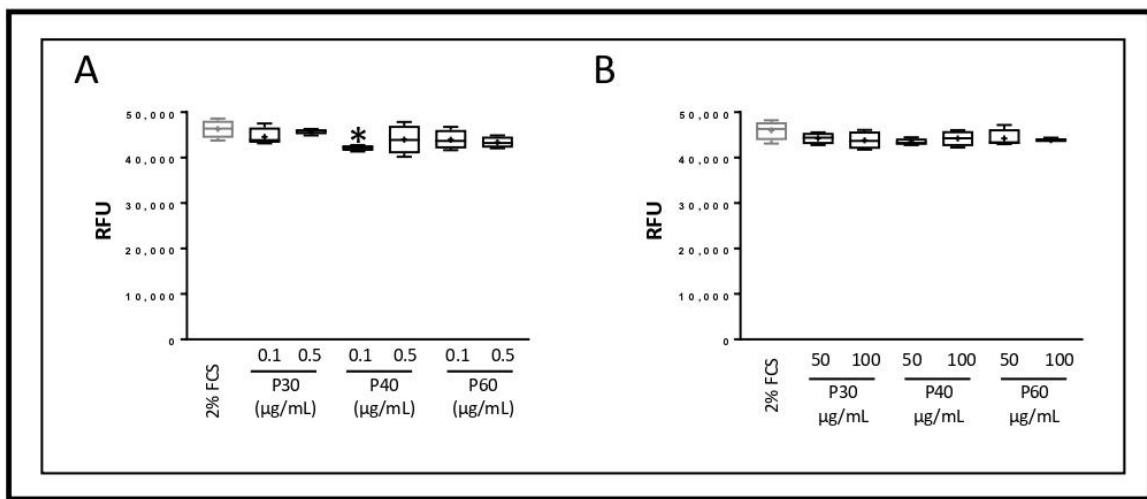


Figure S3: Effect of Promerim® 30, 40 and 60 on the senescence of human articular chondrocytes.

Human articular chondrocytes at P2 and 80% confluency were treated in the presence of 2% FCS, with Promerim® hydrolysates (P30, P40 and P60) at 0.1 and 0.5 µg/mL (A), 50 and 100 µg/mL (B) for 72 hours in normoxia. Controls with 2% FCS were performed (Ctrl) and the levels of β-galactosidase were measured 3 days post-treatment. Results are summarized in box-plots (n= 4) showing the mean (cross). Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test (* p<0.05) and the control condition was used as the reference.

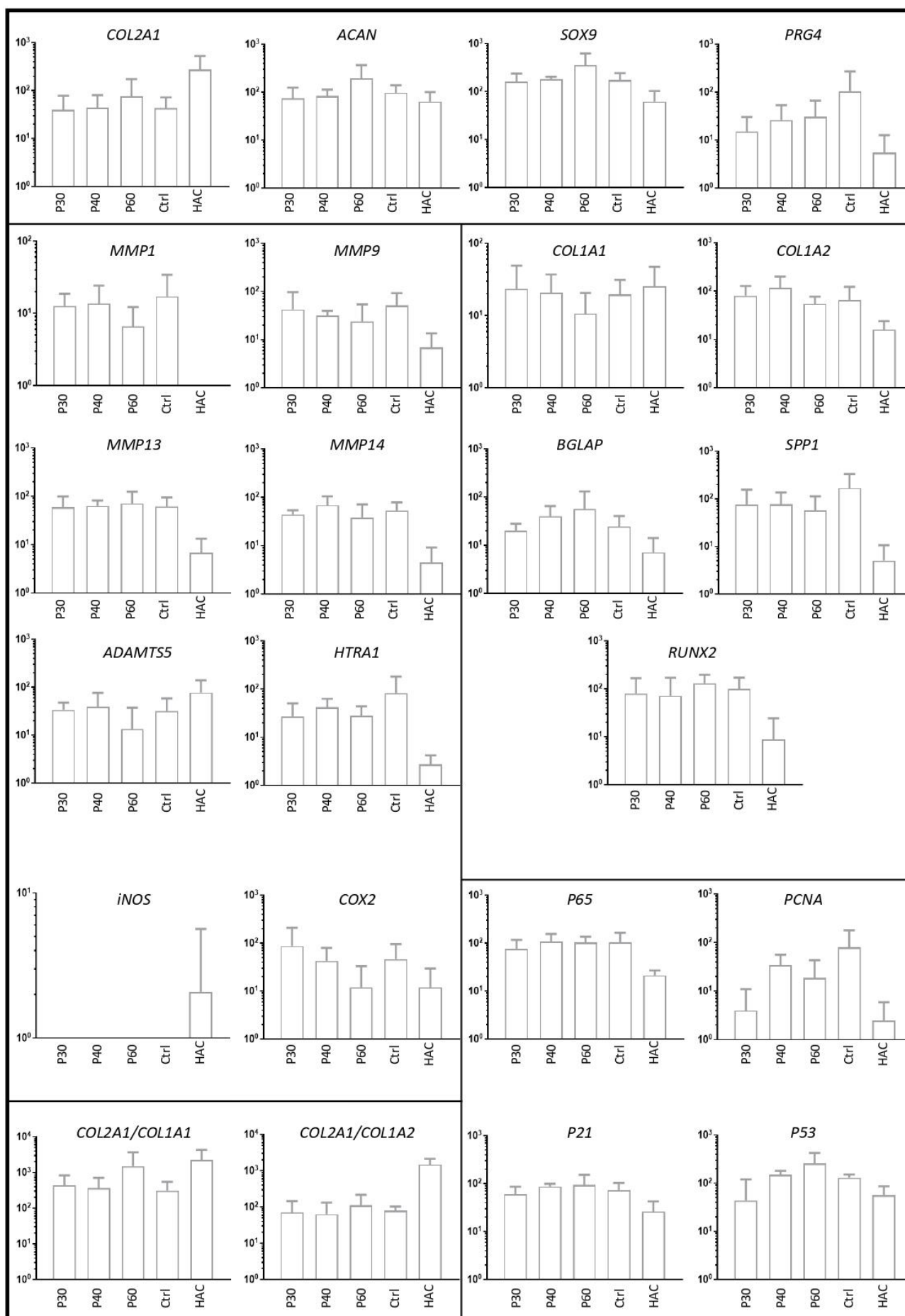


Figure S4: Effect of low concentrations of Promerim®30, 40 and 60 on gene expression profile in human articular chondrocytes. Human articular chondrocytes were grown in type I/III collagen sponges at (P2) for 7 days in hypoxia in the absence (Ctrl: control) or presence of Promerim®30, 40 or 60 at 0.1 µg/mL (P30, P40 and P60). Results are represented as histograms (n= 3) showing the mean ± SE of relative mRNA expression estimated using RT-qPCR and normalized to the *β-ACTIN* and *PPIA* reference gene. The *COL2A1:COL1A1* and *COL2A1:COL1A2* ratios are given. HAC: mRNA obtained from human articular chondrocytes at P0 were used as controls. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test compared with the control condition.

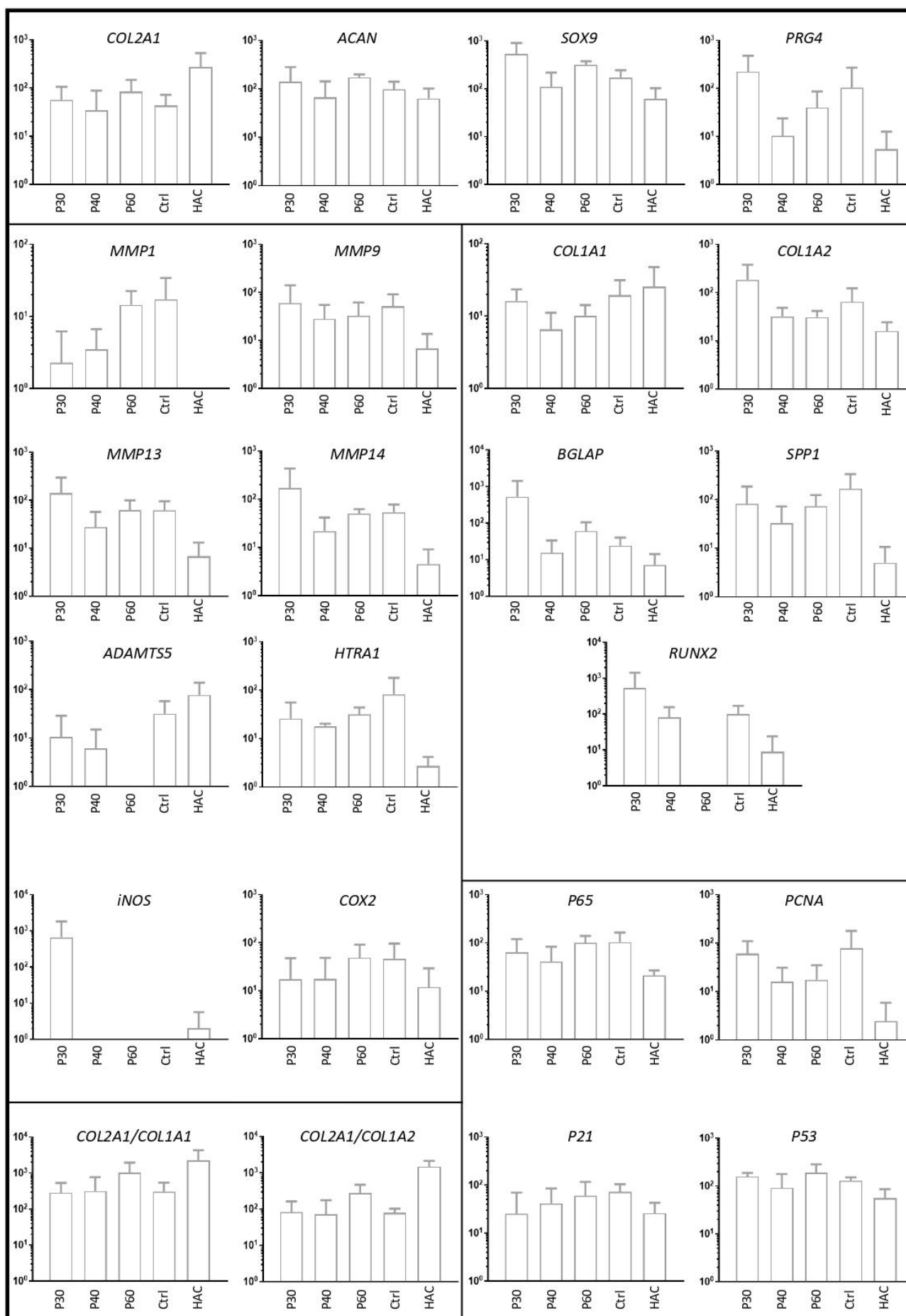


Figure S5: Effect of low concentrations of Promerim®30, 40 and 60 on gene expression profile in human articular chondrocytes. Human articular chondrocytes were grown in type I/III collagen sponges at (P2) for 7 days in hypoxia in the absence (Ctrl: control) or presence of Promerim®30, 40 or 60 at 0.5 µg/mL (P30, P40 and P60). Results are represented as histograms (n= 3) showing the means ± SE of relative mRNA expression estimated using RT-qPCR and normalized to the *β-ACTIN* and *PPIA* reference gene. The *COL2A1:COL1A1* and *COL2A1:COL1A2* ratios are given. HAC: mRNA obtained from human articular chondrocytes at P0 were used as controls. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test compared with the control condition.

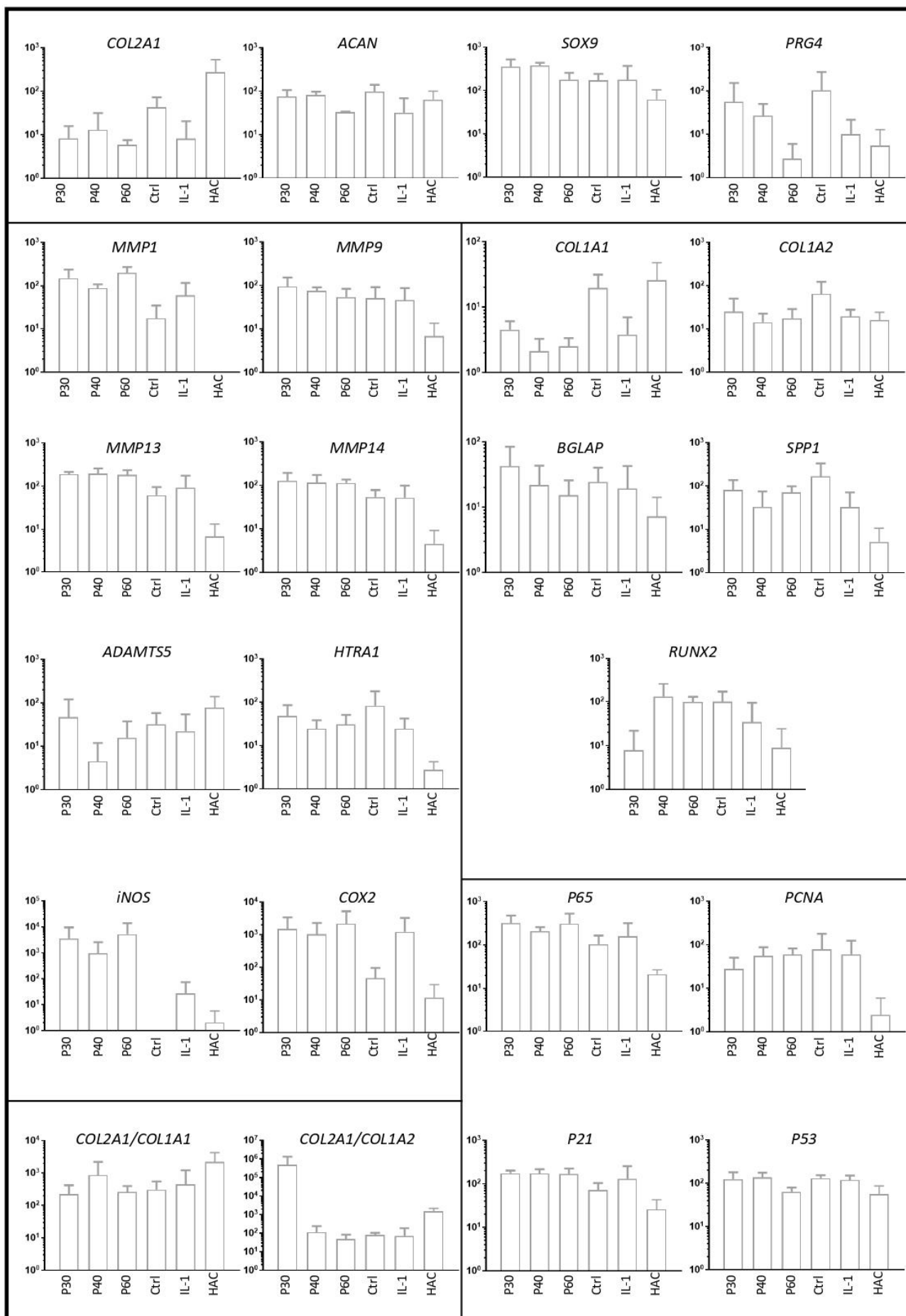


Figure S6: Effect of low concentrations of Promerim®30, 40 and 60 on gene expression profile in human articular chondrocytes. Human articular chondrocytes were grown in type I/III collagen sponges at (P2) for 7 days in hypoxia, treated with IL-1 β (10 ng/mL) or without (Ctrl: control) and/or the presence of Promerim®30, 40 or 60 at 0.1 μ g/mL (P30, P40 and P60). Results are represented as histograms (n= 3) showing the means \pm SE of relative mRNA expression estimated using RT-qPCR and normalized to the β -*ACTIN* and *PPIA* reference gene. The *COL2A1:COL1A1* and *COL2A1:COL1A2* ratios are given. HAC: mRNA obtained from human articular chondrocytes at P0 were used as controls. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test compared with the IL-1 condition.

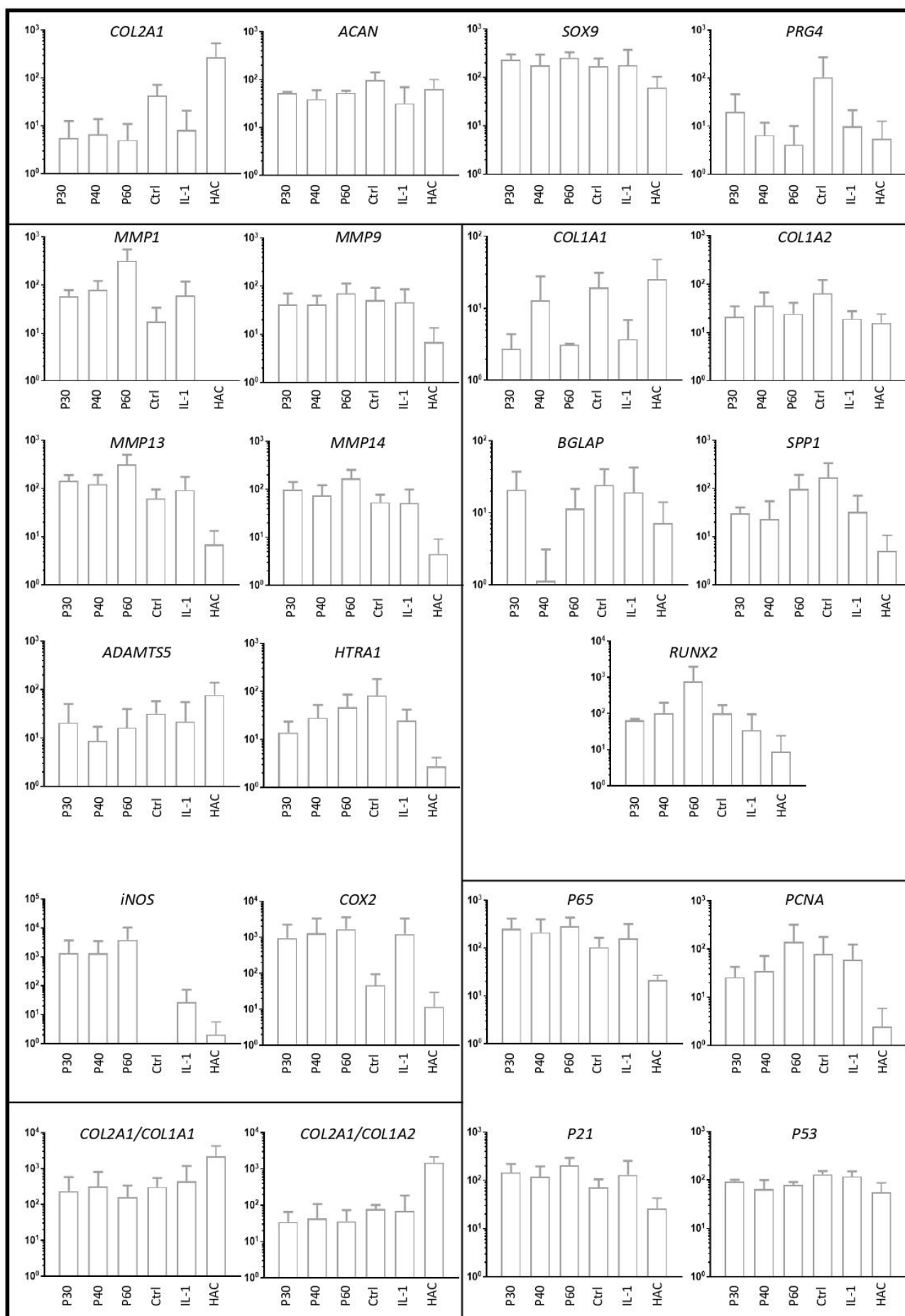


Figure S7: Effect of low concentrations of Promerim®30, 40 and 60 on gene expression profile in human articular chondrocytes. Human articular chondrocytes were grown in type I/III collagen sponges at (P2) for 7 days in hypoxia, treated with IL-1 β (10 g/mL) or not (Ctrl: control) and/or the presence of Promerim®30, 40 or 60 at 0.5 μ g/mL (P30, P40 and P60). Results are represented as histograms (n= 3) showing the mean \pm SE of relative mRNA expression estimated using RT-qPCR and normalized to the β -ACTIN and PPIA reference gene. The COL2A1:COL1A1 and COL2A1:COL1A2 ratios are given. HAC: mRNA obtained from human articular chondrocytes at P0 were used as controls. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test compared with the IL-1 condition.

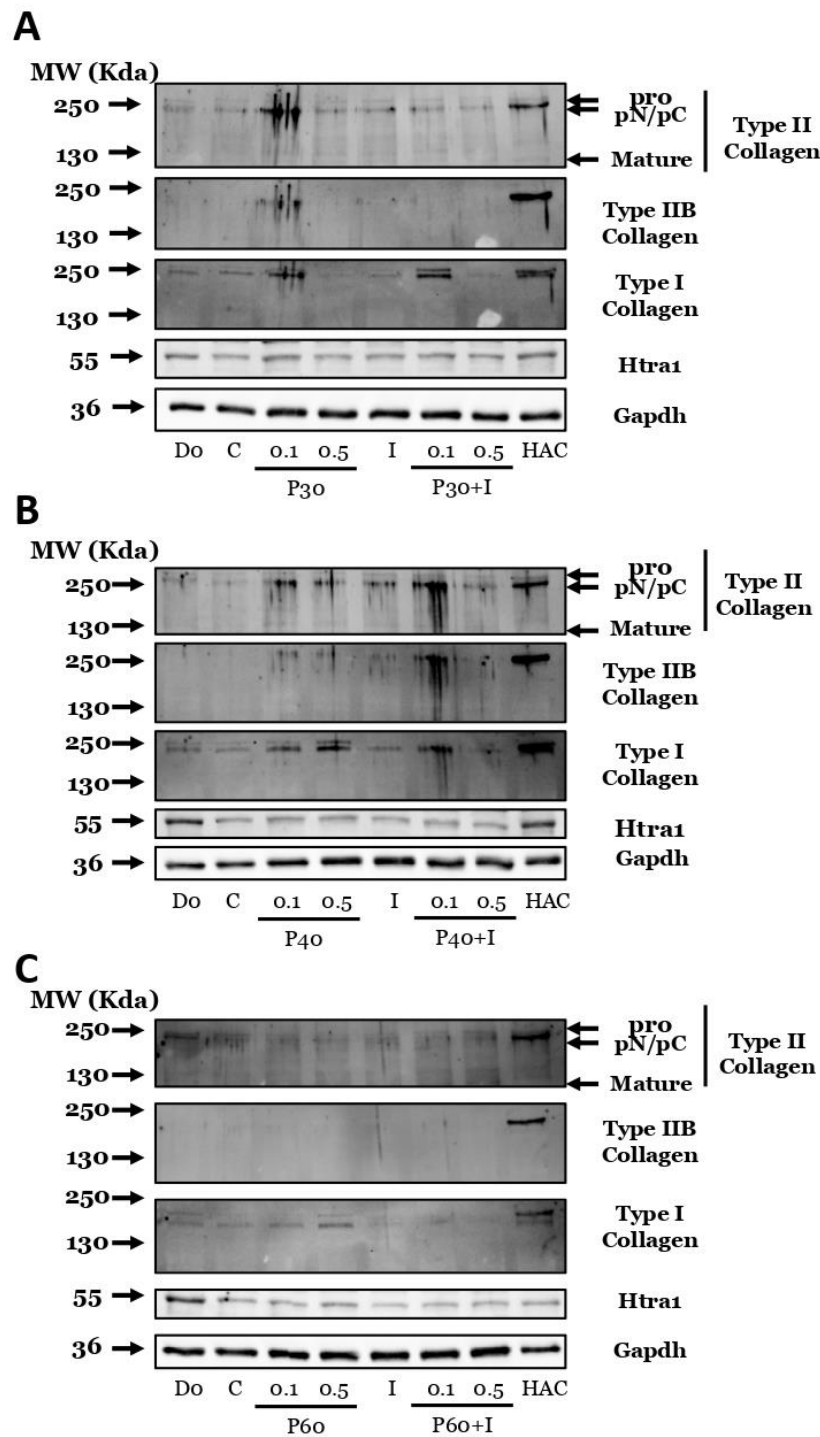


Figure S8: Effect of low concentrations of Promerim® on collagens and HtrA1 protein expression of human articular chondrocytes. Human articular chondrocytes at P2 were inoculated in collagen sponges and treated for 7 days in the absence or presence of IL-1 β (10 ng/mL) with Promerim®30 (A), 40 (B) or 60 (C) at 0.1 and 0.5 μ g/mL. The 3D control culture medium was used as control (C). I (IL-1), P30 (Promerim®30), P40 (Promerim®40), P60 (Promerim®60). Cells seeded in sponges stopped at day 0 (DO) and protein extracts obtained from human articular cartilage (HAC). The molecular weights expressed in kDa are shown on the left-hand side of the panels and the target proteins on the right-hand side of the panels. Images show representative immunoblots from different HAC strains (at least n= 3). Full membranes are shown in figure S14 as well as under-exposed and over-exposed blots in figures S15 and S16, respectively.

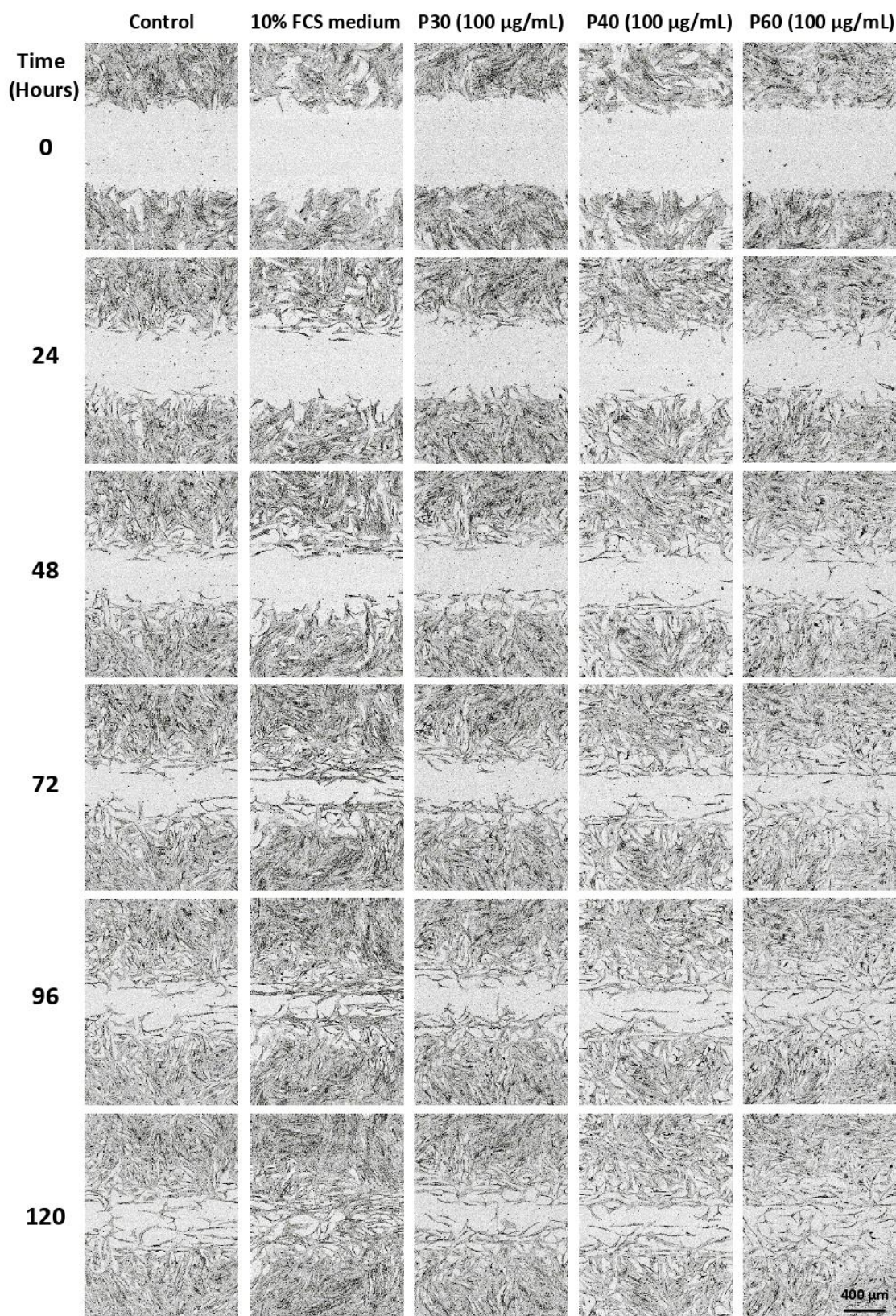


Figure S9: Microscopy of wound filling analysis following a scratch wound assay. Microscopy of human articular chondrocytes seeded at P2. At 90% confluency, a scratch wound assay was performed using a WoundMaker™ kit (Essen BioScience) and then the treatments were added. HACs were incubated in the presence of a culture medium containing 2% FCS (Control), and P30, P40, or P60 at 50 and 100 µg/mL. P30, P40 and P60: Promerim®30, Promerim®40 and Promerim®60.

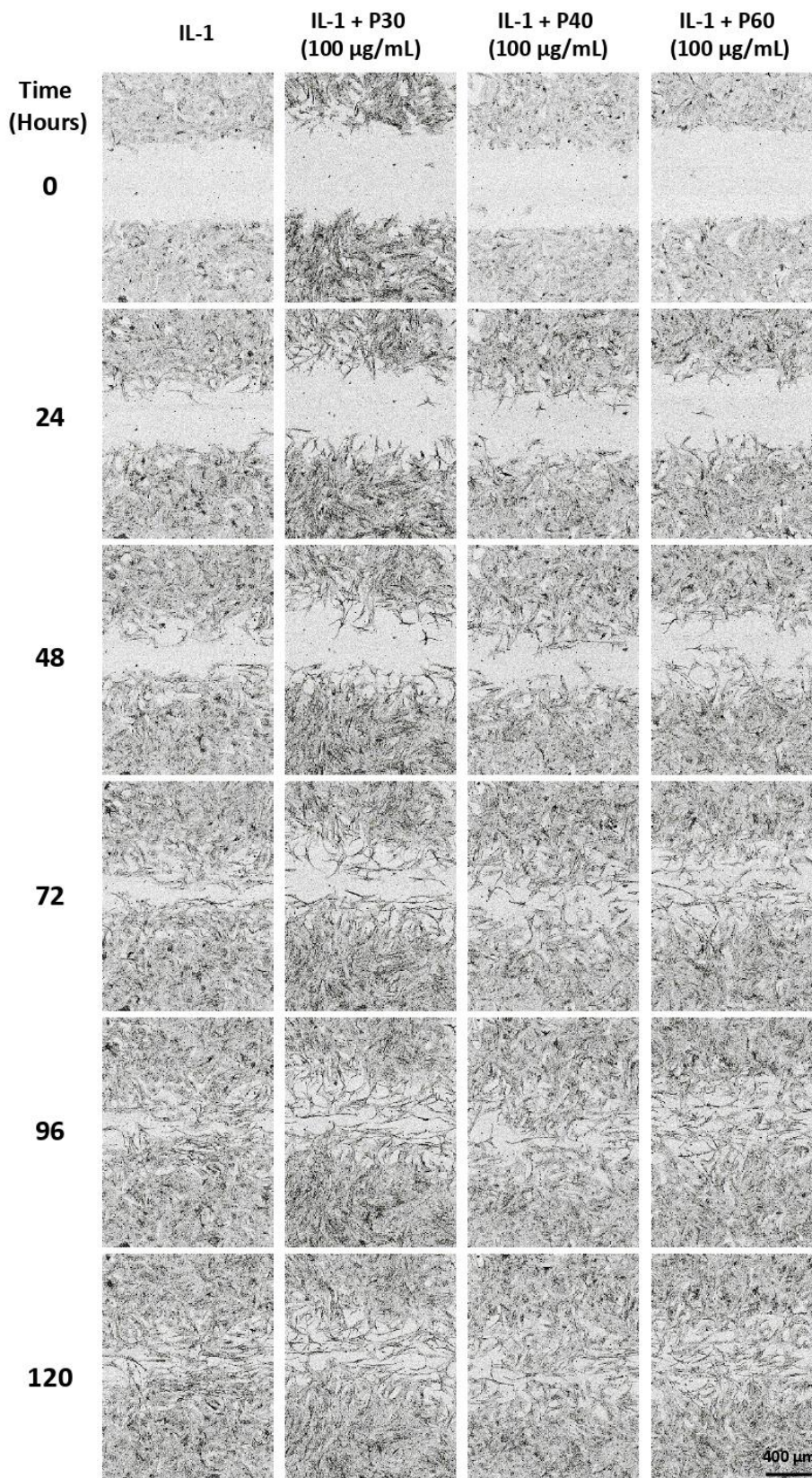


Figure S10: Microscopy of wound filling analysis following a scratch wound assay. Microscopy of human articular chondrocytes seeded at P2. At 90% of confluency, a scratch wound assay was performed using a WoundMaker™ kit (Essen BioScience) and then the treatments were added. HACs were incubated in the presence of a culture medium containing 2% FCS (Control), and P30, P40, or P60 at 50 and 100 µg/mL with IL-1. P30, P40 and P60: Promerim®30, Promerim®40 and Promerim®60.

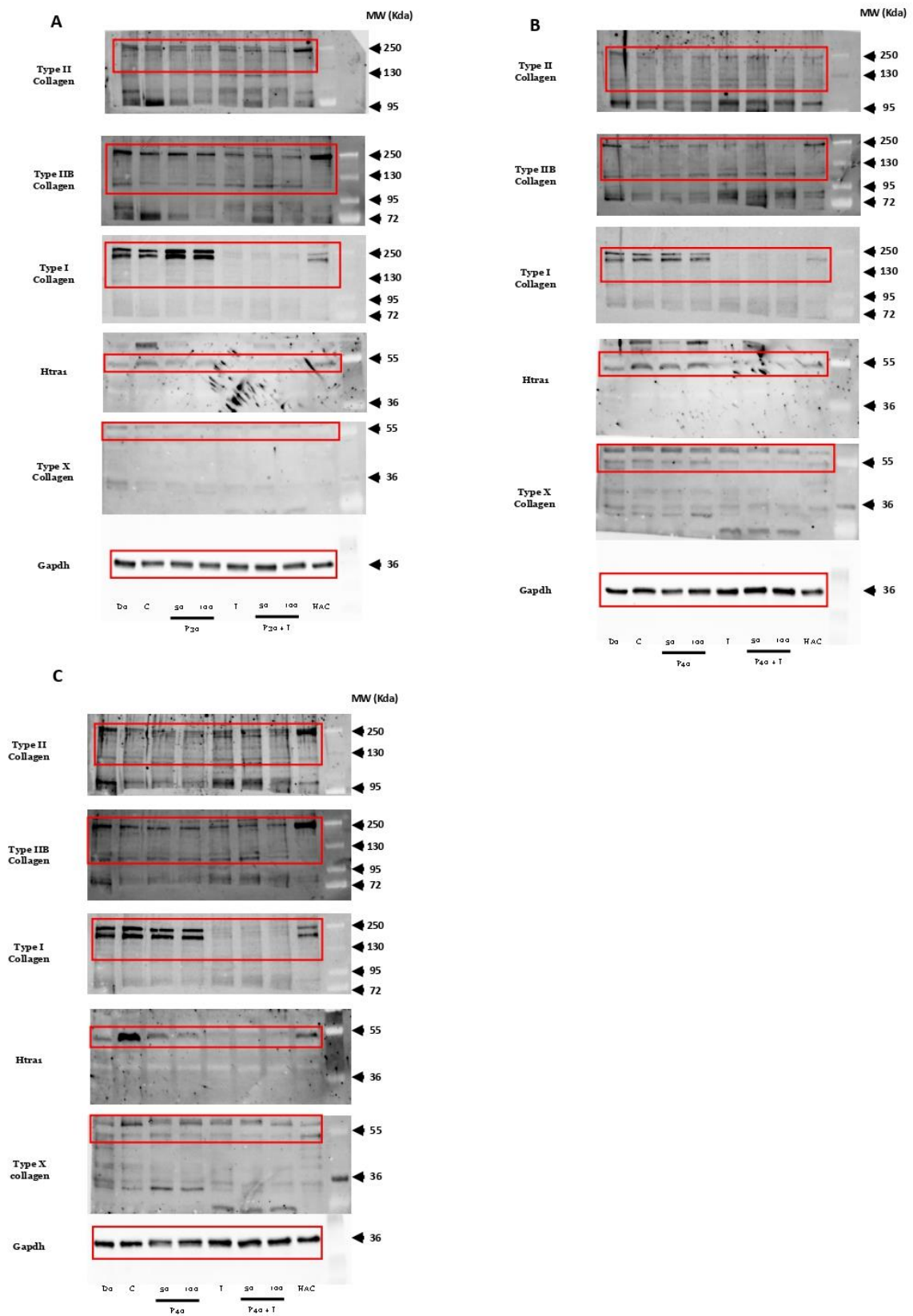


Figure S11: Complete gel and PVDF membranes analyzed in the western-blots.

For the western-blots presented in figure 10, respectively A, B and C, the complete images of the membranes captured with Chemidoc MP Imaging System (Bio-Rad) are shown. The molecular weight marker (MW kDa) is indicated on the right for the images shown. The cropped images are highlighted in the red lines.

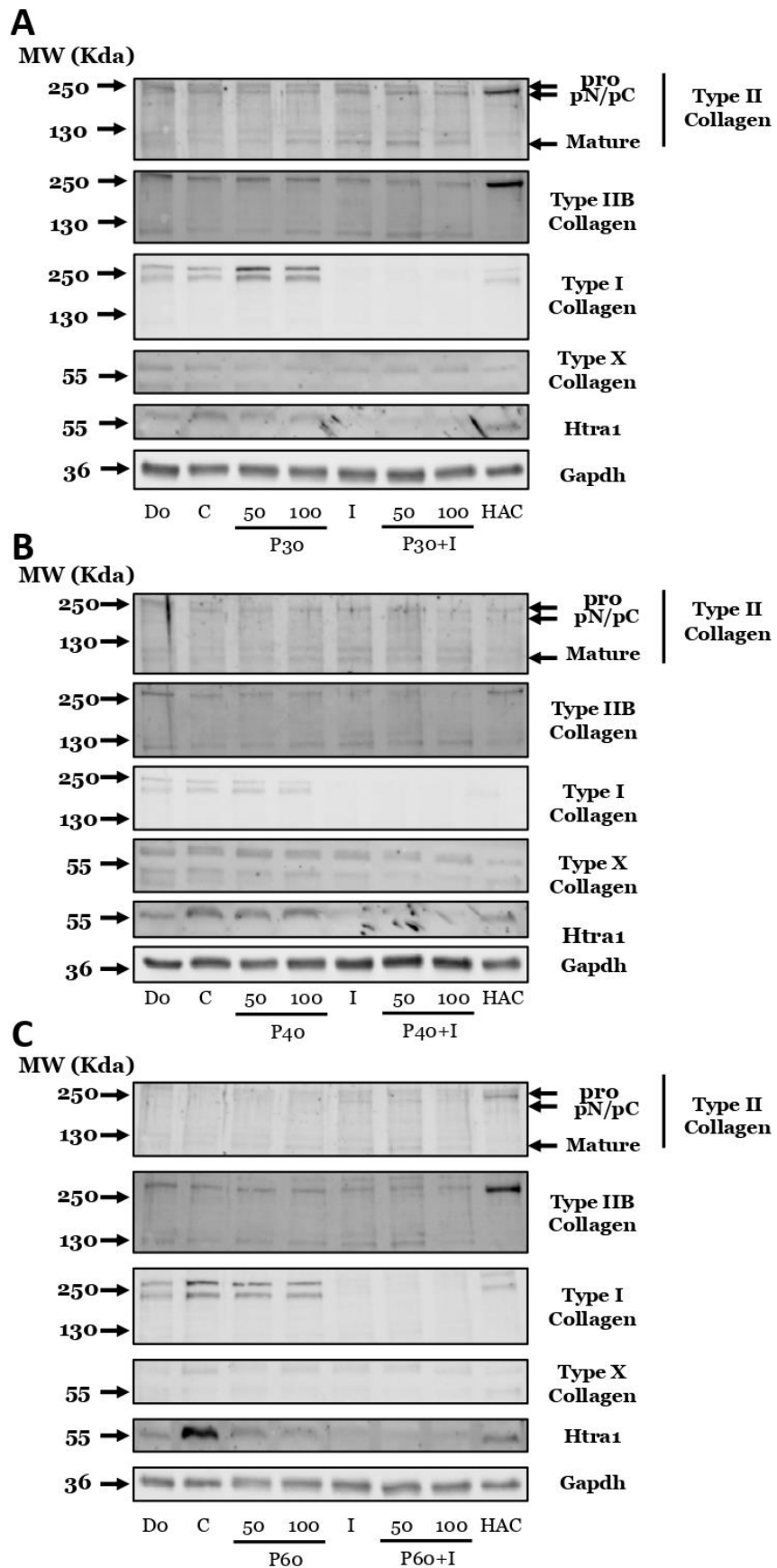


Figure S12: Under-exposure of the blots presented in figure 10.

Under-exposure (A, B, C) are shown. The molecular weight marker (MW kDa) is indicated on the left for the images presented.

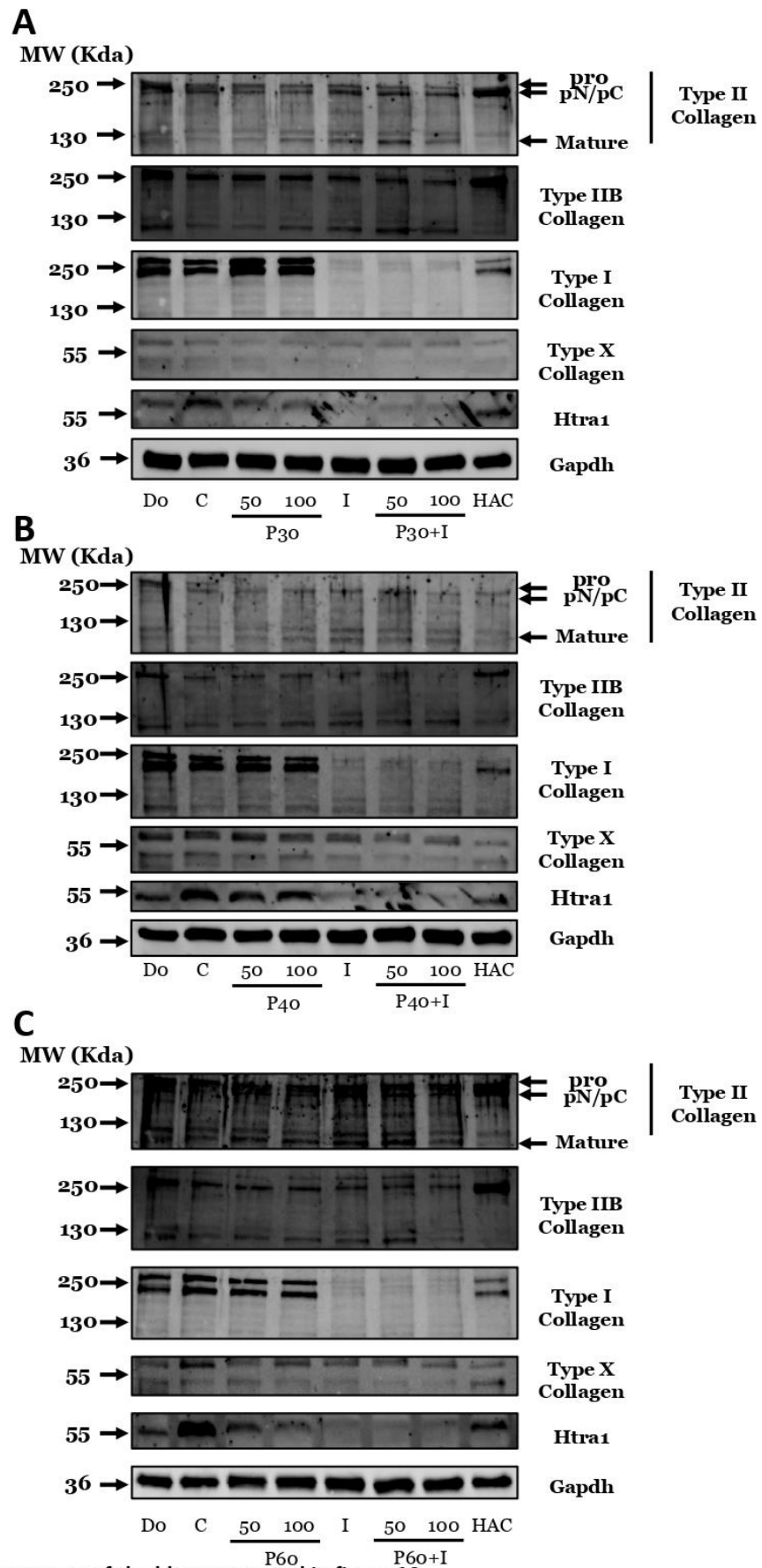


Figure S13: Over-exposure of the blots presented in figure 10.

Over-exposure (A, B, C) are shown. The molecular weight marker (MW kDa) is indicated on the left for the images presented.

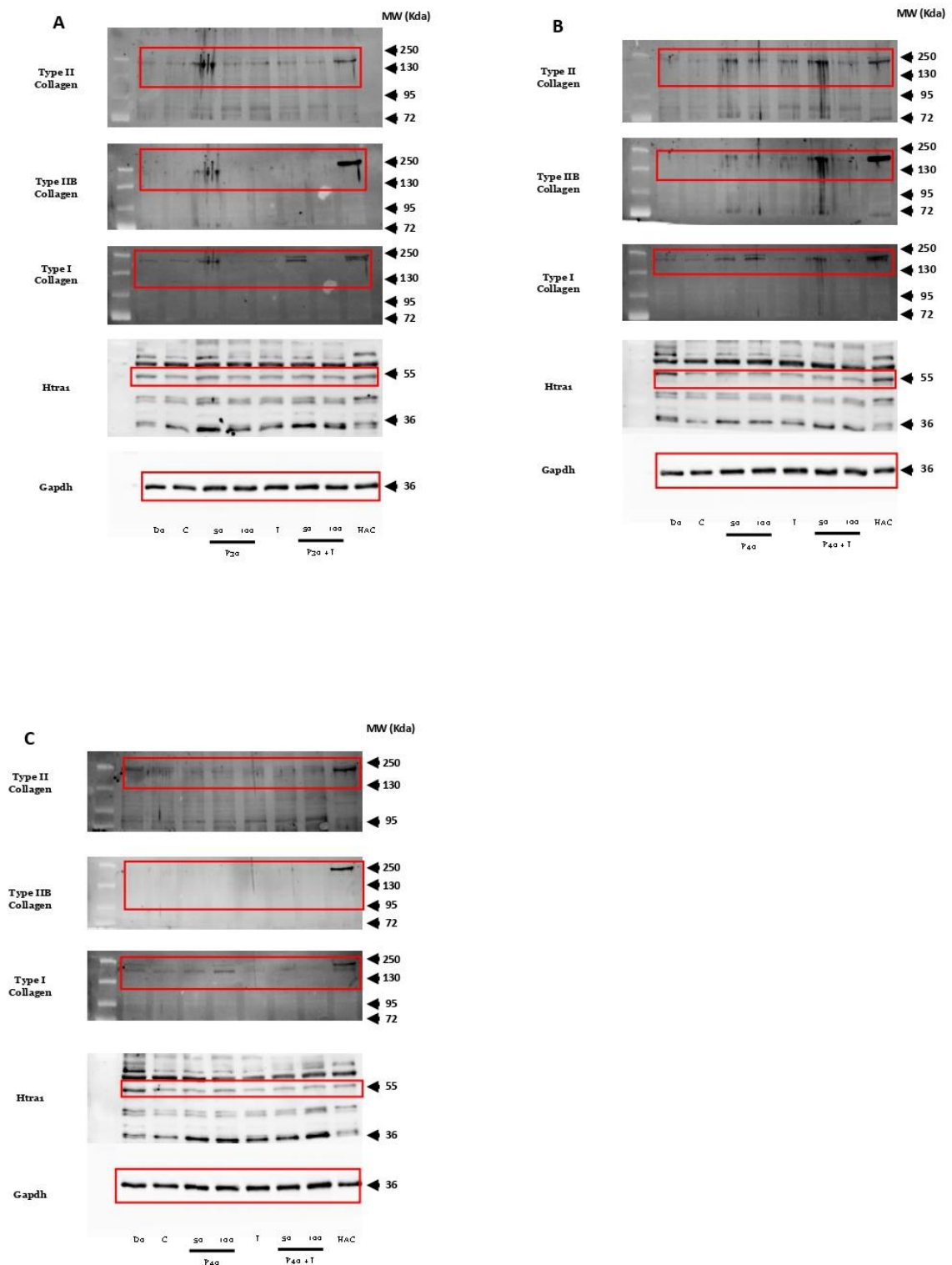


Figure S14: Complete gel and PVDF membranes analyzed in the western-blots.

For the western-blots presented in figure S8, respectively A, B and C, the complete images of the membranes captured with Chemidoc MP Imaging System (Bio-Rad) are shown. The molecular weight marker (MW kDa) is indicated on the right for the images shown. The cropped images are highlighted in the red lines.

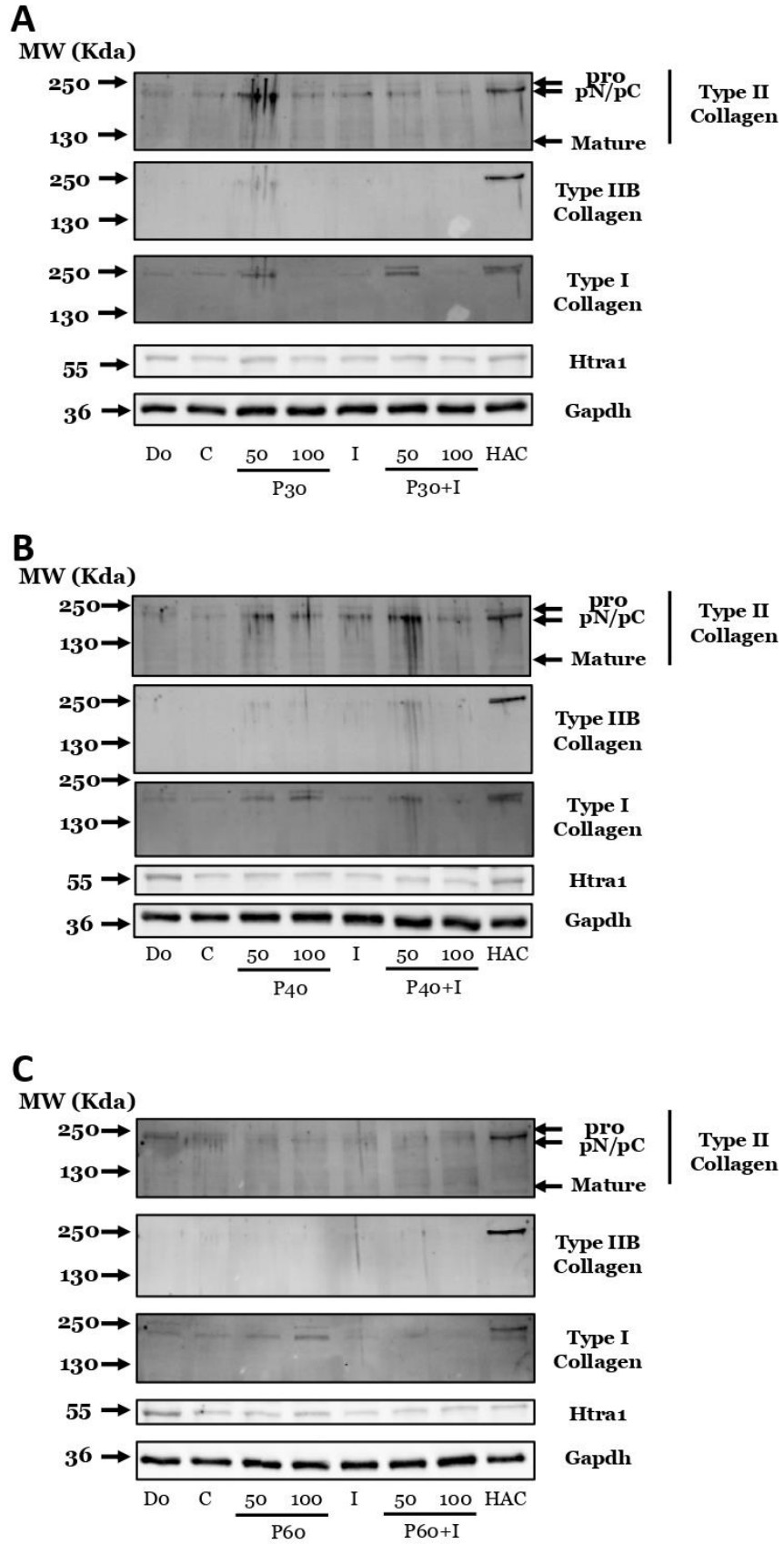


Figure S15: Under-exposure of the blots presented in figure S8.

Under-exposure (A, B, C) are shown. The molecular weight marker (MW kDa) is indicated on the left for the images presented.

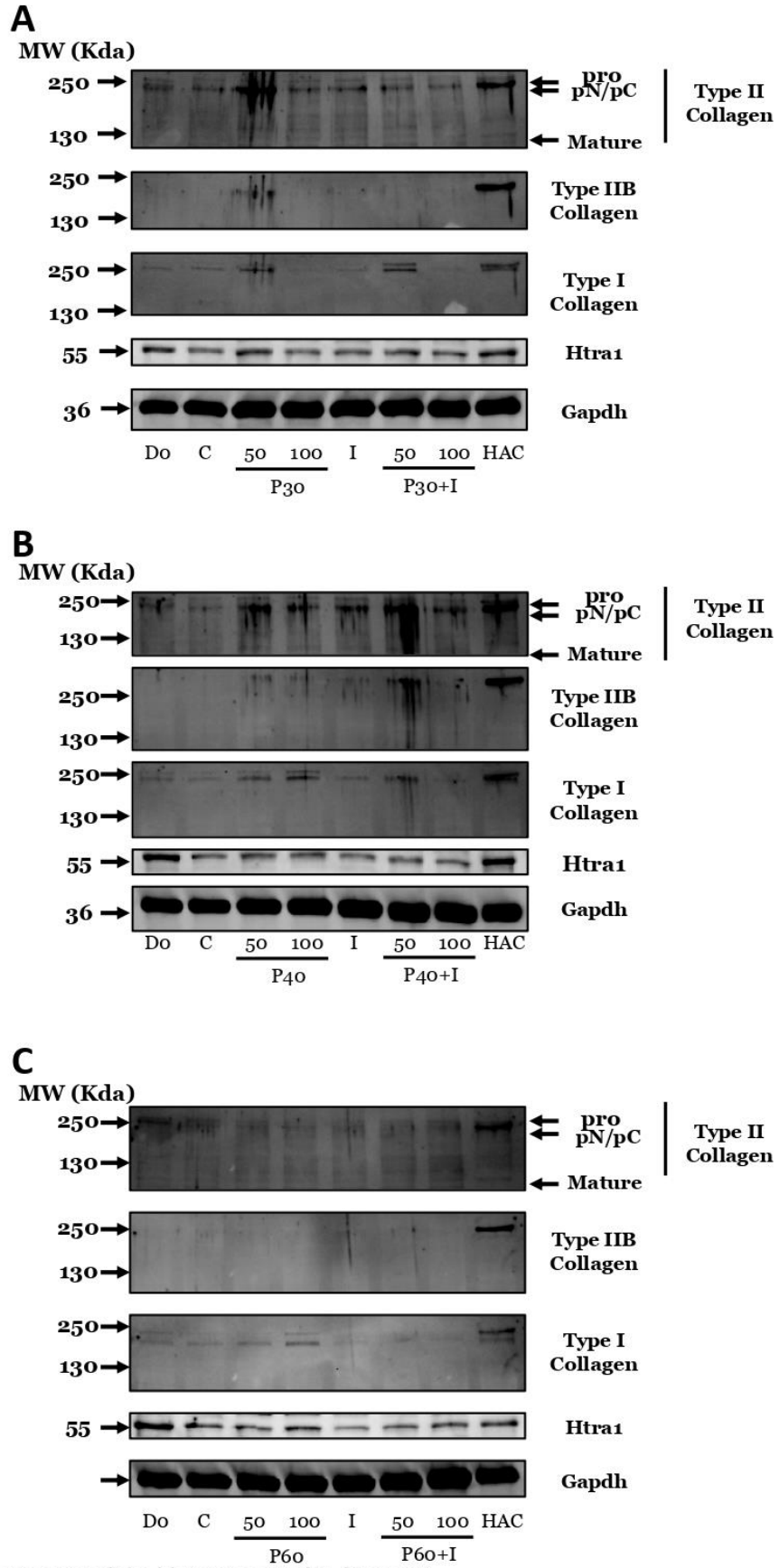


Figure S16: Over-exposure of the blots presented in figure S8.

Over-exposure (A, B, C) are shown. The molecular weight marker (MW kDa) is indicated on the left for the images presented.

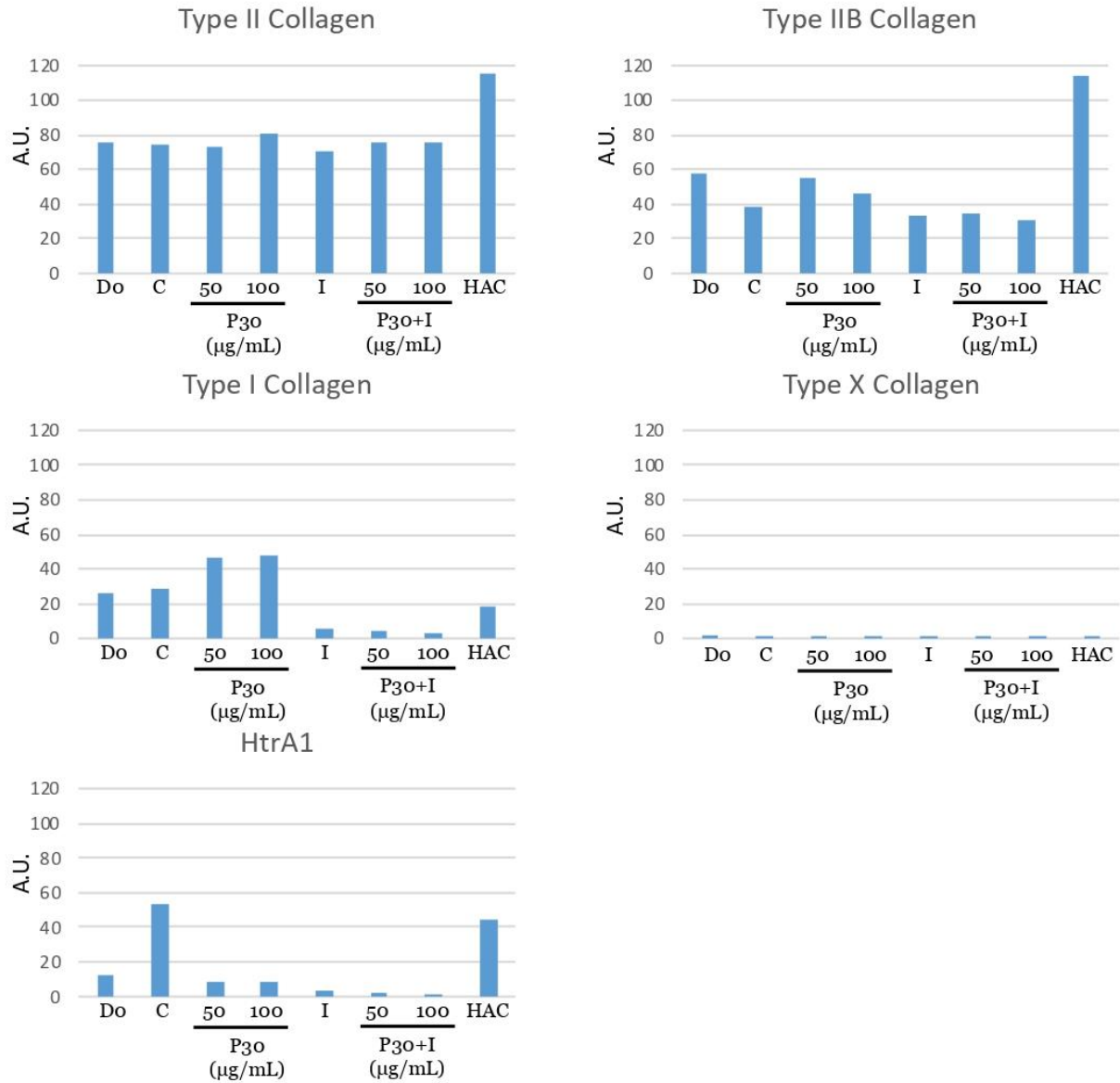


Figure S17A: Quantification of type II, IIB, I and X collagens and of Htra1 western-blots presented in Figure 10A. Protein expression was measured by quantifying the density of immunoblots bands calculated relative to GAPDH using image analysis software ImageJ®. A.U.: Arbitrary Unit.

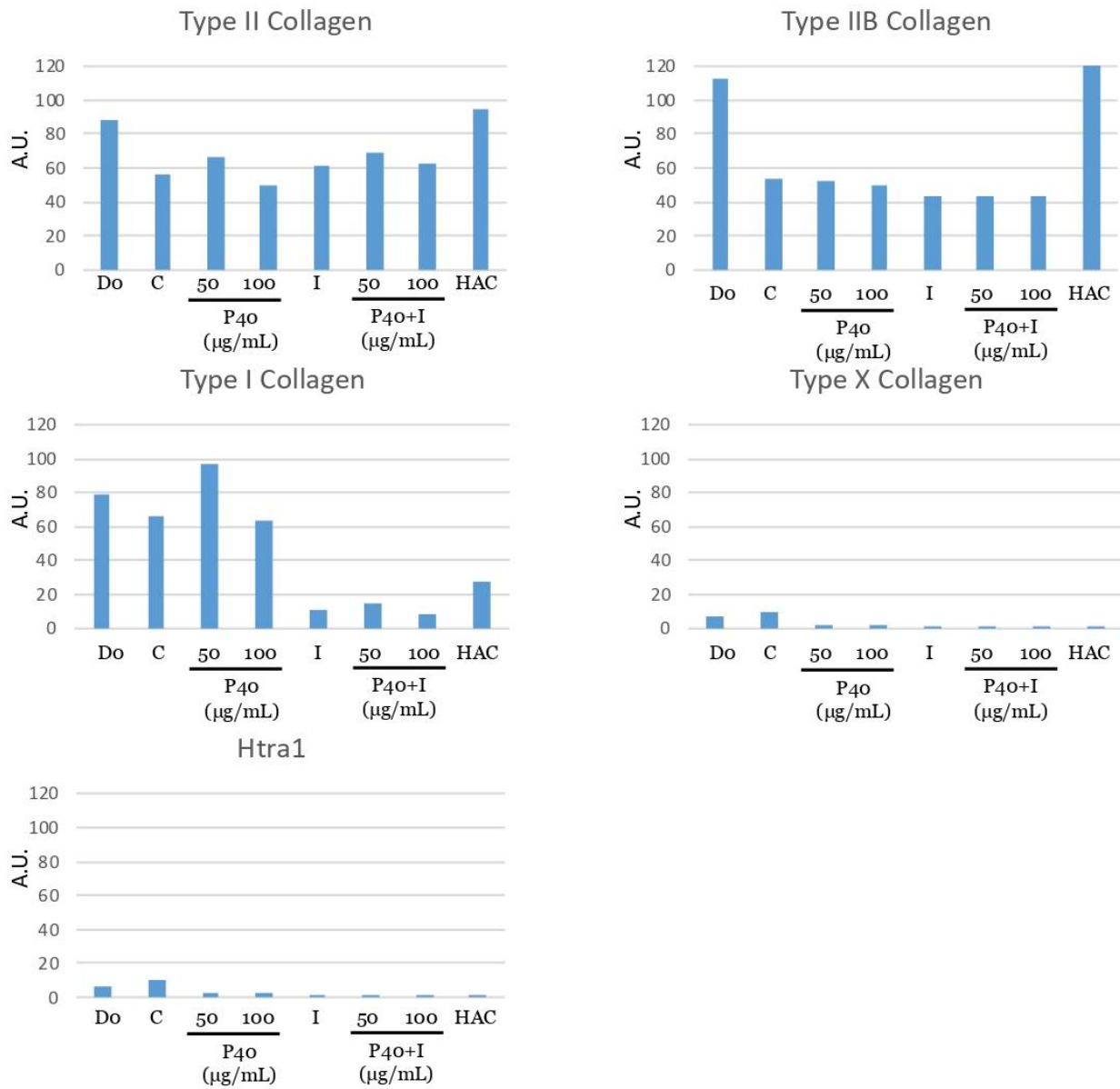


Figure S17B: Quantification of type II, IIB, I and X collagens and of Htra1 western-blots presented in Figure 10B. Protein expression was measured by quantifying the density of immunoblots bands calculated relative to GAPDH using image analysis software ImageJ®. A.U.: Arbitrary Unit.

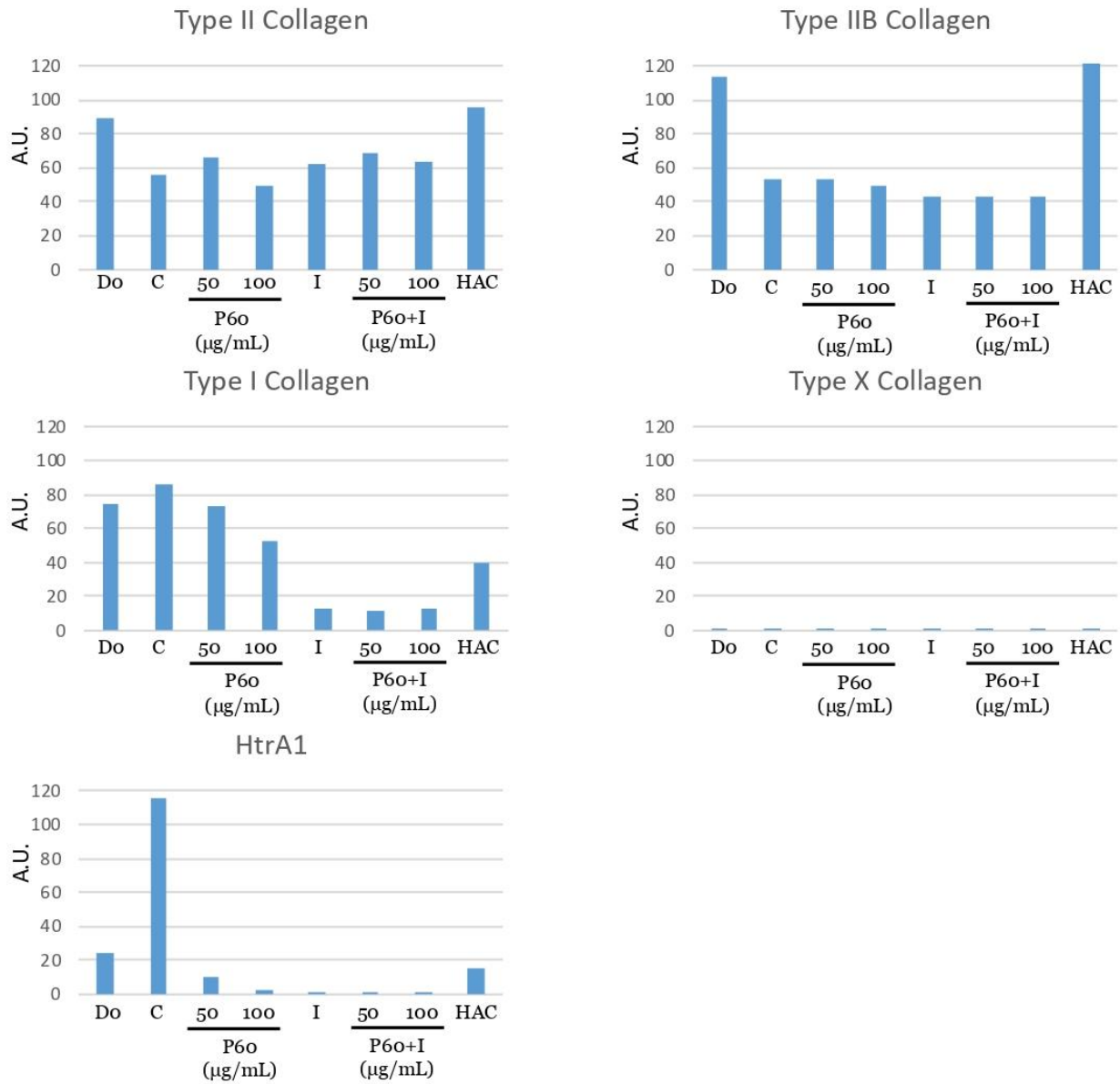


Figure S17C: Quantification of type II, IIB, I and X collagens and of Htra1 western-blots presented in Figure 10C. Protein expression was measured by quantifying the density of immunoblots bands calculated relative to GAPDH using image analysis software ImageJ®. A.U.: Arbitrary Unit.

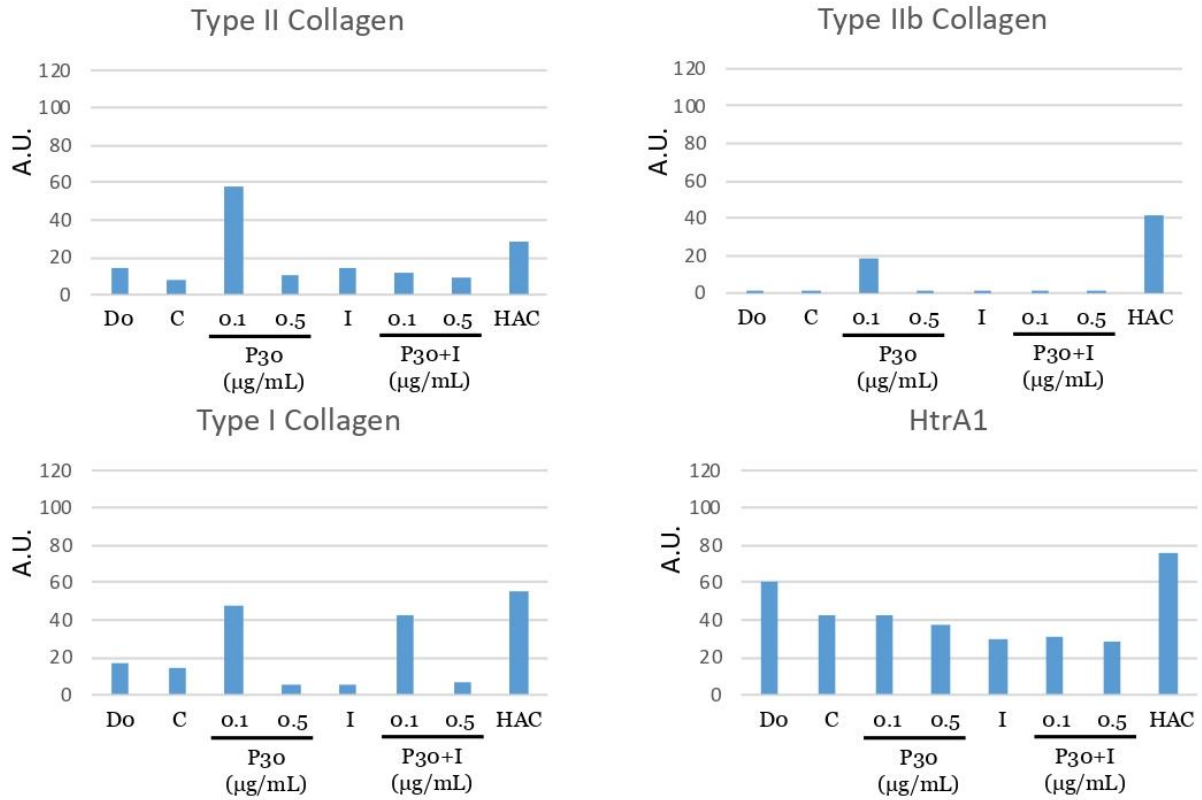


Figure S18A: Quantification of type II, IIB and I collagens and of Htra1 immunoblots presented in Figure S8A. Protein expression was measured by quantifying the density of immunoblots bands calculated relative to GAPDH using image analysis software ImageJ®. A.U.: Arbitrary Unit.

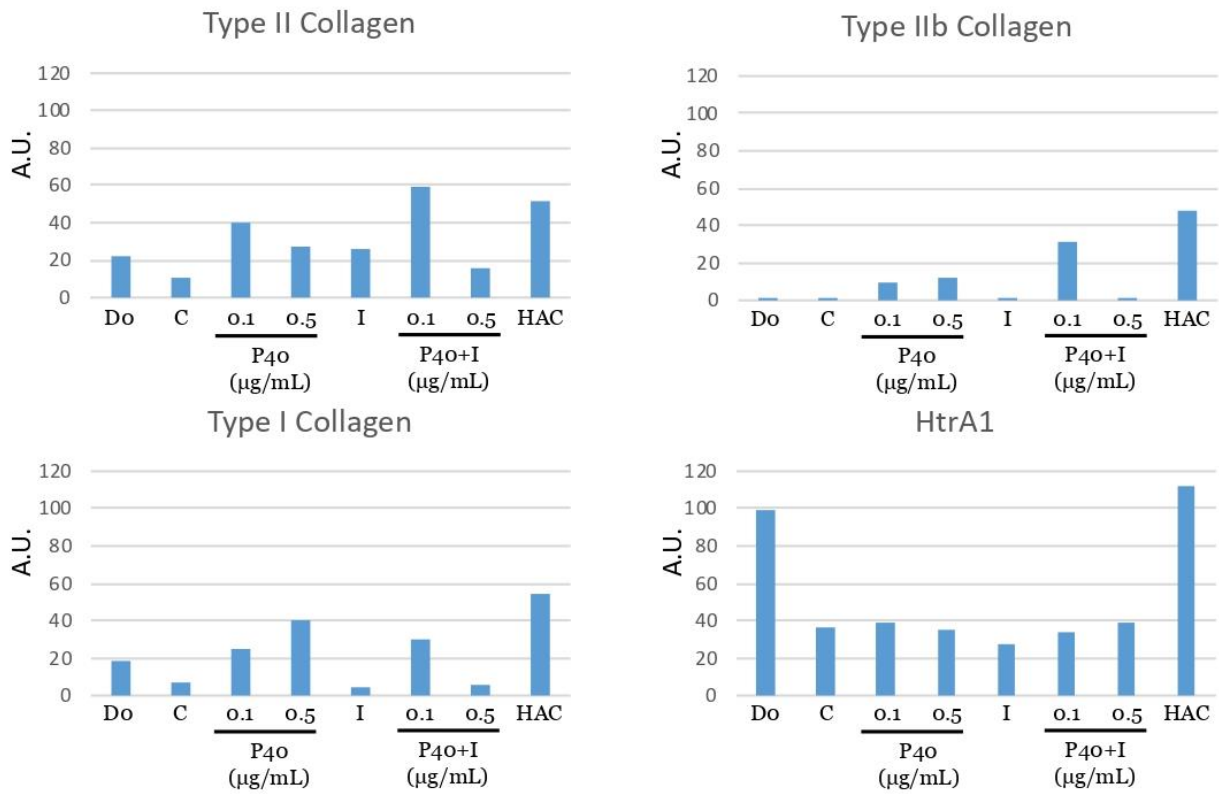


Figure S18B: Quantification of type II, IIB and I collagens and of Htra1 immunoblots presented in Figure S8B. The relative densitometry values (calculated relative to GAPDH) were determined using ImageJ®software. A.U.: Arbitrary Unit.

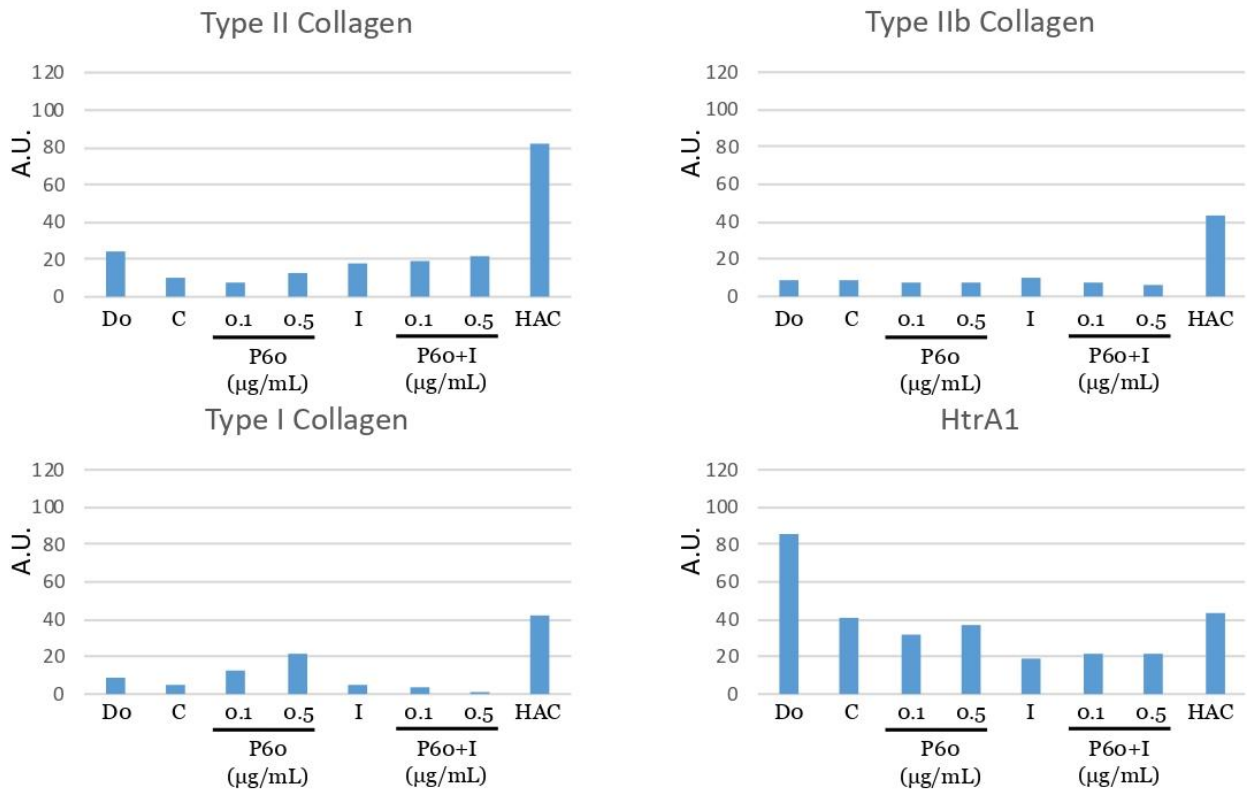


Figure S18C: Quantification of type II, IIB and I collagens and of Htra1 immunoblots presented in Figure S8C. The relative densitometry values (calculated relative to GAPDH) were determined using ImageJ®software. A.U.: Arbitrary Unit.

Gene	Sequence Forward	Sequence Reverse
<i>ACAN</i>	TCGAGGACAGCGAGGCC	TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA
<i>β-ACTIN</i>	CCGCGAGCACAGAGCCTGCCTT	GGCCTTGACATGCCGGAGCCGT
<i>ADAMTS5</i>	CCTCTCCATGACGATTCCA	TGCTTTCGTGGTAGGTCCAG
<i>BGLAP</i>	GCAGCGAGGTAGTGAAGAGAC	AGCAGAGCGACACCCTA
<i>COL1A1</i>	TGAGCCAGCAGATCGAGA	ACCAGTCTCCATGTTGCAGA
<i>COL1A2</i>	TGTGGATACGCGGACTTTGT	CAGCAAAGTCCCACCGAGA
<i>COL2A1</i>	GGCAATAGCAGGTTACGTACA	CGATAACAGTCTTGCCCCACTT
<i>COX-2</i>	CCCTTCTGCCTGACACCTTT	ACTTCTGTACTGCGGGTGG
<i>GAPDH</i>	CCTGCACCACCAACTGCTTA	GGCCATCCACAGTCTTCTGGG
<i>HTRA1</i>	GACTACATCCAGACCGACGC	GCTTTTCCTTTGGCCTGTCG
<i>INOS</i>	ACATTCTGCTTCTGGAAACTA	CGCTACAACATCCTGGAG
<i>MMP1</i>	GGCCCAAAACCCCAAAAG	ATCTCTGTCGGCAAATTCGTAAGC
<i>MMP13</i>	CCCCAACCTAAACATCCAAAAAC	TTAAAAACAGCTCCGCATCAACCT
<i>MMP14</i>	GCCGGGGCATCCAGCAACTTA	TCCTCACCCGCCAGAACCAG
<i>MMP9</i>	TGCCCGGACCAAGGATACAGTTT	AGGCCGTGGCTCAGGTTCAGG
<i>P21</i>	CATGTGGACCTGTCACTGTCTTGTA	GAAGATCAGCCGGCGTTTG
<i>P53</i>	CCCCAGCCAAAGAAGAAAC	AACATCTCGAAGCGCTCAC
<i>P65</i>	GCACAGATACCACCAAGACC	TCAGCCTCATAGAAGCCATC
<i>PCNA</i>	GGCCGAAGATAACGCGGATAC	GGCATATACGTGCAAATTCACCA
<i>PPIA</i>	CGGATTTGATCATTGGTG	CAGGGAATACGTAACCAG
<i>PRG4</i>	GAACGTGCTATAGGACCTTC	CAGACTTGGATAAAGGTCTGCC
<i>RUNX2</i>	AGCCTTACCAAACAACACACCAG	CCATATGTCCTCAGCTCAGC
<i>SOX9</i>	GTACCCGCCTTGCAAC	TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC
<i>SPP1</i>	TGGAAAGCGAGGAGTTGAATGG	GCTCATTGCTCTCATATTGGC

Table S1: Oligonucleotides used in RT-qPCR experiments.

Antibody	supplier	Dilution
Type IIB collagen	Covalab, Villeurbanne, France	1/1500
Type II collagen	Novotec, Bron, France	1/1500
Type I collagen	Novotec, Bron, France	1/1500
Type X collagen	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	1/1000
Htra1	ABGENT, San Diego, CA, USA	1/3000
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA	1/5000

Table S2: Antibodies used in the western-blot.

3. Conclusion de l'article #3

Dans cette étude, nous avons montré que les hydrolysats de collagènes ne présentent aucun risque cytotoxique pour les CAH. Au contraire, nous avons observé une amélioration, dans certaines conditions, de la prolifération. Nous avons aussi montré que les hydrolysats de collagènes retardent l'apparition du processus de sénescence. Ces résultats obtenus sur des CAH montrent que les hydrolysats ont un effet favorable sur la viabilité cellulaire. Les CAH cultivés dans un microenvironnement tridimensionnel ou inflammatoire expriment davantage les transcrits codant les collagènes, notamment le collagène de type I, mais également, exercent une diminution des taux moyens des transcrits codant certaines protéases (*HTRA1* et *MMP-1*) responsables de la dégradation de la MEC, lors du processus arthrosique. Au niveau protéique, nous avons aussi observé, a minima, un maintien de la synthèse de collagènes dans un environnement inflammatoire, mais aussi, une augmentation de leurs accumulations lorsque les CAH sont cultivés en présence des Promérim® seuls. Ces études confortent les résultats obtenus sur le modèle équin, mais aussi l'idée que les hydrolysats de collagènes étudiés sont une source potentielle de compléments alimentaires. Il serait donc intéressant de poursuivre ces études sur un modèle *in vivo*. Plusieurs options peuvent alors être envisagées telles que l'étude de l'effet des Promérim® en tant que complément alimentaire (pouvant être utilisés, soit sous forme solide, soit sous forme liquide) sur des modèles de souris arthrosiques (ménisectomisées par exemple). Une étude de l'articulation lésée a posteriori nous donnerait de nombreuses informations sur l'effet des Promérim® *in situ*. Une étude sur une cohorte de chevaux pourrait aussi être envisagée, là encore, en utilisant les Promérim® sous la forme de compléments alimentaires. Il est possible de générer une arthrose expérimentale métacarpo-phalangienne par fragmentation ostéochondrale, c'est-à-dire création d'un fragment ostéo-chondral avec un ostéotome chez le cheval (Bertoni *et al.*, 2020). Le fragment ostéochondral est laissé en place et il permet la création d'une arthropathie secondaire caractérisée par la présence d'ostéophytes visualisés par radiographie et échographie. En ne lésant que certaines pattes chez un cheval, il nous est possible de comparer les résultats obtenus sur un cartilage lésé et non lésé sur un même individu, qui devient son propre contrôle/témoin. L'évaluation de la mobilité articulaire pourrait ensuite être évaluée, puis, dans un second temps,

différents types d'analyses pourraient être envisagés comme des imageries cliniques (disparition des ostéophytes), des tests macroscopiques et histologiques afin d'évaluer l'état et la qualité de la MEC restante au sein des tissus cartilagineux (Bertoni *et al.*, 2019, 2021).

Discussion

Chez l'Homme et chez le cheval, il n'existe à ce jour, aucun traitement curatif pour traiter l'arthrose. L'apparition de micro-lésions et la perte de substance chondrale qui engendrent l'arthrose sont irréversibles. Cette pathologie fréquente est la source de larges pertes financières pour la filière équine, mais aussi, un enjeu socio-économique majeur pour les différents systèmes de santé mondiaux.

C'est fort de ces constatations que, lors de ces travaux de thèse, nous avons évalué l'effet de différents hydrolysats de collagènes qui ont pour vocation d'être utilisés en tant que compléments alimentaires. Ces hydrolysats (Promérim®) sont issus de la peau et des arêtes de poissons cartilagineux. Ils subissent une hydrolyse spécifique contrôlée et brevetée par le laboratoire Dielen. Ainsi, les hydrolysats étudiés se composent majoritairement de fragments peptidiques issus de collagènes. Ces peptides sont une source à fort potentiel de matrikines, également appelées matricryptines engendrant de possibles signalisations sur les chondrocytes articulaires humains et équins. Les effets des hydrolysats sur les chondrocytes ont été étudiés selon plusieurs niveaux.

Un premier aspect a consisté à étudier leur effet sur la viabilité cellulaire s'assurant ainsi de la non-toxicité des hydrolysats sur les chondrocytes. Au contraire, ils permettent d'augmenter l'activité métabolique mitochondriale, et de ralentir la survenue de la sénescence des chondrocytes cultivés en monocouche.

Dans un second temps, nous nous sommes appuyés sur un modèle de culture tridimensionnel développé chez le modèle humain et équin, permettant une redifférenciation des chondrocytes après amplification *in vitro*. Cette redifférenciation s'effectue par culture des cellules au sein d'un biomatériau, une éponge de collagènes de types I/III, en hypoxie afin de mimer le microenvironnement au sein duquel évoluent les chondrocytes *in vivo*.

Ces travaux sont les premiers réalisés sur ces hydrolysats de collagènes et ont permis d'étudier les mécanismes d'action potentiels de ces derniers *in vitro* sur des chondrocytes articulaires équins et humains.

I. Transposition de la TCA au modèle équin

1. Intérêt de l'utilisation des biomatériaux

Lors des cultures cellulaires réalisées dans nos études, nous avons tenté d'évoluer dans des conditions mimant celles dans lesquelles évoluent les chondrocytes *in vivo*. Le but d'utiliser un biomatériau *in vitro* est de créer un environnement tridimensionnel assurant des liaisons et des interactions entre les cellules et ce biomatériau. Le laboratoire a préalablement démontré que les éponges de collagènes de types I/III présentent divers intérêts dans le cadre de thérapies cellulaires, et ce, sur des chondrocytes équins et humains (Demoor *et al.*, 2014 ; Legendre *et al.*, 2013 ; Rakic *et al.*, 2017). Le biomatériau utilisé ici est inerte, les collagènes de types I/III dont il est constitué sont des atélocollagènes et sont donc biologiquement inactifs. L'utilisation d'un tel support a un double enjeu puisqu'il permet aussi d'envisager une implantation au niveau de la lésion chondrale *in vivo* (Makris *et al.*, 2014).

De nombreux biomatériaux comme les polymères synthétiques dégradables (par exemple, l'acide polylactique, l'acide polyglycolique), les gels de polysaccharides, tels que l'agarose (Mauck *et al.*, 2000, Buschmann *et al.*, 1992) et l'alginate (Hauselmann *et al.*, 1994 ; Mok *et al.*, 1994), les matériaux à base de protéines, comme les gels de collagène, de gélatine et de fibrine (Schneider *et al.*, 2011 ; LaPorta *et al.*, 2012), sont largement cités dans la littérature pour une utilisation dans l'ingénierie tissulaire du cartilage. L'ensemble de ces supports possède un point commun : ils sont poreux et ont pour but d'héberger et d'accueillir les cellules (le type de cellules sera abordé ultérieurement). D'autres supports, les hydrogels, ont été développés avec une forte teneur en eau pour se rapprocher de la teneur en eau du cartilage articulaire hyalin. Les hydrogels sont des polymères synthétiques et accordables, tels que les hydrogels à base de polyéthylène glycol qui affectent la formation et l'accumulation d'une MEC cartilagineuse en faisant varier, notamment, la densité du réseau, son homéostasie et la rigidité (Bryant & Anseth, 2003 ; Bryant *et al.*, 2004 ; Brandl *et al.*, 2007).

Ces biomatériaux ne sont cependant que des « structures d'accueil » et ont donc été améliorés, fonctionnalisés, par l'ajout de composants de la MEC tels que l'AH

(Bian *et al.*, 2013 ; Erickson *et al.*, 2009 ; Toh *et al.*, 2012), la CS (Wang *et al.*, 2007b ; Levett *et al.*, 2014) et le collagène de type I (Antoine *et al.*, 2014 ; Kuo *et al.*, 2015) ; le but étant de générer un tissu fournissant aux cellules néo-implantées en son sein une MEC la plus proche du microenvironnement du cartilage articulaire. Dans un troisième temps, les biomatériaux peuvent aussi être fonctionnalisés à l'aide de facteurs chondrogéniques favorisant une différenciation chondrocytaire et un maintien du phénotype mature qui soit le plus optimal possible.

Les éponges de collagènes de types I/III utilisées dans nos études n'ont pas été greffées avec des facteurs chondrogéniques et ne sont donc pas fonctionnalisées. Cependant, elles sont déjà utilisées en clinique humaine et répondent aux normes CE, ce qui nous permet d'envisager, sans trop de contraintes, une application en médecine humaine.

2. Intérêts de l'utilisation de l'hypoxie

Le cartilage articulaire évolue dans un environnement hypoxique avec un gradient évoluant de 1% à 10% selon la couche cartilagineuse. Cet environnement hypoxique s'explique principalement par le fait que ce tissu est avasculaire et l'apport d'oxygène se fait par diffusion passive en provenance de l'os sous-chondral et du liquide synovial. Nous avons donc redifférencié les chondrocytes en condition hypoxique afin de mimer au mieux la physioxie des chondrocytes articulaires. L'hypoxie est un élément essentiel au maintien du phénotype chondrocytaire et présent dès le développement embryonnaire de l'organisme (Kanichai *et al.*, 2008). Dans l'étude présentée ici, nous avons réalisé l'ensemble des expérimentations portant sur la viabilité et l'activité métabolique chondrocytaire, parallèlement en normoxie et en hypoxie afin de définir l'effet de la physioxie sur les chondrocytes cultivés *in vitro*. Les résultats se sont révélés plus encourageants dans un environnement hypoxique. Après trois jours de culture en hypoxie, nous avons observé une inhibition plus marquée de la SA- β -galactosidase, molécule associée à la sénescence. De même, les traitements à base d'hydrolysats de collagènes ont un effet supérieur sur l'activité métabolique mitochondriale en hypoxie qu'en normoxie. Concernant nos travaux sur la redifférenciation chondrocytaire, nous avons choisi de les réaliser en hypoxie afin de se rapprocher au mieux du contexte *in vivo*, mais aussi, afin de favoriser la redifférenciation. Il a été démontré que les cultures

tridimensionnelles à haute densité cellulaire qui sont associées à une culture en hypoxie favorisent la redifférenciation des chondrocytes articulaires. L'hypoxie augmente par ailleurs l'expression du collagène de type II, de l'agrécane et de Sox9, alors qu'elle diminue parallèlement l'expression des collagènes de types I et III (Duval *et al.*, 2009). La faible tension d'oxygène durant la culture des chondrocytes est aussi capable de stabiliser le phénotype chondrocytaire en maintenant un phénotype mature et prévenant l'hypertrophie des chondrocytes (Lee *et al.*, 2013 ; Lafont *et al.*, 2016).

3. Stratégie de redifférenciation des chondrocytes articulaires

Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage, il est difficile de disposer d'emblée d'une quantité suffisante de chondrocytes matures à réimplanter au sein de la lésion cartilagineuse à cause de la morbidité au site de prélèvement qui fait le nid de l'arthrose dans le temps, et à la faible cellularité du cartilage articulaire. Afin de disposer de cette quantité conséquente de chondrocytes utilisables en thérapie cellulaire ou ingénierie du cartilage, il est nécessaire d'amplifier les chondrocytes préalablement isolés. Or, lors de cette phase d'amplification *in vitro*, les chondrocytes se dédifférencient inévitablement. En effet, des recherches menées au milieu des années 70 ont démontré que, lors de la culture en monocouche, les chondrocytes articulaires humains synthétisent du collagène de type I (Von Der Mark *et al.*, 1977 ; Gay *et al.*, 1976) et du collagène de type III (Benya *et al.*, 1978), aux dépens du collagène du type II. Les chondrocytes deviennent fibroblastiques puis sénescents. Après l'étape d'amplification, il est donc indispensable de redifférencier les chondrocytes. Différentes stratégies peuvent alors être employées. L'utilisation de la BMP-2 a montré d'excellents résultats chez les chondrocytes articulaires équins, en favorisant, notamment, la synthèse de collagène de type II (Rakic *et al.*, 2017). Cependant cette augmentation a été fortement corrélée avec une augmentation concomitante de la synthèse de collagène de type I, atypique du cartilage hyalin, ne permettant pas de générer un substitut cartilagineux de type hyalin. Dans d'autres études, les chercheurs ont combiné la BMP-2 avec de l'insuline et de la triiodothyronine pour obtenir un effet redifférenciant optimal, alors que la phase d'amplification cellulaire a été réalisée en présence de FGF-2 et d'insuline. Après redifférenciation par culture en 3D, le ratio *COL2A1/COL1A1* représentant la qualité

de la matrice était très significativement augmenté (Claus *et al.*, 2012). Au cours des travaux réalisés sur les chondrocytes articulaires équins et humains, nous avons montré que les Promérim®, et particulièrement le Promérim® 30, étaient capables d'augmenter le *ratio COL2A1/COL1A1*. De plus, cet effet a été observé en présence des hydrolysats seuls, mais aussi avec la BMP-2 avec un effet additif. Ainsi, l'utilisation des hydrolysats de collagènes (Promérim®) pourrait s'avérer être pertinente en combinatoire avec de la BMP-2 pour maintenir les chondrocytes différenciés ou favoriser leur redifférenciation. Le Promérim® 40 augmente la prolifération, favorise le comblement de blessure *in vitro* et limite la sénescence alors que les Promérim® 30 et 60 semblent favoriser davantage la différenciation avec la synthèse de collagène de type II, notamment, l'amélioration du *ratio Col2a1/Col1a1* et stabilisant un phénotype plutôt mature, bien que la synthèse du collagène de type I soit accrue. Ainsi, les Promérim® pourraient permettre de favoriser la prolifération et de limiter la dédifférenciation des chondrocytes lors de l'étape d'amplification, et de favoriser leur redifférenciation, en combinaison avec un mode de culture pro-chondrogénique (matrice 3D, hypoxie, facteurs de croissance chondrogéniques).

Globalement, chaque Promérim® a montré des résultats intéressants avec des effets divers, tant sur l'activité métabolique mitochondriale, la survenue de la sénescence que sur la différenciation. Nous avons vu qu'en condition hypoxique, en présence de 2% de sérum, l'activité métabolique mitochondriale des eAC augmentait en présence du Promérim® 30 pendant 72 h de traitement alors que cette dernière augmente après 24 h et 72 h avec les Promérim® 40 et 60. À fortes concentrations, le Promérim® 30 diminue aussi la survenue de la sénescence, effet qui est moins marqué pour le Promérim® 40. N'ayant pas encore décrypté les voies de signalisations activées par les Promérim®, les cibles des peptides contenus dans les différents Promérim® peuvent posséder des modes d'action et des voies de signalisation différents. Nous pouvons alors nous poser la question d'un éventuel effet additif ou synergique de l'utilisation combinatoire Promérim® 30/ Promérim® 40. Nous pourrions espérer un effet à minima additif entre les hydrolysats augmentant ainsi le potentiel prolifératif des chondrocytes, tout en amplifiant la redifférenciation, et notamment, les ratios *Col2a1/Col1a1* et *Col2a1/Col1a2*. Des études complémentaires aux travaux réalisés ici pourraient alors être envisagées afin d'évaluer ces effets et identifier plus précisément les peptides, matrikines et voies de signalisations mises en jeu par ces hydrolysats.

La stratégie d'interférence par l'ARN via l'utilisation de siARN a aussi été employée afin d'inhiber l'expression génique des facteurs non spécifiques du cartilage surexprimés dans l'arthrose (tels que le collagène de type I ou la protéase à sérine Htra1) à travers une régulation post-transcriptionnelle et ainsi obtenir des chondrocytes possédant un phénotype mature. Cependant, malgré l'effet inhibiteur des siARN, l'expression du collagène de type I par les chondrocytes articulaires équins persistait. Des miARN, ayant un spectre d'action plus large puisqu'ils peuvent réguler plusieurs dizaines d'ARNm cibles impliqués dans un même processus biologique, permettent également d'inhiber l'expression de gènes spécifiques, et ainsi affecter le phénotype chondrocytaire (Bartel, 2009). Lors de la chondrogenèse induite par la BMP-2 et régulée par des facteurs de transcription tels que Sox9, différents miARN ont été identifiés comme possédant des fonctions favorisant le développement de l'arthrose et pourraient servir de biomarqueurs arthrosiques, il s'agit des miARN 199a, 145, 181b et 23b (Lin *et al.*, 2009 ; Yang *et al.*, 2011 ; Song *et al.*, 2013 ; Ham *et al.*, 2014). Ces miARN sont aussi retrouvés chez le modèle équin et possèdent des séquences extrêmement bien conservées (entre 80 et 100%) (Kiezun *et al.*, 2012). Il serait peut-être pertinent d'envisager l'utilisation d'antagomirs ciblant ces miRNA, ce qui pourrait permettre d'augmenter la nature hyaline de la MEC néo-synthétisée dans nos organoïdes cartilagineux.

Utiliser des chondrocytes articulaires autologues en thérapie cellulaire et en ingénierie tissulaire du cartilage s'avère donc compliqué tant qu'il ne sera pas possible, soit d'annihiler la dédifférenciation lors de l'étape d'amplification en monocouche, soit de les redifférencier en chondrocyte articulaire hyalin mature, avec un phénotype stabilisé. D'autres sources cellulaires et/ou stratégies de redifférenciation à base de cellules souches mésenchymateuses (CSM) adultes peuvent être envisagées.

4. Les cellules souches mésenchymateuses comme source cellulaire

L'utilisation des CSM peut s'avérer une alternative pertinente et intéressante sous plusieurs aspects. Dans un premier temps, la capacité proliférative et la multipotence qui les caractérisent sont deux éléments primordiaux afin de générer un nombre conséquent de chondrocytes. De nombreuses sources de CSM ont d'ailleurs été étudiées afin de les différencier en chondrocytes. On retrouve ainsi les CSM de

moelle osseuse (Da Silva Meirelles *et al.*, 2006), du sang périphérique (Fu *et al.*, 2013), du tissu adipeux (Zuk *et al.*, 2001), des muscles squelettiques (Iwata *et al.*, 1993), de la pulpe dentaire (Hilkens *et al.*, 2013), du placenta (Anker *et al.*, 2004), de la synovie (Arufe *et al.*, 2010) ou du cordon ombilical (Erices *et al.*, 2000). Cependant, ces sources de CSM ne présentent pas des propriétés équivalentes. En vue d'une thérapie tissulaire du cartilage, l'acte de prélèvement ainsi que l'invasivité du prélèvement est bien évidemment un facteur important ; ainsi des CSM issues du cordon ombilical (provenant du sang ou du tissu conjonctif (gelée de Wharton)) seront plus aisées à prélever que des CSM de synovie ou de muscle squelettique. Ensuite, plusieurs études ont montré que les CSM ne possédaient pas toutes le même potentiel de différenciation bien que répondant aux critères de l'ISCT (International Society for Cellular Therapy). Les CSM doivent ainsi répondre aux critères suivants : capacité d'adhésion au plastique, forte capacité d'auto-renouvellement et donc de prolifération, expression d'un panel de marqueurs de surface membranaire permettant un immunophénotypage et enfin la multipotence des CSM (Horwitz *et al.*, 2005 ; Dominici *et al.*, 2006). Ainsi, des CSM issues du sang de cordon ombilical équin n'ont pas les mêmes capacités de différenciation que les CSM de gelée de Wharton (Rakic *et al.*, 2018). Les CSM de moelle osseuse ont, en revanche, une capacité de différenciation chondrogénique similaire à celle de sang de cordon, mais une capacité supérieure à celle des CSM issues du tissu adipeux (Contentin *et al.*, 2020 ; Baksh *et al.*, 2007 ; Kern *et al.*, 2006 ; Ronzière *et al.*, 2010). Lorsqu'elles sont cultivées dans des billes d'alginate en présence de TGF β 1, les CSM issues de moelle osseuse après deux semaines de traitement expriment 12 fois plus de collagène de type II que les CSM issues de tissu adipeux (Mehlhorn *et al.*, 2006). De nombreux protocoles de différenciation ont été mis au point afin d'optimiser la différenciation chondrocytaire et assurer le maintien d'un phénotype mature. Ainsi la BMP-2, la BMP-7, le TGF β 1, le TGF β 3, le FGF-2, la dexaméthasone ont été employés largement par d'autres équipes (Chubinskaya *et al.*, 2011 ; Gründer *et al.*, 2004). De plus, les combinaisons utilisées pour favoriser la différenciation chondrocytaire sont aussi extrêmement nombreuses, telles que la réalisation de cultures dans un microenvironnement hypoxique, au sein de différents biomatériaux, ou encore, subissant des stimulations mécaniques. Il existe donc une multitude de combinaisons possibles afin d'optimiser la différenciation des CSM en chondrocytes matures. Ces combinaisons sont bien évidemment propres à chaque source de CSM. C'est dans ce contexte que les hydrolysats de collagènes

pourraient jouer un rôle essentiel. En effet, nous avons montré qu'ils sont capables d'augmenter la synthèse des protéines typiques du cartilage telles que le collagène de type II, mais aussi, de limiter les facteurs de dégradation comme les MMP et HtrA1. Les Promérim® pourraient donc faciliter la différenciation chondrocytaire en induisant la différenciation des CSM en chondrocytes matures et favoriser l'homéostasie tissulaire. De plus, ils pourraient stabiliser leur phénotype car nous n'avons pas observé d'augmentation de la synthèse de marqueurs hypertrophiques ou osseux étudiés (tels que le facteur de transcription Runx2 activant l'expression de l'ostéocalcine, l'ostéopontine, ou encore le collagène de type X et la MMP-13). Des essais *in vitro* devraient, dans un premier temps, être menés sur ces CSM de moelle osseuse (le « gold standard » parmi les CSM) avec différentes combinaisons de traitement et dans un environnement optimal de différenciation (en hypoxie couplée à une culture tridimensionnelle et différents facteurs de croissance tels que les BMP et les TGF- β 1 et/ou 3). Des peptides de collagènes issus du Mahi Mahi (*Coryphaena hippurus*) ont déjà été utilisés dans la littérature afin de différencier des CSM et ostéoblastes (Elango *et al.*, 2019). Des hydrogels d'acide hyaluronique couplés à des peptides de collagènes ont permis d'induire la différenciation de CSM de moelle osseuse en chondrocytes et de maintenir leur phénotype chondrocytaire (Ren *et al.*, 2020).

Dans un second temps, des expérimentations prometteuses de co-culture chondrocyte/CSM directe et indirecte ont aussi été employées dans la littérature afin de déterminer le potentiel de chaque type cellulaire à induire ou maintenir un phénotype chondrocytaire mature. Lorsque les chondrocytes sont co-cultivés avec des CSM, le phénotype des chondrocytes reste plus stable, comme en témoignent l'augmentation des synthèses du collagène de type II, des GAG dans le milieu de culture ainsi que celle du facteur de transcription Sox9 (De Windt *et al.*, 2015). Ces éléments sont aussi à prendre en compte afin de générer un néo-tissu *in vitro*. Nous pouvons ainsi nous appuyer sur les résultats obtenus sur les chondrocytes avec les hydrolysats pour expérimenter l'ajout de ces derniers sur des co-cultures de chondrocyte/CSM. En effet, si les Promérim® pourraient permettre l'initiation de la différenciation chondrocytaire des CSM, ils peuvent aussi en changer les sécrétions exosomales avec des nanovésicules extracellulaires aux contenus différents et potentiellement plus efficaces sur les chondrocytes.

Enfin, dans un troisième temps, les CSM sécrètent des nanovésicules extracellulaires (nVE), communément appelées exosomes qui, lorsqu'ils sont utilisés sous forme de milieux conditionnés, permettent d'envisager un effet synergique sur la différenciation chondrocytaire. En effet, les CSM sécrètent des facteurs trophiques, notamment des cytokines et des facteurs de croissance (Meirelles *et al.*, 2009), des microvésicules (Bruno *et al.*, 2009), et des exosomes (Lai *et al.*, 2010). Ce sont *in fine* ces sécrétions qui possèdent un fort potentiel permettant de rétablir l'homéostasie cartilagineuse lorsqu'elles sont au contact des chondrocytes. Les milieux conditionnés à partir de CSM ont d'ailleurs déjà montré une diminution de la dégradation de la MEC lors de l'arthrite inflammatoire *in vitro* (Kay *et al.*, 2017). Les milieux conditionnés et les exosomes sont donc à eux seuls des candidats potentiels afin de traiter et redifférencier des chondrocytes arthrosiques. Les hydrolysats de collagènes pourraient avoir un double emploi dans cette stratégie. Il serait envisageable de « primer » (activer le potentiel immunomodulateur) les CSM avec des hydrolysats de collagène afin de favoriser des sécrétions à fort potentiel chondrogénique qui se retrouveraient dans le milieu de culture. En effet, nous avons étudié l'effet des Promérim® seuls et avons pu observer qu'ils avaient des effets favorisant la différenciation (synthèse de collagène de type II) et le maintien du phénotype chondrocytaire et de l'homéostasie (diminution des protéases étudiées telles que les MMP et une absence d'induction des facteurs hypertrophiques tels que le collagène de type X). Une fois le milieu conditionné réalisé et appliqué sur des cultures de chondrocytes, ce milieu couplé à un nouvel ajout d'hydrolysats de collagène pourrait assurer la différenciation des chondrocytes et assurer la stabilisation du phénotype mature. Nous pouvons alors espérer observer un effet additif entre les milieux conditionnés et les matrikines contenues dans les hydrolysats. De plus, le priming des CSM indifférenciées, habituellement réalisé avec des cytokines (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α) pour augmenter le potentiel thérapeutique de leur sécrétome, pourrait être envisagé avec les Promérim®, ce qui pourrait augmenter les effets immunomodulateur, immunosuppresseur, anti-inflammatoire et anti-fibrotique des cellules souches. Il se pourrait également, dans le contexte d'approches thérapeutiques acellulaires (« cell-free »), que les nanovésicules extracellulaires de CSM primées par les Promérim® puissent augmenter la prolifération des chondrocytes tout en empêchant leur sénescence lors de la phase d'amplification des chondrocytes indispensable dans les approches de thérapie cellulaire et d'ingénierie du cartilage. Ceci semble envisageable

d'après nos études, dans la mesure où nous avons systématiquement montré que les Promérim® favorisent l'activité métabolique des chondrocytes articulaires humains et équins, et par ailleurs certains d'entre eux préviennent la sénescence de ces mêmes cellules.

Ce projet de recherche de thérapie « cell-free » a pour objectif le développement de nouveaux traitements des affections cartilagineuses permettant une meilleure prise en charge des lésions chondrales avec une composante inflammatoire, en diminuant ainsi, le risque de survenue d'arthrose. L'utilisation de cellules souches mésenchymateuses ou de leurs nVE sous forme d'injections intra-articulaires pour des effets préventif et/ou réparateur, immunomodulateur, immunosuppresseur, anti-inflammatoire et antalgique liés à leur sécrétome (initiée dans les projets de l'unité Biotargen, HIPPOCART1bis et EQUITEM) pour restaurer le cartilage constitue une approche thérapeutique originale et innovante. Il est envisagé que cette approche soit validée chez le cheval comme essai pré-clinique pour l'Homme et développée en essai clinique en médecine équine confrontée aux mêmes difficultés thérapeutiques pour le cheval athlète. Cette stratégie envisagée dans le projet qui s'intitule NANOVEXSTEM constitue une alternative particulièrement intéressante pour lutter contre l'arthrose pour laquelle aucun traitement curatif spécifique n'est disponible à ce jour en médecines équine et humaine. L'objectif principal sera de mettre en place une technologie par thérapie acellulaire à base de nVE qui permettra de prévenir l'arthrose et éventuellement mettre au point un traitement curatif de cette arthropathie tout en s'affranchissant du problème de rejet contre le greffon.

Le projet NANOVEXSTEM est envisagé car les résultats préliminaires obtenus dans le programme HIPPOCART1bis (études de tolérance de l'injection allogénique de CSM-MO et de SCO) - montrent que les cellules souches équines peuvent être utilisées pour les mêmes propriétés que celles décrites chez l'Homme et - valident le modèle expérimental chez le cheval. Les résultats d'EQUITEM (étude d'efficacité, [Bertoni et al., 2019, 2020, 2021](#)), même s'ils sont encore à conforter par les travaux en cours et à venir, ont permis de démontrer, en traitement préventif, l'effet bénéfique potentiel de l'utilisation de CSM-MO dans la prise en charge de l'arthrose chez le cheval dans un modèle expérimental. Des résultats préliminaires démontrent par ailleurs la faisabilité de l'approche envisagée avec les nVE, puisqu'avec 2 souches de CSMs-MO équines, nous avons réalisé des expériences de Nanosight® et de

cytométrie en flux. Nous avons ainsi purifié des vésicules extracellulaires ayant une taille comprise entre 30 et 150 nm (communément appelées "exosomes") à partir de milieux conditionnés de cultures de CSM à une concentration de $1,35 \times 10^9$ particules/ml à $2,68 \times 10^9$ particules/mL. L'analyse de cytométrie en flux utilisée afin de mettre en évidence la présence de protéines membranaires spécifiques des exosomes de la famille des tétraspanines (CD9, CD63, CD81 et CD82), tout comme l'analyse des protéines intra-exosomale Alix et Tsg101 signant l'origine endosomale des nanoparticules sont en cours.

5. Les nouveaux outils de culture cellulaire

Dans le but de se rapprocher le plus possible du microenvironnement *in vivo* des chondrocytes, de nombreuses nouveautés technologiques permettent d'optimiser et de contrôler le microenvironnement au sein duquel ils évoluent *in vitro*. Les bioréacteurs et les systèmes microfluidiques sont des environnements de culture cellulaire confinés dans un réservoir ayant la forme d'une cuve, d'un flacon ou même de canaux, reliés à des entrées et des sorties permettant un apport continu des nutriments. Un bioréacteur peut être décrit comme un dispositif ou un système dynamique pour la culture de cellules ou

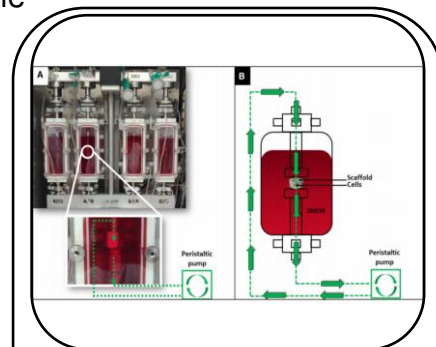


Figure 37 : Exemple de culture 3D en bioréacteur.

Les bioréacteurs permettent de cultiver des biomatériaux ou des cellules en leur assurant en contrôle total de l'environnement : disposition et renouvellement des nutriments, condition oxygène, ... De plus, ils sont capables d'induire des forces de compression ou de cisaillement.
D'après Pedrini *et al.*, 2020.

de tissus en suspension, en 2D ou 3D, dans des conditions biochimiques ou mécaniques contrôlées (figure 37). Les bioréacteurs et les systèmes microfluidiques sont conçus pour remplir au moins une des fonctions suivantes : assurer une distribution uniforme des cellules, maintenir une concentration constante et optimisée de gaz et de nutriments, effectuer le transport de masse vers les tissus, ou encore, augmenter l'évolution des tissus néosynthétisés par l'application de stimuli physiques. Ces dispositifs permettent donc de contrôler le microenvironnement, les apports en nutriments et les conditions oxygènes appliquées aux chondrocytes (Mayer *et al.*, 2016). L'application de stimuli physiques, forces de compression, de cisaillement sont aussi des éléments que l'on retrouve *in situ* pouvant moduler les réponses cellulaires et par

conséquent optimiser la différenciation en chondrocytes matures. En effet, des contraintes mécaniques permettent d'une part d'augmenter la diffusion des nutriments au sein du tissu, mais aussi d'orienter les fibres des collagènes de la MEC au plus proche de l'organisation que l'on retrouve *in vivo*.

Le but de l'ingénierie tissulaire du cartilage est d'implanter un tissu néosynthétisé au niveau des régions cartilagineuses lésées. Il est maintenant envisageable de synthétiser, soit un biomatériau, soit une structure cellulaire tridimensionnelle conforme à la lésion grâce à l'impression 3D (figure 38). De telles imprimantes permettent, à partir de cellules, d'assurer un assemblage qui faciliterait l'implantation du substitut. Cependant à ce jour aucun tissu cartilagineux bio-imprimé n'est encore en essai thérapeutique et de nombreuses limites subsistent. La première limite étant la qualité et la quantité des cellules nécessaires à la création d'un tel tissu, puis la taille et le volume du tissu ainsi que la structure servant de support aux cellules. Enfin, le maintien du tissu généré reste extrêmement limitant et ces approches sont toujours considérées comme des médicaments de thérapies innovantes.



Figure 38 : Exemple d'imprimante cellulaire 3D.

Les imprimantes 3D sont capables de synthétiser une structure tridimensionnelle définie à partir de cellules ou encore de générer à façon des biomatériaux.

II. Les hydrolysats de collagènes (Promérim®), complément alimentaire pertinent contre l'arthrose ?

1. Différences entre les chondrocytes humains et équins

De manière générale, les résultats obtenus sur les chondrocytes équins sont semblables à ceux obtenus sur les chondrocytes humains. Nous avons montré une augmentation de l'activité métabolique ainsi qu'une diminution de la sénescence. Les hydrolysats semblent sur les deux espèces, Homme et cheval, diminuer l'expression des transcrits des métalloprotéases et augmenter l'expression des transcrits et des taux protéiques des collagènes de type I (de manière systématique pour cet isotype) et de type II. Cependant, nous avons observé que les résultats sont plus significatifs chez le modèle équin que chez l'humain avec une plus large variabilité intersouche chez l'Homme.

Pour tenter d'expliquer ces différences, nous pouvons revenir aux différentes sources cellulaires et modèles de chondrocytes. Les chondrocytes équins et humains sont isolés par digestion enzymatique (collagénase) selon le même protocole. En revanche, les chondrocytes équins sont issus de biopsies obtenues à partir de sujets jeunes (généralement entre 3 et 7 ans (soit une estimation d'entre 9 et 21 ans chez l'Homme)). Les articulations ne présentent aucun signe d'arthrose et ont un aspect blanc nacré (figure 39). Au contraire, les chondrocytes articulaires humains sont issus des têtes fémorales arthrosiques isolées



Figure 39 : Prélèvements de cartilage équin.

Les copaux de cartilage sont découpés en fines lamelles avant d'être digérés par la collagénase.



Figure 40 : Prélèvements de cartilage humain.

Le cartilage visuellement « sain » des têtes fémorales issues de pose de prothèses est récupéré et les chondrocytes sont isolés par digestion enzymatique.

de patients ayant subi une chirurgie prothétique, le plus souvent une prothèse de hanche (figure 40). Les prélèvements de ces chondrocytes sont réalisés sur les zones cartilagineuses non portantes et visuellement saines des têtes fémorales. Néanmoins, le phénotype des chondrocytes est arthrosique, puisqu'ils ont évolué au contact d'un liquide synovial inflammatoire, riche en cytokines pro-inflammatoires. En effet, la pose de prothèse de hanche est réalisée chez des patients âgés en moyenne de 67 ans, en France. Comme décrit précédemment, les chondrocytes arthrosiques subissent de nombreuses modifications, qui sont induites par les micro-lésions et les nombreuses cytokines, telles que la modification de la prolifération, de l'autophagie, la mort cellulaire et la perte de l'homéostasie matricielle du tissu (Sandell & Aigner, 2001). Des facteurs contrôlant la dégradation de la MEC tels que l'IL-1 β et le TNF- α sont synthétisés et induisent la sécrétion par les chondrocytes d'enzymes telles que les métalloprotéases dégradant la MEC, de la PGE₂, ou encore, du monoxyde d'azote, ainsi que diverses interleukines comme l'IL-6 ou -8 (Attur *et al.*, 1998 ; Dayer *et al.*, 1985). De plus, l'IL-1 est capable d'inhiber la synthèse des collagènes ou encore de l'agrécanne (Pfander *et al.*, 2004 ; Goldring *et al.*, 1988), molécules typiques du cartilage articulaire hyalin. Ces éléments sont importants à prendre en compte car, bien que l'on prélève des chondrocytes dans des zones non portantes de l'articulation, d'apparences saines, ils évoluent et baignent dans un environnement pro-inflammatoire, affectant déjà leur phénotype, ce qui constitue la différence la plus importante entre les chondrocytes articulaires humains et équins employés dans notre étude.

2. Mort cellulaire et sénescence

La mort cellulaire occupe une place majeure dans le remodelage tissulaire et le maintien de l'homéostasie des tissus. Elle est inhérente aux lésions tissulaires (Greenhalgh, 1998). En effet, lors de lésions tissulaires, diverses cellules convergent vers la lésion. Parmi ces cellules, il y a des macrophages, des neutrophiles, des lymphocytes et diverses autres cellules nécessaires pour amorcer la réparation des tissus. Une fois la guérison résolue, ces cellules en surplus sont éliminées et meurent par apoptose (Greenhalgh, 1998).

Le cartilage articulaire est un tissu hautement spécialisé, majoritairement composé de MEC synthétisée par les chondrocytes, présents en faible proportion. Les

chondrocytes articulaires résultent de la différenciation de progéniteurs mésenchymateux. Les chondrocytes peuvent également se différencier en chondrocytes hypertrophiques puis générer une plaque de croissance ou alors à l'âge adulte mourir par apoptose. L'étude des facteurs tels que RUNX2 et RUNX3 ou encore le collagène de type X, marqueurs d'une évolution du chondrocyte mature vers le phénotype hypertrophique devient alors majeure afin de limiter la perte, la mort des chondrocytes par apoptose (Park *et al.*, 2016 ; Rabie *et al.*, 2004). La prévalence de l'arthrose augmente avec l'âge, ceci pourrait être dû à la réduction du nombre de chondrocytes présents au sein du tissu cartilagineux (Adams & Horton, 1998). Les chondrocytes, bien qu'ayant un potentiel de réparation intrinsèque limité, se retrouvent alors en nombre insuffisant pour régénérer et remodeler le tissu cartilagineux, bouleversant l'homéostasie et l'intégrité du tissu ; de plus, ils possèdent une faible activité anabolique (Adams & Horton, 1998). L'hypocellularité est d'ailleurs observée dans les stades avancés d'arthrose, cependant, le taux de chondrocytes apoptotiques dans un tissu arthrosique demeure discuté allant de 1% à 20% contre 1 à 3% dans le cartilage sain (Aigner *et al.*, 2001 ; Heraud *et al.*, 2000). L'apoptose des chondrocytes pourrait être due à une perte de l'ancrage des chondrocytes à la MEC. En effet, lorsque l'on traite enzymatiquement des explants cartilagineux en ciblant spécifiquement le collagène de type II *in vitro*, qui est lié au chondrocyte par l'intermédiaire d'intégrines, une augmentation de l'apoptose chondrocytaire est observée (Kim *et al.*, 2001). Les chondrocytes sont en effet ancrés à la MEC grâce à des intégrines qui assurent le lien cellule/matrice. La destruction de ces intégrines sur des cultures de sternum de poussin induit une grave dégradation du cartilage, une augmentation de l'expression des MMP-2 et 3, une augmentation des chondrocytes apoptotiques et une diminution de la présence de GAG (Pulai *et al.*, 2002 ; Zemmyo *et al.*, 2003). L'IL-1, la principale cytokine intervenant dans la dégradation du cartilage, diminuerait la viabilité des chondrocytes chez certaines espèces animales (Schuerwegh *et al.*, 2003). Cependant, l'IL-1 seule ne parvient pas à induire la mort des chondrocytes humains (Blanco *et al.*, 1995 ; Kuhn *et al.*, 2000). Le rôle du TNF- α n'est pas encore clairement démontré dans l'apoptose chondrocytaire, cependant, TRAIL (« Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand ») provoque, quant à lui, directement la mort des chondrocytes par apoptose (Pettersen *et al.*, 2002). Il a été démontré que, sur des chondrocytes humains, les récepteurs de TRAIL DR4 et DR5 modulent l'apoptose des

chondrocytes. Par ailleurs, l'expression de ces récepteurs est fortement augmentée lorsque des chondrocytes murins deviennent arthrosiques (Lee *et al.*, 2004).

Les mitochondries jouent un rôle majeur dans le processus arthrosique. Chez des chondrocytes arthrosiques, une diminution significative de l'activité de la chaîne de transport des électrons mitochondriaux dans les complexes II et III, en plus d'une diminution du potentiel de la membrane mitochondriale, a été démontrée (Maneiro *et al.*, 2003). La dépolarisation des mitochondries entraîne la libération de facteurs apoptotiques, tels que le cytochrome c, le facteur d'apoptose et la caspase-9, de l'espace inter-membranaire mitochondrial vers le cytoplasme et conduit à l'apoptose, qui est augmentée par des espèces réactives d'oxygène (ROS) intracellulaires (Grishko *et al.*, 1999). Les mitochondries pourraient aussi être une potentielle cible thérapeutique dans le traitement de l'arthrose. Nous avons observé au cours de notre étude que les Promérim® 30, 40 et 60 augmentent significativement, à différents temps de traitements, l'activité métabolique mitochondriale. Au vu de ces résultats obtenus et du rôle central des mitochondries au sein des chondrocytes, il serait intéressant de les étudier plus en détail. Une étude plus approfondie de l'apoptose, notamment de la voie intrinsèque, pourrait être intéressante. Cette voie résulte d'un équilibre subtil entre des facteurs pro-apoptotiques Bax et Bak et anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-xl. La voie intrinsèque mitochondriale va ainsi libérer le cytochrome-c qui ira former l'« apoptosome » constitué de cytochrome-c/Apaf1/procaspase-9. La caspase 9 une fois active pourra alors activer un ensemble de caspases dont la caspase 3 amenant ainsi l'apoptose. Une culture en condition hypoxique des chondrocytes en 2D devrait permettre d'émettre, dans un premier temps, une réponse à cette potentielle modulation.

La sénescence est un processus se résumant à une dégradation progressive des fonctions cellulaires à l'origine du vieillissement. Nous avons montré, chez les modèles équin et humain au cours de notre étude que les Promérim®, notamment le Promérim® 30 et, dans une moindre mesure, le Promérim® 40, permettaient de diminuer les taux de SA- β -galactosidase. La SA- β -galactosidase est associée aux phénomènes de sénescence, car il a été démontré que la progression d'une cellule dans le processus de sénescence était étroitement associée à une augmentation continue du taux de SA- β -galactosidase (Hall *et al.*, 2016). Les cellules sénescents sécrètent une large variété de cytokines inflammatoires, de facteurs de croissance et de nombreux autres facteurs solubles et insolubles connus sous le nom de

« senescence-associated secretory phenotype » (SASP) (Campisi, 2005), ou « senescence-messaging secretome » (SMS) (Kuilman & Peiper, 2009). Les cellules sénescents se servent de ces SASP pour communiquer avec les cellules voisines et l'ensemble du microenvironnement. Cela induit la sénescence des cellules voisines (Acosta *et al.*, 2008). Cette communication se traduit par une production accrue du VEGF. Le VEGF est exprimé dans le cartilage arthrosique et contribue ainsi à la néovascularisation du tissu initialement avasculaire ; le VEGF aura aussi pour effet d'augmenter la présence d'ostéophytes suite à la progression de l'arthrose (Pfander *et al.*, 2001 ; Hashimoto *et al.*, 2002 ; Enomoto *et al.*, 2003). Le SASP augmente la production des MMP-1 et -13, métalloprotéases présentes et surexprimées lors du processus arthrosique, responsables de la dégradation de la MEC (Philipot *et al.*, 2014). L'obésité qui est connue pour être un facteur de risque de l'arthrose, au-delà des contraintes mécaniques évidentes subies par les articulations, est associée à une accumulation accrue des cellules sénescents et des facteurs SMS (Schafer *et al.*, 2016 ; Tchkonja *et al.*, 2010). Lors de l'arthrose, la sénescence des chondrocytes contribue donc à la perte de l'homéostasie du cartilage articulaire hyalin, par l'intermédiaire, *in fine*, de l'induction de l'activité des métalloprotéases en réponse aux SMS.

Les chondrocytes arthrosiques, comparativement aux chondrocytes sains, présentent ou expriment une variété de marqueurs associés à la sénescence tels que le raccourcissement des télomères (Martin & Buckwalter, 2001), la réponse aux dommages de l'ADN activé (DDR), la sécrétion de ROS, l'activité de SA- β -galactosidase (Price *et al.*, 2002), l'augmentation de l'expression de p16ink4a (Zhou *et al.*, 2004), l'accumulation de MMP, induite par des cytokines pro-inflammatoires (Billinghurst *et al.*, 1997 ; Shlopov *et al.*, 1997). Dans l'arthrose du genou, Gao et ses collaborateurs (2016) ont démontré une corrélation entre l'expression de SA- β -galactosidase et la gravité de la maladie chez les patients. Ils ont étudié les niveaux d'expression de SA- β -galactosidase dans un cartilage normal par rapport à un cartilage arthrosique de gravité différente (légère, modérée et sévère). Dans le cartilage articulaire normal, aucune coloration n'a été observée. Cependant, dans les lésions du cartilage du genou légèrement, modérément et sévèrement endommagé, ils ont observé la coloration de SA- β -galactosidase dans un sous-ensemble de chondrocytes proches de la lésion.

D'autres facteurs, tels que le stress mécanique ou encore le stress oxydatif, peuvent engendrer la sénescence (Martin *et al.*, 2004a ; Martin *et al.*, 2004b).

Lors de ces travaux de thèse, nous avons d'abord montré que les Promérim® ne sont pas toxiques pour les chondrocytes. Nous avons aussi montré que l'ajout d'hydrolysats de collagènes permet de diminuer la sénescence cellulaire des chondrocytes humains et équins. La viabilité des chondrocytes *in situ* s'avère être un enjeu majeur dans le traitement de l'arthrose. En complément des essais déjà réalisés, il pourrait être intéressant de réaliser un suivi *in vitro* et en temps réel de la SA- β -galactosidase grâce à un incucyte par exemple afin de confirmer et mieux appréhender l'effet des hydrolysats de collagènes sur la sénescence. De plus, il serait pertinent d'analyser différents facteurs tels que la caspase 9, les ROS, ou encore, de s'intéresser plus précisément aux mitochondries et leur lien avec l'apoptose.

3. Activité métabolique et test de blessure *in vitro*

Le cartilage articulaire est un tissu régi par une homéostasie résultant d'un équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme. Cette homéostasie est régulée par les chondrocytes. Cependant, les chondrocytes possèdent une activité anabolique faible. Ainsi, lorsqu'il s'agit de combler des lésions chondrales plus ou moins importantes, les chondrocytes ne peuvent assurer une synthèse suffisante de protéines typiques du cartilage. L'une des raisons est la faible activité métabolique des chondrocytes. Nous avons étudié l'activité métabolique mitochondriale des chondrocytes afin de définir si les hydrolysats de collagènes pouvaient induire un accroissement de cette activité, et ainsi, générer une quantité de MEC plus importante, afin d'envisager le comblement des lésions chondrales de surface. Lors de cette étude, nous avons réalisé des tests de blessures qui ont aussi montré que les hydrolysats de collagènes permettaient de combler des blessures sur un tapis cellulaire en monocouche. Cependant, diverses inconnues subsistent, les hydrolysats augmentent-ils la prolifération cellulaire, ou bien est-ce que les effets observés sont liés à l'augmentation de la migration afin de combler la lésion ? Augmentent-ils ces événements de manière concomitante ? Un « tracking » cellulaire pourrait alors être envisagé grâce à la technologie incucyte. Ainsi, nous pourrions suivre le comportement des chondrocytes au sein de la blessure et observer si nous y voyons un plus grand nombre de cellules non marquées, et donc conclure sans ambiguïté sur leurs effets sur la prolifération et/ou la migration des

cellules comblant ainsi la blessure. Une combinaison de ces deux possibilités peut aussi être envisagée, dans un premier temps une migration des chondrocytes environnant la blessure, puis une prolifération de ces chondrocytes afin de combler la blessure. Ainsi, des protéines pourraient être étudiées pour définir l'effet des Promérim® sur la migration. Par exemple, Ras qui régule l'expression génique, la prolifération, la différenciation et l'apoptose ; Rab (« Ras-related in brain ») qui régule le trafic vésiculaire intracellulaire ; Ran (« Ras-related in nuclear import and export ») qui régule le transport nucléocytoplasmique et l'organisation des microtubules lors de la mitose ; Rho qui régule le remodelage du cytosquelette.

Le dogme suggère que les chondrocytes du cartilage adulte ne migrent pas dans leur environnement d'origine en raison du réseau de collagène hautement tendu qui les entoure et qui donne lieu à une matrice hautement pressurisée (Morales, 2007). Cependant, la mobilité des chondrocytes a été rapportée par un petit nombre de publications (Henson *et al.*, 2005, Seol *et al.*, 2012) dans lesquelles il a été observé, qu'après que le cartilage articulaire de bovins ait été blessé par un choc violent, la zone lésée était recolonisée dans les 7 à 14 jours par des cellules qui semblaient migrer de la MEC environnante. Dans le cadre de lésions, une sous-population de chondrocytes avec des capacités migratoires pourrait émerger laissant apparaître différents types de chondrocytes. Cependant, le rôle fonctionnel des cellules chondrocytaire migratrices n'est pas clairement compris (Jiang *et al.*, 2014). En effet, dans l'étude de Seol *et al.* (2012), les cellules migratrices prélevées dans la zone de lésion du cartilage ont produit une deuxième population de cellules identifiées par cytométrie en flux, et ont exprimé des niveaux faibles de gènes de la MEC du cartilage, tels que le collagène de type II et l'aggrécane, par rapport à des chondrocytes sains. Les cellules migratrices sont donc prolifératives et présentent un phénotype différent des chondrocytes articulaires hyalins (Jiang *et al.*, 2014). Le cartilage traumatisé libère des facteurs chimioattractifs pour les cellules progénitrices chondrogéniques tels que le PDGF et l'IGF1, qui sont connus pour induire une importante réponse migratoire dirigée vers un site donné (Joos *et al.*, 2013). Cependant, en même temps, l'IL-1 β et le TNF- α sont libérés et ces cytokines inhibent l'activité migratoire qui pourrait contribuer au faible potentiel de régénération du cartilage *in vivo*. Nous avons observé au cours de notre étude que les Promérim® permettaient de combler des lésions chondrales et possédaient un effet potentialisé en présence de facteurs inflammatoires tels que l'IL-1 utilisé dans notre étude. Nous pouvons alors penser que les Promérim®

seraient un complément extrêmement intéressant dans le contexte d'un comblement de lésion par migration chondrocytaire. En effet, les Promérim® pourraient limiter la dégradation de la MEC, ce qui aura pour effet de diminuer la présence de fragments matriciels dans le liquide synovial. Il y aura donc moins de facteurs inflammatoires tels que les interleukines présentes. De plus, les hydrolysats de collagènes limitent les effets négatifs induits par l'ajout d'IL-1. Pour finir, les Promérim® améliorent le comblement des blessures lors d'un test *in vitro*. Tous ces éléments plaident en faveur d'un comblement des micro-lésions par migration et prolifération chondrocytaire.

4. Effets observés sur HtrA1

HtrA1 est une protéase à sérine très peu décrite dans la littérature. Son rôle paraît bien plus complexe qu'une simple protéase dégradant la MEC. Elle participe notamment à la différenciation ostéoblastique et ostéoclastique (Li & Zhang, 2015 ; Wu *et al.*, 2014), mais à l'inverse inhiberait la différenciation adipogénique des CSM (Tiaden *et al.*, 2016). Lors de l'évolution du processus arthrosique, HtrA1 contribue à la dégradation de la MEC en l'érodant et en activant des facteurs pro-cataboliques tels que les MMP-1 et -3. De plus, HtrA1 inhibe la voie de signalisation induite par le TGF- β en dégradant ses récepteurs ainsi que la voie de signalisation induite par la BMP-2. Nous avons montré que la culture tridimensionnelle augmente les taux de transcrits et protéiques d'HtrA1. Les hydrolysats de collagènes employés dans cette étude, tant le Promérim® 30 que le 40, induisent une diminution significative de ses transcrits, mais aussi, de ses taux protéiques. L'un des éléments les plus surprenants est que l'IL-1 diminue considérablement l'expression de la protéine HtrA1 chez les chondrocytes articulaires. Nous démontrons ceci pour la première fois. Cependant, ceci ne semble pas surprenant car il a été rapporté qu'une autre cytokine, l'IFN- γ , inhibe de manière significative l'expression basale et induite par le LPS d'HtrA1 dans les macrophages et les fibroblastes, deux types cellulaires principalement impliqués dans la synthèse d'HtrA1 dans le contexte de la polyarthrite rhumatoïde, par l'activation de la voie p38 MAPK et l'activation ultérieure ainsi que la liaison de STAT1 au niveau du promoteur HtrA1 (Hou *et al.*, 2014).

Nous avons notamment observé cela en « western-blot » lorsque les organoïdes étaient traités avec de l'IL-1, l'ensemble des souches traitées montrait

systématiquement une très forte diminution de l'expression de cette protéase à sérine. Nous nous attendions, au contraire, à ce que l'IL-1 augmente l'expression de cette protéase du fait du caractère inflammatoire et de la fonction de cette dernière. Ceci conforte le rôle ambivalent d'HtrA1, préalablement indiqué au début de ce paragraphe sur le métabolisme osseux, mais n'apparaît pas surprenant, par rapport aux travaux de Hou *et al.*, 2014 décrivant une diminution de l'expression basale d'HtrA1 en présence d'IFN- γ .

5. Les compléments alimentaires et l'arthrose

Les compléments alimentaires sont définis dans le décret n°2006-352 du 20 mars 2006 comme « des denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés, commercialisés sous forme de doses, à savoir les formes de présentation telles que les gélules, les pastilles, les comprimés, les pilules et autres formes similaires, ainsi que les sachets de poudre, les ampoules de liquide, les flacons munis d'un compte-gouttes et les autres formes analogues de préparations liquides ou en poudre destinées à être prises en unités mesurées de faible quantité ».

Les compléments alimentaires indiqués pour l'arthrose inondent le marché, on dénombre plus de 1550 compléments référencés pour les articulations. Ils ont pour vocation de venir compléter une éventuelle carence due à un déficit alimentaire. De nombreux composants de ces compléments ont été étudiés en phytothérapie et oligothérapie. Cependant, depuis 2012, les autorités sanitaires européennes ont interdit aux entreprises commercialisant des compléments alimentaires contenant de la chondroïtine-sulfate et de la glucosamine de prétendre soutenir la mobilité des articulations, aider à garder les genoux et autres articulations souples et flexibles, ou être un composant important du métabolisme des articulations ou de la bonne santé des articulations. Ces allégations de santé sont désormais interdites. En effet, les effets et les modes d'action des différents compléments alimentaires ne sont pas encore clairement définis, tout comme la bio-disponibilité des compléments alimentaires présents sur le marché. Aucun des compléments alimentaires prescrits

pour l'arthrose ne permet de régénérer-resynthétiser un cartilage de type hyalin. Au mieux, ils permettent de limiter la dégradation du cartilage ou l'inflammation.

La démarche entreprise dans ces travaux de thèse a permis d'amorcer l'étude des différents effets et modes d'action en s'intéressant, d'une part, à différents indicateurs de la viabilité chondrocytaire, mais aussi, en analysant un large panel de transcrits et de protéines typiques et atypiques du cartilage. Il serait à présent nécessaire de caractériser davantage les peptides présents dans les hydrolysats marins et leurs modes d'action. En ce sens, des analyses de spectrométrie de masse ont été initiées. Ces travaux ont différents objectifs. Dans un premier temps, ils servent de contrôle qualité s'assurant de la composition peptidique de chaque hydrolysat issu de différentes productions. Dans un second temps, il s'agit d'identifier l'ensemble des peptides présents dans l'hydrolysat et ensuite de définir si un hydrolysat possède un effet bien spécifique ou s'il s'agit de l'effet d'un ensemble contenu dans les hydrolysats. Ces prochaines étapes permettraient d'identifier les voies de signalisation potentiellement induites par les différents peptides (agissant sur la sénescence, la prolifération ou bien la synthèse du collagène de type II ou du type I). Ceci permettrait aussi de synthétiser les peptides correspondant aux effets désirés, afin de cibler plus finement les effets recherchés (dans notre cas, l'effet le plus important recherché étant la synthèse de collagène de type II).

6. La biodisponibilité des hydrolysats de collagènes

Les hydrolysats de collagènes utilisés dans notre étude ont pour but d'être administrés *per os*. Ceci soulève de nombreuses questions dont la plus importante : quelle proportion des hydrolysats administrés parvient réellement aux chondrocytes et en quelle quantité ?

En passant par le tractus gastro-intestinal, tout médicament rencontre une série de barrières avant d'atteindre les capillaires du tissu sous-épithélial. Les principales barrières sont le milieu gastrique et intestinal, la barrière de mucus, les jonctions serrées (« tight junctions ») bloquant le passage péricellulaire, les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal, et, enfin, le tissu sous-épithélial. Après avoir été administré par voie orale, un médicament de nature peptidique rencontrera une série d'enzymes digestives, dont l'action est de dégrader les macromolécules en nutriments

absorbables (Kiela & Ghishan, 2016). Cependant, les compléments alimentaires utilisés dans cette étude comportent une capsule limitant cette dégradation enzymatique, assurant ainsi une libération des peptides au niveau des sites d'absorption. La barrière gastro-intestinale permet donc un potentiel passage des peptides par deux voies, la première, les jonctions serrées, ou directement par l'intermédiaire des cellules de l'épithélium.

Les jonctions serrées sont des liaisons entre les cellules épithéliales adjacentes qui limitent le flux péricellulaire d'eau, d'ions et de solutés (Artursson & Knight, 2015 ; Turner *et al.*, 2014). Les jonctions serrées séparent les membranes basolatérales et apicales des cellules épithéliales et contribuent à maintenir les barrières tissulaires épithéliales et endothéliales ainsi que la polarité des cellules. Ces jonctions, hors modulation de leur structure par l'intermédiaire, par exemple, de la myosine (MLCK) (Turner *et al.*, 2014 ; Eto, 2009) restent assez perméables. Cependant, des peptides de petites tailles (maximum 3 acides aminés) peuvent passer au travers (Pappenheimer *et al.*, 1994). Les peptides peuvent aussi diffuser au travers des entérocytes par l'intermédiaire de transporteurs tels que PEPT1 ou encore OATP ou PHT1 (Terada *et al.*, 2005). L'absorption des peptides supérieurs à 3 acides aminés est également possible par des phénomènes de transcytose, ou encore, par voie péricellulaire (Shimizu *et al.*, 1997). Les peptides contenus dans les Promérim® ont une taille variable allant de deux acides aminés à maximum 15 acides aminés. La majorité des peptides étant de très petite taille, ils sont plus facilement absorbés par l'organisme.

Les peptides absorbés se retrouvent alors dans le système circulatoire sanguin et doivent encore franchir la membrane synoviale au niveau des sites articulaires afin de diffuser passivement par la suite jusqu'au chondrocyte. La membrane synoviale ne possède pas de membrane basale. Elle assure un équilibre osmotique pour les petites molécules. Pour les peptides inférieurs à 10 kDa, le passage du sang au liquide synovial se déroule passivement sans transporteur (Evans *et al.*, 2014).

Ces observations ne sont que le reflet des différentes études disponibles. En ce qui concerne notre étude, il serait nécessaire de réaliser des essais de biodisponibilité chez un modèle animal (murin par exemple) en effectuant des prélèvements intestinaux, sanguins et intra-articulaires afin de doser la quantité de peptides marqués, présents au sein de ces différents microenvironnements. Cela permettrait

ainsi de définir s'ils agissent directement au contact des chondrocytes articulaires et/ou si les effets sont médiés par d'autres cellules impliquant d'autres facteurs.

7. Les compléments alimentaires et les thérapies cellulaire et tissulaire

Lors d'une l'arthrose à un stade avancé, les compléments alimentaires peuvent s'avérer inefficaces. En effet, aucun complément alimentaire ne permet de régénérer un tissu cartilagineux de type hyalin à partir d'une articulation fortement arthrosique et largement dépourvue de cartilage. L'idéal serait plutôt de prendre les compléments alimentaires en traitement préventif, le plus tôt possible en fonction des carences alimentaires ou des facteurs de risque présents chez les personnes telles que les sportifs de haut niveau, ou encore, une surcharge pondérale. Plus tard, les compléments alimentaires devraient être pris dès les premières lésions tissulaires. Se pose alors la question de la place des compléments alimentaires en tant que traitement anti-arthrosique ?

Au vu des résultats obtenus et des perspectives possibles, les hydrolysats de collagènes pourraient être utilisés dans plusieurs contextes.

Dans un premier temps, ils peuvent être utilisés *in vitro*. En effet, nous avons montré que les Promérim® permettent de favoriser la synthèse des collagènes de types II et I, et de limiter les facteurs dégradant la matrice. Nous pourrions alors envisager d'ajouter directement au milieu de culture des Promérim®, dans le cadre de la TCA. Les hydrolysats de collagènes pourraient permettre une meilleure amplification des chondrocytes *in vitro*, étape indispensable dans toutes les approches de thérapie cellulaire et d'ingénierie tissulaire du cartilage, car nous avons montré que les Promérim® augmentaient l'activité métabolique mitochondriale. Les hydrolysats pourraient aussi favoriser la redifférenciation des chondrocytes et le maintien de leur statut de différenciation mature, une fois ceux-ci amplifiés. Nous ne l'avons pas expérimenté ici, mais ils pourraient aussi limiter la dédifférenciation tout en favorisant la prolifération *in vitro* des chondrocytes lors de leur amplification. Dans cette stratégie réparatrice, les Promérim® pourraient alors avoir un double emploi assurant, dans un premier temps, un maintien du phénotype chondrocytaire, une augmentation de la

prolifération, mais aussi, dans un second temps, favoriser une redifférenciation chondrocytaire.

La TCA a aussi su évoluer et de nouvelles générations ont vu le jour. Ainsi, les cellules souches ont pu être utilisées en vue de les différencier en chondrocytes. Nous pouvons là aussi penser que l'ajout de peptides marins favoriserait la différenciation des CSM en chondrocytes matures, permettant, en plus de la différenciation, la stabilité du phénotype. *In fine*, il serait possible d'obtenir à partir des CSM de nombreux chondrocytes matures pouvant être utilisés par la suite (soit en implantation dans un biomatériau, soit en injection directe). Des injections combinatoires avec des CSM et des Promérim® pourraient aussi s'avérer être pertinentes de par les capacités immunomodulatrices des CSM, mais aussi, des Promérim® et leurs propriétés anti-inflammatoires et différenciantes. On pourrait ainsi espérer générer « un cocktail » limitant l'inflammation et favorisant le comblement des lésions chondrales. Bien évidemment, dans l'ensemble de cas évoqués précédemment, l'emploi de ces peptides d'origine marine pourra se faire en complément d'autres facteurs différenciants tels que des BMP ou des TGF et dans un microenvironnement différenciant détaillé précédemment.

Dans un second temps, les hydrolysats de collagènes pourraient être utilisés *in vivo*. Nous pourrions alors espérer obtenir des résultats prometteurs similaires à ceux obtenus *in vitro*. De ce fait, ils pourraient être utilisés chez des personnes ou équidés relativement jeunes, présentant des facteurs de risque à la survenue de l'arthrose, tels que le surpoids, ou encore, les sportifs de haut niveau présentant des chocs répétés au niveau des sites articulaires. Les Promérim® pourraient aussi être prescrits en parallèle d'une intervention chirurgicale afin de diminuer l'inflammation ou limiter la survenue de fracture, en renforçant les os subissant de nouvelles contraintes biomécaniques (Murphy *et al.*, 2020). Ne sachant pas ce qui arrive exactement au niveau du site articulaire, il serait envisageable, après des études poussées de tolérance, d'injecter directement au niveau du site articulaire ces peptides. À noter que de nombreuses possibilités s'offrent à nous avec cette stratégie puisqu'il serait alors possible de découvrir les voies de signalisation mises en jeu par les Promérim® et sur quel type de cellules (intestinales, synoviocytes, chondrocytes, ostéocytes...). Il serait alors aussi intéressant d'identifier les peptides arrivant *in situ*, ont-ils subi d'éventuelles modifications lors de la digestion par de la trypsine, la chimotrypsine, l'élastase ou encore suite à l'absorption ?

Il est aussi possible de combiner l'utilisation des hydrolysats avec un organoïde cartilagineux afin de favoriser son implantation, la différenciation ou encore limiter l'inflammation. Les peptides peuvent aussi être injectés dans un complexe les mélangeant avec des CSM indifférenciées. L'intérêt serait alors d'utiliser les propriétés immunomodulatrices des CSM et les propriétés décrites précédemment des peptides. Un complexe à base de CSM différenciées, CSM indifférenciées et peptides peut aussi être envisagé afin d'exploiter l'ensemble des caractéristiques de chacun de ces composants. Enfin, les peptides de collagènes pourraient être injectés en site articulaire lors de la réalisation de micro-fractures. Le principe est d'engendrer un saignement au niveau de l'os sous-chondral afin de favoriser la migration des CSM/cellules progénitrices au niveau des lésions. Les peptides injectés en même temps pourraient permettre de favoriser la multiplication des CSM, leur différenciation en chondrocytes et limiter leur dégradation.

L'ensemble des éléments exposés ci-dessus ne représente que des hypothèses qui demandent à être expérimentées de façon à pouvoir, un jour, favoriser la synthèse et la régénération d'un tissu cartilagineux de type hyalin.

Conclusion générale et perspectives

Les articulations subissent, au cours de la vie, de multiples traumatismes induisant des pertes chondrales et la genèse d'un microenvironnement inflammatoire favorable à la dégradation cartilagineuse. Le processus arthrosique est alors enclenché. Il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour soigner l'arthrose. Les traitements utilisés ne visent qu'à soulager la douleur et limiter l'inflammation. La solution d'ultime recours, chez l'Homme, demeure la pose de prothèse qui reste néanmoins limitée dans le temps. En effet, la prothèse, tout comme l'os et les tissus au contact de cette dernière, continuent de s'user progressivement. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude.

Nous avons développé une stratégie de redifférenciation des chondrocytes articulaires équins à partir de chondrocytes dédifférenciés. Pour ce faire, les chondrocytes ont été cultivés en trois dimensions, en hypoxie et en présence de BMP-2. De plus, une stratégie d'inhibition du collagène de type I et d'HtrA1 par des siARN, marqueurs surexprimés lors de la dédifférenciation chondrocytaire lors de l'arthrose, a été mise en place. Les chondrocytes cultivés dans de telles conditions ont montré une augmentation de leur indice fonctionnel (*Col2a1/Col1a1* et *Acan/Col1a1*), représentatif d'une redifférenciation chondrocytaire. Forts de cette transposition du modèle de culture humain au modèle équin et tenant compte de l'enjeu majeur de l'impact des pathologies articulaires sur la filière équine, nous avons entrepris l'étude de l'effet des hydrolysats de collagènes sur des chondrocytes dédifférenciés afin de définir s'ils possèdent de potentiels effets favorables sur des chondrocytes.

Les Promérim®, des hydrolysats de collagènes marins issus de la peau et du cartilage de poissons, ont été étudiés *in vitro* afin de définir leurs potentiels effets sur la viabilité et le phénotype de chondrocytes articulaires. Nous avons réalisé nos travaux sur des chondrocytes articulaires équins et humains. Le cheval et l'Homme possèdent de nombreuses homologues cartilagineuses. Le rapport poids/contraintes, subi par les articulations est semblable ; de plus, les lésions naissantes chez le modèle équin sont comparables à celle d'un Homme. Cette comparaison est d'autant plus vraie pour des chevaux sportifs et humains sportifs.

La stratégie employée a consisté, dans un premier temps, à démontrer la non-toxicité des Promérim®, permettant de s'assurer de la tolérance des hydrolysats par

des chondrocytes (humains et équins). Nous avons ensuite évalué l'effet des Promérim® ajoutés au milieu de culture sur l'activité métabolique mitochondriale et la sénescence. Les Promérim® ont favorisé une augmentation globale de l'activité métabolique. Nous avons ensuite tenté de déterminer si les hydrolysats de collagènes pouvaient moduler un large panel de transcrits, des transcrits typiques du cartilage, inflammatoires, de dégradation, osseux, prolifératifs, ... L'étude de ces derniers a permis de démontrer une diminution de l'expression de certaines MMP (1 et 3 notamment) ainsi que d'Htra1, une protéase à sérine fortement exprimée lors du processus arthrosique. Une augmentation de la synthèse des collagènes de types II et I a aussi été observée avec les Promérim®. Ces effets ont été confortés par une analyse des taux moyens protéiques des collagènes de types II, I et d'Htra1. Dans les deux types de chondrocytes articulaires, humains et équins, l'effet activateur des Promérim® sur la synthèse de collagène de type I est très significatif et très reproductible. Bien que des effets similaires sur la biosynthèse de collagène de type II puissent apparaître de moindre amplitude s'explique très certainement par le fait que l'anticorps dirigé contre le collagène I est de la meilleure qualité envisageable (il présente un très haut titre), ce qui n'est pas du tout le cas pour l'anticorps anti-collagène II, et ceci concerne l'ensemble de la communauté scientifique. Néanmoins, ces effets devront être confirmés en réalisant, par exemple, des dosages ELISA sur les cultures d'organoïdes cartilagineux en tenant compte du fait que le collagène de type I est un isotype très soluble en culture cellulaire (présent dans le milieu de culture), alors que le collagène de type II fait partie intégrante de la fraction insoluble qui s'associe majoritairement à la MEC mise en place au sein de l'organoïde cartilagineux.

Par ailleurs, le fait que les Promérim® augmentent de manière très significative la synthèse de collagène de type I dans les chondrocytes articulaires équins est en soi extrêmement prometteur. En effet, les cliniciens équins de renom s'accordent sur le fait que cette augmentation de synthèse matricielle, incluant notamment du collagène I, est très favorable puisqu'il permet une récupération fonctionnelle de l'articulation des chevaux, particulièrement sportifs dont la carrière est courte, et cela permet de réduire la latence pour un retour plus rapide à la compétition. Pour l'ensemble des chevaux, sportifs ou non, cette récupération fonctionnelle de l'articulation, même si elle peut être transitoire, a forcément des effets bénéfiques si l'on prend en considération la durée de vie, qui est beaucoup plus courte chez le cheval que celle des êtres humains.

L'ensemble des résultats de cette étude conforte les effets observés lors d'une étude clinique précédemment réalisée en cabinet chez 70 patients présentant une douleur de type rhumatologique. Cette étude a conclu à une réduction de la douleur ainsi qu'une diminution de la gêne fonctionnelle (douleur et gêne fonctionnelle évaluées par le score EVA de 1 à 10). Les compléments alimentaires comprenant des Promérim® s'avèrent alors être une réelle alternative attractive aux solutions thérapeutiques actuelles.

Ces travaux sont les premiers réalisés avec les Promérim® sur des chondrocytes *in vitro*, ils ont permis de poser des bases des connaissances sur l'effet de ces hydrolysats sur l'activité des chondrocytes, mais aussi, sur leurs synthèses. Cependant, des travaux complémentaires demeurent nécessaires. Ainsi, trois axes majeurs restent encore à approfondir. Dans un premier temps, il serait important de s'intéresser à la biodisponibilité des hydrolysats. En effet, ces derniers traversent de nombreuses barrières avant d'arriver *in situ*. Il serait donc pertinent de savoir concrètement quels peptides arrivent au contact des chondrocytes et en quelles concentrations. Un second volet plus fondamental consisterait à identifier quels sont les peptides présents et quelle combinaison induit tel ou tel(s) effet(s). Il s'agit là d'une étude assez complexe de par la multitude de peptides présents et du nombre de voies de signalisation potentiellement induites par les hydrolysats. L'idée serait ici de définir un peptide ou un groupe de peptides permettant, soit d'augmenter la synthèse de collagène de type II, soit de diminuer les taux d'Htra1 et de la MMP1. Quel(s) peptide(s) est/sont responsable(s) de la diminution de la sénescence et de l'augmentation de l'activité métabolique mitochondriale ? Une fois identifiés, ces peptides pourraient être la source de nouveaux traitements encore plus efficaces et ciblés, laissant ainsi entrevoir une thérapie spécifique à chaque stade arthrosique de chaque patient, selon les pathologies présentées. Dans un troisième temps, une étude *in vivo* sur un modèle gros animal tel que le modèle équin pourrait être envisagé. Le CIRALE, qui collabore avec le laboratoire BioTARGen depuis longue date, a développé par le passé un protocole permettant la mise en place d'une arthrose expérimentale au sein d'une articulation choisie (Bertoni *et al.*, 2020). Ainsi, il serait envisageable d'induire, ou non, l'arthrose au sein d'une cohorte d'équidés et d'étudier de multiples facteurs. Tout d'abord, un suivi de marqueurs sanguins, fonctionnels et de douleur pourra être effectué, associé à des études cliniques (radiographies, échographies). Dans un second temps, les tissus cartilagineux pourront être récupérés afin d'évaluer, en

laboratoire, la qualité de la matrice cartilagineuse des différentes articulations. L'ensemble des stratégies évoquées ici permettrait de caractériser davantage les effets des Promérim® qui pourraient représenter un bon complément aux traitements anti-arthrosiques actuels.

Références

A

- Abdel-Sayed, P. and Pioletti, D.P. Strategies for improving the repair of focal cartilage defects. *Nanomedicine*. **10**, 2893-2905 (2015).
- Acosta, J.C., O'Loughlen, A., Banito, A., Guijarro, M.V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N., Takatsu, Y., Melamed, J., d'Adda di Fagagna, F., Bernard, D., Hernando, E., Gil, J. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*. **133**, 1006-1018 (2008).
- Adams, C.S. and Horton, W.E. Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals. *Anatomical Record*. **250**, 418-425 (1998).
- Aigner, T., and Stöve, J. 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 (2003).
- Aigner, T., Zhu Y., Chansky, H.H., Matsen, F.A., Maloney, W.J., Sandell, L.J. Reexpression of type IIA procollagen by adult articular chondrocytes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis and Rheumatology*. **42**, 1443-1450 (1999).
- Aigner, T., Hemmel, M., Neureiter, D., Gebhard, P.M., Zeiler, G., Kirchner, T., McKenna, L. Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritis human articular knee cartilage: A study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage. *Arthritis and Rheumatology*. **44**, 1304-1312 (2001).
- Aigner, T., Cook, J.L., Gerwin, N., Glasson, S.S., Lavery, S., Little, C.B., McIlwraith, W., Kraus, V.B. Histopathology atlas of animal model systems - overview of guiding principles. *Osteoarthritis and Cartilage*. **18**, S2-S6 (2010).
- Aikio, M., Alahuhta, I., Nurmenniemi, S., Suojanen, J., Palovuori, R., Teppo, S., Sorsa, T., Lopez-Otin, C., Pihlajaniemi, T., Salo, T., Heljasvaara, R., Nyberg, P. Arresten, a Collagen-Derived Angiogenesis Inhibitor, Suppresses Invasion of Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE*. **7**, e51044 (2012).
- Akhtar, N., Miller, M.J., Haqqi, T.M. Effect of a Herbal-Leucine mix on the IL-1 β -induced cartilage degradation and inflammatory gene expression in human chondrocytes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **11**, (2011).
- Akiyama, H., Chaboissier, M.C., Martin, J.F., Schedl, A., De Crombrughe, B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes and Development*. **16**, 2813-2828 (2002).
- Al-Lamki, R.S. Wang, J., Skepper, J.N., Thiru, S., Pober, J.S., Bradley, J.R. Expression of Tumor Necrosis Factor Receptors in Normal Kidney and Rejecting Renal Transplants. *Laboratory Investigation*. **81**, 1503-1515 (2001).

- Alsalameh, S., Amin, R., Gemba, T. Lotz, M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis and Rheumatology*. **50**, 1522-1532 (2004).
- Alshenibr, W., Tashkandi, M.M., Alsaqer, S.F., Alkheriji, Y., Wise, A., Fulzele, S., Mehra, P., Goldring, M.B., Gerstenfeld, L.C., Bais, M.V. Anabolic role of lysyl oxidase like-2 in cartilage of knee and temporomandibular joints with osteoarthritis. *Arthritis Research and Therapy*. **19**, (2017).
- Ammon, H.P.T. Boswelliasauren (Inhaltsstoffe des Weihrauchs) als wirksame Prinzipien zur Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen*. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. **152**, 373-378 (2002).
- An, C., Cheng, Y., Yuan, Q., Li, J. IGF-1 and BMP-2 induces differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes-like cells. *Annals of Biomedical Engineering*. **38**, 1647-1654 (2010).
- Andhare, R.A., Takahashi, N., Knudson, W., Knudson, C. B. Hyaluronan promotes the chondrocyte response to BMP-7. *Osteoarthritis and Cartilage*. **17**, 906-916 (2009).
- Ando, H. Natsume, A., Iwami, K., Ohka, F., Kuchimaru, T., Kizaka-Kondoh, S., Ito, K., Saito, K., Sugita, S., Hoshino, T., Wakabayashi, T. A hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α splicing variant, HIF-3 α 4 impairs angiogenesis in hypervascular malignant meningiomas with epigenetically silenced HIF-3 α 4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **433**, 139-144 (2013).
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., Rosato, A. Counting the Zinc-Proteins Encoded in the Human Genome. *Journal of Proteome Research*. **5**, 196-201 (2006).
- Antoine, E.E., Vlachos, P.P., Rylander, M.N. Review of collagen I hydrogels for bioengineered tissue microenvironments: characterization of mechanics, structure, and transport. *Tissue Engineering Engineering Part B Reviews*. **20**, 683-696 (2014).
- Anker, P.S., Scherjon, S.A., Kleijburg Van Der Keur, C., De Groot-Swings, G.M., Claas, F.H., Fibbe, W.E., Kanhai, H.H. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*. **22**, 1338-1345 (2004).
- Appelboom, T. Arthropathy in art and the history of pain management—through the centuries to cyclooxygenase-2 inhibitors. *Rheumatology*. **41**, 28-34 (2002).
- Archer, S.J., Weatherbee, J.A., Torchia'J, D.A. Transforming Growth Factor β 1: Secondary Structure As Determined by Heteronuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biochemistry*. **32**, 1164-1171 (1993).
- Artursson, P. and Knight, S.D. Breaking the intestinal barrier to deliver drugs. *Science*. **347**, 716-717 (2015).
- Arufe, M. C., De la Fuente, A., Fuentes, I., De Toro, F.J., Blanco, F.J. Chondrogenic potential of subpopulations of cells expressing mesenchymal stem cell markers derived from human synovial membranes. *Journal of Cellular Biochemistry*. **111**, 834-845 (2010).
- Attur, M.G., Patel, I.R., Patel, R.N., Abramson, S.B., Amin, A.R. Autocrine production of IL-1 beta by human osteoarthritis-affected cartilage and differential regulation of endogenous nitric oxide, IL-6, prostaglandin E2, and IL-8, *Proceedings of the Association of American Physicians*. **110**, 65-72 (1998).

- Aycock, R.S., Raghov, R., Stricklin, G.P., Seyer, J.M., Kang, A.H. Post-transcriptional inhibition of collagen and fibronectin synthesis by a synthetic homolog of a portion of the carboxyl-terminal propeptide of human type I collagen. *Journal of Biological Chemistry*. **261**, 14355-14360 (1986).
- Aydelotte, M.B. and Kuettner, K.E. Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. *Connective Tissue Research*. **18**, 205-222 (1988).
- Ayhan, E. Intraarticular injections (corticosteroid, hyaluronic acid, platelet rich plasma) for the knee osteoarthritis. *World Journal of Orthopedics*. **5**, 351-361 (2014).
- Aykul, S. and Martinez-Hackert, E. Transforming Growth Factor- β Family Ligands Can Function as Antagonists by Competing for Type II Receptor Binding. *Journal of Biological Chemistry*. **291**, 10792-10804 (2016).
- Azadmehr, A., Hajiaghaee, R., Mazandarani, M. Induction of apoptosis and G₂/M cell cycle arrest by *Scrophularia striata* in a human leukaemia cell line. *Cell Proliferation*. **46**, 637-643 (2013).

B

- Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., Kirkland, J.L., van Deursen, J.M. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. **479**, 232-236 (2011).
- Baksh, D., Yao, R., Tuan, R.S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*. **25**, 1384-1392 (2007).
- Bannuru, R.R., Osani, M.C., Al-Eid, F., Wang, C. Efficacy of curcumin and Boswellia for knee osteoarthritis: Systematic review and meta-analysis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. **48**, 416-429 (2018).
- Bartel, D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. **136**, 215-233 (2009).
- Bartok, B. and Firestein, G.S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews*. **233**, 233-255 (2010).
- Bassleer, C., Rovati, L., Franchimont, P. Stimulation of proteoglycan production by glucosamine sulfate in chondrocytes isolated from human osteoarthritic articular cartilage in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage*. **6**, 427-434 (1998).
- Bauer, D.C., Abramson, S.B., Attur, M., Corr, M., Felson, D., Heinegård, D., Jordan, J.M., Kepler, T.B., Saxne, T., Tyree, B., Kraus, V.B. Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. *Osteoarthritis and Cartilage*. **14**, 723-727 (2006).
- Bello, A. E. and Oesser, S. Collagen hydrolysate for the treatment of osteoarthritis and other joint disorders: a review of the literature. *Current Medical Research and Opinion*. **22**, 2221-2232 (2006).

- Benninghoff, A. Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*. **76**, 43-63. (1925)
- 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*. **15**, 1313-1321 (1978).
- Bertoni, L., Branly, T., Jacquet, S., Desancé, M., Desquillet, L., Rivory, P., Hartmann, D.J., Denoix, J.M., Audigié, F., Galéra, P., Demoor, M. Intra-Articular Injection of 2 Different Dosages of Autologous and Allogeneic Bone Marrow- and Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Triggers a Variable Inflammatory Response of the Fetlock Joint on 12 Sound Experimental Horses. *Stem Cells International*. 9431894, (2019).
- Bertoni, L., Jacquet-Guibon, S., Branly, T., Legendre, F., Desancé, M., Mespoulhes, C., Melin, M., Hartmann, D.J., Schmutz, A., Denoix, J.M., Galéra, P., Demoor, M., Audigié, F. An experimentally induced osteoarthritis model in horses performed on both metacarpophalangeal and metatarsophalangeal joints: Technical, clinical, imaging, biochemical, macroscopic and microscopic characterization. *PLoS ONE*. **15**, e0235251 (2020).
- Bertoni, L., Jacquet-Guibon, S., Branly, T., Desancé, M., Legendre, F., Melin, M., Rivory, P., Hartmann, D.J., Schmutz, A., Denoix, J.M., Demoor, M., Audigié, F., Galéra, P. Evaluation of allogeneic bone-marrow-derived and umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells to prevent the development of osteoarthritis in an equine model. *International Journal of Molecular Sciences*. **22**, (2021).
- Bian, L.M., Guvendiren, M., Mauck, R.L., Burdick, J.A. Hydrogels that mimic developmentally relevant matrix and N-cadherin interactions enhance MSC chondrogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. **110**, 10117-10122 (2013).
- Billingham, R.C., Dahlberg, L., Ionescu, M., Reiner, A., Bourne, R., Rorabeck, C., Mitchell, P., Hambor, J., Diekmann, O., Tschesche, H., Chen, J., Van Wart, H., Poole, A.R. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *Journal of Clinical Investigation*. **99**, 1534-1545 (1997).
- Blanco, F.J., Ochs, R.L., Schwarz, H., Lotz, M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *The American Journal of Pathology*. **146**, 75-85 (1995).
- Bonaterrea, G.A. Heinrich, E.U., Kelber, O., Weiser, D., Metz, J., Kinscherf, R. Anti-inflammatory effects of the willow bark extract STW 33-I (Proaktiv®) in LPS-activated human monocytes and differentiated macrophages. *Phytomedicine*. **17**, 1106-1113 (2010).
- Bondeson, J., Blom, A.B., Wainwright, S., Hughes, C., Caterson, B., van den Berg W.B. The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*. **62**, 647-657 (2010).
- Bost, M. Houdart, S., Oberli, M., Kalonji, E., Huneau, J.F., Margaritis, I. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **35**, 107-115 (2016).
- Bragdon, B. Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J., Nohe, A. Bone Morphogenetic Proteins: A critical review. *Cellular Signalling*. **23**, 609-620 (2011).
- Brandl, F., Sommer, F., Goepferich, A. Rational design of hydrogels for tissue engineering: impact of physical factors on cell behavior. *Biomaterials*. **28**, 134-146 (2007).

- Brannigan, K. and Griffin, M. An Update into the Application of Nanotechnology in Bone Healing. *The Open Orthopaedics Journal*. **10**, 808-823 (2016).
- Brassart-Pasco, S., Sénéchal, K., Thevenard, J., Ramont, L., Devy, J., Di Stefano, L., Dupont-Deshorgue, A., Brézillon, S., Feru, J., Jazeron, J.F., Diebold, M.D., Ricard-Blum, S., Maquart, F.X., Monboisse, J.C. Tetrastatin, the NC1 Domain of the $\alpha 4$ (IV) Collagen Chain: A Novel Potent Anti-Tumor Matrikine. *PLoS ONE*. **7**, e29587 (2012).
- Braun, H.J. and Gold, G.E. Diagnosis of osteoarthritis: Imaging. *Bone*. **51**, 278-288 (2012).
- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., Peterson, L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *The New England Journal of Medicine*. **331**, 889-895 (1994).
- Brittberg, M. and Winalski, C.S. Evaluation of cartilage injuries and repair. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American*. **85**, 58-69 (2003).
- Bruno, S., Grange, C., Deregibus, M. C., Calogero, R. A., Saviozzi, S., Collino, F., Morando, L., Busca, A., Falda, M., Bussolati, B., Tetta, C., Camussi, G. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. **20**, 1053-1067 (2009).
- Bruyère, O., Zegels, B., Leonori, L., Rabenda, V., Janssen, A., Bourges, C., Reginster, G.Y. Effect of collagen hydrolysate in articular pain: A 6-month randomized, double-blind, placebo controlled study. *Complementary Therapies in Medicine*. **20**, 124-130 (2012).
- Bryant, S.J. and Anseth, K.S. Controlling the spatial distribution of ECM components in degradable PEG hydrogels for tissue engineering cartilage. *Journal of Biomedical Materials Research*. **64**, 70-79 (2003).
- Bryant, S.J., Bender, R.J., Durand, K.L., Anseth, K.S. Encapsulating chondrocytes in degrading PEG hydrogels with high modulus: engineering gel structural changes to facilitate cartilaginous tissue production. *Biotechnology and Bioengineering*. **86**, 747-755 (2004).
- Buckwalter, J.A. and Lane, N.E. Athletics and Osteoarthritis. *The American Journal of Sports Medicine*. **25**, 873-881 (1997).
- Burdan, F., Szumiło, J., Korobowicz, A., Farooquee, R., Patel, S., Patel, A., Dave, A., Szumiło, M., Solecki, M., Klepacz, R., Dudka, J. Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. **47**, 5-16 (2009).
- Burroughs, S.K., Kaluz, S., Wang, D., Wang, K.E., Van Meir, E.G., Wang, B. Hypoxia inducible factor pathway inhibitors as anticancer therapeutics. *Future Medicinal Chemistry*. **5**, 553-572 (2013).
- Buschmann, M.D., Gluzband, Y.A., Grodzinsky, A.J., Kimura, J.H., Hunziker, E.B. Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix. *Journal of Orthopaedic Research*. **10**, 745-758 (1992).

C

- Calesnick, B. and Dinan, A.M. Zinc deficiency and zinc toxicity. *American family physician*. **37**, 267-270 (1988).
- Callender, G.R. and Keiser, R.A. A comparison of the pathological changes in man and equines. *The American Journal of Pathology*. **14**, 253-282 (1938).
- Campisi, J. Senescent, cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. **120**, 513-522 (2005).
- Chantre, P., Cappelaere, A., Leblan, D., Guedon, D., Vandermander, J., Fournie, B. Efficacy and tolerance of *Harpagophytum procumbens* versus diacerhein in treatment of osteoarthritis. *Phytomedicine*. **7**, 177-183 (2000).
- Chasapis, C.T., Loutsidou, A.C., Spiliopoulou, C.A., Stefanidou, M. E. Zinc and human health: an update. *Archives of Toxicology*. **86**, 521-534 (2012).
- Chen, N. Chen, N.P., Zhang, J., Chen, C., Wei, X.L., Gul, Y., Wang, W.M., Wang, H.L. Molecular characterization and expression analysis of three hypoxia-inducible factor alpha subunits, HIF-1 α /2 α /3 α of the hypoxia-sensitive freshwater species, Chinese sucker. *Gene*. **498**, 81-90 (2012).
- Chen, A. L. Fang, C., Liu, C., Leslie, N.P., Chang, E., Di Cesare, P.E. Expression of bone morphogenetic proteins, receptors, and tissue inhibitors in human fetal, adult, and osteoarthritic articular cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*. **22**, 1188-1192 (2004).
- Chien, J. Ota, T., Aletti, G., Shridhar, R., Boccellino, M., Quagliuolo, L., Baldi, A. Serine Protease HtrA1 Associates with Microtubules and Inhibits Cell Migration. *Molecular and Cellular Biology*. **29**, 4177-4187 (2009).
- Choi, Y.C., Hough, A.J., Morris, G.M., Sokoloff, L. Experimental siderosis of articular chondrocytes cultured in vitro. *Arthritis and Rheumatism*. **24**, 809-823 (1981).
- Chubinskaya, S., Otten, L., Soeder, S., Borgia, J.A., Aigner, T., Rueger, D.C., Loeser, R.F. Regulation of chondrocyte gene expression by osteogenic protein-1. *Arthritis Research and Therapy*. **13**, R55 (2011).
- Cicutini, F.M. and Spector, T.D. Genetics of osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **55**, 665-667 (1996).
- Circosta, C. Occhiuto, F., Ragusa, S., Trovato, A., Tumino, G., Brguglio, F., De Pasquale, A. A drug used in traditional medicine: *Harpagophytum procumbens* DC. *Journal of Ethnopharmacology*. **11**, 259-274 (1984).
- Claus, S., Mayer, N., Aubert-Foucher, E., Chajra, H., Perrier-Groult, E., Lafont, J., Piperno, M., Damour, O., Mallein-Gerin, F. Cartilage-characteristic matrix reconstruction by sequential addition of soluble factors during expansion of human articular chondrocytes and their cultivation in collagen sponges. *Tissue Engineering Part C Methods*. **18**, 104-12 (2012).

- Clawson, G.A., Bui, V., Xin, P., Wang, N., Pan, W. Intracellular localization of the tumor suppressor HtrA1/Prss11 and its association with HPV16 E6 and E7 proteins. *Journal of Cellular Biochemistry*. **105**, 81-88 (2008).
- Colorado, P.C. Torre, A., Kamphaus, G., Maeshima, Y., Hopfer, H., Takahashi, K., Volk, R., Zamborsky, E.D., Herman, S., Sarkar, P.K., Ericksen, M.B., Dhanabal, M., Simons, M., Post, M., Kufe, D.W., Weichselbaum, R.R., Sukhatme, V.P., Kalluri, R. Anti-angiogenic Cues from Vascular Basement Membrane Collagen. *Cancer Research*. **60**, 250-2526 (2000).
- Contentin, R., Demoor, M., Concari, M., Desancé, M., Audigié, F., Branly, T., Galéra, P. Comparison of the Chondrogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow and Umbilical Cord Blood Intended for Cartilage Tissue Engineering. *Stem Cell Reviews and Reports*. **16**, 126-143 (2020).
- Costa De Pasquale, R.C. Busa, G., Circosta, C., Iauk, L., Ragusa, S., Ficarra, P., Occhiuto, F. A drug used in traditional medicine: harpagophytum procumbens dc. iii. effects on hyperkinetic ventricular arrhythmias by reperfusion. *Journal of Ethnopharmacology*. **13**, 193-199 (1985).
- Cucchiari, M., Ekici, M., Schetting, S., Kohn, D., Madry, H. Metabolic activities and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer and overexpression of fibroblast growth factor 2. *Tissue Engineering Part A*. **15**, 1921-33 (2011).

D

- Da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C., Nardi, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*. **119**, 2204-2213 (2006).
- Dasuri, K., Antonovici, M., Chen, K., Wong, K., Standing, K., Ens, W., El-Gabalawy, H., Wilkins, J.A. The synovial proteome: analysis of fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Research and Therapy*. **6**, 161-168 (2004).
- Davis, G.E., Bayless, K.J., Davis, M.J., Meiningner, G.A. Regulation of Tissue Injury Responses by the Exposure of Matricryptic Sites within Extracellular Matrix Molecules. *The American Journal of Pathology*. **156**, 1489-1498 (2000).
- Dayr, J.M., Beutler, B., Cerami, A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin e2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *Journal of Experimental Medicine*. **162**, 2163-2168 (1985).
- De Windt, T.S., Saris, D.B.F., Slaper-Cortenbach, I.C.M., Van Rijen, M.H.P., Gawlitta, D., Creemers, L.B., De Weger, R.A., Dhert, W.J.A., Vonk, L.A. Direct Cell-Cell Contact with Chondrocytes Is a Key Mechanism in Multipotent Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Chondrogenesis. *Tissue Engineering Part A*. **21**, 2536-2547 (2015).
- DeLise, A.M., Fischer, L., Tuan, R.S. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis and Cartilage*. **8**, 309-334 (2000).

- Dellett, M., Hu, W., Papadaki, V., Ohnuma, S. Small leucine rich proteoglycan family regulates multiple signalling pathways in neural development and maintenance. *Development, Growth and Differentiation*. **54**, 327-340 (2012).
- 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. Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1840**, 2414-2440 (2014).
- Diab, M., Wu, J.J., Eyre, D.R. Collagen type IX from human cartilage: a structural profile of intermolecular cross-linking sites. *Biochemical Journal*. **314**, 327-332 (1996).
- DiCesare, P.E., Mörgelin, M., Carlson, C S., Pasumarti, S., Paulsson, M. Cartilage oligomeric matrix protein: Isolation and characterization from human articular cartilage: human cartilage oligomeric matrix protein. *Journal of Orthopaedic Research*. **13**, 422-428 (1995).
- Dieppe, P.A. and Lohmander, L.S. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *The Lancet*. **365**, 965-973 (2005).
- Dixelius, J., Cross, M.J., Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L. Endostatin action and intracellular signaling: β -catenin as a potential target? *Cancer Letters*. **196**, 1-12 (2003).
- Djoko, K.Y., Ong, C.Y., Walker, M.J., McEwan, A.G. The Role of Copper and Zinc Toxicity in Innate Immune Defense against Bacterial Pathogens. *Journal of Biological Chemistry*. **290**, 18954-18961 (2015).
- 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*. **8**, 315-317 (2006).
- Drummond, E.M., Harbourne, N., Marete, E., Martyn, D., Jacquier, J.C., O'Riordan, D., Gibney, R. Inhibition of Proinflammatory Biomarkers in THP1 Macrophages by Polyphenols Derived From Chamomile, Meadowsweet and Willow bark. *Phytotherapy Research*. **27**, 588-594 (2012).
- Duval, E., Leclercq, S., Elissalde, J.M., Demoor, M., Galéra, P., Boumédiène, K. 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 and Rheumatology*. **60**, 3038-3048 (2009).
- Duval, E. Bigot, N., Hervieu, M., Kou, I., Leclercq, S., Galéra, P., Boumédiène, K, Baugé, C. Asporin Expression Is Highly Regulated in Human Chondrocytes. *Molecular Medicine*. **17**, 816-823 (2011).

E

- Elango, J., Robinson, J., Zhang, J., Bao, B., Ma, N., De Val, J.E.M.S., Wu, W. Collagen Peptide Upregulates Osteoblastogenesis from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells through MAPK-Runx2. *Cells*. **11**, 446 (2019).
- Enomoto, H., Inoki, I., Komiya, K., Shiomi, T., Ikeda, E., Obata, K.I., Matsumoto, H., Toyama, Y., Okada, Y. Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage. *The American Journal of Pathology*. **162**, 171-181 (2003).
- Erices, A., Conget, P., Minguell, J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology*. **109**, 235-242 (2000).
- Erickson, I.E., Huang, A.H., Sengupta, S., Kestle, S., Burdick, J.A., Mauck, R.L. Macromer density influences mesenchymal stem cell chondrogenesis and maturation in photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Osteoarthritis and Cartilage*. **17**, 1639-1648 (2009).
- Eto, M. Regulation of cellular protein phosphatase-1 (PP1) by phosphorylation of the CPI-17 family, C-kinase-activated PP1 inhibitors, *Journal of Biological Chemistry*. **284**, 35273-35277 (2009).
- Evans, C.H., Kraus, V.B., Setton, L.A. Progress in intra-articular therapy. *Nature Reviews Rheumatology*. **10**, 11-22 (2014).
- Exposito, J.Y., Valcourt, U., Cluzel, C., Lethias, C. The Fibrillar Collagen Family. *International Journal of Molecular Sciences*. **11**, 407-426 (2010).

F

- Felbor, U., Dreier, L., Bryant, R.A.R., Ploegh, H.L., Olsen, B.R., Mothes, W. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *The EMBO Journal*. **19**, 1187-1194 (2000).
- Fell, H.B. The histogenesis of cartilage and bone in the long bones of the embryonic fowl. *Journal of Morphology*. **40**, 417-459 (1925).
- Fernández Torres, J., Zamudio Cuevas, Y., Martínez Nava, G.A., López Reyes, A.G. Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) in the articular cartilage: a systematic review. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. **21**, 2800-2810 (2017).
- Ferreras, M., Felbor, U., Lenhard, T., Olsen, B.R., Delaissé, J.M. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Letters*. **486**, 247-251 (2000).
- Fields, G.B. Interstitial Collagen Catabolism. *Journal of Biological Chemistry*. **288**, 8785-8793 (2013).
- Fischer, K., Collins, P., Bjorkman, S., Blanchette, v., OH, M., Fritsch, S., Schroth, P., Spotts, G., Eweenstein, B. Trends in bleeding patterns during prophylaxis for severe haemophilia: observations from a series of prospective clinical trials: bleeding patterns on prophylaxis. *Haemophilia*. **17**, 433-438 (2011).

- Fleming, R. E. and Ponka, P. Iron Overload in Human Disease. *New England Journal of Medicine*. **366**, 348-359 (2012).
- Fosmire, G.J. Zinc toxicity. *American Society for Clinical Nutrition*. **51**, 225-227 (1990).
- Fraga, C.G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Molecular Aspects of Medicine*. **26**, 235-244 (2005).
- Franzke, C.W., Bruckner Tuderman, L., Blobel, C.P. Shedding of Collagen XVII/BP180 in Skin Depends on Both ADAM10 and ADAM9. *Journal of Biological Chemistry*. **284**, 23386-23396 (2009).
- Freyria, A.M., Courtes, S., Mallein-Gerin, F. Differentiation of adult human mesenchymal stem cells: chondrogenic effect of BMP-2. *Pathologie Biologie*. **56**, 326-33 (2008).
- Freyria, A.M. and Mallein-Gerin, F. Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors. *Injury*. **3**, 259-65 (2012).
- Fu, W. L., Zhou, C.Y., Yu, J.K. A new source of mesenchymal stem cells for articular cartilage repair: MSCs derived from mobilized peripheral blood share similar biological characteristics in vitro and chondrogenesis in vivo as MSCs from bone marrow in a rabbit model. *American Journal of Sports Medicine*. **10**, 10 (2013).
- Fujita, T., Ohue, M., Fujii, Y., Miyauchi, A., Takagi, Y. The effect of active absorbable algal calcium (AAA Ca) with collagen and other matrix components on back and joint pain and skin impedance. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. **20**, 298-302 (2002).

G

- Galéra, P., Redini, 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. *Experimental Cell Research*. **200**, 379-392 (1992).
- Gao, S.G., Zeng, C., Li, L.J., Luo, W., Zhang, F.J., Tian, J., Cheng, C., Tu, M., Xiong, Y.L., Jiang, W., Xu, M., Lei, G.H. Correlation between senescence-associated beta-galactosidase expression in articular cartilage and disease severity of patients with knee osteoarthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases*. **19**, 226-232 (2016).
- Garlanda, C., Dinarello, C.A., Mantovani, A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity*. **39**, 1003-1018 (2013).
- Gay, S., Müller, P.K., Lemmen, C., Remberger, K., Matzen, K., Kühn, K. Immunohistological study on collagen in cartilage-bone metamorphosis and degenerative osteoarthritis. *Wiener Klinische Wochenschrift*. **54**, 969-976 (1976).
- Gelse, K., Poschl, E., Aigner, T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **55**, 1531-1546 (2003).

- Ghosh, S., Banerjee, S., Sil, P.C. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food and Chemical Toxicology*. **83**, 111-124 (2015).
- Gilmore, R.S.C. and Palfrey, A. J. Chondrocyte distribution in the articular cartilage of human femoral condyles. *Journal of Anatomy*. **157**, 23-31 (1988).
- Goldring, M.B., Birkhead, J., Sandell, L.J., Kimura, T., Krane, S.M. Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. *Journal of Clinical Investigation*. **82**, 2026-2037 (1988).
- Goldring, S.R. and Goldring, M.B. The Role of Cytokines in Cartilage Matrix Degeneration in Osteoarthritis: *Clinical Orthopaedics and Related Research*. **427**, S27-S36 (2004).
- Goldring, M.B. and Marcu, K.B. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Research and Therapy*. **11**, 224 (2009).
- Goldring, M.B. and Otero, M. Inflammation in osteoarthritis: *Current Opinion in Rheumatology*. **23**, 471-478 (2011).
- Görlach, A. Regulation of HIF-1 α at the Transcriptional Level. *Current Pharmaceutical Design*. **15**, 3844-3852 (2009).
- Grande, D. A., Pitman, M. I., Peterson, L., Menche, D., Klein, M. The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *Journal of Orthopaedic Research*. **7**, 208-218 (1989).
- Grange, L., Rannou, F., Bertin, P., Taieb, C. Osteoarthritis in France the cost of ambulatory care in 2010. *Osteoarthritis and Cartilage*. **20**, (2012).
- Greene, M.A. and Loeser, R.F. Aging-related inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. **23**, 1966-71 (2015).
- Greenhalgh, D.G. The role of apoptosis in wound healing. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. **30**, 1019-1030 (1998).
- Grishko, V.I., Druzhyna, N., LeDoux, S.P., Wilson, G.L. Nitric oxide-induced damage to mtDNA and its subsequent repair. *Nucleic Acids Research*. **27**, 4510-4516 (1999).
- Gründer, T., Gaissmaier, C., Fritz, J., Stoop, R., Hortschansky, P., Mollenhauer, J., Aicher, W.K. Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *Osteoarthritis and Cartilage*. **12**, 559-567 (2004).
- Grunke, M. and Schulze koops, H. Successful treatment of inflammatory knee osteoarthritis with tumour necrosis factor blockade. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **65**, 555-556 (2006).
- Gu, Y.Z., Moran, S.M., Hogenesch, J.B., Wartman, L., Bradfield, C. A. Molecular Characterization and Chromosomal Localization of a Third class Hypoxia Inducible Factor Subunit, HIF3 α . *Gene Expression*. **7**, 205-213, (1998).
- Guilak, F., Erickson, G.R., Ting-Beall, H.P. The Effects of Osmotic Stress on the Viscoelastic and Physical Properties of Articular Chondrocytes. *Biophysical Journal*. **82**, 720-727 (2002).

Gunda, V., Verma, R.K., Sudhakar, Y.A. Inhibition of Elastin Peptide-Mediated Angiogenic Signaling Mechanism(s) in Choroidal Endothelial Cells by the $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$ Collagen Fragment. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. **54**, 7828 (2013).

Guo, Q., Wang, Y., Xu, D., Nossent, J., Pavlos, N.J., Xu, J. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Research*. **6**, 15-29 (2018).

H

Hadfield, K.D., Rock, C.F., Inkson, C.A., Dallas, S.L., Sudre, L., Wallis, G.A., Boot Handford, R.P., Canfield, A.E. HtrA1 Inhibits Mineral Deposition by Osteoblasts: requirement for the protease and pdz domains. *Journal of Biological Chemistry*. **283**, 5928-5938 (2008).

Hall, B.M., Balan, V., Gleiberman, A.S., Strom, E., Krasnov, P., Virtuoso, L.P., Rydkina, E., Vujcic, S., Balan, K., Gitlin, I., Leonova, K., Polinsky, A., Chernova, O.B., Gudkov, A.V. Aging of mice is associated with p16(Ink4a)- and β -galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells. *Aging*. **8**, 1294-1315 (2016).

Hall, B.K. and Miyake, T. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *BioEssays*. **22**, 138-147 (2000).

Ham, O., Lee, C.Y., Song, B.W., Lee, S.Y., Kim, R., Park, J.H., Lee, J., Seo, H.H., Lee, C.Y., Chung, Y.A., Maeng, L.S., Lee, M.Y., Kim, J., Hwang, J. Upregulation of miR-23b enhances the autologous therapeutic potential for degenerative arthritis by targeting PRKACB in synovial fluid-derived mesenchymal stem cells from patients. *Molecules and Cells*. **37**, 449-456 (2014).

Hamano, Y., Zeisberg, M., Sugimoto, H., Lively, J.C., Maeshima, Y., Yang, C., Hynes, R.O., Werb, Z., Sudhakar, A., Kalluri, R. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV $\alpha 3$ chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via $\alpha \text{V}\beta 3$ integrin. *Cancer Cell*. **3**, 589-602 (2003).

Han, Y. and Lefebvre, V. L-Sox5 and Sox6 Drive Expression of the Aggrecan Gene in Cartilage by Securing Binding of Sox9 to a Far-Upstream Enhancer. *Molecular and Cellular Biology*. **28**, 4999-5013 (2008).

Hara, S., Hamada, J., Kobayashi, C., Kondo, Y., Imura, N. Expression and Characterization of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-3 α in Human Kidney: Suppression of HIF-Mediated Gene Expression by HIF-3 α . *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **287**, 808-813 (2001).

Harkness, L.M., Weckmann, M., Kopp, M., Becker, T., Ashton, A.W., Burgess, J.K. Tumstatin regulates the angiogenic and inflammatory potential of airway smooth muscle extracellular matrix. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. **21**, 3288-3297 (2017).

Haseeb, A., Ansari, M.Y., Haqqi, T.M. Harpagoside suppresses IL-6 expression in primary human osteoarthritis chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Research*. **35**, 311-320 (2017).

Hashimoto, S., Creighton-Achermann, L., Takahashi, K., Amiel, D., Coutts, R.D., Lotz, M. Development and regulation of osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. **10**, 180-187 (2002).

- Hashimoto, S. Ochs, R.L., Rosen, F., Quach, J., McCabe, G., Solan, J., Seegmiller, J.E., Terkeltaub, R., Lotz, M. Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. **95**, 3094-3099 (1998).
- Hauselmann, H.J., Fernandes, R.J., Mok, S.S., Schmid, T.M., Block, J.A., Aydelotte, M.B., Kuettner, K.E., Thonar, E.J. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after longterm culture in alginate beads. *Journal of Cell Science*. **107**, 17-27 (1994).
- Heinegård, D. and Saxne, T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. **7**, 50-56 (2011).
- Heinonen, J., Taipaleenmäki, H., Roering, P., Takatalo, M., Harkness, L., Sandholm, J., Uusitalo Järvinen, H., Kassem, M., Kiviranta, I., Laitala Leinonen, T., Säämänen, A.M. Snorc is a novel cartilage specific small membrane proteoglycan expressed in differentiating and articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*. **19**, 1026-1035 (2011).
- Henrotin, Y., Lambert, C., Couchourel, D., Ripoll, C., Chiotelli, E. Nutraceuticals: do they represent a new era in the management of osteoarthritis? - a narrative review from the lessons taken with five products. *Osteoarthritis and Cartilage*. **19**, 1-21 (2011).
- Henson, F.M., Bowe, E.A., Davies, M.E. Promotion of the intrinsic damage-repair response in articular cartilage by fibroblastic growth factor-2. *Osteoarthritis and Cartilage*. **13**, 37-44 (2005).
- Heraud, F., Heraud, A., Harmand, M.F. Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **59**, 959-965 (2000).
- Hering, T.M., Wirthlin, L., Ravindran, S. McAlinden, A. Changes in type II procollagen isoform expression during chondrogenesis by disruption of an alternative 5' splice site within Col2a1 exon 2. *Matrix Biology*. **36**, 51-63 (2014).
- Hilkens, P., Gervois, P., Fanton, Y., Vanormelingen, J., Martens, W., Struys, T., Politis, C., Lambrichts, I., Bronckaers, A. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell and Tissue Research*. **353**, 65-78 (2013).
- Hodge, W.A., Fijan, R.S., Carlson, K.L., Burgess, R.G., Harris, W.H., Mann, R.W. Contact pressures in the human hip joint measured *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. **83**, 2879-2883 (1986).
- Hohenester, E., Sasaki, T., Olsen, B.R., Timpl, R. Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution. *The EMBO Journal*. **17**, 1656-1664 (1998).
- Hooiveld, M.J.J. Roosendall, G., Van Den Berg, H.M., Bijlsma, J.W.J Lafeber, F.P.J.G. Haemoglobin-derived iron-dependent hydroxyl radical formation in blood-induced joint damage: an *in vitro* study. *Rheumatology*. **42**, 784-790 (2003)a.
- Hooiveld, M. Roosendall, G., Wenting, M., Van Den Berg, H.M., Bijlsma, J.W.J Lafeber, F.P.J.G. Short-Term Exposure of Cartilage to Blood Results in Chondrocyte Apoptosis. *The American Journal of Pathology*. **162**, 943-951 (2003)b.
- Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., Keating, A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. **7**, 393-395 (2005).

Hou, Y., Lin, H., Zhu, L., Liu, Z., Hu, F., Shi, J., Yang, T., Shi, X., Guo, H., Tan, X., Zhang, L., Wang, Q., Li, Z., Zhao, Y. The Inhibitory Effect of IFN- γ on Protease HTRA1 Expression in Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Immunology*. **193**, 130-138 (2014).

Hu, S.I. Carozza, M., Klein, M., Nantermet, P., Luk, D., Crowl, R.M. Human HtrA, an Evolutionarily Conserved Serine Protease Identified as a Differentially Expressed Gene Product in Osteoarthritic Cartilage. *Journal of Biological Chemistry*. **273**, 34406-34412 (1998).

Huang, Z. M. Du, S.H., Huang, L.G., Li, J.H., Xiao, L., Tong, P. Leptin promotes apoptosis and inhibits autophagy of chondrocytes through upregulating lysyl oxidase-like 3 during osteoarthritis pathogenesis. *Osteoarthritis and Cartilage*. **24**, 1246-1253 (2016).

Huang, Z., Rose, A.H., Hoffmann, P.R. The Role of Selenium in Inflammation and Immunity: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling*. **16**, 705-743 (2012).

Hui, A.Y., McCarty, W.J., Masuda, K., Firestein, G.S. Sah, R. L. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease: A systems biology approach to synovial joint lubrication. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. **4**, 15-37 (2012).

Hunsaker, D.M., Spiller, H.A., Williams, D. Acute selenium poisoning: suicide by ingestion. *Journal of Forensic Sciences*. **50**, 942-946 (2005).

Husa, M., Liu Bryan, R., Terkeltaub, R. Shifting HIFs in osteoarthritis. *Nature Medicine*. **16**, 641-644 (2010).

I

Iozzo, R.V. The Family of the Small Leucine-Rich Proteoglycans: Key Regulators of Matrix Assembly and Cellular Growth. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **32**, 141-174 (1997).

Iozzo, R.V. Matrix proteoglycans: From Molecular Design to Cellular Function. *Annual Review of Biochemistry*. **67**, 609-652 (1998).

Iozzo, R.V. and Schaefer, L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biology*. **42**, 11-55 (2015).

Iwata, H., Ono, S., Sato, K., Sato, T., Kawamura, M. Bone morphogenetic protein-induced muscle- and synovium-derived cartilage differentiation in vitro. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. **296**, 295-300 (1993).

J

James, A.W., Xu, Y., Lee, J.K., Wang, R. Longaker, M. T. Differential Effects of TGF- β 1 and TGF- β 3 on Chondrogenesis in Posterofrontal Cranial Suture-Derived Mesenchymal Cells In Vitro: *Plastic and Reconstructive Surgery*. **123**, 31-43 (2009).

- Jang, M.S. Park, J.E., Lee, J.A., Park, S.G., Myung, P.K., Lee, D.H., Park, B.C., Cho, S. Binding and regulation of hypoxia-inducible factor-1 by the inhibitory PAS proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **337**, 209-215 (2005).
- Jennings, L., Wu, L., King, K.B., Hämmerle, H., Cs-Szabo, G., Mollenhauer, J. The effects of collagen fragments on the extracellular matrix metabolism of bovine and human chondrocytes. *Connective Tissue Research*. **42**, 71-86 (2001).
- Jiang, Y., Tuan, R.S. Origin and function of cartilage stem/progenitor cells in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. **10**, 206-212 (2014).
- John, H. and Forssmann, W.G. Determination of the disulfide bond pattern of the endogenous and recombinant angiogenesis inhibitor endostatin by mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **15**, 1222-1228 (2001).
- Jones, S.J., Ledgerwood, E.C., Prins, J.B., Galbraith, J., Johnson, D.R., Pober, J.S., Bradley, J.R. TNF recruits TRADD to the plasma membrane but not the trans-Golgi network, the principal subcellular location of TNF-R1. *The Journal of Immunology*. **162**, 1042-1048 (1999).
- Joos, H., Wildner, A., Hogrefe, C., Reichel, H., Brenner, R.E. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha inhibit migration activity of chondrogenic progenitor cells from non-fibrillated osteoarthritic cartilage. *Arthritis Research and Therapy*. **15**, 119 (2013).

K

- 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)-1alpha. *Journal of Cellular Physiology*. **216**, 708-715 (2008).
- Karagiannis, E.D. and Popel, A.S. A systematic methodology for proteome-wide identification of peptides inhibiting the proliferation and migration of endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. **105**, 13775-13780 (2008).
- Karagiannis, E.D. and Popel, A.S. Identification of novel short peptides derived from the alpha 4, alpha 5, and alpha 6 fibrils of type IV collagen with anti-angiogenic properties. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **354**, 434-439 (2007).
- Karsenty, G. The complexities of skeletal biology. *Nature*. **423**, 316-318 (2003).
- Kaszkin, M. Beck, K.F., Koch, E., Erdelmeier, C., Kusch, S., Pfeilschifter, J., Loew, D. Downregulation of iNOS expression in rat mesangial cells by special extracts of *Harpagophytum procumbens* derives from harpagoside-dependent and independent effects. *Phytomedicine*. **11**, 585-595 (2004).
- Kay, A.G., Long, G., Tyler, G., Stefan, A., Broadfoot, S.J., Piccinini, A.M., Middleton, J., Kehoe, O. Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Reduces Disease Severity and Immune Responses in Inflammatory Arthritis. *Scientific Report*. **7**, 18019 (2017).

- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H., Bieback, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. **24**, 1294-1301 (2006).
- Khayyal, M. El Ghazaly, M., Abdallah, D.M., Okpanyi, S.N., Kelber, O., Weiser, D. Mechanisms Involved in the Anti-inflammatory Effect of a Standardized Willow Bark Extract. *Arzneimittelforschung*. **55**, 677-687 (2011).
- Kuhn, K., Hashimoto, S., Lotz, M. IL-1 β protects human chondrocytes from CD95-induced apoptosis. *The Journal of Immunology*. **164**, 2233-2239 (2000).
- Kiela, P.R. and Ghishan, F.K. Physiology of intestinal absorption and secretion. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*. **30**, 145-159 (2016).
- Kiezun, A., Artzi, S., Modai, S., Volk, N., Isakov, O., Shomron, N. miRviewer: a multispecies microRNA homologous viewer. *BMC Research Notes*. **5**, 92 (2012).
- Kim, J.J., and Conrad, H.E. Kinetics of mucopolysaccharide and glycoprotein synthesis by chick embryo chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*. **251**, 6210-6217 (1976).
- Kim, H.A., Suh, D.I., Song, Y.W. Relationship between chondrocyte apoptosis and matrix depletion in human articular cartilage. *The Journal of Rheumatology*. **28**, 2038-2045 (2001).
- Kim, L.S., Axelrod, L.J., Howard, P., Buratovich, N. Waters, R.F. Efficacy of methylsulfonylmethane (MSM) in osteoarthritis pain of the knee: a pilot clinical trial. *Osteoarthritis and Cartilage*. **14**, 286-294 (2006).
- Kirkpatrick, C.J., Mohr, W. Haferkamp, O. Alterations in Chondrocyte Morphology, Proliferation and Binding of $^{35}\text{SO}_4$ due to Fe(III), Fe(II), Ferritin and Haemoglobin in vitro. *Cell Pathology*. **38**, 297-306 (1982).
- Kizhakkedath, R. Clinical evaluation of a formulation containing Curcuma longa and Boswellia serrata extracts in the management of knee osteoarthritis. *Molecular Medicine Reports*. **8**, 1542-1548 (2013).
- Komori, T. Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *Journal of Cellular Biochemistry*. **95**, 445-453 (2005).
- Koskimaki, J.E. Kariagiannis, E.D., Tang, B.C., Hammers, H., Watkins, D.N., Pili, R., Popel, A.S. Pentastatin-1, a collagen IV derived 20-mer peptide, suppresses tumor growth in a small cell lung cancer xenograft model. *BMC Cancer*. **10**, (2010).
- Krejci, P., Krakow, D., Mekikian, P.B., Wilcox, W. R. Fibroblast Growth Factors 1, 2, 17, and 19 Are the Predominant FGF Ligands Expressed in Human Fetal Growth Plate Cartilage. *Pediatric Research*. **61**, 267-272 (2007).
- Kreuger, J. Matsumoto, T., Vanwildemeersch, M., Sasaki, T., Timpl, R., Claesson Welsh, L., Spillmann, D., Lindahl, U. Role of heparan sulfate domain organization in endostatin inhibition of endothelial cell function. *The EMBO Journal*. **21**, 6303-6311 (2002).
- Kuilman, T. and Peeper, D.S. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature Reviews Cancer*. **9**, 81-94 (2009).

- Kuo, K.C., Lin, R.Z., Tien, H.W., Wu, P.Y., Li, Y.C., Melero-Martin, J.M., Chen, Y.C. Bioengineering vascularized tissue constructs using an injectable cell-laden enzymatically crosslinked collagen hydrogel derived from dermal extracellular matrix. *Acta Biomaterialia*. **27**, 151-166 (2015).
- Kuptniratsaikul, V., Dajpratham, P., Taechaarpornkul, W., Buntragulpoontawe, M., Lukkanapichonchut, P., Chootip, C., Saengsuwan, J., Tantayakom, K., Laongpech, S. Efficacy and safety of Curcuma domestica extracts compared with ibuprofen in patients with knee osteoarthritis: a multicenter study. *Clinical Interventions in Aging*. **9**, 451-458 (2014).
- Kurz, B., Jost, B., Schünke, M. Dietary vitamins and selenium diminish the development of mechanically induced osteoarthritis and increase the expression of antioxidative enzymes in the knee joint of STR/1N mice. *Osteoarthritis and Cartilage*. **10**, 119-126 (2002).
- Kuyinu, E.L., Narayanan, G., Nair, L.S., Laurencin, C.T. Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. **11**, (2016).
- L
- Lafeber, F.P.J.G., Miossec, P., Valentino, L.A. Physiopathology of haemophilic arthropathy. *Haemophilia*. **14**, 3-9 (2008).
- Lafont, J.E. Lack of oxygen in articular cartilage: consequences for chondrocyte biology. *International Journal of Experimental Pathology*. **91**, 99-106 (2010).
- Lafont, J.E., Talma, S., Hopfgarten, C., Murphy, C.L. Hypoxia promotes the differentiated human articular chondrocyte phenotype through SOX9-dependent and -independent pathways. *Journal of Biological Chemistry*. **283**, 4778-4786 (2008).
- Lafont, J.E., Poujade, F.A., Padeloup, M., Neyret, P., Mallein-Gerin, F. Hypoxia potentiates the BMP-2 driven COL2A1 stimulation in human articular chondrocytes via p38 MAPK. *Osteoarthritis and Cartilage*. **24**, 856-867 (2016).
- Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M.M., Sze, N.S., Choo, A., Chen, T. S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C.N., El, O.R., Pasterkamp, G., De Kleijn, D.P., Lim, S.K. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research*. **4**, 214-222 (2010).
- Lambert, E., Fuselier, E., Ramont, L., Brassart, B., Dukic, S., Oudart, J.B., Dupont Deshorgue, A., Sellier, C., Machado, C., Dauchez, M., Monboisse, J.C., Maquart, F.X., Baud, S., Brassart Pasco, S. Conformation-dependent binding of a Tetrastatin peptide to $\alpha v \beta 3$ integrin decreases melanoma progression through FAK/PI3K/Akt pathway inhibition. *Scientific Reports*. **8**, (2018).
- Lansdown, A.B.G., Mirastschijski, U., Stubbs, N., Scanlon, E., Ågren, M.S. Zinc in wound healing: Theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair and Regeneration*. **15**, 2-16 (2007).
- LaPorta, T.F., Richter, A., Sgaglione, N.A., Grande, D.A. Clinical relevance of scaffolds for cartilage engineering. *The Orthopaedic Clinics of North America*. **43**, 245-254 (2012).

- Lazarus, J. E., Hegde, A., Andrade, A.C., Nilsson, O., Baron, J. Fibroblast growth factor expression in the postnatal growth plate. *Bone*. **40**, 577-586 (2007).
- Lee, S.W., Lee, H.J., Chung, W.T., Choi, S.M., Rhyu, S.H., Kim, D.K., Kim, K.T., Kim, J.Y., Kim, J.M., Yoo, Y.H. TRAIL induces apoptosis of chondrocytes and influences the pathogenesis of experimentally induced rat osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatology*. **50**, 534-542 (2004).
- Lee, Y.C., Nassikas, N.J., Clauw, D.J. The role of the central nervous system in the generation and maintenance of chronic pain in rheumatoid arthritis, osteoarthritis and fibromyalgia. *Arthritis Research and Therapy*. **13**, 211 (2011).
- Lee, H.H., Chang, C.C., Shieh, M.J., Wang, J.P., Chen, Y.T., Young, T.H., Hung, S.C. Hypoxia enhances chondrogenesis and prevents terminal differentiation through PI3K/Akt/FoxO dependent anti-apoptotic effect. *Scientific Report*. **3**, 2683 (2013).
- Lefebvre, V., Li, P., De Crombrughe, B. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *The EMBO Journal*. **17**, 5718-5733 (1998).
- Lefebvre, V., Behringer, R.R., De Crombrughe, B. L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthritis and Cartilage*. **9**, S69-S75 (2001).
- Legendre, F., Ollitrault, D., Hervieu, M., Baugé, C., Maneix, L., Goux, D., Chajra, H., Mallein Gerin, F., Boumediene, K., Galera, P., Demoor, M. Enhanced Hyaline Cartilage Matrix Synthesis in Collagen Sponge Scaffolds by Using siRNA to Stabilize Chondrocytes Phenotype Cultured with Bone Morphogenetic Protein-2 Under Hypoxia. *Tissue Engineering Part C Methods*. **19**, 550-567 (2013).
- Lejima, D., Nakayama, M., Iwata, T. HTRA1 Overexpression Induces the Exudative Form of Age-related Macular Degeneration. *Stem Cells*. **10**, 193-203 (2015).
- Léonard, A., Gerber, G.B., Léonard, F. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of zinc. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. **168**, 343-353 (1986).
- Levett, P.A., Melchels, F.P., Schrobback, K., Hutmacher, D.W., Malda, J., Klein, T.J. A biomimetic extracellular matrix for cartilage tissue engineering centered on photocurable gelatin, hyaluronic acid and chondroitin sulfate. *Acta Biomaterialia*. **10**, 214-223 (2014).
- Li, R. and Zhang, Q. HtrA1 may regulate the osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells by TGF- β 1. *Journal of Molecular Histology*. **46**, 137-144 (2015).
- Lin, C., McGough, R., Aswad, B., Block, J.A., Terek, R. Hypoxia induces HIF-1 α and VEGF expression in chondrosarcoma cells and chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Research*. **22**, 1175-1181 (2004).
- Lin, E.A., Kong, L., Bai, X.H., Luan, Y., Liu, C.J. miR-199a, a bone morphogenetic protein 2-responsive MicroRNA, regulates chondrogenesis via direct targeting to Smad1. *Journal of Biological Chemistry*. **284**, 11326-11335 (2009).
- Linder, M.C. Ceruloplasmin and other copper binding components of blood plasma and their functions: an update. *Metallomics*. **8**, 887-905 (2016).

- Liu, M. Zeng, X., Ma, C., Yi, H., Ali, Z., Mou, X., Li, S., Deng, Y., He, N. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone Research*. **5**, (2017).
- Liu, T. M. and Lee, E. H. Transcriptional Regulatory Cascades in Runx2-Dependent Bone Development. *Tissue Engineering Part B Reviews*. **19**, 254-263 (2013).
- Loboda, A., Jozkowicz, A., Dulak, J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors — Similar but not identical. *Molecules and Cells*. **29**, 435-442 (2010).
- Loeser, R.F. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis and Cartilage*. **17**,971-979 (2009).
- Lorenzo, P. Aspberg, A., Onnerfjord, P., Bayliss, M.T., Neame, P.J., Heinegard, D. Identification and Characterization of Asporin: a novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan. *Journal of Biological Chemistry*. **276**, 12201-12211 (2001).
- Lotz, M., Hashimoto, S., Kühn, K. Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis and Cartilage*. **7**, 389-391 (1999).
- Lotz, M. and Loeser, R. F. Effects of aging on articular cartilage homeostasis. *Bone*. **51**, 241-248 (2012).
- Lukens, J.R., Gross, J.M., Kanneganti, T.D. IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease. *Frontiers in Immunology*. **3**, (2012).
- Luo, N., Knudson, W., Askew, E.B., Veluci, R., Knudson, C.B. CD44 and Hyaluronan Promote the Bone Morphogenetic Protein 7 Signaling Response in Murine Chondrocytes: BMP-7 Signaling Response in Murine Chondrocytes. *Arthritis and Rheumatology*. **66**, 1547-1558 (2014).

M

- Ma, J. You, D., Li, W.Y., Lu, X.L, Sun, S., Li H.W. Bone morphogenetic proteins and inner ear development. *Journal of Zhejiang University-science b*. **20**, 131-145 (2019).
- Ma, L. Elliott, S.N., Cirino, G., Buret, A., Ignarro, L.J., Wallace, J.L. Platelets modulate gastric ulcer healing: Role of endostatin and vascular endothelial growth factor release. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. **98**, 6470-6475 (2001).
- MacConaill, M.A. The movement of bones and joint; the mechanical structure of articulating cartilage. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. **33**, 251-257 (1951).
- Maeshima, Y., Colorado, P.C., Kalluri, R. Two RGD-independent $\alpha_v\beta_3$ Integrin Binding Sites on Tumstatin Regulate Distinct Anti-tumor Properties. *Journal of Biological Chemistry*. **275**, 23745-23750 (2000).
- Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, Hu JC, Athanasiou KA Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nature Reviews Rheumatology*. **11**, 21-34 (2014).
- Maneiro, E., Martin, M.A., de Andres, M.C., Lopez-Armada, M.J., Fernandez-Sueiro, J.L., Del Hoyo, P., Galdo, F., Arenas, J., Blanco, F.J. Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis and Rheumatology*. **48**, 700-708 (2003).


- Manning, L.B., Li, Y., Chickmagalur, N.S., Li, X., Xu, L. Discoidin Domain Receptor 2 as a Potential Therapeutic Target for Development of Disease-Modifying Osteoarthritis Drugs. *The American Journal of Pathology*. **186**, 3000-3010 (2016).
- Manon Jensen, T., Kjeld, N.G., Karsdal, M. A. Collagen-mediated hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **14**, 438-448 (2016).
- Marcucio, R., Hu, D., Yang, F., Bahney, C., Mclau, T. Transdifferentiation of chondrocytes to osteoblasts during bone fracture healing. *The FASEB Journal*. **30**, 223-231 (2016).
- Marinova Mutafchieva, L., Taylor, P., Funa, K., Maini, R.N., Zvaifler, N.J. Mesenchymal cells expressing bone morphogenetic protein receptors are present in the rheumatoid arthritis joint. *Arthritis and Rheumatism*. **43**, 2046-2055 (2000).
- Marudas, A. Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage. *Nature*. **260**, 808-809 (1976).
- Martin, J.A. and Buckwalter, J.A., Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes. *The Journals of Gerontology Series A Biological Sciences and Medical Sciences*. **56**, 172-179 (2001).
- Martin, J.A., Brown, T., Heiner, A., Buckwalter, J.A. Post-traumatic osteoarthritis: the role of accelerated chondrocyte senescence. *Biorheology*. **41**, 479-491 (2004)a.
- Martin, J.A., Klingelutz, A.J., Moussavi-Harami, F., Buckwalter, J.A. Effects of oxidative damage and telomerase activity on human articular cartilage chondrocyte senescence. *The Journals of Gerontology Series A Biological Sciences and Medical Sciences*. **59**, 324-337 (2004)b.
- Martinon, F., Agostini, L., Meylan, E., Tschopp, J. Identification of Bacterial Muramyl Dipeptide as Activator of the NALP3/Cryopyrin Inflammasome. *Current Biology*. **14**, 1929-1934 (2004).
- Mason, R.M. and Sweeney, C. The relationship between proteoglycan synthesis in Swarm chondrocytes and pathways of cellular energy and UDP-sugar metabolism. *Carbohydrate Research*. **255**, 255-270 (1994).
- Massagué, J. TGF- β signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*. **67**, 753-791 (1998).
- Mauck, R.L., Soltz, M.A., Wang, C.C., Wong, D.D., Chao, P.H.G., Valhmu, W.B., Hung, C.T., Ateshian, G.A. Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *The Journal of Biomechanical Engineering*. **122**, 252-260 (2000).
- Maxwell, P.H. Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator: Hypoxia-inducible factor. *Experimental Physiology*. **90**, 791-797 (2005).
- Mayer, N., Lopa, S., Talò, G., Lovati, A.B., Padeloup, M., Riboldi, S.A., Moretti, M., Mallein-Gerin, F. Interstitial Perfusion Culture with Specific Soluble Factors Inhibits Type I Collagen Production from Human Osteoarthritic Chondrocytes in Clinical-Grade Collagen Sponges. *PLoS ONE*. **11**, 161479 (2016).
- Maynard, M. A. Qi, H., Chung, J., Lee, E.H., Kondo, Y., Hara, S., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Ohh, M. Multiple Splice Variants of the Human HIF-3 α Locus Are Targets of the von Hippel-Lindau E3 Ubiquitin Ligase Complex. *Journal of Biological Chemistry*. **278**, 11032-11040 (2003).

- McAlinden, A., Johnstone, B., Kollar, J., Kazmi, N., Hering, T. Expression of two novel alternatively spliced COL2A1 isoforms during chondrocyte differentiation. *Matrix Biology*. **27**, 254-266 (2008).
- McCoy, A.M. Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. *Veterinary Pathology*. **52**, 803-818 (2015).
- McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Kawcak, C.E. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone and Joint Research*. **1**, 297-309 (2012).
- Medeiros, D.M. Copper, iron, and selenium dietary deficiencies negatively impact skeletal integrity: A review. *Experimental Biology and Medicine*. **241**, 1316-1322 (2016).
- Mehlhorn, A. T., Niemeyer, P., Kaiser, S., Finkenzeller, G., Stark, G.B., Sudkamp, N.P., Schmal, H. Differential expression pattern of extracellular matrix molecules during chondrogenesis of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Engineering*. **12**, 2853-2862 (2006).
- Meirelles, L. S., Fontes, A. M., Covas, D. T., Caplan, A. I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. **20**, 419-427 (2009).
- Mella, C., Nuñez, A., Villalón, I. Treatment of acetabular chondral lesions with microfracture technique. *SICOT-J*. **3**, (2017).
- Mendler, M., Eich Bender, S.G., Vaughan, L., Winterhalter, K.H., Bruckner, P. Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *The Journal of Cell Biology*. **108**, 191-197 (1989).
- Merline, R., Schaefer, R. M., Schaefer, L. The matricellular functions of small leucine-rich proteoglycans (SLRP). *Journal of Cell Communication and Signaling*. **3**, 323-335 (2009).
- Merza, H., Sood, N., Sood, R. Idiopathic hyperzincemia with associated copper deficiency anemia: a diagnostic dilemma. *Clinical Case Reports*. **3**, 819-822 (2015).
- Messier, S.P. Obesity and Osteoarthritis: Disease Genesis and Nonpharmacologic Weight Management. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. **34**, 713-729 (2008).
- Miller, E.J. and Matukas, V.J. Chick cartilage collagen: a new type of $\alpha 1$ chain not present in bone or skin of the species. *Biochemistry*. **64**, 1264-1268 (1969).
- Miosge, N., Sasaki, T., Timpl, R. Angiogenesis inhibitor endostatin is a distinct component of elastic fibers in vessel walls. *The FASEB Journal*. **13**, 1743-1750 (1999).
- Młyniec, K., Gawęł, M., Doboszewska, U., Starowicz, G., Pytko, K., Davies, C.L., Budziszewska, B. Essential elements in depression and anxiety. *Pharmacological Reports*. **67**, 187-194 (2015).
- Mobasheri, A., Richardson, S., Mobasheri, R., Shakibaei, M., Hoyland, J. A. Hypoxia inducible factor-1 and facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT3: Putative molecular components of the oxygen and glucose sensing apparatus in articular chondrocytes. *Histology and Pathology*. **20**, 1327-1338 (2005).
- Mok, S.S., Masuda, K., Hauselmann, H.J., Aydelotte, M.B., Thonar, E.J. Aggrecan synthesized by mature bovine chondrocytes suspended in alginate. Identification of two distinct metabolic matrix pools. *Journal of Biological Chemistry*. **269**, 33021-33027 (1994).

- Mollenhauer, J., Bee, J.A., Lizarbe, M.A., Von Der Mark, K. Role of anchorin CII, a 31,000-mol-wt membrane protein, in the interaction of chondrocytes with type II collagen. *The Journal of Cell Biology*. **98**, 1572-1579 (1984).
- Monboisse, J.C., Oudart, J.B., Ramont, L., Brassart Pasco, S., Maquart, F.X. Matrikines from basement membrane collagens: A new anti-cancer strategy. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1840**, 2589-2598 (2014).
- Morales, T.I. Chondrocyte moves: clever strategies? Osteoarthritis and cartilage/OARS. *Osteoarthritis Research Society International*. **15**, 61-71 (2007).
- Moran, C.J., Ramesh, A., Brama, P.A., O'Byrne, J.M., O'Brien, F.J., Levingstone, T.J. The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair. *Journal of Experimental Orthopaedics*. **3**, (2016).
- Morris, N.P. and Bächinger, H.P. Type XI collagen is a heterotrimer with the composition (1 alpha, 2 alpha, 3 alpha) retaining non-triple-helical domains. *Journal of Biological Chemistry*. **262**, 11345-11350 (1987).
- Murdoch, A.D., Hardingham, T.E., Eyre, D.R., Fernandes, R.J. The development of a mature collagen network in cartilage from human bone marrow stem cells in Transwell culture. *Matrix Biology*. **50**, 16-26 (2016).
- Murphy, M.P., Koepke, L.S., Lopez, M.T., Tong, X., Ambrosi, T.H., Gulati, G.S., Marecic, O., Wang, Y., Ransom, R.C., Hoover, M.Y., Steininger, H., Zhao, L., Walkiewicz, M.P., Quarto, N., Levi, B., Wan, D.C., Weissman, I.L., Goodman, S.B., Yang, F., Longaker, M.T., Chan, C.K.F. Articular cartilage regeneration by activated skeletal stem cells. *Nature Medicine*. **26**, 1583-1592 (2020).

N

- Nahrstedt, A., Schmidt, M., Jäggi, R., Metz, J., Khayyal, M.T. Willow bark extract: The contribution of polyphenols to the overall effect. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. **157**, 348-351 (2007).
- Neidhart, M., Hauser, N., Paulsson, M., DiGesare, P.E., Michel, B.A., Häuselmann, H.J. Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. *Rheumatology*. **36**, 1151-1160 (1997).
- Nieuwenhuizen, L. Roosendaal, G., Mastbergen, S.C., Coeleveld, K., Biesma, D.H., Lafeber, F.P., Schutgens, R.E. Antiplasmin, but not amiloride, prevents synovitis and cartilage damage following hemarthrosis in hemophilic mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **12**, 237-245 (2014).
- Nishimura, K., Solchaga, L.A., Caplan, A.I., Yoo, J.U., Goldberg, V.M., Johnstone, B. Chondroprogenitor cells of synovial tissue. *Arthritis and Rheumatology*. **42**, 2631-2637 (1999).

- Nishimura, R., Wakabayashi, M., Hata, K., Matsubara, T., Honma, S., Kiyonari, H., Shioi, G., Yamaguchi, A., Tsumaki, N., Akiyama, H., Yoneda, T. Osterix Regulates Calcification and Degradation of Chondrogenic Matrices through Matrix Metalloproteinase 13 (MMP13) Expression in Association with Transcription Factor Runx2 during Endochondral Ossification. *Journal of Biological Chemistry*. **287**, 33179-33190 (2012).
- Nyberg, P., Xie, L., Kalluri, R. Endogenous Inhibitors of Angiogenesis. *Cancer Research*. **10**, 3967-3979 (2005).
- 
- O'Rear, L., Longobardi, L., Torello, M., Law, B.K., Moses, H.L., Chiarelli, F., Spagnoli, A. Signaling cross-talk between IGF-binding protein-3 and transforming growth factor-(beta) in mesenchymal chondrogenitor cell growth. *Journal of Molecular Endocrinology*. **3**, 723-37 (2005).
- Oesser, S. and Seifert, J. Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell and Tissue Research*. **311**, 393-399 (2003).
- Ohara, H., Iida, H., Ito, K., Takeuchi, Y., Nomura, Y. Effects of Pro-Hyp, a collagen hydrolysate-derived peptide, on hyaluronic acid synthesis using in vitro cultured synovium cells and oral ingestion of collagen hydrolysates in a guinea pig model of osteoarthritis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **74**, 2096-2099 (2010).
- 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. HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by TGF family proteins. *Development*. **131**, 1041-1053 (2004).
- Oke, S.L. and McIlwraith, C.W. Review of the Economic Impact of Osteoarthritis and Oral Joint-Health Supplements in Horses. *Joints*. **56**, 12-16 (2010).
- 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. BMP-2, hypoxia, and COL1A1/HtrA1 siRNAs favor neo-cartilage hyaline matrix formation in chondrocytes. *Tissue Engineering Part C Methods*. **21**, 133-147 (2015).
- Olney, R.C. Mechanisms of impaired growth: effect of steroids on bone and cartilage. *Hormone Research in Paediatrics*. **1**, 30-35 (2009).
- Ornitz, D.M. FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. **16**, 205-13 (2005).
- Ortega, N., Behonick, D.J., Werb, Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends in Cell Biology*. **14**, 86-93 (2004).
- Ortved, K.F. and Nixon, A.J. Cell-based cartilage repair strategies in the horse. *The Veterinary Journal*. **208**, 1-12 (2016).

P

- Palmer, J.L. and Bertone, A.L. Joint structure, biochemistry and biochemical disequilibrium in synovitis and equine joint disease. *Equine Veterinary Journal*. **26**, 263-277 (1994).
- Palomo, J., Dietrich, D., Martin, P., Palmer, G., Gabay, C. The interleukin (IL)-1 cytokine family - Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. *Cytokine*. **76**, 25-37 (2015).
- Pappenheimer, J.R., Dahl, C.E., Karnovsky, M.L., Maggio, J.E. Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of D amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. **91**, 1942-1945 (1994).
- Park, N.R., Lim, K.E., Han, M.S., Che, X., Park, C., Kim, J.E., Taniuchi, I., Bae, S.C., Choi, J.Y. Core binding factor β plays a critical role during chondrocyte differentiation. *Journal of Cellular Physiology*. **231**, 162-171 (2016).
- Patel, S. and Simon, M. Biology of hypoxia-inducible factor-2a in development and disease. *Cell Death and Differentiation*. **15**, 628-634 (2008).
- Pedrini, F., Hausen, M., Gomes, R., Duek, E. Enhancement of cartilage extracellular matrix synthesis in Poly(PCL-TMC) urethane scaffolds: a study of oriented dynamic flow in bioreactor. *Biotechnology Letters*. **42**, 2721-2734 (2020).
- Pelt, C.E., Erickson, J.A., Peters, C. L., Anderson, M. B., CannonAlbright, L.A Heritable Predisposition to Osteoarthritis of the Hip. *The Journal of Arthroplasty*. **30**, 125-129 (2015).
- Percival, S.S. Cooper and immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **67**, 1064-1068 (1998).
- Perkins, N., Reid, S., Morris, R. Pro ling the New Zealand Thoroughbred racing industry. 2. Conditions interfering with training and racing. *New Zealand Veterinary Journal*. **53**, 69-76 (2004).
- Peterson, R.S., Andhare, R.A., Rousche, K.T., Knudson, W., Wang, W., Grossfield, J.B., Thomas, R.O., Hollingsworth, R.E., Knudson, C.B. CD44 modulates Smad1 activation in the BMP-7 signaling pathway. *Journal of Cell Biology*. **166**, 1081-1091 (2004).
- Petitclerc, E., Boutaud, A., Prestayko, A., Xu, J., Sado, Y., Ninomiya, Y., Sarras, M.P., Hudson, B.G., Brooks, P.C. New Functions for Non-Collagenous Domains of Human Collagen Type IV: novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*. **275**, 8051-8061 (2000).
- Pettersen, I., Figenschau, Y., Olsen, E., Bakkelund, W., Smedsrod, B., Sveinbjornsson, B. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces apoptosis in human articular chondrocytes in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **296**, 671-676 (2002).
- Pfander, D., Kortje, D., Zimmermann, R., Weseloh, G., Kirsch, T., Gesslein, M., Cramer, T., Swoboda, B. Vascular endothelial growth factor in articular cartilage of healthy and osteoarthritic human knee joints. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **60**, 1070-1073 (2001).

- Pfander, D., Heinz, N., Rothe, P., Carl, H.D., Swoboda, B. Tenascin and aggrecan expression by articular chondrocytes is influenced by interleukin 1 β : A possible explanation for the changes in matrix synthesis during osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **63**, 240-244 (2004).
- Pfander, D., Swoboda, B. Cramer, T. The role of HIF-1 in maintaining cartilage homeostasis and during the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Research and Therapy*. **8**, 104-105 (2006).
- Pham, T. Les injections intra-articulaires de hanche dans la coxarthrose : corticoïdes, hyaluronan. *Revue du Rhumatisme*. **76**, 356-360 (2009).
- Philipot, D., Guerit, D., Platano, D., Chuchana, P., Olivotto, E., Espinoza, F., Dorandeu, A., Pers, Y.M., Piette, J., Borzi, R.M., Jorgensen, C., Noel, D., Brondello, J.M. p16INK4a and its regulator miR-24 link senescence and chondrocyte terminal differentiation-associated matrix remodeling in osteoarthritis. *Arthritis Research and Therapy*. **16**, 58 (2014).
- Plum, L.M., Rink, L., Haase, H. The Essential Toxin: Impact of Zinc on Human Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. **7**, 1342-1365 (2010).
- Poepsel, S., Sprengel, A., Sacca, B., Kaschani, F., Kaiser, M., Gatsogiannis, C., Raunser, S., Clausen, T., Ehrmann, M. Determinants of amyloid fibril degradation by the PDZ protease HTRA1. *Nature Chemical Biology*. **11**, 862-869 (2015).
- Poole, A.R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M., Lavery, S. Composition and Structure of Articular Cartilage: A Template for Tissue Repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. **391**, 26-33 (2001).
- Poole, C.A., Ayad, S., Schofield, J.R. Immunolocalization of type VI collagen in the pericellular capsule of isolated canine tibial chondrons. *Journal of Cell Science*. **90**, 635-643 (1988).
- Poole, C.A., Glant, T.T., Schofield, J.R. Chondrons from articular cartilage. (IV) Immunolocalization of proteoglycan epitopes in isolated canine tibial chondrons. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. **39**, 1075-1187 (1991).
- Poole, C.A., Ayad, S., Gilbert, R.T. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy. *Journal of Cell Science*. **103**, 1101-1110 (1992).
- Pourmand, E.P., Binderman, I., Doty, S.B., Kudryashov, V., Boskey, A.L. Chondrocyte apoptosis is not essential for cartilage calcification: Evidence from an in vitro avian model. *Journal of Cellular Biochemistry*. **100**, 43-57 (2007).
- Powell, S.R. The Antioxidant Properties of Zinc. *The Journal of Nutrition*. **130**, 1447-1454 (2000).
- Prasad, A.S., Miale, A., Farid, Z., Sandstead, H.H., Schulert, A.R. Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. **61**, 537-549 (1963).
- Prasad, A.S. Recognition of zinc-deficiency syndrome. *Nutrition*. **17**, 67-69 (2001).
- Prasad, A.S. Zinc is an Antioxidant and Anti-Inflammatory Agent: Its Role in Human Health. *Frontiers in Nutrition*. **1**, (2014).

- Preston, S.A., Trumble, T.N., Zimmel, D.N., Chmielewski, T.L., Brown, M.P., Hernandez, J.A. Lameness, athletic performance, and financial returns in yearling Thoroughbreds bought for the purpose of resale for profit. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **232**, 85-90 (2008).
- Price, J.S., Waters, J.G., Darrah, C., Pennington, C., Edwards, D.R., Donell, S.T., Clark, I.M. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell*. **1**, 57-65 (2002).
- Prockop, D.J., Sieron, A.L., Li, S.W. 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 Biology*. **16**, 399-408 (1998).
- Prydz, K. and Dalen, K.T. Synthesis and sorting of proteoglycans. *Journal of Cell Science*. **113**, 193-205 (2000).
- Pulai, J.I., Del Carlo, M.J., Loeser, R.F. The $\alpha 5 \beta 1$ integrin provides matrix survival signals for normal and osteoarthritic human articular chondrocytes in vitro. *Arthritis and Rheumatology*. **46**, 1528-1535 (2002).
- Pujol, J.P., Chadjichristos, C., Legendre, F., Bauge, C., Beauchef, G., Andriamanalijaona, R., Galera, P., Boumediene, K. Interleukin-1 and Transforming Growth Factor- β 1 as Crucial Factors in Osteoarthritic Cartilage Metabolism. *Connective Tissue Research*. **49**, 293-297 (2008).

R

- Rabie, A.B., Tang, G.H., Hagg, U. Cbfa1 couples chondrocytes maturation and endochondral ossification in rat mandibular condylar cartilage. *Archives of Oral Biology*. **49**, 109-118 (2004).
- Rakic R, Bourdon B, Hervieu M, Branly T, Legendre F, Saulnier N, Audigié F, Maddens S, Demoor M, Galera P. RNA Interference and BMP-2 Stimulation Allows Equine Chondrocytes Redifferentiation in 3D-Hypoxia Cell Culture Model: Application for Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation. *International Journal of Molecular Sciences*. **18**, 1842 (2017).
- Rakic R, Bourdon B, Demoor M, Maddens S, Saulnier N, Galéra P. Differences in the intrinsic chondrogenic potential of equine umbilical cord matrix and cord blood mesenchymal stromal/stem cells for cartilage regeneration. *Scientific Reports*. **8**, 13799 (2018).
- Ramchandran, R., Dhanabal, M., Volk, R., Waterman, M.J., Segal, M., Lu, H., Knebelmann, B., Sukhatme, V.P. Antiangiogenic Activity of Restin, NC10 Domain of Human Collagen XV: Comparison to Endostatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **255**, 735-739 (1999).
- Rand, J.A., Trousdale, R.T., Ilstrup, D.M., Harmsen, W.S. factors affecting the durability of primary total knee prostheses: *The Journal of Bone and Joint Surgery-American*. **85**, 259-265 (2003).
- Rayman, M.P. Selenium and human health. *The Lancet*. **379**, 1256-1268 (2012).

- Rebustini, I.T, Myers, C., Lassiter, K.S., Surmak, A., Szabova, L., Holmbeck, K., Pedchenko, V., Hudson, B.G., Hoffman, M.P. MT2-MMP-Dependent Release of Collagen IV NC1 Domains Regulates Submandibular Gland Branching Morphogenesis. *Developmental Cell*. **17**, 482-493 (2009).
- Redini, F., Galera, P., Mauviel, A., Loyau, G., Pujol, J.P. Transforming growth factor β stimulates collagen and glycosaminoglycan biosynthesis in cultured rabbit articular chondrocytes. *FEBS Letters*. **234**, (1998).
- Ren, Y., Zhang, H., Qin, W., Du, B., Liu, L., Yang, J. A collagen mimetic peptide-modified hyaluronic acid hydrogel system with enzymatically mediated degradation for mesenchymal stem cell differentiation. *Materials Science and Engineering*. **108**, 110276 (2020).
- Rengel, Y., Ospelt, C., Gay, S. Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction. *Arthritis Research and Therapy*. **9**, 221 (2007).
- Ricard-Blum, S. The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. **3**, 4978 (2011).
- Ricard-Blum, S. and Salza, R. Matricryptins and matrikines: biologically active fragments of the extracellular matrix. *Experimental Dermatology*. **23**, 457-463 (2014).
- Ricard-Blum, S. and Vallet, S.D. Fragments generated upon extracellular matrix remodeling: Biological regulators and potential drugs. *Matrix Biology*. **75**, 170-189 (2019).
- Rink, L. and Gabriel, P. Extracellular and immunological actions of zinc. in *Zinc Biochemistry, Physiology, and Homeostasis*. **14**, 181-197 (2001).
- Rivera, S., Khrestchatisky, M., Kaczmarek, L., Rosenberg, G.A., Jaworski, D.M. Metzincin Proteases and Their Inhibitors: Foes or Friends in Nervous System Physiology? *Journal of Neuroscience*. **30**, 15337-15357 (2010).
- Roman-Blas, J.A., Castañeda, S., Largo, R., Herrero Beaumont, G. Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis Research and Therapy*. **11**, 241 (2009).
- Ronziere, M. C., Perrier, E., Mallein-Gerin, F., Freyria, A.M. Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells. *Biomedical Materials and Engineering*. **20**, 145-158 (2010).
- Rose, J., Söder, S., Skhirtladze, C., Schmitz, N., Gebhard, P.M., Sesselmann, S., Aigner, T. DNA damage, disordinated gene expression and cellular senescence in osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*. **20**, 1020-1028 (2012).
- Ross, M. and Pawlina, W. Histology A Text and Atlas. *Lippincott Williams and Wilkins*: 1-1996 (2011).
- Roughley, P.J. and Mort, J.S. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. *Journal of Experimental Orthopaedics*. **1**, (2014).
- Roughley, P.J. and Lee, E.R. Cartilage proteoglycans: Structure and potential functions. *Microscopy Research and Technique*. **28**, 385-397 (1994).
- Ryan, M.C., and Sandell, L.J. Differential expression of a cysteine-rich domain in the amino-terminal propeptide of type II (cartilage) procollagen by alternative splicing of mRNA. *Journal of Biological Chemistry*. **265**, 10334-10339 (1990).

Ryu, J.H., Yang, S., Shin, Y., Rhee, J., Chun, C.H., Chun, J.S. Interleukin-6 plays an essential role in hypoxia-inducible factor 2 α -induced experimental osteoarthritic cartilage destruction in mice. *Arthritis and Rheumatism*. **63**, 2732-2743 (2011).

S

Sandell, L.J. Morris, N., Robbins, J.R., Goldring, L.D. Alternatively Spliced Type 11 Procollagen mRNAs Define Distinct Populations of Cells during Vertebral Development: Differential Expression of the Amino-Propeptide. *The Journal of Cell Biology*. **114**, 13 (1991).

Sandell, L. J. and Aigner, T. Articular cartilage and changes in arthritis an introduction: Cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Research*. **3**, 107-113 (2001).

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. *Developmental Dynamics*. **199**, 129-140 (1994).

Sasaki, T., Larsson, H., Kreuger, J., Salmivirta, M., Claesson Welsh, L., Lindahl, U., Hohenester, E., Timpl, R. Structural basis and potential role of heparin/heparan sulfate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin. *The EMBO Journal*. **18**, 6240-6248 (1999).

Sasaki, T., Larsson, H., Tisi, D., Claesson Welsh, L., Hohenester, E., Timpl, R. Endostatins derived from collagens XV and XVIII differ in structural and binding properties, tissue distribution and anti-angiogenic activity. *Journal of Molecular Biology*. **301**, 1179-1190 (2000).

Schafer, M.J., White, T.A., Evans, G., Tonne, J.M., Verzosa, G.C., Stout, M.B., Mazula, D.L., Palmer, A.K., Baker, D.J., Jensen, M.D., Torbenson, M.S., Miller, J.D., Ikeda, Y., Tchkonja, T., Van Deursen, J.M., Kirkland, J.L., LeBrasseur, N.K. Exercise prevents diet-induced cellular senescence in adipose tissue. *Diabetes*. **65**, 1606-1615 (2016).

Schaible, H.G., Ebersberger, A., Natura, G. Update on peripheral mechanisms of pain: beyond prostaglandins and cytokines. *Arthritis Research and Therapy*. **13**, 210 (2011).

Schenk, S. and Quaranta, V. Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix. *Trends in Cell Biology*. **13**, 366-375 (2003).

Schlechter, N.L., Russell, S.M., Spencer, E.M., Nicoll, C.S. Evidence suggesting that the direct growth-promoting effect of growth hormone on cartilage in vivo is mediated by local production of somatomedin. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. **20**, 7932-7924 (1986).

Schmid, B., Lütke, R., Selbmann, H.K., Kötter, I., Tschirdewahn, B., Schaffner, W., Heide, L. Efficacy and tolerability of a standardized willow bark extract in patients with osteoarthritis: randomized placebo-controlled, double blind clinical trial: willow bark extract in osteoarthritis. *Phytotherapy Research*. **15**, 344-350 (2001).

Schmid, T. M. and Linsenmayer, T.F. Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues. *The Journal of Cell Biology*. **100**, 598-605 (1985).

- Schneider, U., Schmidt-Rohlfing, B., Gavenis, K., Maus, U., Mueller-Rath, R., Andereya, S. A comparative study of 3 different cartilage repair techniques. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. **19**, 2145-2152 (2011).
- Schrobback, K. Klein, T.J., Crawford, R., Upton, Z., Malda, J., Leavesley, D.I. Effects of oxygen and culture system on in vitro propagation and redifferentiation of osteoarthritic human articular chondrocytes. *Cell and Tissue Research*. **347**, 649-663 (2012).
- Schuerwegh, A.J., Dombrecht, E.J., Stevens, W.J., Van Offel, J.F., Bridts, C.H., De Clerck, L.S. Influence of pro-inflammatory (IL-1 α , IL-6, TNF- α , IFN- γ) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. *Osteoarthritis and Cartilage*. **11**, 681-687 (2003).
- Seifarth, C., Csaki, C., Shakibaei, M. Anabolic actions of IGF-I and TGF-beta1 on Interleukin-1beta-treated human articular chondrocytes: evaluation in two and three dimensional cultures. *Histology and Histopathology*. **24**, 1245-62 (2009).
- Semenza, G.L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of Applied Physiology*. **88**, 1474-1480 (2000).
- Sengupta, K., Krishnaraju, A.V., Vishal, A.A., Mishra, A., Trimurtulu, G., Sarma, K.V., Raychaudhuri, S.K., Raychaudhuri, S.P. Comparative Efficacy and Tolerability of 5-Loxin[®] and Aflapin[®] Against Osteoarthritis of the Knee: A Double Blind, Randomized, Placebo Controlled Clinical Study. *International Journal of Medical Sciences*. **7**, 366-377 (2010).
- Seol, D., McCabe, D.J., Choe, H., Zheng, H., Yu, Y., Jang, K., Walter, M.W., Lelhman, A.D., Ding, L., Buckwalter, J.A., Martin, J.A. Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury. *Arthritis and Rheumatology*. **64**, 26-37 (2012).
- Serra, R., Johnson, M., Filvaroff, E.H., LaBorde, J., Sheehan, D.M., Derynck, R., Moses, H.L. Expression of a Truncated, Kinase-Defective TGF- β Type II Receptor in Mouse Skeletal Tissue Promotes Terminal Chondrocyte Differentiation and Osteoarthritis. *The Journal of Cell Biology*. **139**, 12 (1997).
- Shara, M. and Stohs, S.J. Efficacy and Safety of White Willow Bark (*Salix alba*) Extracts: Willow Bark Extract Efficacy and Safety. *Phytotherapy Research*. **29**, 1112-1116 (2015).
- Sharma, L., Kapoor, D., Issa, S. Epidemiology of osteoarthritis: an update. *Current Opinion in Rheumatology*. **18**, 147-156 (2006)a.
- Sharma, R.; Dash, B. Caraka Samhita. *Chowkhamba Sanskrit Series Office*. (2006)b.
- Sharma, D. and Kanneganti, T.D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *Journal of Cell Biology*. **213**, 617-629 (2016).
- Shimizu, M., Tsunogai, M., Arai, S. Transepithelial transport of oligopeptides in the human intestinal cell, Caco-2. *Peptides*. **18**, 681-687 (1997).
- Shlopov, B.V., Lie, W.R., Mainardi, C.L., Cole, A.A., Chubinskaya, S., Hastly, K.A. Osteoarthritic lesions. Involvement of three different collagenases. *Arthritis and Rheumatology*. **40**, 2065-2074. (1997).
- Singh, J.A., Noorbaloochi, S., MacDonald, R., Maxwell, L.J. Chondroitin for osteoarthritis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. **1**, 5614 (2015).

- Skaar, E.P. and Raffatellu, M. Metals in infectious diseases and nutritional immunity. *Metalomics*. **7**, 926-928 (2015).
- Smith, I.D.M., Milto, K.M., Doherty, C.J., Amyes, S.G.B., Simpson, A.H.R.W., Hall, A.C. A potential key role for alpha-haemolysin of *Staphylococcus aureus* in mediating chondrocyte death in septic arthritis. *Bone and Joint Research*. **7**, 457-467 (2018).
- Söder, S., Hambach, L., Lissner, R., Kirchner, T., Aigner, T. Ultrastructural localization of type VI collagen in normal adult and osteoarthritic human articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*. **10**, 464-470 (2002).
- Song, J., Lee, M., Kim, D., Han, J., Chun, C.H., Jin, E.J. MicroRNA-181b regulates articular chondrocytes differentiation and cartilage integrity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **431**, 210-214 (2013).
- Sophia Fox, A.J., Bedi, A., Rodeo, S.A. The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health: A Multidisciplinary Approach*. **1**, 461-468 (2009).
- Spector, T.D. and MacGregor, A.J. Risk factors for osteoarthritis: genetics11Supported by Procter and Gamble Pharmaceuticals, Mason, OH. *Osteoarthritis and Cartilage*. **12**, 39-44 (2004).
- Ständker, L. Schrader, M., Kanse, S.M., Jürgens, M., Forssmann, W.G., Preissner, K.T. Isolation and characterization of the circulating form of human endostatin. *FEBS Letters*. **420**, 129-133 (1997).
- Stefanidou, M., Maravelias, C., Dona, A., Spiliopoulou, C. Zinc: a multipurpose trace element. *Archives of Toxicology*. **80**, 1-9 (2006).
- Stephensen, D., Tait, R.C., Brodie, N., Collins, P., Cheal, R., Keeling, D., Melton, K., Dolan, G., Haye, H., Hayman, E., Winter, M. Changing patterns of bleeding in patients with severe haemophilia A. *Haemophilia*. **15**, 1210-1214 (2009).
- Ströbel, S., Loparic, M., Wendt, D., Schenk, A.D., Candrian, C., Lindberg, R.L., Moldovan, F., Barbero, A., Martin, I. Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages. *Arthritis Research and Therapy*. **12**, R34 (2010).
- Su, N., Jin, M. Chen, L. Role of FGF/FGFR signaling in skeletal development and homeostasis: learning from mouse models. *Bone Research*. **2**, (2014).

T

- Tachmazidou, I., Hatzikotoulas, K., Southam, L., Esparza Gordillo, J., Haberland, V., Zheng, J., Johnson, T., Koprulu, M., Zengini, E., Steinberg, J., Wilkinson, J.M., Bhatnagar, S., Hoffman, J.D., Buchan, N., Süveges, D. arcOGEN Consortium, YergesArmstrong, L., Smith, G.D., Gaunt, T.R., Scott, R.A., McCarthy, L.C., Zeggini, E. Identification of new therapeutic targets for osteoarthritis through genome-wide analyses of UK Biobank. *Nature Genetics*. **51**, 230-236 (2019).

- Tanaka, T., Wiesener, M., Bernhardt, W., Eckardt, K.U., Warnecke, C. The human HIF (hypoxia-inducible factor)-3 α gene is a HIF-1 target gene and may modulate hypoxic gene induction. *Biochemical Journal*. **424**, 143-151 (2009).
- Tapiero, H., Townsend, D. M., Tew, K. D. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. **57**, 386-398 (2003).
- Tapiero, H. and Tew, K.D. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. **57**, 399-411 (2003).
- Tchkonina, T., Morbeck, D.E., Von Zglinicki, T., Van Deursen, J., Lustgarten, J., Scoble, H., Khosla, S., Jensen, M.D., Kirkland, J.L. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*. **9**, 667-684 (2010).
- Terada, T., Shimada, Y., Pan, X., Kishimoto, K., Sakurai, T., Doi, R., Onodera H, Katsura T, Imamura M, Inui K. Expression profiles of various transporters for oligopeptides, amino acids and organic ions along the human digestive tract. *Biochemical Pharmacology*. **70**,1756-1763 (2005).
- Tiaden, A.N., Bahrenberg, G., Mirsaidi, A., Glanz, S., Blüher, M., Richards, P.J. Novel Function of Serine Protease HTRA1 in Inhibiting Adipogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells via MAP Kinase-Mediated MMP Upregulation. *Stem Cells*. **34**, 1601-1614 (2016).
- Thiede, R.M., Lu, Y., Markel, M.D. A review of the treatment methods for cartilage defects. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*. **25**, 263-272 (2012).
- Toh, W.S., Lim, T.C., Kurisawa, M., Spector, M. Modulation of mesenchymal stem cell chondrogenesis in a tunable hyaluronic acid hydrogel microenvironment. *Biomaterials*. **33**, 3835-3845 (2012).
- Turner, J.R. Buschmann, M.M. Romero-Calvo, I. Sailer, A. Shen, L. The role of molecular remodeling in differential regulation of tight junction permeability. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. **36**, 204-212 (2014).

U

- Ucuncu, Y., Celik, N., Ozturk, C., Turkoglu, M., Cetin, N., Kockara, N., Sener, E., Dundar, C., Arslan, A., Dogan, H., Kurt, N., Suleyman, H. Chondroprotective effects of a new glucosamine combination in rats: Gene expression, biochemical and histopathological evaluation. *Life Sciences*. **130**, 31-37 (2015).
- Uriu Adams, J.Y. and Keen, C. L. Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular Aspects of Medicine*. **26**, 268-298 (2005).

V

- Valentino, L.A. Blood-induced joint disease: the pathophysiology of hemophilic arthropathy: Blood-induced joint disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **8**, 1895-1902 (2010).

- Van Caam, A., Madej, W., Thijssen, E., Garcia de Vinuesa, A., Van Den Berg, W., Goumans, M.J., Ten Dijke, P., Blaney Davidson, E., Van Der Kraan, P.M. Expression of TGF β -family signalling components in ageing cartilage: age-related loss of TGF β and BMP receptors. *Osteoarthritis and Cartilage*. **24**, 1235-1245 (2016).
- Van Den Berg, W.B. Uncoupling of inflammatory and destructive mechanisms in arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. **30**, 7-16 (2001).
- Van der Rest, M., Rosenberg, L.C., Olsen, B.R., Poole, A.R. Chondrocalcin is identical with the C-propeptide of type II procollagen. *Biochemical Journal*. **237**, 923-925 (1986).
- Van Wyk, J.J. and Smith, E.P. Insulin-like growth factors and skeletal Growth: Possibilities for therapeutic interventions. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **84**, 4349-4354 (1999).
- VasÅk, M. and Hasler, D. Metallothioneins: new functional and structural insights. *Current Opinion in Chemical Biology*. **4**, 177-183 (2000).
- Vignon, E., Arlot, M., Patricot, L. M., Vignon, G. The Cell Density of Human Femoral Head Cartilage. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. **121**, 303-308(1976).
- Vignon, E., Valat, J.P., Rossignol, M., Avouac, B., Rozenberg, S., Thoumie, P., Avouac, J., Nordin, M., Hilliquin, P. Osteoarthritis of the knee and hip and activity: a systematic international review and synthesis (OASIS). *Joint Bone Spine*. **73**, 442-455 (2006).
- Vlachojannis, J.E., Cameron, M., Chrubasik, S. A systematic review on the effectiveness of willow bark for musculoskeletal pain. *Phytotherapy Research*. **23**, 897-900 (2009).
- Von Der Mark, K., Gauss, V., Von Der Mark, H., Müller, P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*. **267**, 531 (1977).
- Von Der Mark, K., Kirsch, T., Nerlich, A., Kuss, A., Weseloh, G., Glückert, K., Stöss, H. Type x collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis and Rheumatism*. **35**, 806-811 (1992).

W

- Walia, A., Yang, J.F., Huang, Y.H., Rosenblatt, M.I., Chang, J.H., Azar, D.T. Endostatin's emerging roles in angiogenesis, lymphangiogenesis, disease, and clinical applications. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1850**, 2422-2438 (2015).
- Walrand, S., Chiotelli, E., Noirt, F., Mwewa, S., Lassel, T. Consumption of a functional fermented milk containing collagen hydrolysate improves the concentration of collagen-specific amino acids in plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**, 7790-7795 (2008).

- Wang, Y., Wan, C., Deng, L., Liu, X., Cao, X., Gilbert, S.R., Bouxsein, M.L., Faugere, M.C., Guldberg, R.E., Gerstenfeld, L.C., Haase, V.H., Johnson, R.S., Schipani, E., Clemens, T.L. The hypoxia-inducible factor α pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *Journal of Clinical Investigation*. **117**, 1616-1626 (2007)a.
- Wang, G.L. and Semenza, G.L. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry*. **270**, 1230-1237 (1995).
- Wang, D.A., Varghese, S., Sharma, B., Strehin, I., Fermanian, S., Gorham, J., Fairbrother, D.H., Cascio, B., Elisseeff, J.H. Multifunctional chondroitin sulphate for cartilage tissue-biomaterial integration. *Nature Materials*. **6**, 385-392 (2007)b.
- Warnock, M., McBean, D., Suter, A., Tan, J., Whittaker, P. Effectiveness and safety of Devil's Claw tablets in patients with general rheumatic disorders. *Phytotherapy Research*. **21**, 1228-33 (2007).
- Watt, F.E. Hand osteoarthritis, menopause and menopausal hormone therapy. *Maturitas*. **83**, 13-18 (2016).
- Wegener, T. and Lüpke, N.P. Treatment of patients with arthrosis of hip or knee with an aqueous extract of Devil's Claw (*Harpagophytum procumbens* DC). *Phytotherapy Research*. **17**, 1165-1172 (2003).
- Weiskirchen, R., Meurer, S.K. BMP-7 counteracting TGF-beta1 activities in organ fibrosis. *Frontiers in Bioscience*. **18**, 1407 (2013).
- Weiskirchen, R., Meurer, S.K., Gressner, O.A., Herrmann, J., Borkham Kamphorst, E., Gressner, A.M. BMP-7 as antagonist of organ fibrosis. *Frontiers in Bioscience*. **14**, 4992 (2009).
- Wu, X., Wang, Y., Xiao, Y., Crawford, R., Mao, X., Prasad, I. Extracellular vesicles: Potential role in osteoarthritis regenerative medicine. *Journal of Orthopaedic Translation*. **21**, 73-80 (2020).
- Wu, X., Chim, S.M., Kuek, V., Lim, B.S., Chow, S.T., Zhao, J., Yang, S., Rosen, V., Tickner, J., Xu, J. HtrA1 is upregulated during RANKL-induced osteoclastogenesis, and negatively regulates osteoblast differentiation and BMP2-induced Smad1/5/8, ERK and p38 phosphorylation. *FEBS Letters*. **588**, 143-150 (2014).



- Xu, L., Golshirazian, I., Asbury, B.J., Li Y. Induction of high temperature requirement A1, a serine protease, by TGF-beta1 in articular chondrocytes of mouse models of OA. *Histology and Histopathology*. **29**, 609-618 (2014).
- Xu, R., Xin, L., Fan, Y., Meng, H.R., Li, Z.P., Gan, R.B. Mouse restin inhibits bovine aortic endothelial cell proliferation and causes cell apoptosis. *Acta Biochimica and Biophysica Sinica*. **34**, 138-142 (2002).

Y

- 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*. **6**, 21679 (2011).
- Yasuda, J., Fukui, K., Okada, M., Yamawaki, H. T3 peptide, a fragment of tumstatin, stimulates proliferation and migration of cardiac fibroblasts through activation of Akt signaling pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. **390**, 1135-1144 (2017).

Z

- Zelzer, E., Glotzer, D.J., Hartmann, C., Thomas, D., Fukai, N., Soker, S., Olsen, B.R. Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mechanisms of Development*. **106**, 97-106 (2001).
- Zemmyo, M., Meharra, E.J., Kuhn, K., Creighton-Achermann, L., Lotz, M. Accelerated, aging-dependent development of osteoarthritis in $\alpha 1$ integrin-deficient mice. *Arthritis and Rheumatology*. **48**, 2873-2880 (2003).
- Zhang, M., Zhou, Q., Liang, Q.Q., Li, C.G., Holz, J.D., Tang, D., Sheu, T.J., Li T.F., Shi, Q., Wang, Y.J. IGF-1 regulation of type II collagen and MMP-13 expression in rat endplate chondrocytes via distinct signaling pathways. *Osteoarthritis and Cartilage*. **17**, 100-106 (2009).
- Zhang, F.J., Luo, W., Lei, G.H. Role of HIF-1 α and HIF-2 α in osteoarthritis. *Joint Bone Spine*. **82**, 144-147 (2015).
- Zhang, L., Zhu, T., Qian, F., Xu, J., Dorje, G., Zhao, Z., Guo, F., Li, Y. Iridoid glycosides isolated from *Scrophularia dentata* Royle ex Benth. and their anti-inflammatory activity. *Fitoterapia*. **98**, 84-90 (2014)a.
- Zhang, P., Yao, Q., Lu, L., Li, Y., Chen, P.J., Duan, C. Hypoxia-Inducible Factor 3 Is an Oxygen-Dependent Transcription Activator and Regulates a Distinct Transcriptional Response to Hypoxia. *Cell Reports*. **6**, 1110-1121 (2014)b.
- Zhou, H.W., Lou, S.Q., Zhang, K. Recovery of function in osteoarthritic chondrocytes induced by p16INK4a-specific siRNA *in vitro*. *Rheumatology*. **43**, 555-568 (2004).
- Zhou, X., Von Der Mark, K., Henry, S., Norton, W., Adams, H., De Crombrughe, B. Chondrocytes Transdifferentiate into Osteoblasts in Endochondral Bone during Development, Postnatal Growth and Fracture Healing in Mice. *PLoS Genetics*. **10**, e1004820 (2014).
- Zhou, N., Li, Q., Lin, X., Hu, N., Liao, J.Y., Lin, L.B., Zhao, C., Hu, Z.M., Liang, X., Xu, W., Chen, H., Huang, W. BMP2 induces chondrogenic differentiation, osteogenic differentiation and endochondral ossification in stem cells. *Cell and Tissue Research*. **366**, 101-111 (2016).

- Zhu, T., Zhang, L., Ling, S., Qian, F., Li, Y., Xu, J.W. Anti-Inflammatory Activity Comparison among Scropoliosides—Catalpol Derivatives with 6-O-Substituted Cinnamyl Moieties. *Molecules*. **20**, 19823-19836 (2015).
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., Hedrick, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*. **7**, 211-228 (2001).

Annexes

I. Publications scientifiques

Rakic R, Bourdon B, Hervieu M, Branly T, Legendre F, Saulnier N, Audigié F, Maddens S, Demoor M, Galera P. 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.* 2017 Aug 24;18(9):1842.

Rakic R, Bourdon B, Demoor M, Maddens S, Saulnier N, Galéra P. Differences in the intrinsic chondrogenic potential of equine umbilical cord matrix and cord blood mesenchymal stromal/stem cells for cartilage regeneration. *Sci Rep.* 2018 Sep 14;8(1):13799.

Bourdon B, Contentin R, Cassé F, Maspimby C, Oddoux S, Noël A, Legendre F, Gruchy N, Galéra P. Marine collagen hydrolysates downregulate the synthesis of pro-catabolic and pro-inflammatory markers of osteoarthritis and favor collagen production and metabolic activity in equine articular chondrocyte organoids. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 8;22(2):580.

Bourdon B, Cassé F, Gruchy N, Cambier P, Leclercq S, Oddoux S, Noël A, Lafont J.E, Contentin R, Galéra P. Marine collagen hydrolysates promote collagen synthesis, viability and proliferation while downregulating the synthesis of pro-catabolic markers in human articular chondrocytes. *Int J Mol Sci.* 2021 22 (7):3693.

II. Article #4

SCIENTIFIC REPORTS

There are amendments to this paper

OPEN

Differences in the intrinsic chondrogenic potential of equine umbilical cord matrix and cord blood mesenchymal stromal/stem cells for cartilage regeneration

Rodolphe Rakic^{1,2}, Bastien Bourdon¹, Magali Demoor¹, Stéphane Maddens², Nathalie Saulnier² & Philippe Galéra¹ 

Umbilical cord blood mesenchymal stromal/stem cells (UCB-MSCs) and umbilical cord matrix MSCs (UCM-MSCs) have chondrogenic potential and are alternative sources to standard surgically derived bone marrow or adipose tissue collection for cartilage engineering. However, the majority of comparative studies explore neonatal MSCs potential only on ISCT benchmark assays accounting for some bias in the reproducibility between *in vitro* and in clinical studies. Therefore, we characterized equine UCB-MSCs and UCM-MSCs and investigated with particular attention their chondrogenesis potential in 3D culture with BMP-2 + TGF- β 1 in normoxia or hypoxia. We carried out an exhaustive characterization of the extracellular matrix generated by both these two types of MSCs after the induction of chondrogenesis through evaluation of hyaline cartilage, hypertrophic and osteogenic markers (mRNA, protein and histology levels). Some differences in hypoxia sensitivity and chondrogenesis were observed. UCB-MSCs differentiated into chondrocytes express an abundant, dense and a hyaline-like cartilage matrix. By contrast, despite their expression of cartilage markers, UCM-MSCs failed to express a relevant cartilage matrix after chondrogenic induction. Both MSCs types also displayed intrinsic differences at their undifferentiated basal status, UCB-MSCs expressing higher levels of chondrogenic markers whereas UCM-MSCs synthesizing higher amounts of osteogenic markers. Our results suggest that UCB-MSCs should be preferred for *ex-vivo* horse cartilage engineering. How those results should be translated to *in vivo* direct cartilage regeneration remains to be determined through dedicated study.

Mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) are an attractive source of stem cells for regenerative medicine, due to their plasticity, trophic factors secretion and immunomodulatory properties¹. Considerable effort and financial resources have been invested in research into MSCs and their clinical use both in human and veterinary medicine. Bone marrow MSCs (BM-MSCs) and adipose-derived MSCs (AD-MSCs) are the most frequently investigated sources of MSCs. However, the use of adult MSCs is limited by the need for invasive procedures to collect the cells, together with their lower proliferation potential, intrinsic and extrinsic factors sensitivity, and the impact of aging on their biological properties^{2–4}. To circumvent these limitations, new sources have been explored to isolate MSCs. In particular, neonatal tissues-derived MSCs harbor several advantages over adult MSCs: the procurement procedure is painless and noninvasive, and these cells have a higher proliferation capacity than adult MSCs⁵. Moreover, neonatal MSCs seem to express pluripotent markers and do not display the same effects of aging observed in cells from adult donors⁶. The absence of ethical constraints and the considerable potential of neonatal MSCs for expansion have thus raised new hopes for the development of stem cell therapies, with the possibility of industrialization in good manufacturing practices (GMP) conditions⁷.

¹Normandie Univ, Unicaen, Biotargen, Caen, 14000 Caen, France. ²Vetbiobank, 69280, Marcy l'Etoile, France. Nathalie Saulnier and Philippe Galéra contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.G. (email: philippe.galera@unicaen.fr)

Various neonatal tissues have been described to isolate MSCs in horse, including umbilical cord blood (UCB-MSCs)^{8–11}, umbilical cord matrix (UCM-MSCs), commonly referred as “Wharton’s jelly”¹², amniotic tissue¹³, or placenta¹⁴. Such cells meet the standards recommended by the International Society of Cellular Therapy (ISCT) for MSCs¹⁵, including plastic adherence, multilineage differentiation potential, and a particular immunophenotype. Nonetheless, these standards have been established following a scientific consensus based on results mainly obtained from human BM-MSCs, and do not predict the clinical potency of the cells¹⁶.

This is particularly true when considering the use of MSCs to develop a tissue-engineered cartilage substitute. It is widely accepted that neonatal MSCs are able to differentiate toward the chondrogenic lineage *in vitro*, but the choice of the most suitable MSCs source for cartilage tissue-engineering remains difficult. In the equine model, different groups reported the production of a cartilage neosubstitute using bone marrow-derived MSCs cultured in 3 dimensional (3D) models^{17–19}. Nevertheless, only few studies explored the chondrogenic differentiation ability of neonatal equine MSCs. More informations were obtained from researches performed on human neonatal MSCs. While the chondrogenic ability of UCB-MSCs has been largely reported^{20,21}, less consistent informations were available on the chondrogenic differentiation of UCM-MSCs, with divergent results^{22–26}. This demonstrates the need to develop further experimental assays that may help to define the better source for cartilage tissue engineering both in human and horse models.

Chondrogenesis is a multiparametric differentiation process dependent on the cellular microenvironment²⁷. The commitment of cells to this lineage requires particular conditions, and development of the chondrogenic lineage is closely related to hypertrophic chondrocyte maturation and osteogenesis, as during endochondral ossification in embryonic development²⁸. The successful differentiation of MSCs into chondrocytes is dependent on 1- a three-dimensional (3D) network²⁹, 2- a particular cocktail of chondrogenic growth factors³⁰, 3- an hypoxic environment³¹. A subtle regulation of all these parameters is required to produce a specific hyaline cartilage extracellular matrix (ECM).

We have previously shown that human UCB-MSCs cultured in a three-dimensional (3D) sponge of type I/III collagen with transforming growth factor 1 (TGF- β 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) can generate a hyaline-like extracellular matrix of potential value for tissue engineering³². To gather further information about the potential of neonatal MSCs for cartilage tissue generation, we carry on new investigations with equine UCM- and UCB-MSCs and compare their ability to generate a hyaline like cartilage. Following a systematic characterization of the cells according to the ISCT recommendations, UCM- and UCB-MSCs were cultured under a standardized chondrogenic differentiation process, including a 3D cell culture model and BMP-2/ TGF- β 1 (BT) stimulation for 28 days. The influence of hypoxic condition was also evaluated for the first time on equine neonatal MSCs lineage commitment. Our data showed significant differences in the capacity of UCB- and UCM-MSCs to differentiate toward the chondrogenic lineage. Furthermore, our results suggest that, unlike BM-MSCs, low oxygen tension do not improve the chondrogenic differentiation of neonatal MSCs. These data could help to design strategies for improving cartilage tissue engineering.

Results

UCM- and UCB-MSCs characterization. UCM- and UCB-MSCs display a fibroblastic-like appearance, hallmark of MSCs populations (Fig. 1A). Growth rates of both MSCs populations were investigated over 15 consecutive passages *in vitro*, when feasible. Our results showed that UCM-MSCs have a higher proliferation capacity than UCB-MSCs (Fig. 1B,C). Only two samples of UCB-MSCs expanded during at least seven passages. Immunophenotyping of both UCM- and UCB-MSCs showed a similar profile for the following markers: CD90+/CD44+/CD29+/MHC2–/CD45– (Fig. 1D). The multipotency of UCM- and UCB-MSCs was assessed by inducing differentiation into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes in monolayer cultures in specific differentiation media (Fig. 1E). Both UCM- and UCB-MSCs displayed commitment into the adipogenic lineage, as assessed by the presence of a large number of lipid droplets stained with O red oil. Osteogenic differentiation was evaluated by staining the calcium phosphate deposits with Alizarin red S. Intense labeling was observed in UCM-MSCs stimulated with the osteogenic medium, while results were more heterogeneous with UCB-MSCs, as several cell lines detach from their support during the induction, impeding a valuable interpretation of the results. Chondrogenic differentiation was assessed by Alcian blue staining after 21 days of differentiation. UCB-MSCs express sulfated ECM colored by Alcian blue. UCM-MSCs show also a comparable positive coloration to Alcian Blue, however the latter being localized at intracellular level.

Chondrogenic differentiation treatment induces a differential mRNA expression profile in UCM and UCB-MSCs.

The potential of UCM- and UCB-MSCs to be used in cartilage tissue engineering was further evaluated by seeding them in type I/III collagen scaffolds in a culture medium containing BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- β 1 (10 ng/ml) (referred as BT condition here after). A time course analysis of the expression of 11 genes encoding chondrogenic, osteogenic and hypertrophic markers was performed by RT-qPCR at 7, 14, 21 and 28 days. Major differences in expression profile following stimulation with the chondrogenic medium were observed between UCM- and UCB-MSCs (Fig. 2). While the expression of the chondrogenic markers *Col2a1*, *Acan* and *Sox9* increased during the differentiation protocol, only few inductions were observed in UCM-MSCs. These results implicate a strong difference in cellular responses of both neonatal MSCs sources confirmed by macroscopical analysis at 28 days of chondrogenic differentiation (Fig. 2). Here, BT condition has been compared to Incomplete chondrogenic medium condition which represents a control culture condition without the stimulation by growth factors (referred as ICM condition here after). Following 28 days of BT treatment, UCB-MSCs produced a hydrated, nacreous tissue resembling cartilage, while UCM-MSCs showed a contracted appearance.

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

To evaluate the chondrogenic potential of both MSCs sources, we focused on

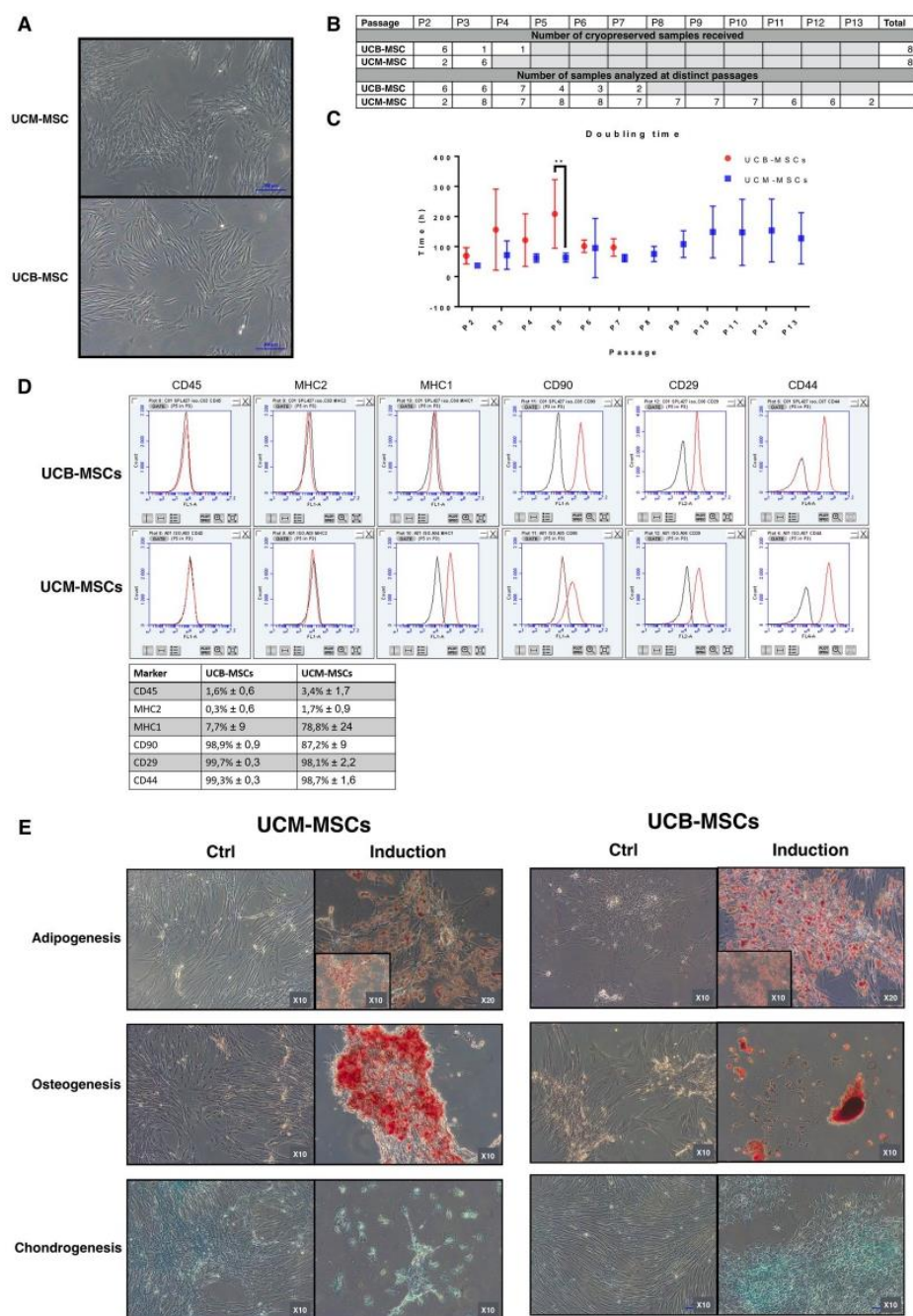


Figure 1. UCM-MSCs have a higher proliferation rate than UCB-MSCs. (A) Morphological aspect of UCM-MSCs and UCB-MSCs during monolayer cell culture at P3 observed by phase-contrast microscopy (magnification $\times 10$). (B) Samples characteristics. This table recapitulates the number of independent cryopreserved UCM- and UCB-MSCs vials received for analysis, and the number of samples evaluated for each passage. (C) Proliferation characteristics of UCM- and UCB-MSCs upon successive passages. This graph represents the doubling time (h) of UCB-MSCs and UCM-MSCs cultured up to P13. Samples with doubling time above 400 h were systematically excluded from the representation, these samples being considered as non-proliferating. A statistical analysis was realized to compare the proliferation potential of UCM- and UCB-MSCs using multiple comparison two-way ANOVA test (** $p < 0.01$) when the number of samples was appropriated (from P2 to P7). (D) Flow cytometry graph analysis of representative samples of UCM-MSCs and UCB-MSCs. Recapitulative table of mean values and standard deviation is presented for CD-45, MHC-1, MHC-2, CD-90, CD-29 and CD-44. (E) UCB-MSCs and UCM-MSCs multilineage evaluation. UCM-MSCs

and UCB-MSCs were induced in adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineage by using specific induction media. ECM mineralization was demonstrated by alizarin red S staining. Lipid droplets in the cytoplasm are highlighted by oil red O staining and sulfated matrix observed during chondrogenesis was evidenced by alcian blue staining. A representative example from seven samples for UCM-MSCs and five samples for UCB-MSCs are shown (magnification: $\times 10$ and $\times 20$).

the gene expression at the end of chondrogenic differentiation, at 28 days compared to undifferentiated cells cultured in monolayer (2D). Quality of the *de novo* synthesized ECM was evaluated by molecular analyses, using healthy equine chondrocytes as reference. Analysis of the chondrogenic markers expression after BT protocol showed large differences between the two MSCs populations. UCB-MSCs displayed strong expression of the chondrocyte markers *Col2a1*, *Acan* and *Sox9* compared to monolayer basal condition (2D) (1043-fold, 72-fold and 3-fold induction, respectively). Interestingly, mRNA levels of these chondrogenic markers were similar in differentiated UCB-MSCs and in primary culture of equine chondrocytes. By contrast, only a moderate induction of *Acan* expression was observed in UCM-MSCs following treatment (13-fold induction) whereas *Col2a1* and *Sox9* expressions were not modulated by treatments compared to 2D condition (Fig. 3A).

The functional *Col2a1/Col1a1* ratio was increased in both types of neonatal MSCs following differentiation, respectively 133-fold for UCB-MSCs and 9-fold for UCM-MSCs (Fig. 3B).

Chondrocyte hypertrophic markers expression was also evaluated following the differentiation process. Results showed that *Mmp13* mRNA expression is upregulated only for ICM condition in both MSCs sources in comparison to the 2D condition (9-fold for UCM-MSCs and 1429-fold for UCB-MSCs). *Col10a1* mRNA levels were unaffected by the experimental conditions and remained lower than *Col10a1* mRNA relative levels in eAC (Fig. 3C). High *Col10a1* mRNA steady-state amounts after post-enzymatic isolation of P0 eAC could be explained by the presence of hypertrophic chondrocytes in the sample during cartilage biopsy and chondrocytes isolation. However, as previously described, *Col10a1* mRNA decreases progressively after few cell passages probably because of the instability/death of the hypertrophic phenotype in monolayer cell culture (Rakic *et al.*³³).

We paid a particular attention to the expression of osteogenic markers, to evaluate if our differentiation process may induce MSCs into another lineage (Fig. 3D). Results showed an increase of mRNA levels for *Alpl* in UCM-MSCs and UCB-MSCs (6-fold and 205-fold induction, respectively), while opposite results were observed for other markers. *Col1a1*, *Spp1*, β -*Glap* and *Htra1* were downregulated in UCM-MSCs (respectively by 4-, 5-, 5- and 1-fold) and *Col1a1*, *Spp1* and *Htra1* were upregulated in UCB-MSCs (respectively by 16-, 63- and 5-fold). For Runx2, this transcriptional factor implicated in hypertrophy and osteogenesis, BT treatment induce its transcription only in UCB-MSCs compared to 2D condition (by 2-fold).

Finally, a comparative analysis of relative mRNA levels after 28 days of chondrogenic differentiation confirmed the stronger expression of chondrogenic markers in UCB-MSCs than in UCM-MSCs, from a quantitative point of view (Fig. 3E). After 28 days of chondrogenesis, comparative analysis between UCM-MSCs and UCB-MSCs shows a significant overexpression of the chondrogenic markers in UCB-MSCs in comparison to UCM-MSCs (respectively 3×10^5 -, 11- and 44-fold more for *Col2a1*, *Acan* and *Sox9*). Here, *Mcsm*, encoding the CD146 surface marker and considered as a multipotency predictor was also quantified. No significant difference was observed in the *Mcsm* expression at the end of differentiation between UCM- and UCB-MSCs. Interestingly, the mRNA levels of the osteogenic markers (*Bglap* and *Spp1*), deregulated during UCM-MSCs differentiation, were expressed at comparable level in UCM- and UCB-MSCs at 28 days of BT treatment. This last result implicates that osteogenic markers could be highly expressed at undifferentiated state in UCM-MSCs compared to UCB-MSCs.

Western blots were performed to evaluate the protein levels for some of these markers and results were compared to healthy equine articular cartilage samples (Fig. 4). Despite the observed lack of increase in relative levels of *Col2a1* mRNA in response to BT treatment in UCM-MSCs, the mature type II collagen protein was detected after seven days of incubation (Fig. 4A). However, no further increase in the levels of this protein was observed in subsequent days, right up until the end of BT stimulation, after 28 days of culture. UCM-MSCs synthesized an immature form of type I collagen. BT treatment induced the maturation of this form, but the global level of type I collagen seems to decrease during the 28 days of cell culture both in ICM and BT conditions (Supp. Figure 1). High levels of *Htra1*, which is involved in matrix mineralization³⁴, were induced by 3D cell culture with or without BT treatment, throughout chondrogenic differentiation.

High levels of ECM synthesis were induced by treatment of UCB-MSCs with chondrogenic factors (Fig. 4B). This induction made it possible for use to load much smaller amounts of protein extract onto SDS-PAGE gels (once sixth the amount) to evaluate more correctly signal differences in the intensity (Fig. 4C). The use of less than 2.5 μ g UCB-MSCs protein for SDS-PAGE led to a loss of the peroxidase signal for some of the antibodies used in the analysis, in particular for reference proteins. Type II procollagen (Pro) was found to be overexpressed after chondrocyte differentiation, on gels loaded with 2.5 μ g protein. Type II procollagen with C-terminal or N-terminal propeptide deletion (the Pc and Pn forms, respectively) was also produced by UCB-MSCs treated with BT. Nevertheless, low levels of the mature form of type II collagen were detected. In parallel, high levels of type I collagen were observed. BT treatment induced the maturation of this collagen isotype, as the amount of the procollagen form seemed to decrease with treatment time, suggesting a likely blockade of type I collagen synthesis. By contrast, *Htra1* expression, which was induced by 3D culture, was inhibited by BT treatment in UCB-MSCs, but not in UCM-MSCs. Chondrogenic medium induced higher levels of ECM production in UCB-MSCs than in UCM-MSCs, as shown by SDS-PAGE for equal amounts of protein. For both MSCs sources, no type X collagen has been detected (Supp. Figure 2).

UCB-MSCs express a hyaline-like cartilage ECM under BT treatment, whereas UCM-MSCs do not. Following treatment under chondrogenic, osteogenic and adipogenic differentiation protocols, tissue substitutes

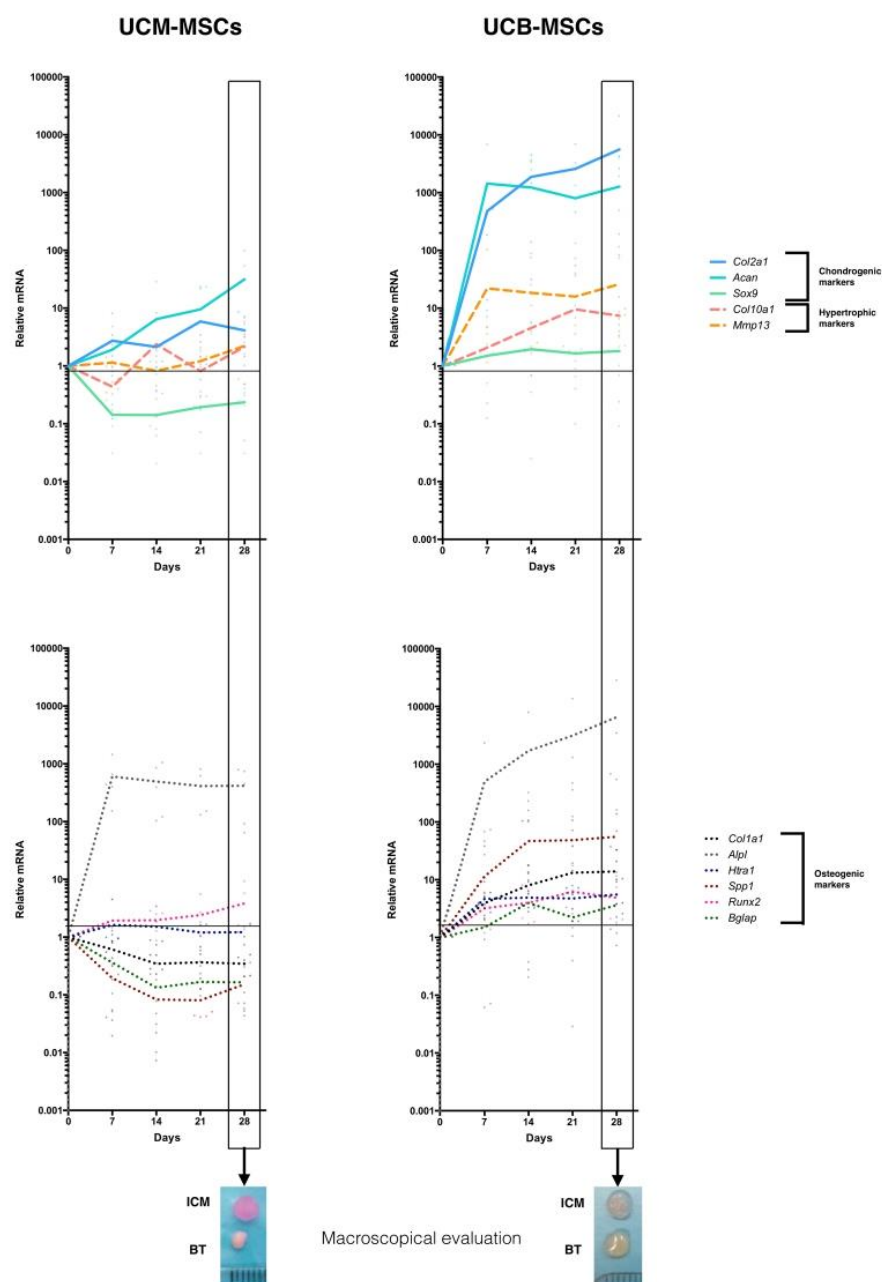


Figure 2. Strong differences between UCM-MSCs and UCB-MSCs in gene expression during chondrogenesis. Chondrogenesis was induced in UCM-MSCs and UCB-MSCs by culturing the cells in 3D scaffolds under BMP-2 and TGF- β 1 treatment. The time-course monitoring of chondrogenic (*Col2a1*, *Acan*, *Sox9*), hypertrophic (*Mmp13*, *Col10a1*) (upper panel) and osteogenic markers (*Col1a1*, *Alpl*, *Htra1*, *Spp1*, *Runx2* and *Bglap*) (lower panel) were assessed at 7, 14, 21 and 28 days post-treatment. At each time point, the mRNA levels of each transcript were normalized to the mRNA levels of the housekeeping gene. Relative expression of each gene was compared to the expression of the control (D0) set at 1. Small dots represent the distribution of the values measured for the 5 independent samples at each time. The images below the graphs represent the macroscopical appearance of the neo-tissue substitute following 28 days under the chondrogenic regimen (BT treatment).

were processed for histological evaluations. Differentiated UCB-MSCs showed intense Alcian blue and O-safranin labeling, while a moderate staining was observed for UCM-MSCs. In some UCM-MSCs substitutes, ECM mineralization was observed, as assessed by Alzarin red staining (Fig. 5).

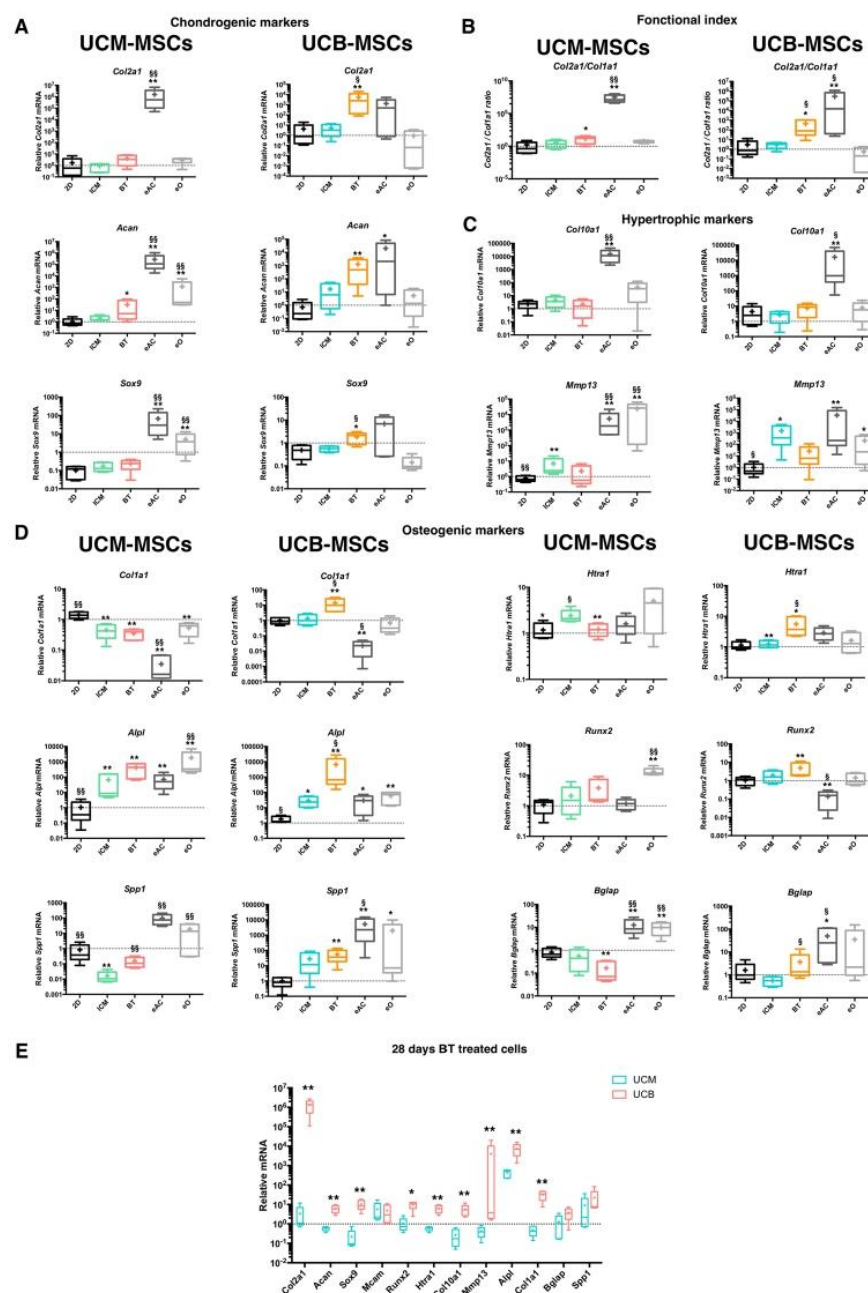


Figure 3. Differential expression of chondrogenic and osteogenic markers for UCM-MSCs and UCB-MSCs after chondrogenic differentiation in type I/III collagen scaffolds. UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds and normoxia for 28 days in incomplete chondrogenic medium (ICM) or ICM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- β 1 (10 ng/ml) (BT). Relative mRNA amounts encoding chondrogenic markers (A) (*Col2a1*, *Acan* and *Sox9*), hypertrophic markers (C) (*Col10a1* and *Mmp13*) and osteogenic markers (D) (*Col1a1*, *Alpl*, *Spp1*, *Htra1*, *Runx2* and *Bglap*) were determined by RTqPCR. The functional *Col2a1/Col1a1* ratio was presented in (B) mRNA extracts obtained from equine articular chondrocytes (eAC) released from cartilage after overnight enzymatic digestion and equine P0 osteoblasts (eO) were used as controls. Monolayer cultured MSCs (2D) were used as undifferentiated cells control. All results for each MSCs source were normalized versus untreated MSCs incubated during 1 h in type I/III collagen scaffolds at 37°C and presented as the relative expression of each gene. Box-plots represent five independent experiments for each MSCs source. Statistically significant differences were determined using the Mann-Whitney test. *: 2D versus other conditions (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). §: ICM versus other conditions (§ $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$). (E) Steady-state levels of mRNA expression in UCB-MSCs and UCM-MSCs after 28 days of chondrogenic

differentiation in BT condition were compared by RTqPCR. All results were normalized versus undifferentiated sample of one UCM-MSCs sample, and presented as the relative expression of each gene. Box-plots represent five independent experiments and statistically significant differences were determined using the Mann Whitney test by comparison of UCM-MSCs versus UCB-MSCs (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

UCB-MSCs and UCM-MSCs differ not only in chondrogenic properties, but also in intrinsic characteristics. Based on the previous results showing contrasting results of UCM- and UCB-MSCs in response to chondrogenic stimulation, a more accurate evaluation of both MSCs populations in steady-state conditions was carried out (Fig. 6). Results showed significant differences between both cell types at basal level (Fig. 6A). UCB-MSCs express higher levels of chondrogenic markers than UCM-MSCs (respectively 2500-, 2- and 15-fold more for *Col2a1*, *Acan* and *Sox9*), while the osteogenic marker *Spp1* was significantly more expressed in UCM- than UCB-MSCs (55-fold difference) (no difference in gene expression was observed for *Alpl*, *Col1a1* and *Bglap*). *Mcam*, was also more strongly expressed in UCB- than in UCM-MSCs (8-fold difference).

At the protein level, in a longitudinal study of 8 different samples of neonatal populations (Fig. 6B), basal level of type II collagen seems to be higher in UCB- than UCM-MSCs. Higher expression of type I collagen was found in UCM-MSCs compared to UCB-MSCs. Interestingly, osteocalcin protein levels were much higher in UCM-MSCs than in UCB-MSCs. Another major difference between the MSCs from these two different sources was the overexpression of the osteochondral transcription factors Sox-9 and Runx-2 in UCB-MSCs compared to UCM-MSCs.

Hypoxia induces a time-dependent effect on transcript expression profile in UCM- and UCB-MSCs during chondrogenesis induction. Hypoxia is known to affect positively the chondrogenic differentiation of BM-MSCs *in vitro*. This parameter has not yet been evaluated in equine UCB- and UCM-MSCs. Gene expression of chondrogenic markers has been compared in UCB- and UCM-MSCs cultured in BT condition under normoxia and hypoxia for 28 days. Molecular analysis showed that hypoxia did not induce significant difference in gene expressions for the selected genes (Fig. 7). Only *Htra1* showed a significant modulation of expression in UCM-MSCs under hypoxia (5-fold increase in hypoxia).

To evaluate if hypoxia may nonetheless exert some effect throughout the chondrogenesis process, a time-course gene expression analysis was realized. Results showed that hypoxia may induce various effects between UCM- and UCB-MSCs throughout the differentiation process, but not conclusive (Fig. 7B and Supp. Figures 3, 4). These data are summarized in Fig. 7B, in which we classified the significant results for comparisons between hypoxia and normoxia at the same time points [*Positive or negative regulation* $p < 0.05$ (*Hypoxia(t)* versus *Normoxia(t)*)] (strong effect) and between hypoxia at the end of the study and seven days of normoxia [*Positive regulation* $p < 0.05$ (*Hypoxia(t)* versus *Normoxia(7 days)*)] (weaker effect). During our 3D cell culture model, UCM-MSCs and UCB-MSCs responded differently to hypoxia, in ICM or BT conditions. These differences were gene- and time-dependent, with opposite results between UCB- and UCM-MSCs in some cases.

Hypoxia seems to have also an implication in chondrogenic differentiation without the use of growth factors (Fig. 7B,C and Supp. Fig. 4). At the end of cell culture, hypoxia condition induced an increase of *Sox9* expression and *Col2a1/Col1a1* ratio (respectively 2-fold and 21-fold for *Sox9* and *Col2a1/Col1a1* ratio at 28 days in hypoxia condition compared to 28 days in normoxia condition).

Hypoxia seems also able to repress *Alpl* expression during UCB-MSCs chondrogenesis (57-fold decreased in hypoxia condition compared to normoxia condition at 14 days) (Supp. Fig. 3).

Hypoxia decreases the amount of hyaline-cartilage ECM synthesized by UCB-MSCs. A histological analysis of the newly synthesized ECM produced by neonatal MSCs was performed after chondrogenic differentiation in different oxygen concentrations (Fig. 8). Oxygenation conditions had only minor effects on the new tissue synthesized from UCM-MSCs. They synthesized a highly diffuse ECM with a low glycosaminoglycan content and low levels of matrix mineralization under BT treatment in normoxia. The synthesis of this ECM was further reduced by incubating the cells in hypoxia.

Hypoxia affected all samples of UCB-MSCs subjected to histological analysis. It seemed to decrease ECM synthesis and resulted in a more diffuse and heterogeneous ECM than observed in BT-normoxia conditions. As ECM was already poorly mineralized in normoxia, it was difficult to detect an effect of hypoxia on calcium deposits, although such an effect was observed in some cases (Fig. 8A).

These results were confirmed by western-blot analyses of collagen levels. Total collagen synthesis was decreased by hypoxia during the differentiation of UCB-MSCs (Fig. 8B). Similar decreases were observed for both type I and type II collagen. Thus, the lower levels of ECM synthesis in hypoxia were not associated with a change in ECM quality. UCM-MSCs synthesized only very small amounts of ECM under BT conditions; we did not highlight an effect of hypoxia at protein level for this neonatal MSCs source (Supp. Fig. 5).

Discussion

There are great hopes for the use of MSCs in regenerative medicine and, particularly, in tissue engineering, due to their cellular plasticity and numerous biological properties. In the engineering of both horse and human cartilage tissues³⁵, MSCs may supplant chondrocytes for matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI), thereby overcoming the medical and cellular limitations associated with the need for cartilage biopsy and chondrocyte amplification³⁶. In particular, neonatal MSCs appear as a valuable alternative to develop cell- and tissue-based products. Clarification of their biological properties is required before their therapeutic use can be considered. In this study, we aimed at evaluating the properties of 2 neonatal tissues-derived MSCs from horse,

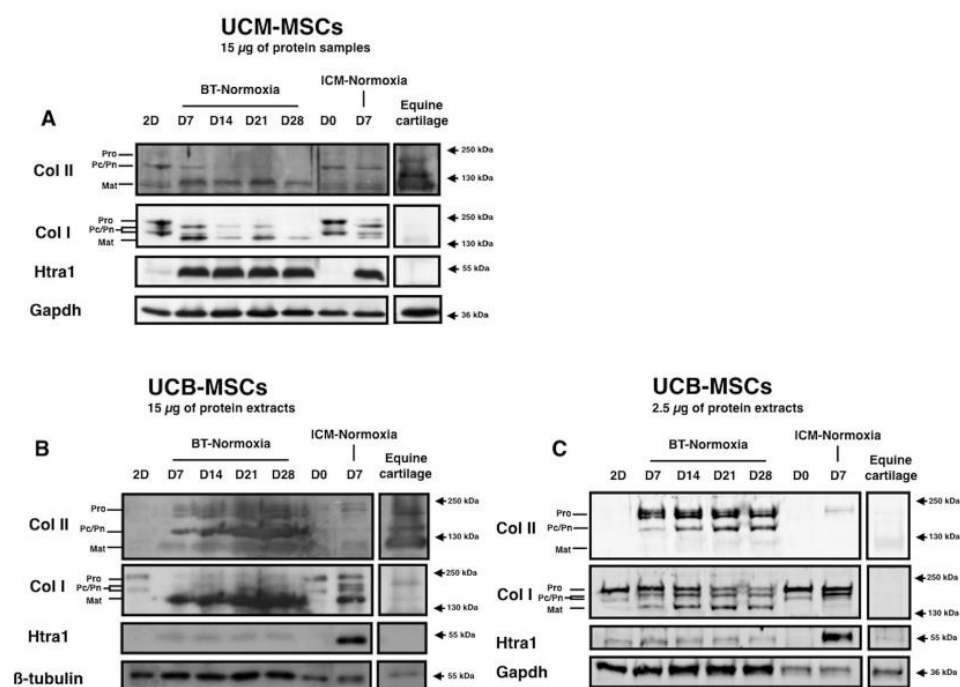


Figure 4. Protein analysis of UCM-MSCs and UCB-MSCs after chondrogenic differentiation. UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds in normoxia during 7, 14, 21 and 28 days in ICM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- β 1 (10 ng/ml). Protein extracts were analyzed in western-blot for type II collagen, type I collagen and Htra1. Representative blots of UCM-MSCs ($n = 5$) (A) and UCB-MSCs ($n = 3$) (B and C) are shown. (C) 2.5 μ g of protein extracts were used for the western-blot of UCB-MSCs samples in order to enhance signal accuracy. The blots presented come from 2 independent experiments and the figure has been composed from 3 western-blot, each coming from one gel. Different levels of type II and type I collagen maturation forms are indicated such as type II procollagen (pro), without C- or N- terminal propeptides (Pc/Pn) and the mature doubly cleaved form (mat).

based on conventional characterization (ISCT recommendations). Moreover, we investigated the chondrogenic differentiation potential of both UCM- and UCB-MSCs for their use in tissue engineering.

While equine UCM- and UCB-MSCs share the common characteristics usually reported for MSCs, we were able to maintain UCM-MSCs proliferation in culture for longer period than UCB-MSCs. Most of UCB-MSCs samples stop proliferating after 4 passages. These results reveal a heterogeneity among UCB-MSCs strains, as only 4 of the samples have been maintained for at least 4 passages and 3 for 5 passages in culture. Only one UCB-MSCs sample has been grown up to 13 passages (data not shown), while UCM-MSCs could be reproducibly maintained up to 13 passages. This difference of proliferative profile could be explained either by intrinsic differences among the biological sources, or by different cell responses for the same culture process, potentially better adapted to UCM-MSCs. Higher batch to batch consistency with UCM-MSCs suggest that these cells might be more resistant to the stress induced by shipping and/or freeze/thaw steps. Nevertheless, their heterogeneity and the difficulties to maintain UCB-MSCs in cell culture does not seem to affect their much higher chondrogenic potential.

When considering equine UCM- and UCB-MSCs for their specific use in cartilage tissue regeneration, major differences were observed between both cell populations. Following the differentiation process, molecular analysis of UCB-MSCs showed strong expression of chondrogenic markers (*Col2a1*, *Acan*, *Sox9*), while these genes were poorly induced in UCM-MSCs. Furthermore, histological analysis showed that UCB-MSCs produced an abundant ECM composed of type II collagen and sulfated GAGs, while UCM-MSCs express only a limited amount of ECM. To rule out the possibility that our culture conditions or 3D collagen scaffold model was not suitable to induce chondrogenic differentiation of UCM-MSCs, conventional methods (including micro-pellet and hanging drop models)³⁷ were further evaluated. None of the different chondrogenic conditions tested promotes substantial cartilage-specific markers expressions by UCM-MSCs (Supplementary Figs S6–S8).

If we focus on the UCB-MSCs chondrogenesis, no mineralization has been observed in the neo-cartilage and type X collagen transcript and protein seem to be expressed at very low amounts during this differentiation in normoxia. Nevertheless, overexpression of Runx2, Spp1, Alpl and type I collagen seems to indicate an hypertrophy of MSCs and a possible osteochondral ossification. The weak expression of Htra1 protein during UCB-MSCs chondrogenesis seems to corroborate these results even if no induction of Mmp13 transcription was observed.

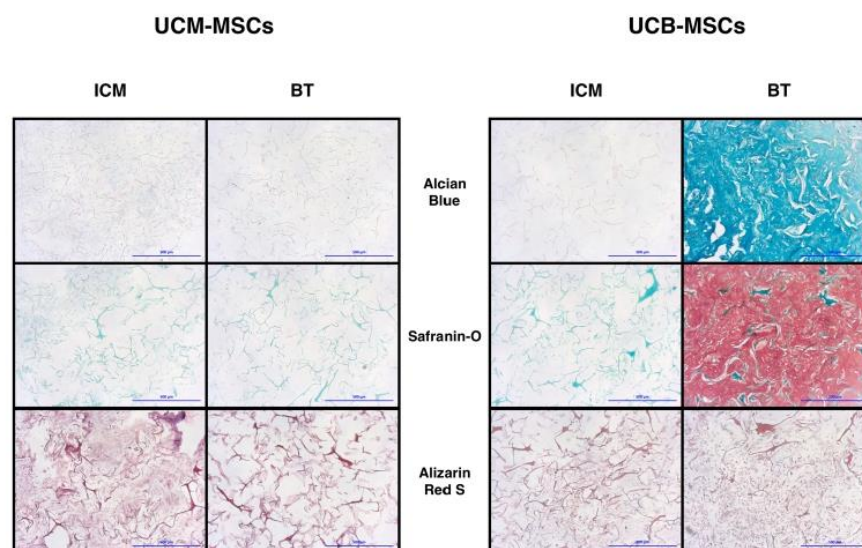


Figure 5. Histological analysis of the neo-tissue substitute generated by UCM-MSCs and UCB-MSCs after chondrogenic stimulation. UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds at 21% O₂ during 28 days in ICM supplemented with or without BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- β 1 (10 ng/ml). Chondrogenic and/or osteogenic ECM was analyzed by alcian blue, O-safranin and alizarin red S stainings. A representative example from four samples for UCM-MSCs and three samples for UCB-MSCs is shown (magnification: $\times 10$, scale bar: 500 μ m).

Indeed, in addition to Mmp-13 and Mmp-10 up-regulation, cartilage hypertrophy events could induce a deep remodeling of the ECM by protease expression and activation that may lead to the formation of bone collar³⁸. Then, Mmp-9 and Mmp-14 will ensure the removing of the bone collar which is replaced by a bone specific ECM.

Recently, HTRA1 was described as a catabolic and transition actor of hypertrophy and ECM remodeling. Its expression and activity can regulate Mmp-13 expression, hypertrophic commitment and the mineralization of the early bone ECM^{39–41}. Strategies targeting Htra1 activity or expression could be relevant. Indeed, this serine protease could be involved in the MSCs lineages and could play a key role in the chondrogenesis and the MSCs behavior^{33,42,43}. To better characterize the differentiation status of UCB-MSCs, protease activity and/or zymographic analyses and/or protease inhibitor assays need therefore to be considered in future experiments.

Hypertrophic cartilage represents a transition tissue at the frontier of an hydrated/viscoelastic tissue and a calcified/mineralized cartilage matrix. During embryonic and post-natal development, hypertrophic chondrocytes participate to remove the limb cartilage pattern and assist the endochondral bone formation²⁸. Concerning articular cartilage tissue engineering, if cartilage hypertrophy happens, this will lead to an imperfect neo-cartilage substitute which can lose its biomechanical properties and generates an instable tissue after implantation. Indeed, chondrocyte hypertrophy can also promote cell apoptosis and decellularization of the tissue with the association of reactive oxidative species release. Furthermore, an hypertrophic tissue could provide a place for vascularization which impairs the general integrity of the implanted articular cartilage⁴⁴.

The limitation of the hypertrophic commitment in the mature chondrocyte represents a real challenge and, in this case, the control of the proximal microenvironment is a critical parameter to stabilize the articular chondrocyte phenotype. Terminal differentiation of the chondrocyte is mediated by several molecular actors and *Runx2* is a major one⁴⁵. By contrast to the normal chondrogenic differentiation, its expression was up-regulated in UCB-MSCs in our experiments. One way to inhibit *Runx2* could be the activation of the hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 α). Whereas the 3–5% O₂ hypoxic culture inhibits *Alpl* transcription during UCB-MSCs chondrogenesis in our experiments, it is not enough to repress *Runx2* expression. This *Runx2* repression could be obtained by lowering the oxygen concentrations near to 1% or by cobalt chloride treatment which is able to induce a *Runx2* transinhibition by an effective HIF-1 α activation⁴⁶. Another solution to inhibit this terminal differentiation of the chondrocytes could be to increase the cell density for the chondrogenic commitment⁴⁷.

Molecular analysis of chondrogenic and osteogenic markers in undifferentiated UCM- and UCB-MSCs showed that these cells have different molecular expression patterns in basal condition. UCM-MSCs express higher levels of the osteogenic markers *Spp1* (the gene encoding the osteopontin protein) and osteocalcin which suggest a possible early osteogenic commitment. UCB-MSCs, on the other hand, significantly overexpress the osteochondral transcription factors Sox-9 and *Runx2*. This could be potentially associated with their greater tendency to differentiate into mature cells of the osteochondrogenic lineage⁴⁵. Interestingly, *Mcam*, encoding the melanoma cell adhesion molecule (CD-146) was only expressed in UCB-MSCs. This marker has been described as a predictive multipotency marker of particular relevance in chondrogenic differentiation^{48,49}. Altogether, these data suggest that UCB-MSCs are able to differentiate toward the chondrogenic lineage, while UCM-MSCs

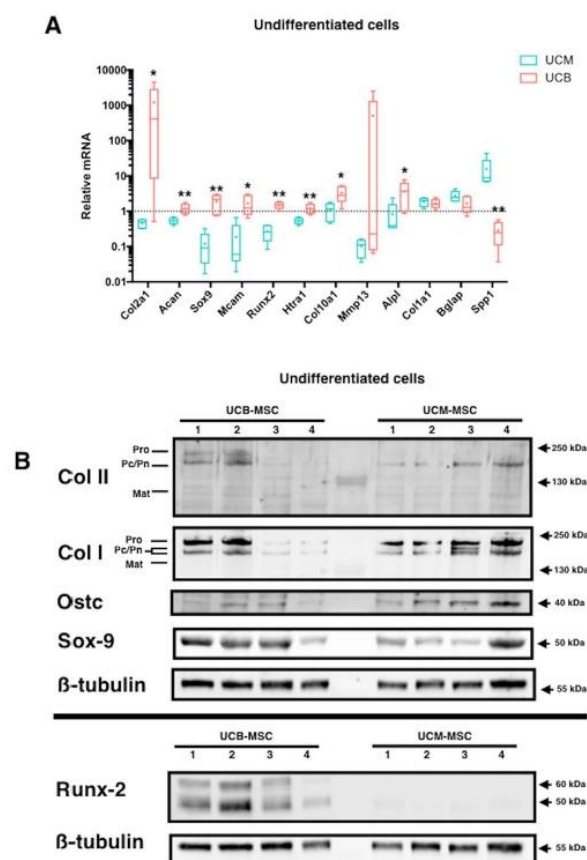


Figure 6. Comparison of the osteo-chondrogenic markers expression between UCM-MSCs and UCB-MSCs in longitudinal study. UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in monolayer to sub-confluence. Steady-state levels of mRNA expression in UCB-MSCs and UCM-MSCs were compared by RTqPCR. All results were normalized versus undifferentiated sample of one UCM-MSCs sample, and presented as the relative expression of each gene. Box-plots represent five independent experiments and statistically significant differences were determined using the Mann Whitney test by comparison of UCM-MSCs versus UCB-MSCs *: $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. **(B)** Four samples of monolayer cultured MSCs for each MSCs sources (numbers 1 to 4) were compared at protein level by western-blot analysis of types I and II collagens, osteocacin, Sox-9 and Runx-2. The images presented correspond to a western-blot including 2 gels.

chondrogenesis seems to be limited. Interestingly, low expression of mature type II collagen protein was observed in UCM-MSCs after 7 days of differentiation. This chondrogenic marker expression could be due to a small population of chondroprogenitors within UCM-MSCs, which is not enough to synthesize significant amount of hyaline ECM. In fact, we supposed that differences observed between UCM-MSCs and UCB-MSCs could be caused by different proportions of cell progenitors in the native MSCs populations. Deep analysis of this intra-population heterogeneity could provide a better characterization of the different MSCs sources and their more efficient use in clinical applications⁵⁰.

Overall, our results showing a limited commitment of UCM-MSCs towards the chondrogenic lineage confirm the findings of Islam *et al.*⁵¹ reporting a poor chondrogenesis of UCM-MSCs, when using a multiple quantitative approach for measuring genes and proteins. These results are nonetheless in contradiction with other groups reporting the use of UCM as a suitable source for cartilage tissue engineering^{24–26,52–54}. Divergent outcomes between groups may be due to many factors, in particular to the isolation and handling techniques of MSCs, the culture methods, and the treatments used to induce chondrogenesis.

A plausible explanation could be also that umbilical cord includes an heterogeneous composition of MSCs which could drastically affect the nature of MSCs populations isolated from the whole tissue. This reasoning can be corroborated by the study of Sarugaser *et al.*⁵⁵, who observed a high heterogeneity in the location of CD146+ cells in the umbilical cord structure. These cells called Human Umbilical Cord PeriVascular (HUCPV) cells are predominantly localized close to the vascular system of the umbilical cord. These studies and our work seem to indicate that the cord matrix should not be considered as a whole for clinical application but as an heterogeneous tissue.

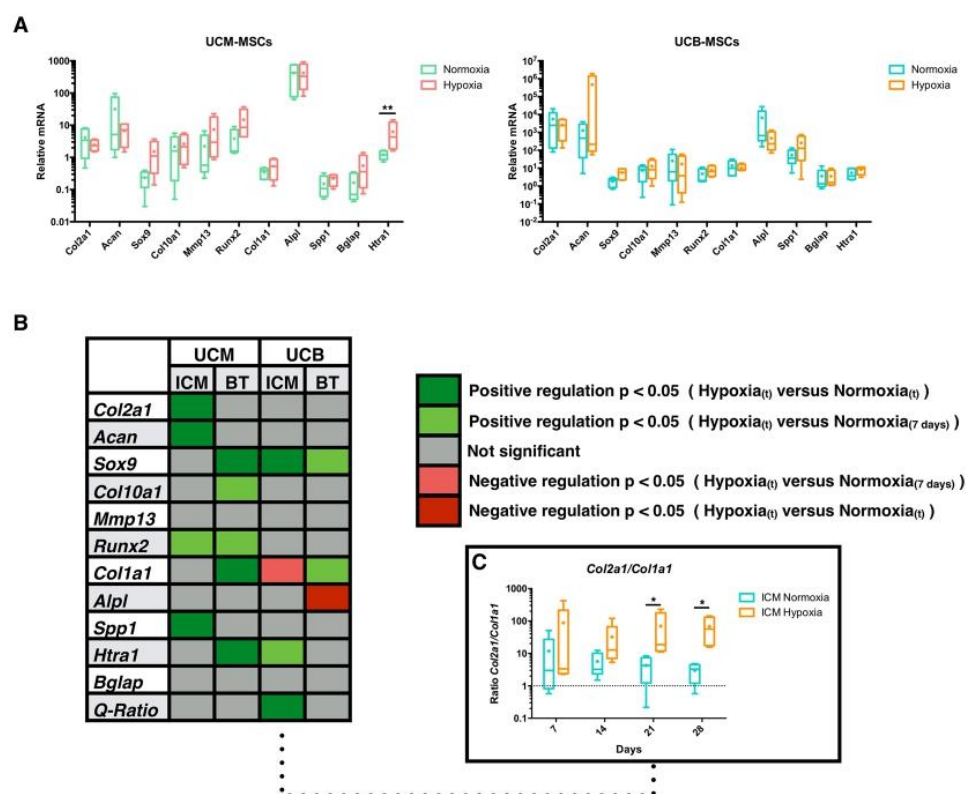


Figure 7. Differential gene expression modulation under hypoxia during a kinetic chondrogenic differentiation of UCM-MSCs and UCB-MSCs. UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds at 21% or 3–5% O₂ during 7, 14, 21 and 28 days in ICM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- β 1 (10 ng/ml). Relative mRNA expression was determined by RTqPCR. All results for each MSCs source were normalized versus untreated MSCs incubated during 1 h in type I/III collagen scaffolds at 37 °C and presented as the relative expression of each gene. **(A)** Effect of hypoxia on chondrogenic differentiation after 28 days of culture in the presence of growth factors. **(B)** Summary of the relative effects of hypoxia on different genes expression: differential time-dependent profile between MSCs sources and upon growth factors treatment. Manual classification of mRNA expression variation by hypoxia was realized by taking into account only the significant results between hypoxia versus normoxia at the same time of measurement or between hypoxia versus normoxia at 7 days. **(C)** *Col2a1/Col1a1* ratio (Q-Ratio) was presented for UCB-MSCs cultured in ICM. Box-plots represent five independent experiments for each MSCs source. Statistically significant differences between normoxia and hypoxia conditions were determined using the Mann Whitney test. *: Hypoxia versus normoxia at the same time (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Hypoxia plays a major role in cartilage and chondrocyte physiology. We previously showed that hypoxia enhances chondrogenesis and hyaline-like ECM synthesis in human BM-MSCs⁴². Hypoxia is involved in the inhibition of the terminal differentiation of chondrocytes³¹, and in MSCs physiology as it is a key microenvironmental parameter^{56,57}. Our results showing an inhibition of *Alpl* in UCB-MSCs during chondrogenesis in hypoxia corroborate these previous data. Nevertheless, while hypoxia did not induce a significant difference in gene expression of chondrogenic markers in differentiated UCB-MSCs, it reduces ECM synthesis. Only *Sox9* expression is overexpressed under hypoxia. This can be explained by the affinity of Hif-1 α to consensus sequences in the promoter of the *Sox9* gene. This relation between *Sox-9* and hypoxia is essential to the pre-chondrogenic induction under low oxygen conditions⁵⁸.

Concerning our MSCs comparison, long-term hypoxia incubation during chondrogenesis of both types of neonatal MSCs induces variable cellular responses and confirm the differential regulation between both the MSCs sources. Hypoxia predominates in hematopoietic stem cell niches⁵⁹ and may regulate the therapeutic properties of MSCs⁶⁰. However, hypoxia has not clearly been involved in chondrogenesis of neonatal MSCs. Indeed, unlike bone marrow niche that maintains stem cells in a quiescent state through an hypoxic environment, MSCs in the cord blood evolve in a normoxic environment. For example, in the arterial umbilical cord blood, oxygen saturation is near to 99%⁶¹. Conversely, oxygen distribution is diffused across a gradient according to the proximity of the vessels in the UCM. This difference of *in vivo* microenvironment for both neonatal MSCs could explain the variations observed during the chondrogenic assays under hypoxic condition.

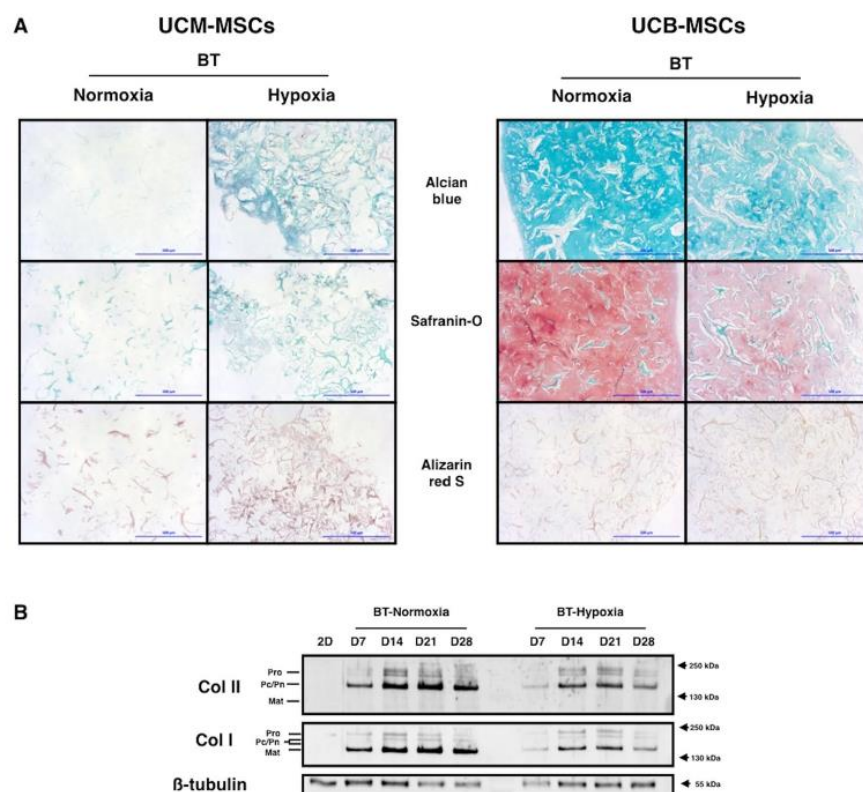


Figure 8. Hypoxia influence on the nature of the matrix newly synthesized by UCB-MSCs under BT treatment. UCB-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds at 21% or 3–5% O_2 during 7, 14, 21 and 28 days in ICM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- β 1 (10 ng/ml). **(A)** The qualitative nature of the ECM was evaluated by alcian blue, O-safranin and alizarine red S stainings. A representative example from four samples for UCM-MSCs and three samples for UCB-MSCs are shown (magnification: $\times 10$, scale bar: 500 μ m). **(B)** Protein extracts were analyzed in western-blot for type II and type I collagens. Representative blots of UCB-MSCs ($n = 3$) are shown. The blots come from one experiment and a western-blot from 1 gel. 2.5 μ g of protein extracts were used for SDS-PAGE of UCB-MSCs samples to improve signal accuracy. Different levels of type II and type I collagen maturation forms are indicated such as type II procollagen (pro), with only C- or N-terminal propeptides (Pc/Pn) and the mature doubly cleaved form (mat).

As previously reported, 3D-chondrogenesis of UCB-MSCs is more efficient when cultures are first placed in normoxia⁶², while hypoxia allows chondrocyte phenotype stabilization, as confirmed in our work by a down-regulation of the osteogenic and hypertrophic factor *Alpl* under hypoxia. Hypoxia stress at the beginning of the chondrogenesis probably imposes metabolic changes on UCB-MSCs, limiting ECM synthesis. Hypoxia could have a time-dependent effect on UCB-MSCs lineage commitment and cellular behavior. The long-term culture of undifferentiated cells in hypoxia before their differentiation may result in cellular metabolism adaptation, with differential effects on UCB-MSCs chondrogenesis.

This work provides the first extensive evaluation of the chondrogenic potential of equine UCM- and UCB-MSCs. It is also the first study, to our knowledge, investigating the role of hypoxia in chondrogenesis for both neonatal MSCs populations. Our results suggest that UCB-MSCs should be preferred over UCM-MSCs for cartilage generation and highlight the need to take inter-source variability into account for tissue engineering for therapeutic purposes in both humans and horses. These results also suggest that the native environment of each type of MSCs should be considered to establish optimal experimental conditions for growing and differentiating MSCs.

Materials and Methods

Equine mesenchymal stem cell samples. Equine UCM-MSCs and UCB-MSCs were kindly provided by Vetbiobank Inc. Briefly, neonatal tissues were recovered from selected mare belonging to French National Studs (IFCE, Saumur, France) following parturition in accordance with standard veterinary practice. All procedures were carried out in accordance with the guidelines put in place by IFCE for animal welfare.

UC samples ($n = 8$) and UCB bags ($n = 9$) were transported under appropriate refrigerated condition to the laboratory facility into 72 h. Samples processing and cell isolation were performed according to Vetbiobank's

protocols. Cells were grown in a proprietary medium and harvested at passages 1–3. UCB- and UCM-MSCs were cryopreserved in liquid nitrogen until further use. A microbiological screening was performed on both the maternal blood and the neonatal tissues.

Culture of equine UCM-MSCs and UCB-MSCs. MSCs vials were thawed at 37 °C, and cells were grown in proliferation medium for several passages, with media renewal twice a week. At each passage, cells were trypsinized and counted by trypan blue exclusion assay. Cell proliferation was evaluated using the following equation:

Δt : time between two passages (h); N_0 : initial number of cells; N_t : cell number at harvesting; n : number of cell generations during Δt ; k : number of generations by time units; g : doubling time (h). Doubling times (g) exceeding 400 h caused by the rapid loss of cell proliferation were systematically excluded from analysis and considered as non-proliferating cells.

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

$$g = \frac{1}{k}$$

UCB- and UCM-MSCs characterization. *Flow cytometry.* MSCs at P2 to P4 were harvested, washed and resuspended in DPBS-sodium azide buffer (0.1%) at a density of 1×10^6 cells/ml. Cells were incubated with monoclonal antibodies, for 25 min at 4 °C in a dark room. Monoclonal antibodies against the following proteins were used: CD-90, CD-44, MHC-1, MHC-2, CD-45 and CD-29 (with mouse anti-human CD90-PE, mouse anti-human CD44-APC, mouse anti-human CD29-PE (all three purchased from BioLegend), mouse anti-horse MHC1-FITC, mouse anti-horse MHC2-FITC, and mouse anti-human CD45-FITC (all four purchased from ABD Serotec)). Negative control staining was performed with the corresponding conjugated isotype antibodies. The cells were washed and resuspended in 300 μ l D-PBS. Flow cytometry was performed with a BD ACCURI C6 cytometer (BD Biosciences).

Evaluation of MSCs multipotency. We evaluated the chondrogenic, osteogenic and adipogenic differentiation of MSCs from P4 to P6, by specific staining in six-well plates. Chondrogenesis was induced at 70% confluence. MSCs were cultured in differentiation medium consisting of incomplete chondrogenic medium (ICM: HG-DMEM Glutamax (Thermo Fisher), dexamethasone (1×10^{-7} M, Sigma-Aldrich), ascorbic acid-2-phosphate (50 μ g/ml, Sigma-Aldrich), proline (40 μ g/ml, Sigma-Aldrich), sodium pyruvate (1 nM, Thermo Fisher), insulin transferin selenium (1%, Thermo Fisher)) supplemented with BMP-2 (50 ng/ml, rhBMP-2, inductOs, Wyeth Europa Ltd) and TGF- β 1 (10 ng/ml, Miltenyi Biotec). The chondrogenic differentiation medium was changed twice weekly during the 21-day incubation period. Osteogenesis was induced at 70% confluence. MSCs were cultured in osteogenic medium consisting of MSCs amplification medium supplemented with dexamethasone (1×10^{-7} M), ascorbic acid-2-phosphate (100 ng/ml), β -glycerophosphate (10 mM). The osteogenic medium was changed once weekly during the 21-day incubation period. Adipogenesis was induced at 50% confluence. MSCs were cultured in adipogenic medium consisting of LG-DMEM, 1% glutamine, 2% PSF supplemented with 10% rabbit serum (Sigma-Aldrich), dexamethasone (1×10^{-6} M, Sigma-Aldrich), 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (0.5 mM), indomethacin (0.2 mM) and recombinant human insulin (10 μ g/ml). The medium was replaced three times during the first two weeks and the incubation was prolonged for seven more days. After 17–21 days of incubation, lipid droplet accumulation became visible. For each differentiation, MSCs cultured in amplification medium were used as negative controls.

At the end of the incubation period, cells were washed twice with DPBS, fixed with 10% formalin neutral buffer (Sigma-Aldrich) for 10 min at room temperature and then washed again with DPBS. Chondrogenesis was evaluated by staining with 1% alcian blue 1% in 1 M chlorhydric acid 1 M (pH = 1) (Sigma-Aldrich). Osteogenesis was assessed by alizarin red S (pH = 4.1) staining (Sigma-Aldrich) and adipogenesis was evaluated by staining with 0.3% oil red O in isopropanol (Sigma-Aldrich). Images were acquired with a confocal phase-contrast microscope.

Chondrogenic differentiation in a 3D scaffold. Collagen scaffolds were manufactured by Symatèse Biomatériaux (Chaponost, France) and used for chondrogenic differentiation. These collagen sponges (100% collagen, 2 mm thick, 5 mm in diameter, corresponding to a volume of 0.04 cm³, with a pore size of about 100 μ m) consisted of native type I (90–95%) and type III (5–10%) collagens from calf skin. Collagen fibers were crosslinked with glutaraldehyde to increase their stability, sterilized by β -irradiation and they displayed no swelling on rehydration.

After MSCs amplification, P3–P6 cells were treated with trypsin, stained with trypan blue, counted and included in collagen scaffolds. The collagen sponges were seeded with cells by dropping 20 μ l of the cell suspension onto the scaffold (5×10^5 cells/scaffold) in 96-wells culture plates, drying for 1 h at 37 °C under an atmosphere containing 5% CO₂ and then transferring the cells to ICM or ICM supplemented with 50 ng/ml BMP-2 and 10 ng/ml TGF- β 1 in 24-well plates. For cultures in hypoxic conditions, ICM was pre-equilibrated at 3% O₂ by bubbling before the transfer of culture dishes into hypoxic Plas-Labs basic multistation glove box (Sigma-Aldrich) containing 2–4% O₂ at 37 °C, under an atmosphere containing 5% CO₂. MSCs were allowed to differentiate into chondrocytes for 7, 14, 21 or 28 days and were then harvested for RNA, protein and histochemical analyses. MSCs incubated for 1 h in collagen type I/III scaffolds at 37 °C were used as day 0 controls for these experiments.

RNA analysis. Total RNA was extracted in Trizol Reagent (ThermoFisher) according to the manufacturer's instructions. We reverse-transcribed RNA to generate cDNA, using reverse transcriptase (MMLV; Thermo Fisher) and oligodT (Eurogentec). RT-qPCR was performed on a StepOnePlus Real-Time system (Thermo Fisher) by Power SYBR Green PCR (Thermo Fisher). The sequences of the primers used are listed in Supplementary Table S2. They were purchased from Eurogentec. The β -actin gene (*Actb*) was used as an endogenous reference gene. Relative mRNA levels were determined with StepOnePlus software (Thermo Fisher), by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method or the standard curve method, depending on the efficiency of amplification for *Actb* amplification and each target gene. The results are expressed as the mean for triplicate samples⁶³.

Protein extraction and western-blots. After treatment, the scaffolds containing the cells were rinsed once with ice-cold DPBS (PAN- Biotech), frozen, crushed and total protein was extracted in RIPA lysis buffer supplemented with protease inhibitors. Protein concentration was assessed with the Bradford colorimetric assay (Bio-Rad). We separated 2.5–15 μ g of total protein by electrophoresis in 10% polyacrylamide gels (Bio-Rad) in denaturing conditions and transferred the proteins onto a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) (Biorad) with the Trans-Blot Turbo Transfer System (Biorad). Non-specific binding sites on the membrane were blocked by incubation with 10% non-fat milk powder in Tris-buffered saline supplemented with 0.1% Tween for 2 h. Membranes were incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-human type I collagen (Novotec), rabbit anti-human type II collagen (Novotec), rabbit anti-human type X collagen (Abcam or Sigma-Aldrich), rabbit anti-human HtrA1 (Millipore), mouse anti-human Sox9 (Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-human Runx2 (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-human osteocalcin (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-human GAPDH (Santa Cruz Biotechnology) or rabbit anti-human β -tubulin (Santa Cruz Biotechnology) antibodies. The next day, the membranes were washed three times, and incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG antibody (Jackson ImmunoResearch). For the Western-blots presented in Fig. 4A,B, signals were visualized with the chemiluminescence method (ECL plus western blotting detection reagent+, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and developed on X-ray films. For the Western-blots presented in Fig. 4C, 6B and 8B signals were visualized by the chemiluminescence method (Clarity ECL, Biorad) and analyzed on the ChemiDoc Touch Imaging system with Image Lab Touch software (Biorad). Complete gels and different exposures of cropped presentations are provided in Figs S9–S11.

Histochemical analysis. After 28 days of chondrogenic differentiation in 3D scaffold model, MSCs were harvested, washed twice in PBS, fixed by incubation in 10% formalin neutral buffer for 8 h at room temperature and embedded in paraffin. The paraffin blocks were cut into 4 μ m-thick sections. The paraffin was removed by incubation in toluene and the sections were rehydrated by passage through a series of alcohol solutions of decreasing concentration. For alcian blue staining, deparaffinized sections were rinsed in 3% acetic acid, stained with an alcian blue/3% acetic acid solution (pH = 2.5) (Sigma-Aldrich) and counterstained with Nuclear Fast Red solution (Sigma-Aldrich). For the analysis of ECM calcification, deparaffinized sections were stained with alizarin Red S solution (pH = 4.1) (Sigma-Aldrich). Sulfated proteoglycans were detected by counterstaining deparaffinized sections with 0.01% Fast Green solution (Sigma-Aldrich) and then incubating in 0.1 safranin-O solution (Sigma-Aldrich) before washing in absolute ethanol. Stained deparaffinized sections were dehydrated by passage through a series of alcohol solutions of graded concentrations, cleared in toluene and mounted.

Statistical analysis. All experiments were replicated with cells samples from different specimens. Values are reported as means \pm SD or box plots. Statistical analyses were performed with the Mann-Whitney U-test to assess the significance of differences between the two groups. All statistical analyses were performed with Prism v6 (Graphpad). P-values \leq 0.05 was considered to be significant.

References

- Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 726–736 (2008).
- Choudhery, M. S., Badowski, M., Muise, A., Pierce, J. & Harris, D. T. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J. Transl. Med.* **12**, 8 (2014).
- Stolzing, A., Jones, E., McGonagle, D. & Scutt, A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. *Mech. Ageing Dev.* **129**, 163–173 (2008).
- Mareschi, K. *et al.* Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J. Cell. Biochem.* **97**, 744–754 (2006).
- 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* **24**, 1294–1301 (2006).
- Carlin, R., Davis, D., Weiss, M., Schultz, B. & Troyer, D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **13** (2006).
- Nekanti, U. *et al.* Optimization and scale-up of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical application. *s. Stem Cell Res* **5**, 244–254 (2010).
- Koch, T. G., Heerkens, T., Thomsen, P. D. & Betts, D. H. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnol.* **7**, 26 (2007).
- Iacono, E. *et al.* Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse. *e. Reproduction* **143**, 455–468 (2012).
- De Schauwer, C. *et al.* Successful isolation of equine mesenchymal stromal cells from cryopreserved umbilical cord blood-derived mononuclear cell fractions: Equine mesenchymal stromal cells isolated from cryopreserved mononuclear cells. *Equine Vet. J.* **45**, 518–522 (2013).
- Mohanty, N. *et al.* Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells derived from equine umbilical cord blood. *Cytotechnology* **68**, 795–807 (2016).
- Lovati, A. B. *et al.* Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. *Vet. Res. Commun.* **35**, 103–121 (2011).

13. Lange-Consiglio, A. *et al.* Characterization and potential applications of progenitor-like cells isolated from horse amniotic membrane: Characterization and application of horse amnion-derived progenitor-like cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **6**, 622–635 (2012).
14. Carrade, D. D. *et al.* Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytotherapy* **13**, 419–430 (2011).
15. Horwitz, E. M. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **7**, 393–395 (2005).
16. Samsonraj, R. M. *et al.* Establishing Criteria for Human Mesenchymal Stem Cell Potency: Establishing Criteria for hMSC Potency. *Stem Cells* **33**, 1878–1891 (2015).
17. Branly, T. *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.* **13**, 611–630 (2017).
18. Kopesky, P. W. *et al.* Adult equine bone marrow stromal cells produce a cartilage-like ECM mechanically superior to animal-matched adult chondrocytes. *Matrix Biol.* **29**, 427–438 (2010).
19. Watts, A. E., Ackerman-Yost, J. C. & Nixon, A. J. A Comparison of Three-Dimensional Culture Systems to Evaluate *In Vitro* Chondrogenesis of Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng. Part A* **19**, 2275–2283 (2013).
20. Lo, W.-C. *et al.* Preferential therapy for osteoarthritis by cord blood MSCs through regulation of chondrogenic cytokines. *Biomaterials* **34**, 4739–4748 (2013).
21. Zhang, X. *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 *J. Cell. Biochem.* **112**, 1206–1218 (2011).
22. Bailey, M. M., Wang, L., Bode, C. J., Mitchell, K. E. & Detamore, M. S. A Comparison of Human Umbilical Cord Matrix Stem Cells and Temporomandibular Joint Condylar Chondrocytes for Tissue Engineering Temporomandibular Joint Condylar Cartilage. *Tissue Eng.* **13**, 2003–2010 (2007).
23. Bosch, J. *et al.* Distinct Differentiation Potential of “MSC” Derived from Cord Blood and Umbilical Cord: Are Cord-Derived Cells True Mesenchymal Stromal Cells? *Stem Cells Dev.* **21**, 1977–1988 (2012).
24. Chen, X. *et al.* Chondrogenic differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in type I collagen-hydrogel for cartilage engineering. *Injury* **44**, 540–549 (2013).
25. Liu, S. *et al.* Characteristics of mesenchymal stem cells derived from Wharton’s jelly of human umbilical cord and for fabrication of non-scaffold tissue-engineered cartilage. *e. J. Biosci. Bioeng* **117**, 229–235 (2014).
26. Reppel, L. *et al.* Chondrogenic induction of mesenchymal stromal/stem cells from Wharton’s jelly embedded in alginate hydrogel and without added growth factor: an alternative stem cell source for cartilage tissue engineering. *Stem Cell Res. Ther.* **6** (2015).
27. Demoor, M. *et al.* Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 2414–2440 (2014).
28. Yang, L., Tsang, K. Y., Tang, H. C., Chan, D. & Cheah, K. S. E. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 12097–12102 (2014).
29. Ghone, N. V. & Grayson, W. L. Recapitulation of mesenchymal condensation enhances *in vitro* chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* **227**, 3701–3708 (2012).
30. Handorf, A. M. & Li, W.-J. Induction of Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis Through Sequential Administration of Growth Factors Within Specific Temporal Windows. *J. Cell. Physiol.* **229**, 162–171 (2014).
31. Lee, H.-H. *et al.* Hypoxia Enhances Chondrogenesis and Prevents Terminal Differentiation through PI3K/Akt/FoxO Dependent Anti-Apoptotic Effect. *Sci. Rep.* **3** (2013).
32. Gómez-Leduc, T. *et al.* Chondrogenic commitment of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in collagen matrices for cartilage engineering. *Sci. Rep.* **6**, 32786 (2016).
33. Rakic, R. *et al.* 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**, 1842 (2017).
34. Tiaden, A. N. *et al.* Human Serine Protease HTRA1 Positively Regulates Osteogenesis of Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells and Mineralization of Differentiating Bone-forming Cells Through the Modulation of Extracellular Matrix Protein: Regulation of Osteogenesis by HTRA1. *Stem Cells* **30**, 2271–2282 (2012).
35. Frisbie, D. D. *et al.* Evaluation of autologous chondrocyte transplantation via a collagen membrane in equine articular defects – results at 12 and 18 months. *Osteoarthritis Cartilage* **16**, 667–679 (2008).
36. Makris, E. A., Gomoll, A. H., Malizos, K. N., Hu, J. C. & Athanasiou, K. A. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat. Rev. Rheumatol.* **11**, 21–34 (2015).
37. Suzuki, S., Sekiya, I., Tsuji, K. & Muneta, T. Properties and usefulness of aggregates of synovial mesenchymal stem cells as a source for cartilage regeneration. *Osteoarthritis Cartilage* **20**, S128 (2012).
38. Ortega, N., Behonick, D. J. & Werb, Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol.* **14**, 86–93 (2004).
39. Holt, D. W. *et al.* Osteoarthritis-like changes in the heterozygous *sedc* mouse associated with the *HtrA1-Ddr2-Mmp-13* degradative pathway: a new model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **20**, 430–439 (2012).
40. Tiaden, A. N. *et al.* Human Serine Protease HTRA1 Positively Regulates Osteogenesis of Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells and Mineralization of Differentiating Bone-forming Cells Through the Modulation of Extracellular Matrix Protein: Regulation of Osteogenesis by HTRA1. *Stem Cells* **30**, 2271–2282 (2012).
41. Xu, L., Golshirazian, I., Asbury, B. J. & Li, Y. Induction of high temperature requirement A1, a serine protease, by TGF- β 1 in articular chondrocytes of mouse models of OA. *Histol. Histopathol.* **29**, 609–618 (2014).
42. Legendre, F. *et al.* 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**, (2017).
43. Tiaden, A. N. *et al.* Novel Function of Serine Protease HTRA1 in Inhibiting Adipogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells via MAP Kinase-Mediated MMP Upregulation: HTRA1 Inhibits Mesenchymal Stem Cell Adipogenesis. *Stem Cells* **34**, 1601–1614 (2016).
44. De Bari, C., Dell’Accio, F. & Luyten, F. P. Failure of *in vitro*-differentiated mesenchymal stem cells from the synovial membrane to form ectopic stable cartilage *in vivo*. *Arthritis Rheumatol.* **50**, 142–150 (2004).
45. Eames, B. F., Sharpe, P. T. & Helms, J. A. Hierarchy revealed in the specification of three skeletal fates by *Sox9* and *Runx2*. *Dev. Biol.* **274**, 188–200 (2004).
46. Wang, G. L., Jiang, B.-H., Rue, E. A. & Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 5510–5514 (1995).
47. Wang, Y., Blasioli, D., Kim, H., Kim, H. & Kaplan, D. Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. *Biomaterials* **27**, 4434–4442 (2006).
48. Russell, K. C. *et al.* *In Vitro* High-Capacity Assay to Quantify the Clonal Heterogeneity in Trilineage Potential of Mesenchymal Stem Cells Reveals a Complex Hierarchy of Lineage Commitment. *Stem Cells* **28**, 788–798 (2010).
49. Su, X. *et al.* CD146 as a new marker for an increased chondroprogenitor cell sub-population in the later stages of osteoarthritis: CD146 used for chondroprogenitors. *J. Orthop. Res.* **33**, 84–91 (2015).

50. Nombela-Arrieta, C., Ritz, J. & Silberstein, L. E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 126–131 (2011).
51. Islam, A., Hansen, A. K., Mennan, C. & Martinez-Zubiaurre, I. Mesenchymal stromal cells from human umbilical cords display poor chondrogenic potential in scaffold-free three dimensional cultures. *Eur. Cells Mater.* **31**, 407–424 (2016).
52. Lo Iacono, M. Perinatal and Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells in Cartilage Regenerative Medicine and Tissue Engineering Strategies. *Open Tissue Eng. Regen. Med.* **14**, 72–81 (2011).
53. Aleksander-Konert, E., Padaszyński, P., Zajdel, A., Dzierżewicz, Z. & Wilczok, A. *In vitro* chondrogenesis of Wharton's jelly mesenchymal stem cells in hyaluronic acid-based hydrogels. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **21** (2016).
54. Tanthaisong, P. *et al.* Enhanced Chondrogenic Differentiation of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells by GSK-3 Inhibitor. *PLOS ONE* **12**, e0168059 (2017).
55. Sarugaser, R., Lickorish, D., Baksh, D., Hosseini, M. M. & Davies, J. E. Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors. *Stem Cells* **23**, 220–229 (2005).
56. Grayson, W. L., Zhao, F., Izadpanah, R., Bunnell, B. & Ma, T. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J. Cell. Physiol.* **207**, 331–339 (2006).
57. Bigot, N. *et al.* Hypoxia Differentially Modulates the Genomic Stability of Clinical-Grade ADSCs and BM-MSCs in Long-Term Culture: Genetic Stability of Long-term Cultured MSCs in Hypoxia. *Stem Cells* **33**, 3608–3620 (2015).
58. Amarilio, R. *et al.* HIF1 regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis. *Development* **134**, 3917–3928 (2007).
59. Cipolleschi, M. G., Dello Sbarba, P. & Olivotto, M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* **82**, 2031–2037 (1993).
60. Rosová, I., Dao, M., Capoccia, B., Link, D. & Nolte, J. A. Hypoxic Preconditioning Results in Increased Motility and Improved Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* **26**, 2173–2182 (2008).
61. Ak, A., Ogun, C. O., Bayir, A., Kayis, S. A. & Koylu, R. Prediction of Arterial Blood Gas Values from Venous Blood Gas Values in Patients with Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Tohoku J. Exp. Med.* **210**, 285–290 (2006).
62. Gómez-Leduc, T. *et al.* 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**, 1933 (2017).
63. Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* **3**, 1101–1108 (2008).

Acknowledgements

We are grateful to Marie-Christine Enos for her administrative and technical support. This research was funded by the French ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) and VETBIOBANK, to PG and SM (917CB170); the Fonds Eperon to PG and MD (EQUISTEM, N80-2014, 917CB194); an ERDF (European Regional Development Funds, EQUISTEM 917CB210) and Regional Council of Normandie grant to PG and MD in the CPER Centaure grant (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. RR is a recipient from the French ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) and VETBIOBANK, a CIFRE fellowship. Stéphane Maddens has cell stocks in Vetbiobank Inc. and Nathalie Saulnier is an employee of Vetbiobank Inc.

Author Contributions

R.R. was implicated in the study design, in data collection/assembly and analysis, performed experiments, and in the writing of the manuscript. B.B. and N.S. performed experiments, collected data, and analyzed the data. R.R. and N.S. were involved in collecting MSCs. P.G., N.S. and S.M. were involved in the study conception and design, in supervision of the study, in data analysis, and data interpretation. M.D. was involved in data analysis. P.G., N.S. and S.M. participated in the writing of the manuscript. S.M. and P.G. provided financial support. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28164-9>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

Differences in the intrinsic chondrogenic potential of equine umbilical cord matrix and cord blood mesenchymal stromal/stem cells for cartilage regeneration.

Rakic Rodolphe^{1,2}, Bourdon Bastien¹, Magali Demoor¹, Maddens Stéphane², Saulnier Nathalie^{2†} and Galéra Philippe^{1†*}.

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

² VETBIOBANK, 69280 Marcy l'Etoile, France.

† Contributed equally

* Corresponding author: philippe.galera@unicaen.fr

Dose effect of BMP-2 and TGF-β1

	BMP-2 (ng/ml)	TGF-β1 (ng/ml)	
1	-	-	Normoxia
2	5	5	
3	10	10	
4	-	-	
5	-	-	
6	5	5	
7	5	5	
8	10	10	
9	10	10	
10	-	-	Hypoxia
11	5	5	
12	10	10	
13	-	-	
14	-	-	
15	5	5	
16	5	5	
17	10	10	
18	10	10	

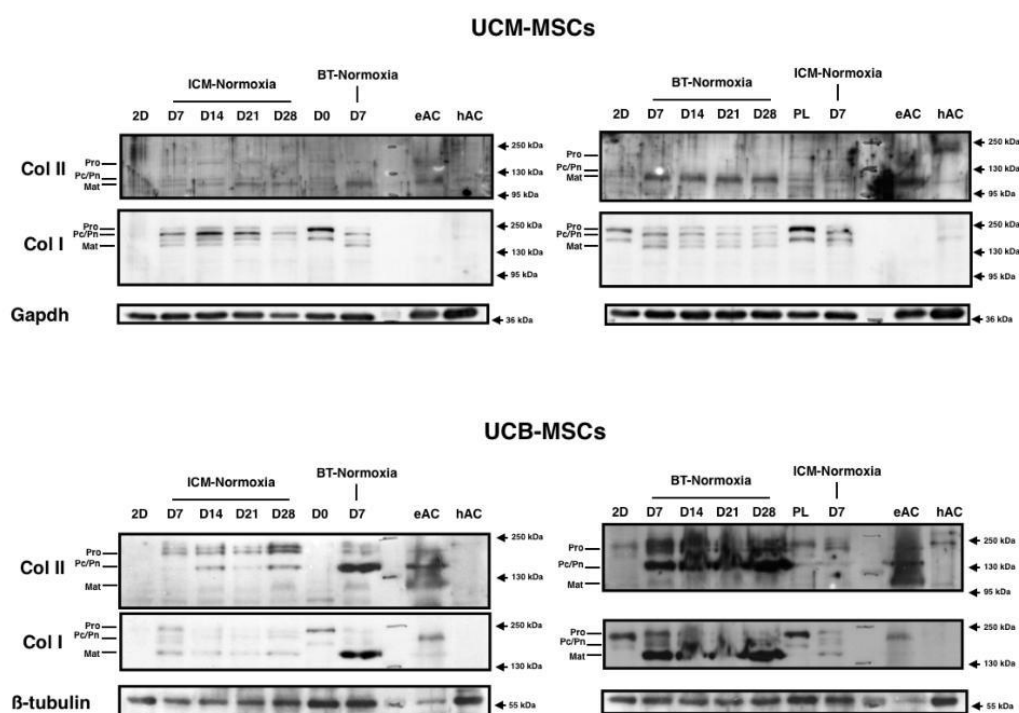
Chondrogenic conditions for the screening

	Treatment	
1	ICM	Normoxia
2	TGF-β1 (10 ng/ml) + BMP-2 (50 ng/ml)	
3	TGF-β3 (10 ng/ml)	
4	TGF-β3 (10 ng/ml) + BMP-2 (50 ng/ml)	
5	BMP-6 (500 ng/ml)	
6	BMP-6 (500 ng/ml) + TGF-β1 (10 ng/ml) + BMP-2 (50 ng/ml)	
7	BMP-6 (500 ng/ml) + TGF-β3 (10 ng/ml)	
8	Stempro +supplement (TermoFisher)	
9	Poietics complete (Lonza)	
10	Poietics complete + TGF-β3 (10 ng/ml)	Hypoxia
11	ICM	
12	TGF-β1 (10 ng/ml) + BMP-2 (50 ng/ml)	
13	TGF-β3 (10 ng/ml)	
14	TGF-β3 (10 ng/ml) + BMP-2 (50 ng/ml)	
15	BMP-6 (500 ng/ml)	
16	BMP-6 (500 ng/ml) + TGF-β1 (10 ng/ml) + BMP-2 (50 ng/ml)	
17	BMP-6 (500 ng/ml) + TGF-β3 (10 ng/ml)	
18	Stempro +supplement (TermoFisher)	
19	Poietics complete (Lonza)	
20	Poietics complete + TGF-β3 (10 ng/ml)	

Supplemental table I: lists of the growth factors concentrations and chondrogenic conditions used for the screening.

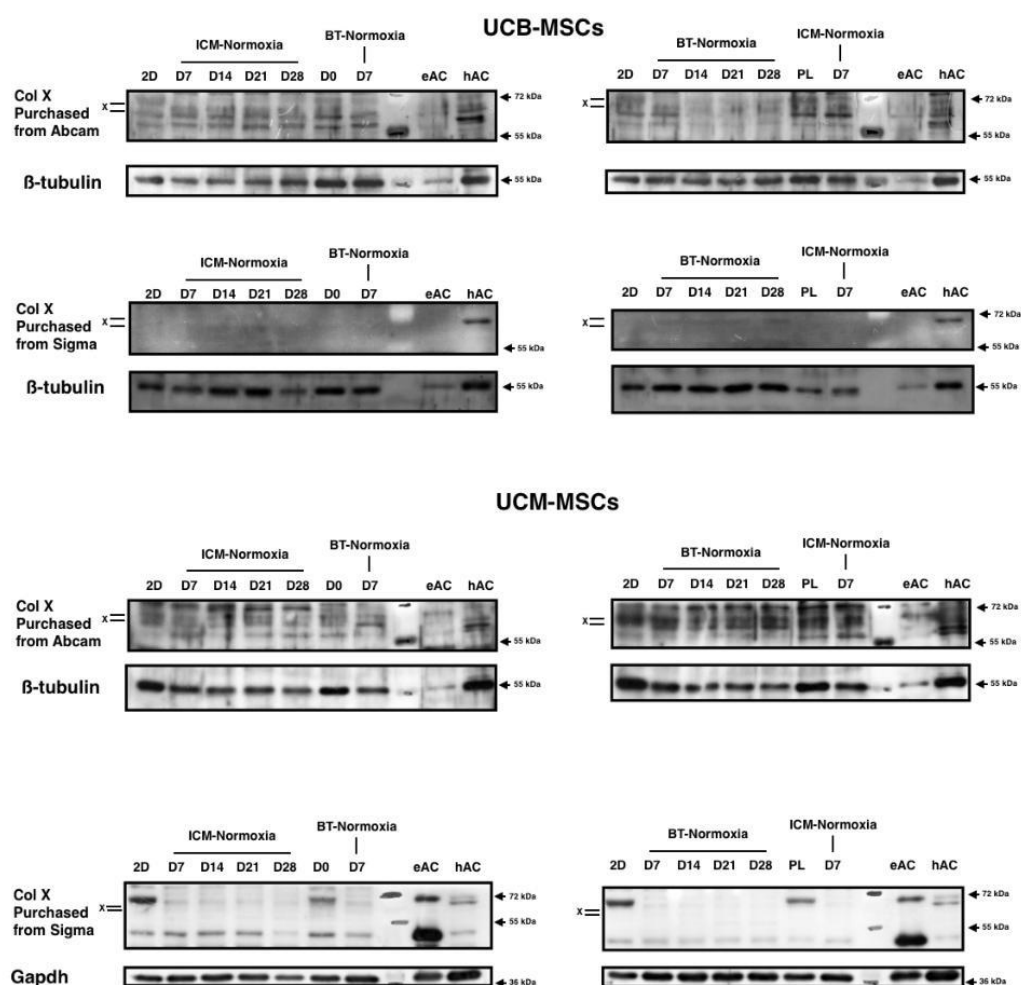
Gene	Primer	sequence 5'-3'
<i>Actb</i>	forward	GATGATGATATCGCCGCGCTC
	reverse	TGCCCCACGTATGAGTCCTT
<i>Col1a1</i>	forward	TGCCGTGACCTCAAGATGTG
	reverse	CGTCTCCATGTTGCAGAAGA
<i>Col2a1</i>	forward	GGCAATAGCAGGTTACGTACA
	reverse	CGATAACAGTCTTGCCCCACTT
<i>Col10a1</i>	forward	GCACCCCAGTAATGTACACCTATG
	reverse	GAGCCACACCTGGTCATTTTC
<i>Acan</i>	forward	ACACGGATGGTGTCTCTTC
	reverse	CTCAGTCCACGGGTTACGAT
<i>Runx-2</i>	forward	GCAGTTCCCAAGCATTTCAT
	reverse	CACTCTGGCTTTGGGAAGAG
<i>Mmp13</i>	forward	TGAAGACCCGAACCCTAAACAT
	reverse	GAAGACTGGTGATGGCATCAAG
<i>Sox9</i>	forward	CAAGAAGGACCACCCGGACTA
	reverse	GGAGATGTGTGTCTGCTCCGT
<i>Alpl</i>	forward	GACATGACCTCCCAGGAAGA
	reverse	GCAGTGAAGGGCTTCTTGTC
<i>Htra1</i>	forward	GGACTTCATGTTTCCCTCAA
	reverse	GTTCTGCTGAACAAGCAACA
<i>Mcam</i>	forward	GCTCCGTGTGTACAAAGCTCC
	reverse	GGGACGACTGAATGTGGACT
<i>Ppia</i>	forward	CCCTACCGTGTTCTTCGACA
	reverse	GTGAAGTCACCACCCTGACA
<i>Bglap</i>	forward	TCCTTTGGGGTTTGGCCTAC
	reverse	GCCTGTGAGACAAAGGAGGG
<i>Spp1</i>	forward	GAGACACGTATGATGGCCGA
	reverse	GCTGTCCCAATCAGAAGCCA

Supplemental table II: Primers used in RT-qPCR analysis.



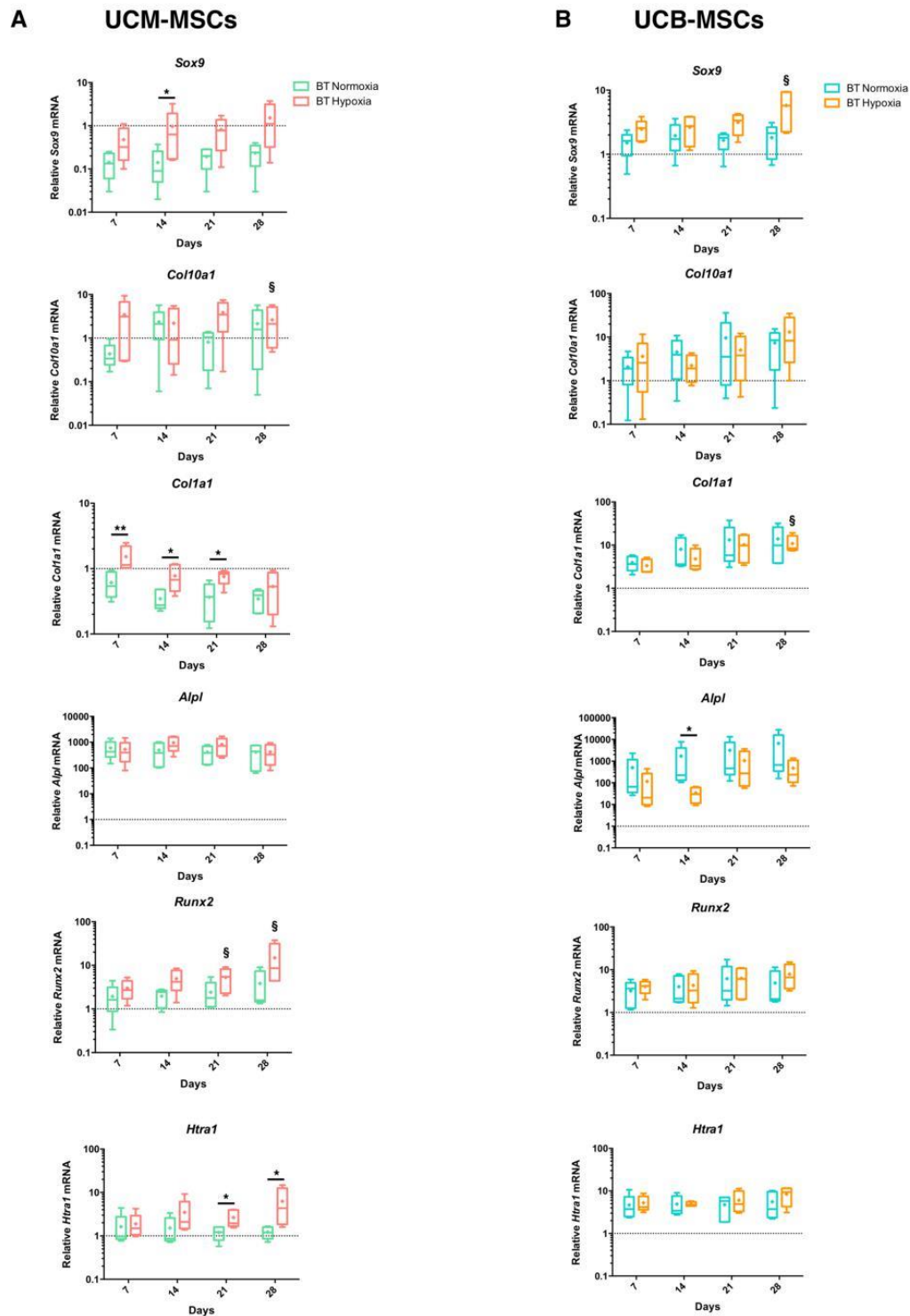
Supplemental figure 1: Comparison of ICM and BT treatments on UCM-MSCs and UCB-MSCs.

UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds at 21% O₂ during 7, 14, 21 and 28 days in ICM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF-β1 (10 ng/ml). Protein extracts were analyzed in western-blot for type II and type I collagen. Representative blots of UCM-MSCs (n= 5) and UCB-MSCs (n= 3) are shown. Blots were obtained from 2 independent experiments and 2 western-blot of 2 gels each. Different levels of type II and type I collagen maturation forms are indicated such as type II procollagen (pro), without C- or N- terminal propeptides (Pc/Pn) and the mature doubly cleaved form (mat).



Supplemental figure 2: Analysis of type X collagen expression in UCB-MSCs and UCM-MSCs protein extracts.

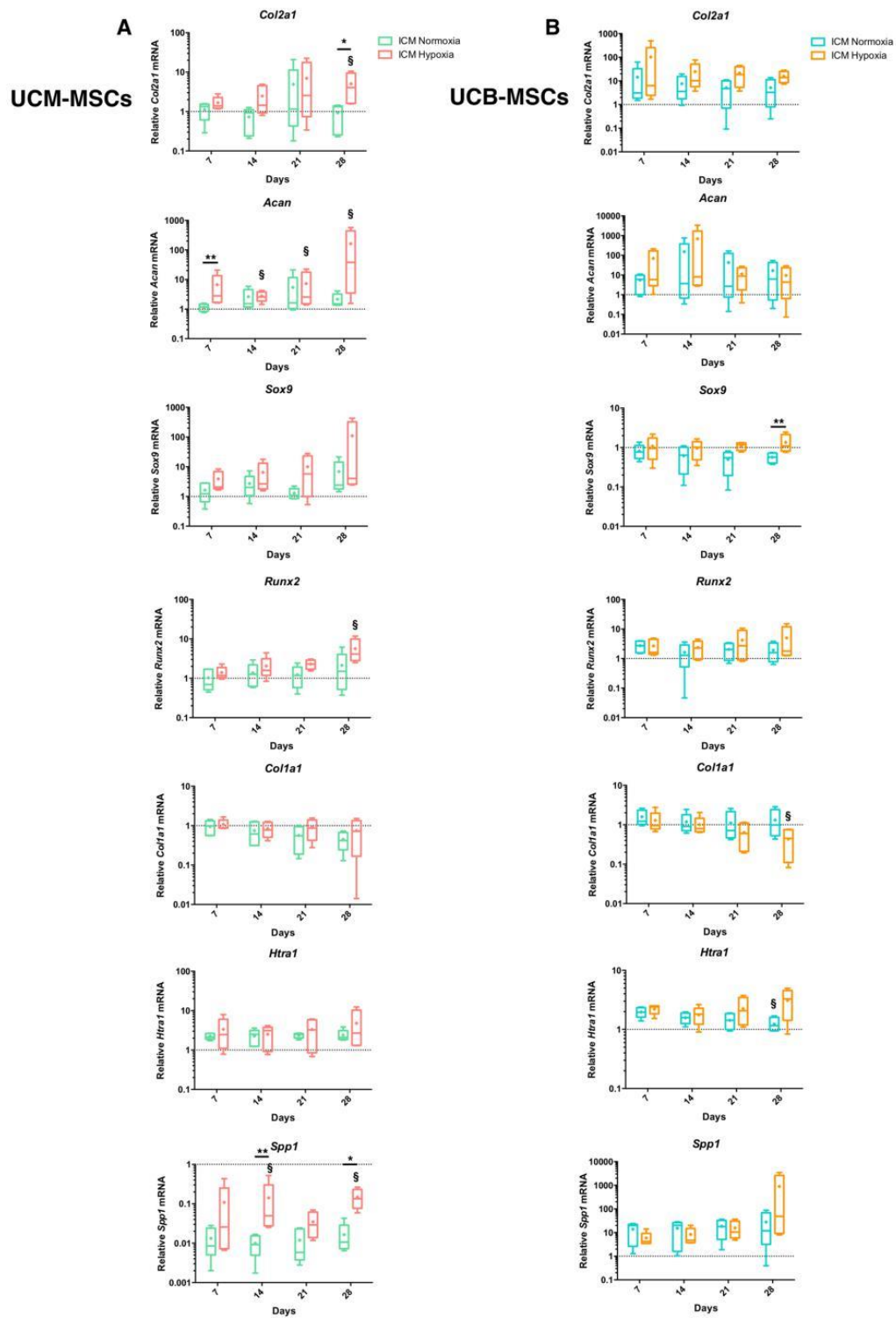
UCB-MSCs and UCM-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds at 21% O₂ during 7, 14, 21 and 28 days in ICM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF-β1 (10 ng/ml). Protein extracts were analyzed in western-blot for type X collagen. Representative blots of UCM-MSCs (n= 5) and UCB-MSCs (n= 3) are shown. Blots were obtained from 4 independent experiments and 4 western-blot of 2 gels each. Two forms of type X collagen should be observed corresponding to the long form (66 kDa) and signal peptide clived form (64 kDa).



Supplemental figure 3: Differential gene expression modulation under hypoxia during a kinetic

culture under BMP-2 and TGF- β 1 treatment of UCM-MSCs and UCB-MSCs.

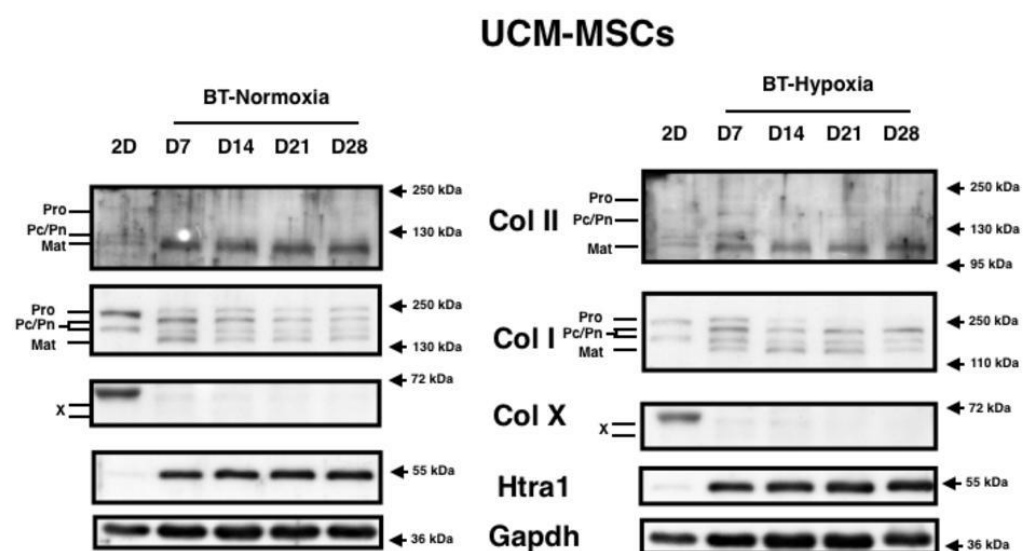
UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds at 21% or 3-5% O₂ during 7, 14, 21 and 28 days in ICM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF- β 1 (10 ng/ml). Relative mRNA expression was determined by RT-qPCR. All results for each MSCs source were normalized versus untreated MSCs incubated during 1 h in type I/III collagen scaffolds at 37°C and presented as the relative expression of each gene. Box-plots represent five independent experiments for each MSCs source. Statistically significant differences between normoxia and hypoxia conditions were determined using a Mann Whitney test. *: Hypoxia versus normoxia at the same time (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). §: Hypoxia versus normoxia at 7 days (§p < 0.05, §§p < 0.01, §§§p < 0.001).



Supplemental figure 4: Differential gene expression modulation by hypoxia in a kinetic culture of

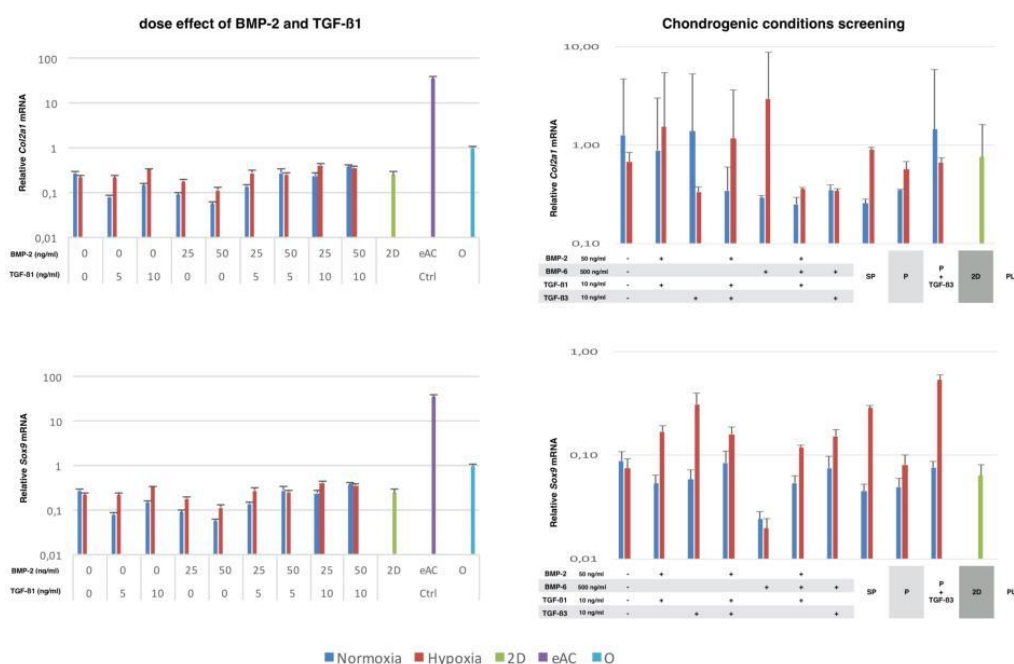
UCB-MSCs and UCM-MSCs cultured without growth factors.

UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds at 21% or 3-5% O₂ during 7, 14, 21 and 28 days in ICM in absence of growth factors. Relative mRNA expression was determined by RT-qPCR. All results for each MSCs source were normalized versus untreated MSCs incubated during 1 h in collagen type I/III scaffolds at 37°C and presented as the relative expression of each gene. Box-plots represent five independent experiments for each MSCs source. Statistically significant differences between normoxia and hypoxia conditions were determined using a Mann Whitney test. *: Hypoxia versus normoxia at the same time (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). §: Hypoxia versus normoxia at 7 days (§p < 0.05, §§p < 0.01, §§§p < 0.001).



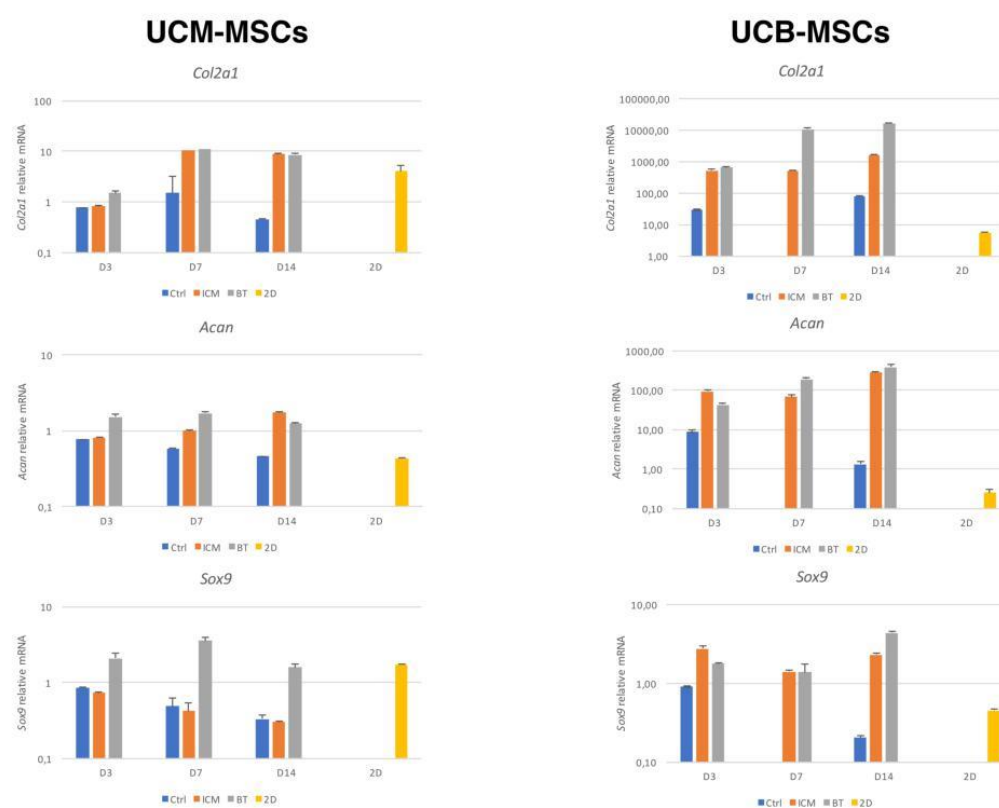
Supplemental figure 5: Effect of hypoxia on matrix synthesis by UCM-MSCs under growth factors treatment.

UCM-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds at 21% or 3-5% O₂ during 7, 14, 21 and 28 days in ICM supplemented with BMP-2 (50 ng/ml) and TGF-β1 (10 ng/ml). Protein extracts were analyzed in western-blot for types II, I and X collagens and Htra1. Representative blots of UCM-MSCs (n= 5) are shown. The images were obtained from one experiment and one western-blot of 2 gels. Different levels of type II and type I collagen maturation forms are indicated such as type II procollagen (pro), with only C- or N- terminal propeptides (Pc/Pn) and the mature doubly cleaved form (mat).



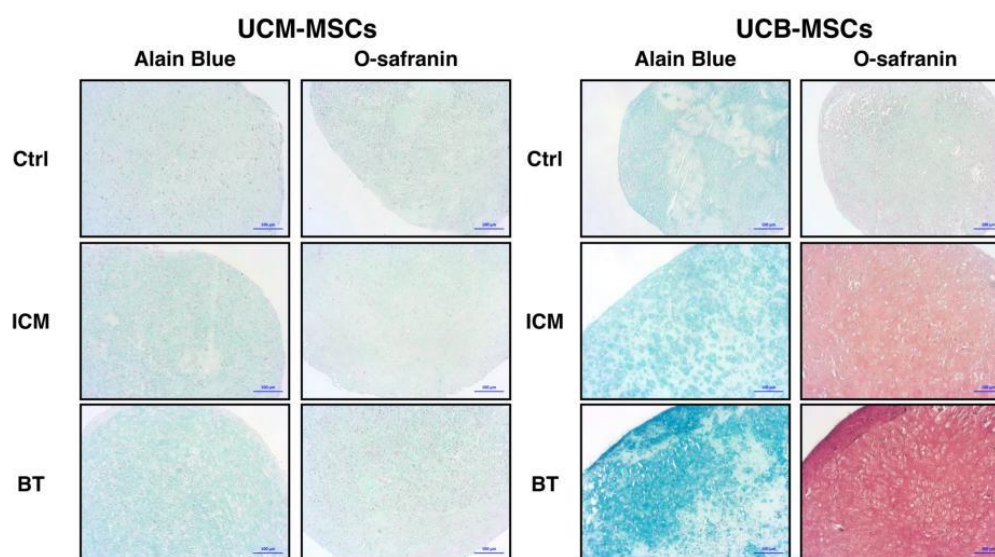
Supplemental figure 6: Effect of different growth factors and chondrogenic culture conditions screening on chondrogenesis induction in UCM-MSCs.

UCM-MSCs were cultured in type I/III collagen scaffolds at 21% or 3-5% O₂ during 14 days in various chondrogenic media and growth factors presented in Supp. table I. Relative mRNA amounts encoding *Col2a1* and *Sox9* were analyzed by RT-qPCR and shown. mRNA extracts obtained from equine articular chondrocytes (eAC) released from cartilage after overnight enzymatic digestion and equine primary (P0) osteoblasts (O) are used as controls. Monolayer cultured MSCs were used as a control for the undifferentiated status. All results were normalized versus untreated MSCs incubated during 1 h in type I/III collagen scaffolds at 37°C and presented as the relative expression of each gene. A representative experiment of two independent experiments is presented.



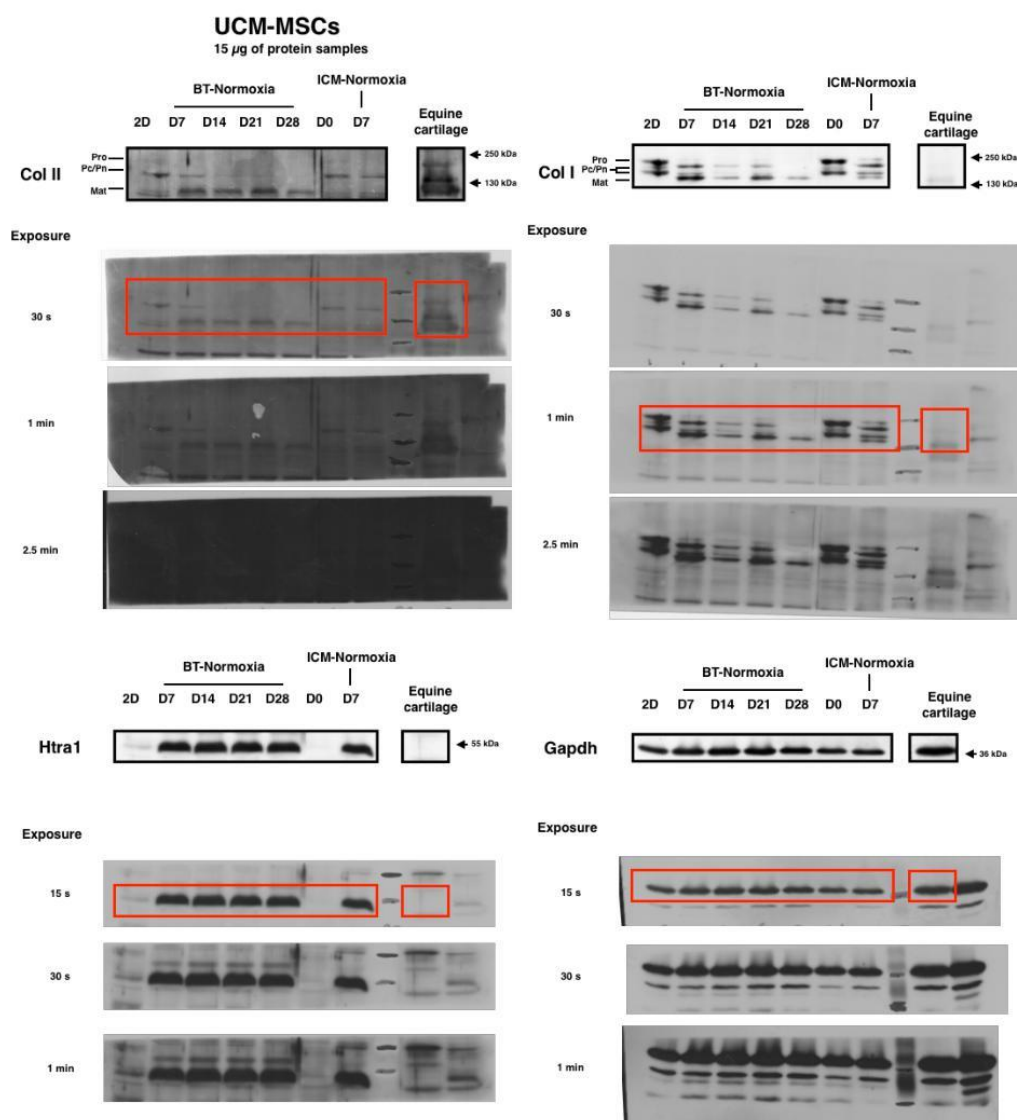
Supplemental figure 7: UCM-MSCs and UCB-MSCs chondrogenic differentiation in a hanging-drop cell culture model.

UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured in a hanging-drop model during 14 days in amplification medium (Ctrl) or in ICM with or without BT treatment. Relative mRNA amounts encoding *Col2a1*, *Acan* and *Sox9* were determined by RT-qPCR and shown. All results for each MSCs source were normalized versus a 24 h hanging drop culture before treatment (D0) and presented as the relative expression of each gene. A representative experiment of two independent experiments is presented.



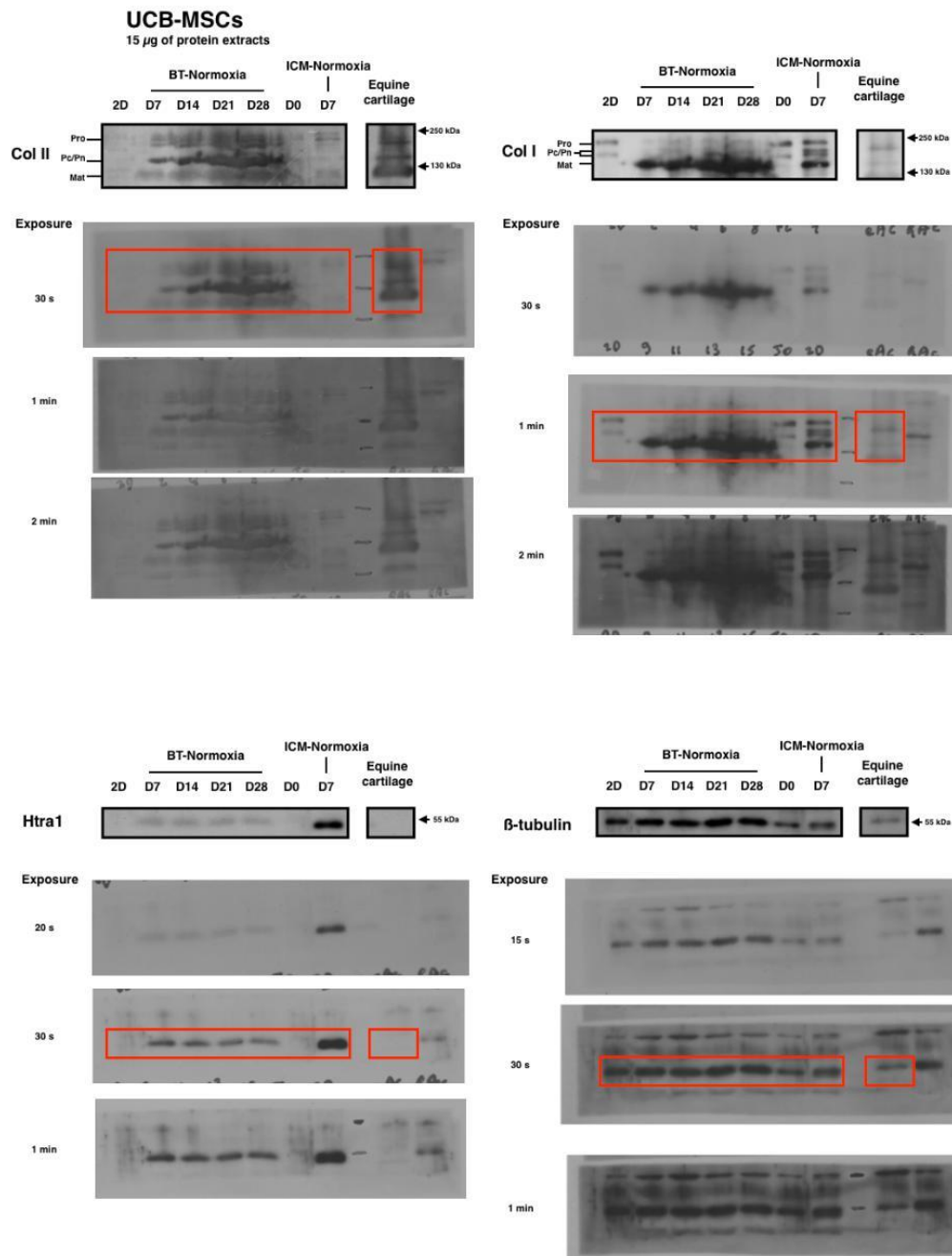
Supplemental figure 8: Histochemistry of UCM-MSCs and UCB-MSCs chondrogenic differentiation in a micro-pellet cell culture model.

UCM-MSCs and UCB-MSCs were cultured as micro-pellets during 28 days in amplification medium (Ctrl) or in ICM with or without BT treatment. The quality of the ECM synthesized was evaluated by Alcian blue and O-safranin stainings. A representative example of two independent experiments is shown (magnification: $\times 20$, scale bar: 100 μm).



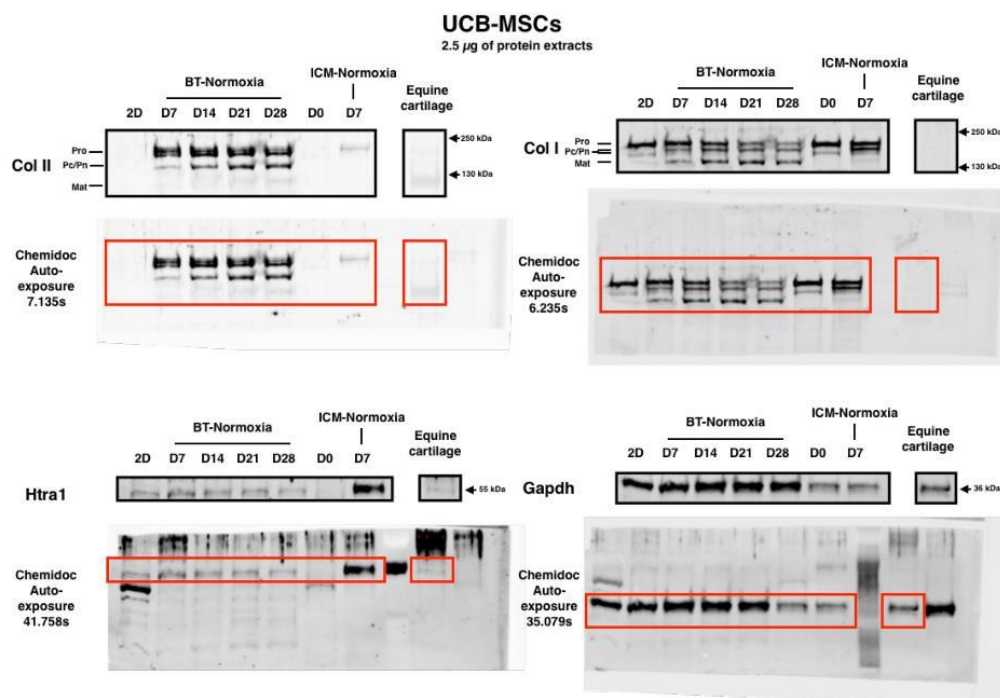
Supplemental figure 9: Complete gel and different exposure times of the autoradiographic films for the western-blot.

For the western-blot presented in figure 4A, different exposures of one PVDF membrane were done as shown. The cropped images are highlighted in the red lines.



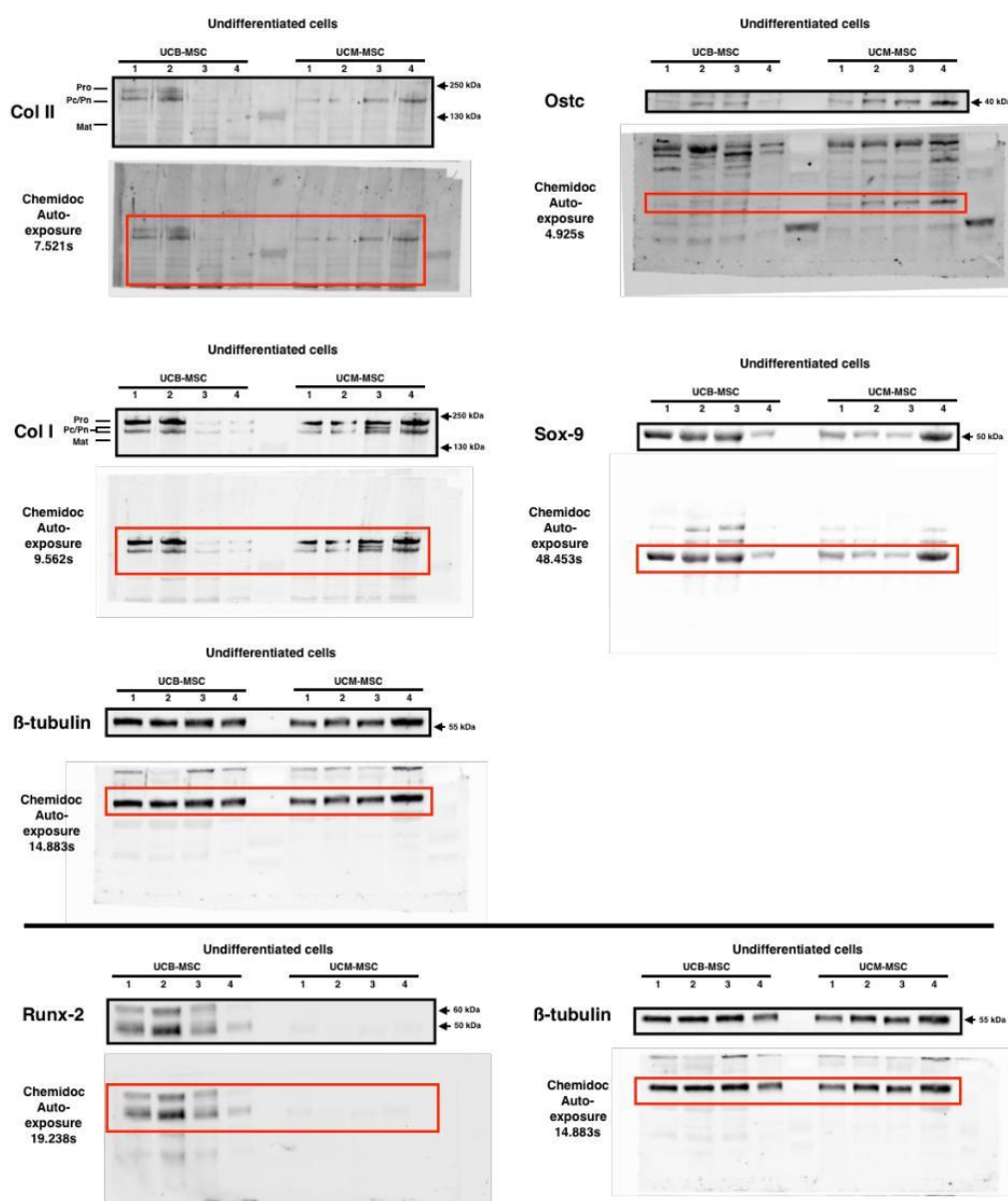
Supplemental figure 10: Complete gel and different exposure times of the autoradiographic films for the western-blot.

For the western-blot presented in figure 4B, different exposures of one PVDF membrane were performed as presented. The cropped images are highlighted in the red lines.



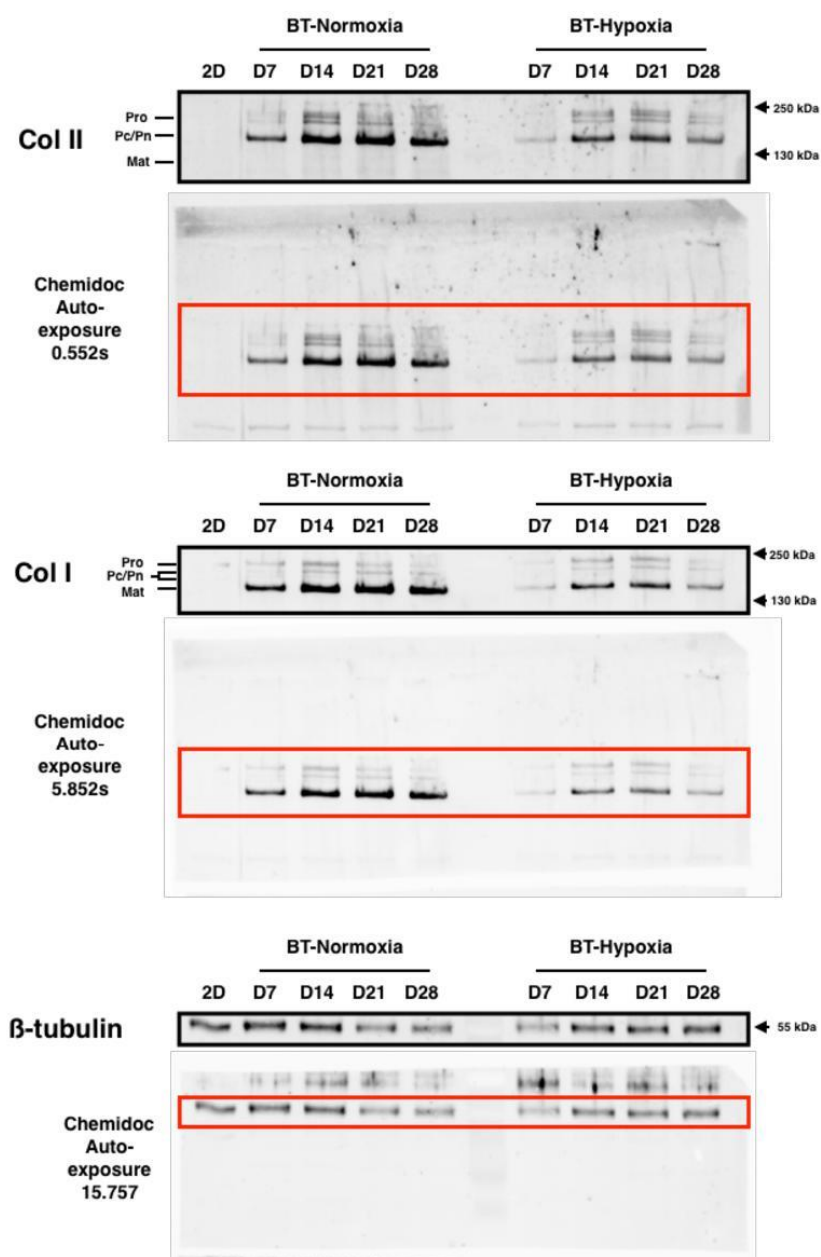
Supplemental figure 11: Complete gel and PVDF membranes analyzed in the western-blot.

For the western-blot presented in figure 4C, one PVDF membrane was analyzed by the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) with automatic exposure parameters. The cropped images are highlighted in the red lines.



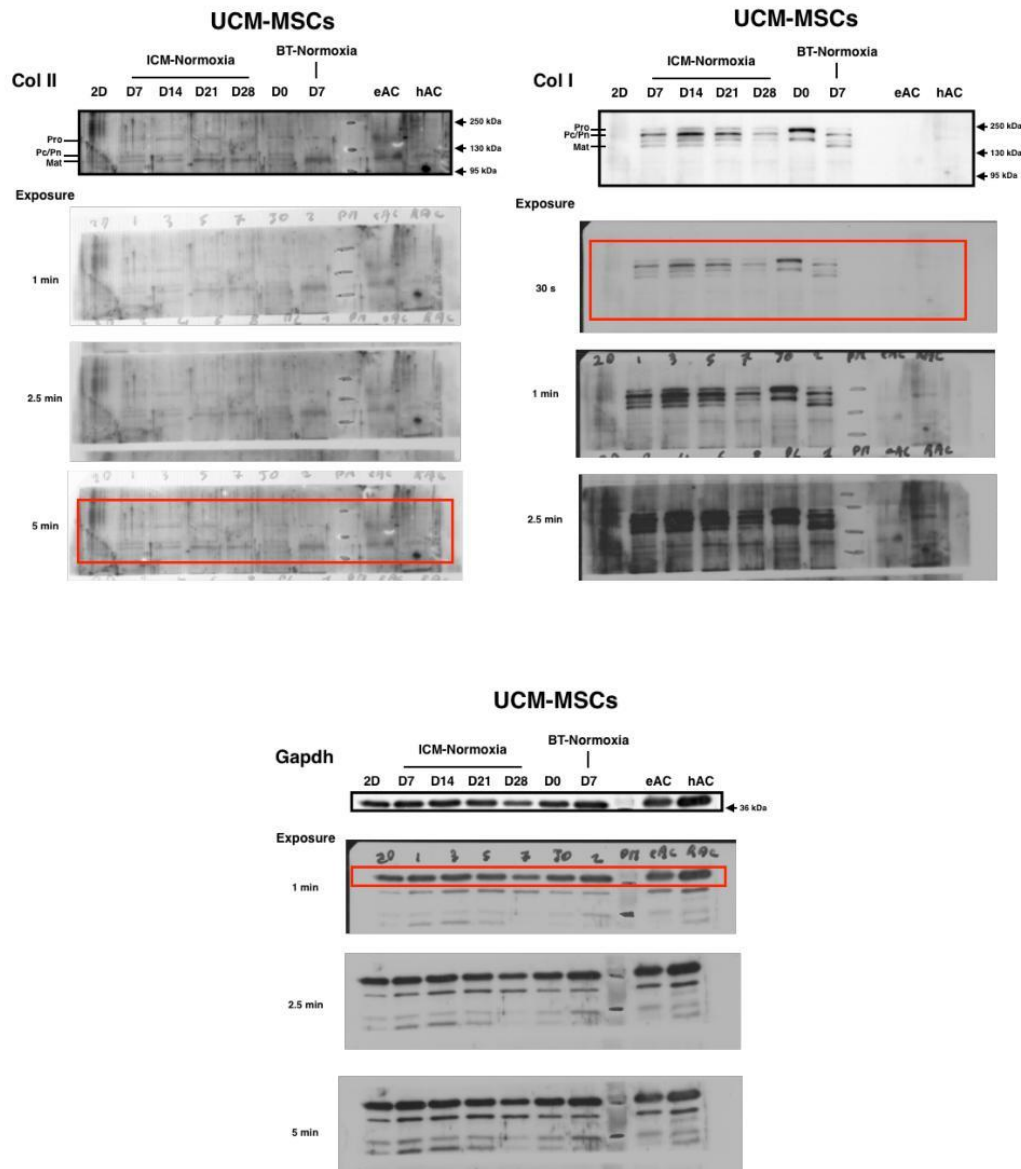
Supplemental figure 12: Complete gel and the polyvinylidene difluoride membranes analyzed in the western-blot.

For the western-blot presented in figure 6B, two PVDF membranes were analyzed by the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) with automatic exposure parameters. The horizontal black line separates different western-blot membranes from two series, this is the reason why the β -tubulin was presented twice, one presentation for each series. The cropped images are highlighted in the red lines.



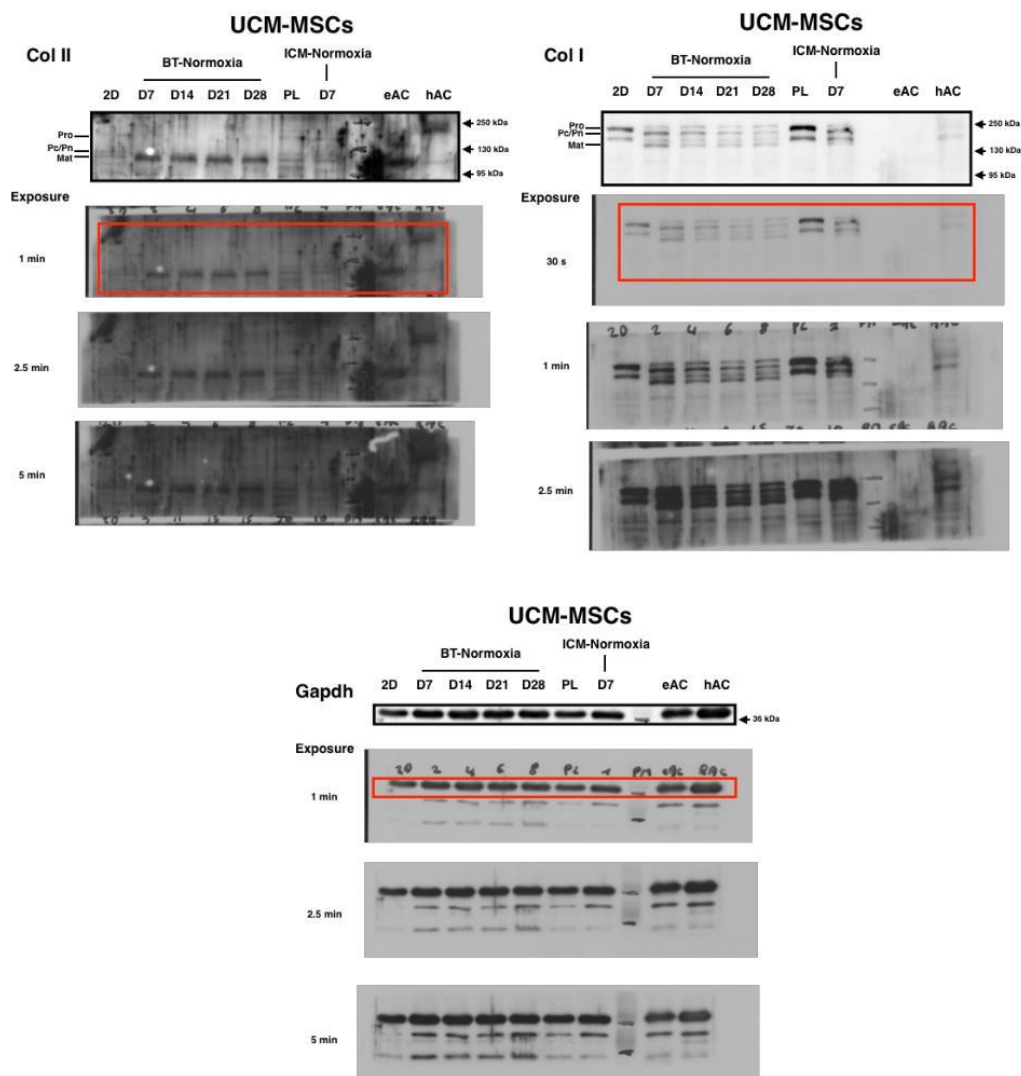
Supplemental figure 13: Complete gel and the polyvinylidene difluoride membranes analyzed in the western-blot.

For the western-blot presented in supplemental figure 8B, one PVDF membrane was analyzed by the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) with automatic exposure parameters. The cropped images are highlighted in the red lines.



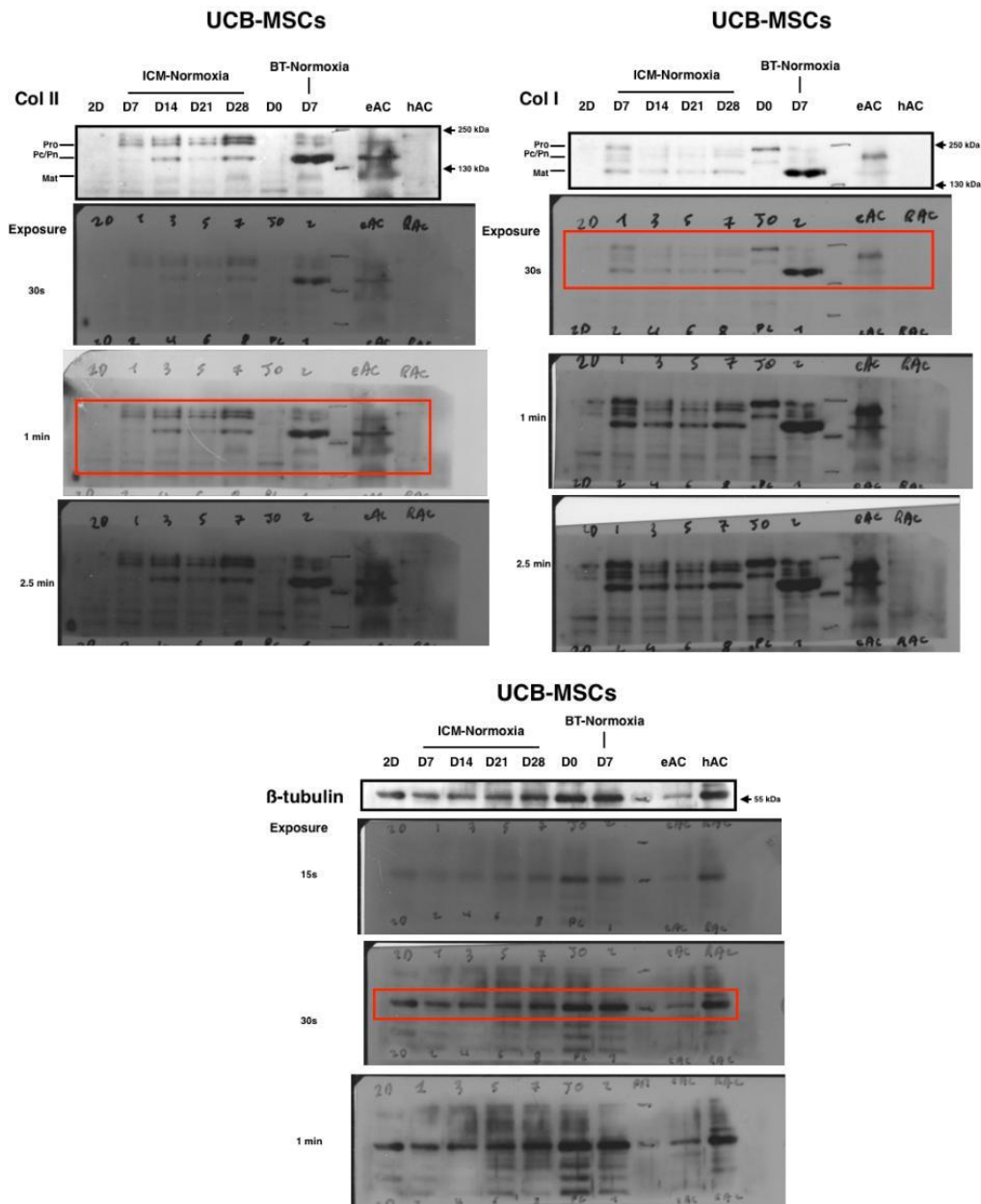
Supplemental figure 14: Complete gel and the polyvinylidene difluoride membranes analyzed in the western-blot.

For the western-blot presented in supplemental figure 1 (top left), the blots were obtained from 1 independent experiment and 1 western-blot of 1 gel. The cropped images are highlighted in the red lines.



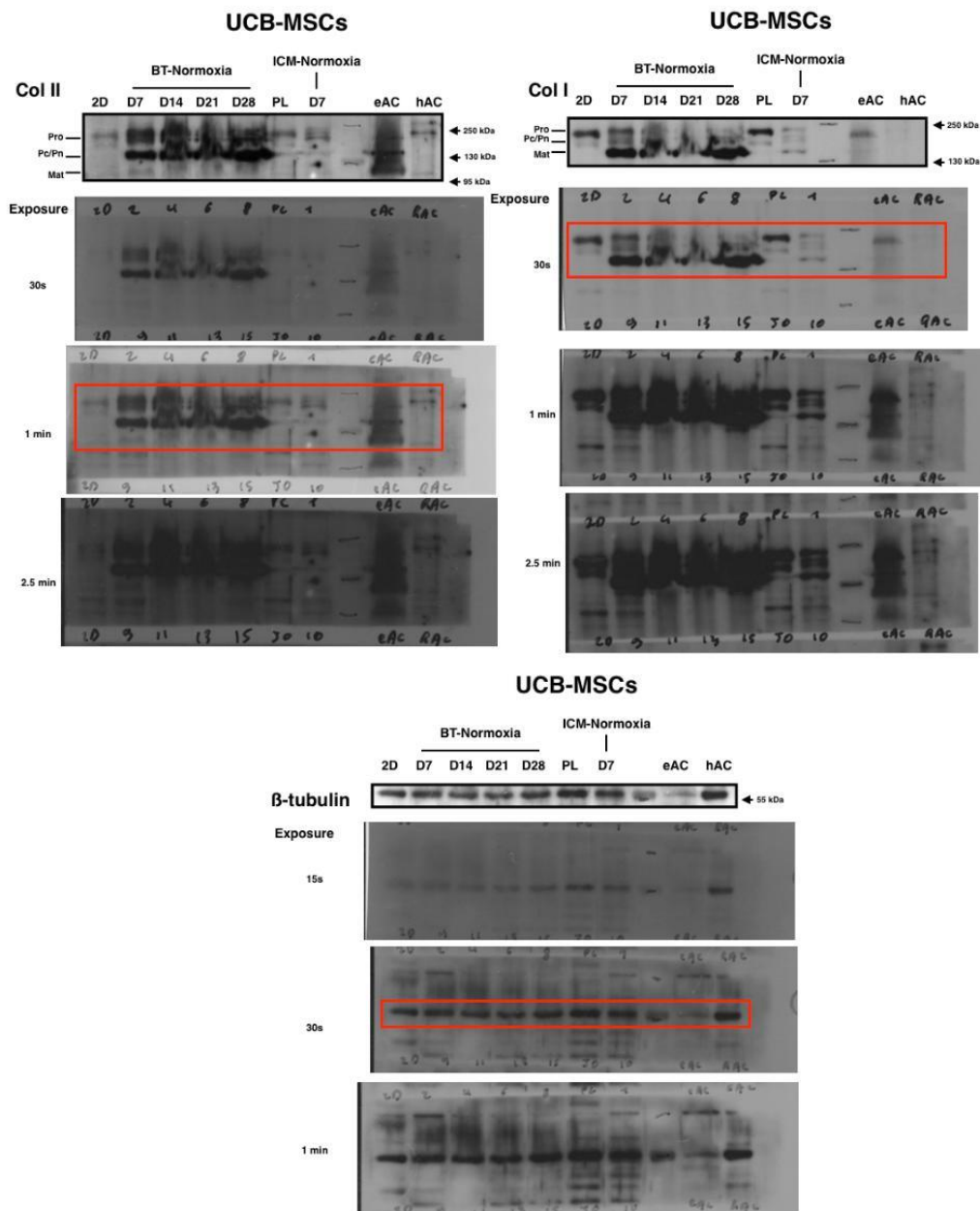
Supplemental figure 15: Complete gel and the polyvinylidene difluoride membranes analyzed in the western-blot.

For the western-blot presented in supplemental figure 1 (top right), the blots were obtained from 1 independent experiment and 1 western-blot of 1 gel. The cropped images are highlighted in the red lines.



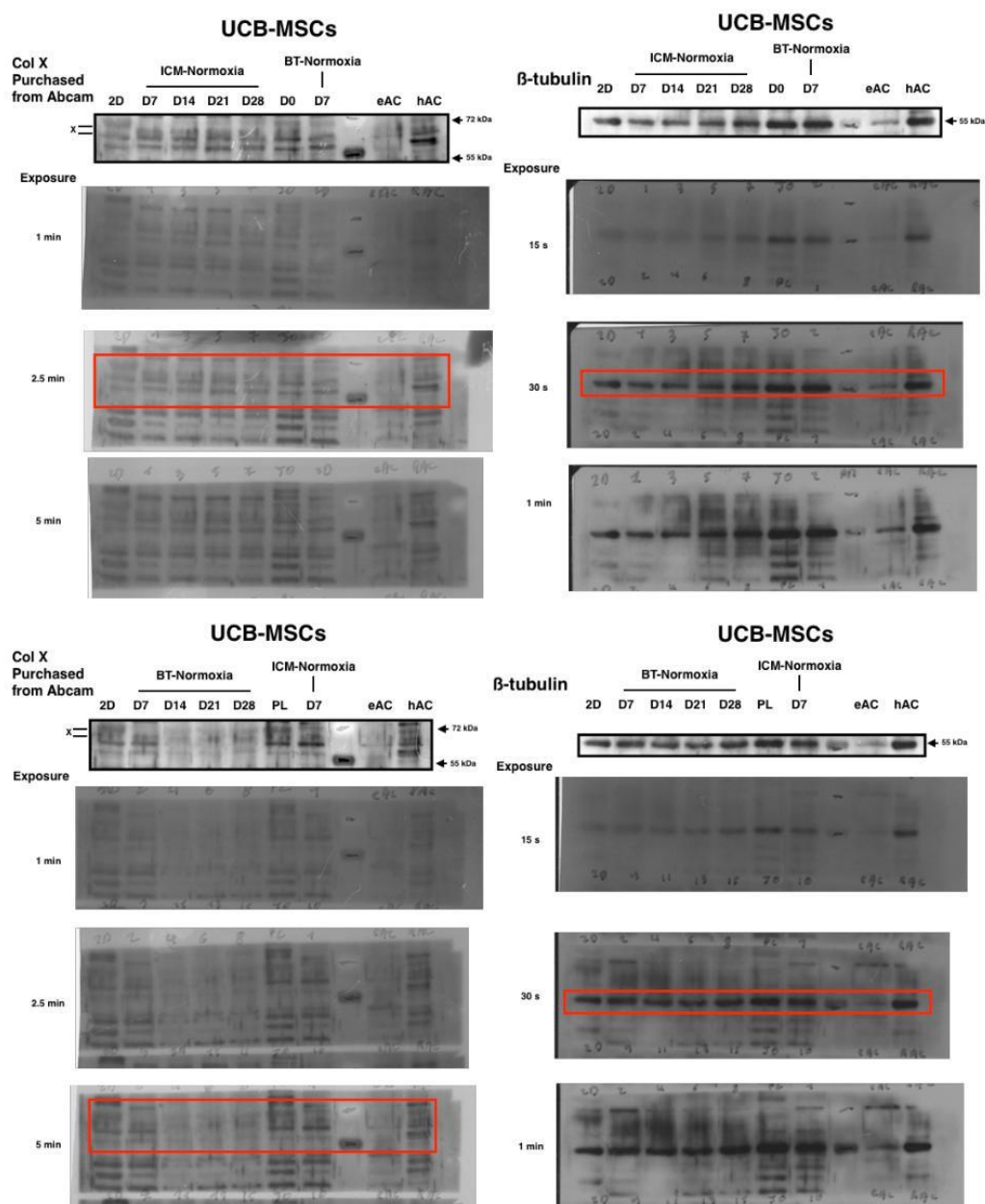
Supplemental figure 16: Complete gel and the polyvinylidene difluoride membranes analyzed in the western-blot.

For the western-blot presented in supplemental figure 1 (bottom left), the blots were obtained from 1 independent experiment and 1 western-blot of 1 gel. The cropped images are highlighted in the red lines.



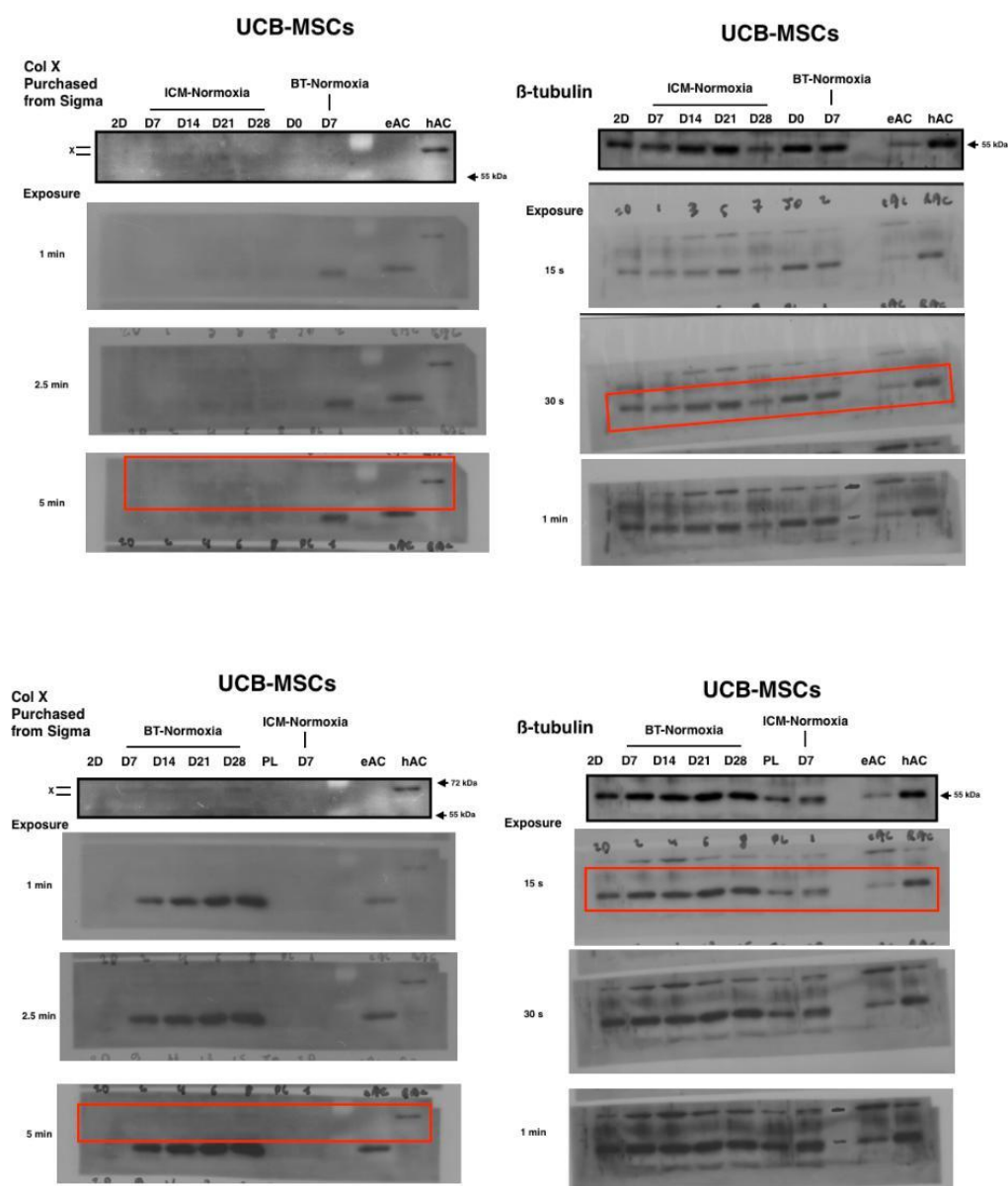
Supplemental figure 17: Complete gel and the polyvinylidene difluoride membranes analyzed in the western-blot.

For the western-blot presented in supplemental figure 1 (bottom right), the blots were obtained from 1 independent experiment and 1 western-blot of 1 gel. The cropped images are highlighted in the red lines.



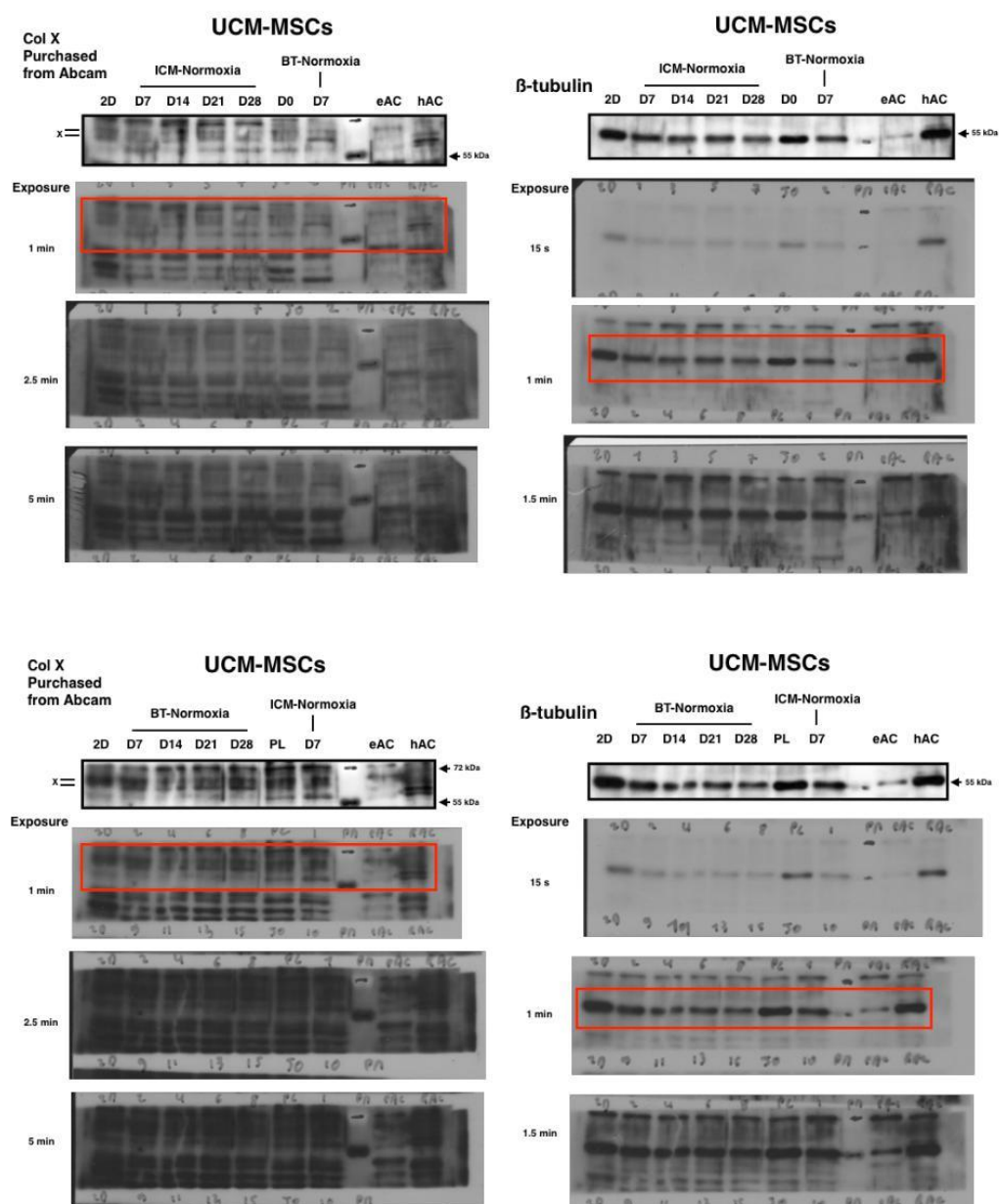
Supplemental figure 18: Complete gel and the polyvinylidene difluoride membranes analyzed in the western-blot.

For the western-blot (WB) presented in supplemental figure 2 (top WB for UCB-MSCs), the blots were obtained from 1 independent experiment and 1 western-blot of 2 gels. The cropped images are highlighted in the red lines.



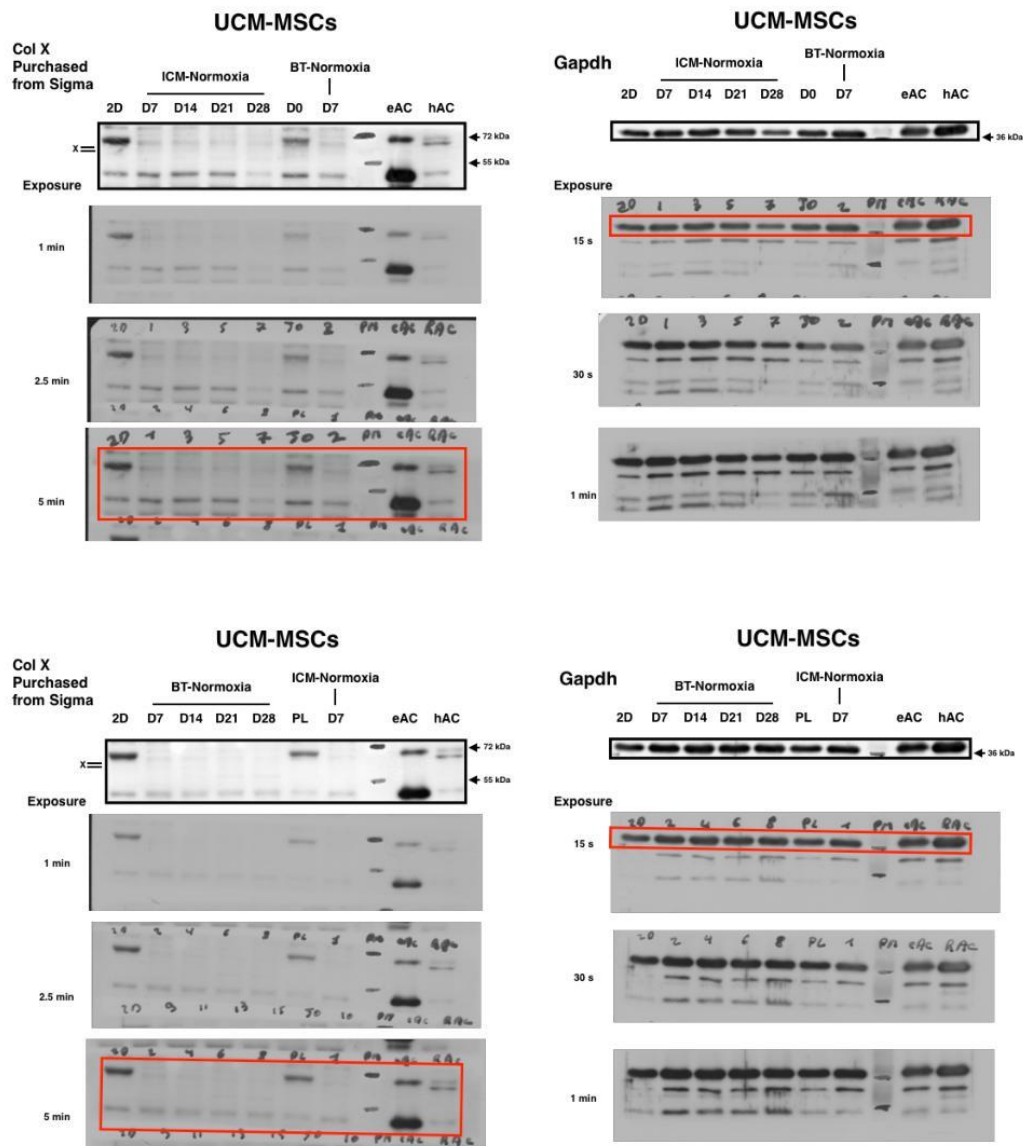
Supplemental figure 19: Complete gel and the polyvinylidene difluoride membranes analyzed in the western-blot.

For the western-blot presented in supplemental figure 2 (bottom WB for UCB-MSCs), the blots were obtained from 1 independent experiment and 1 western-blot of 2 gels. The cropped images are highlighted in the red lines.



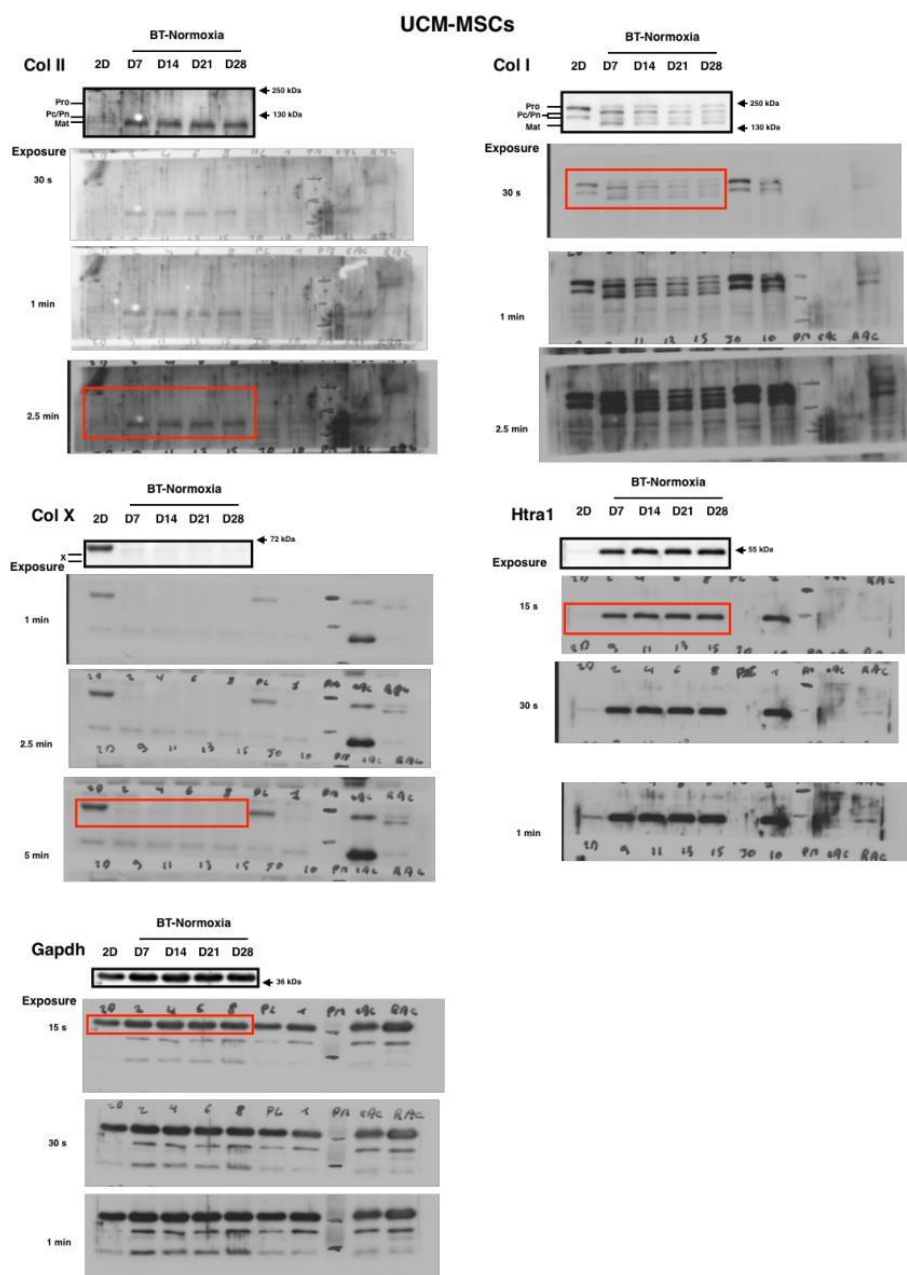
Supplemental figure 20: Complete gel and the polyvinylidene difluoride membranes analyzed in the western-blot.

For the western-blot presented in supplemental figure 2 (top WB for UCM-MSCs), the blots were obtained from 1 independent experiment and 1 western-blot of 2 gels. The cropped images are highlighted in the red lines.



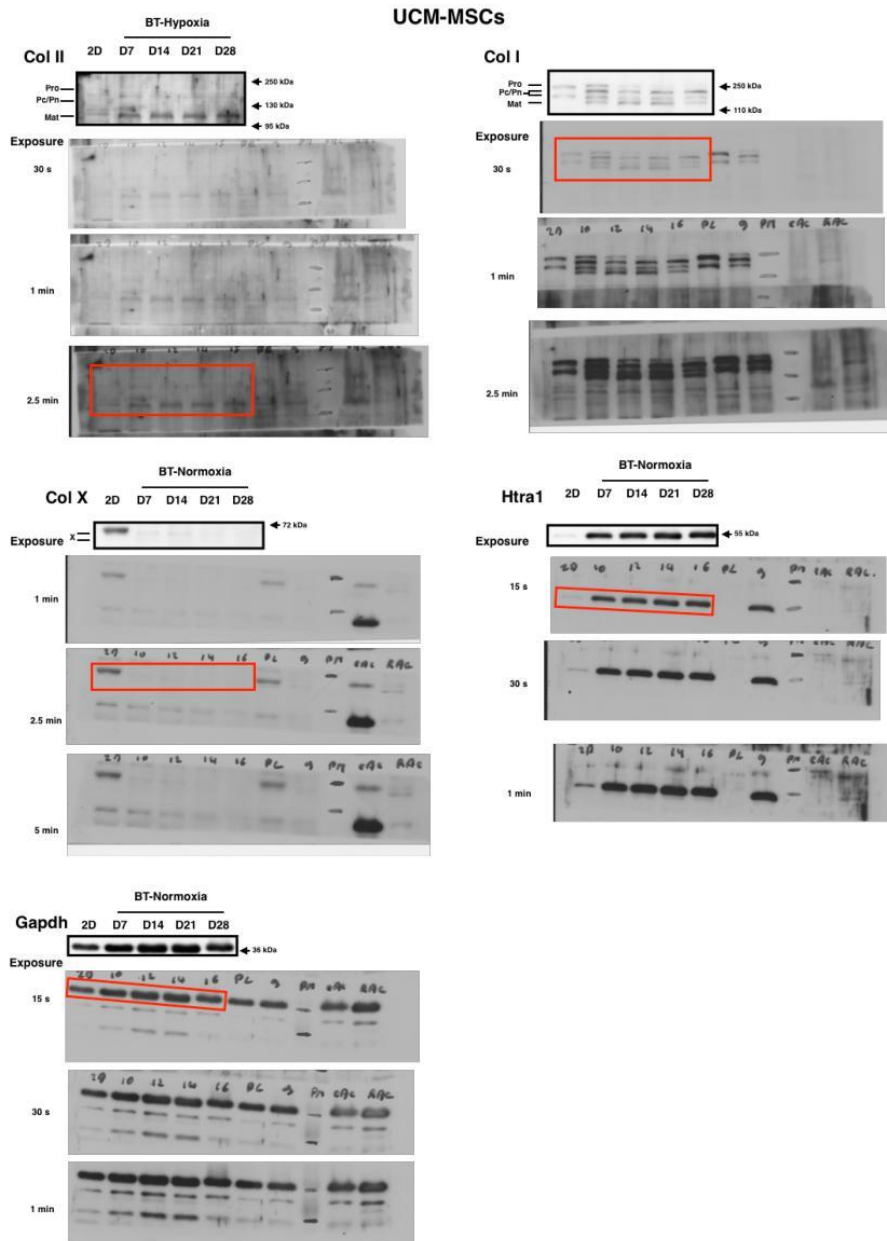
Supplemental figure 21: Complete gel and the polyvinylidene difluoride membranes analyzed in the western-blot.

For the western-blot presented in supplemental figure 2 (bottom WB for UCM-MSCs), the blots were obtained from 1 independent experiment and 1 western-blot of 2 gels. The cropped images are highlighted in the red lines.



Supplemental figure 22: Complete gel and the polyvinylidene difluoride membranes analyzed in the western-blot.

For the western-blot presented in supplemental figure 5 (left), the blots were obtained from 1 independent experiment and 1 western-blot of 1 gel. The cropped images are highlighted in the red lines.



Supplemental figure 23: Complete gel and the polyvinylidene difluoride membranes analyzed in the western-blot.

For the western-blot presented in supplemental figure 5 (right), the blots were obtained from 1 independent experiment and 1 western-blot of 1 gel. The cropped images are highlighted in the red lines.

III. Encadrement de stagiaires

2019 :

- Encadrement d'une stagiaire en première année de Master (2 mois) :

Mme Seguin Marion « Elaboration d'un substitut cartilagineux à partir de cellules souches mésenchymateuses équine pour des applications en ingénierie tissulaire du cartilage ».

Maître de stage : Dr. Demoor Magali. Encadrants : Dr. Branly Thomas et Mr. Bourdon Bastien.

- Encadrement d'une stagiaire de Master 2 Recherche (5 mois) :

Mme Maspimby Chloé « Étude comparative d'hydrolysats de collagène de poisson sur le métabolisme des chondrocytes articulaires équine : application pour le traitement de l'arthrose ».

Maître de stage : Pr. Galéra Philippe. Encadrants : Dr. Contentin Romain et Mr. Bourdon Bastien.

- Co-encadrement d'un binôme de deux élèves (collégienne et lycéenne) dans le cadre du Dispositif « Apprentis chercheurs » de l'association « Arbre des Connaissances » (8 jours /an) :

Mme Hervé-Commereuc Alice et Mme Messi Graziella « Les apprentis chercheurs en mission à BIOTARGEN : En route vers la création de cartilage ».

Encadrants : Dr Contentin Romain et Mr. Bourdon Bastien.

2020 :

- Encadrement d'un stagiaire de Master 1 (2 mois) :

Mr Huchet Albin « Étude comparative d'hydrolysats de collagène de poisson sur le métabolisme des chondrocytes articulaires équine : application pour le traitement de l'arthrose ».

Maîtres de stage : Pr. Galéra Philippe et Dr. Gruchy Nicolas. Encadrant : Mr. Bourdon Bastien.

- Encadrement d'un stagiaire de Master 2 Recherche (5 mois) :

Mr Cambier Pierre « Étude comparative d'hydrolysats de collagène de poisson sur le métabolisme des chondrocytes articulaires humains : application pour le traitement de l'arthrose ».

Maîtres de stage : Pr. Galéra Philippe et Dr. Gruchy Nicolas. Encadrant : Mr. Bourdon Bastien.

IV. Formations

- Apprentis chercheurs : 30 h
- Intégrité scientifique : 4 h
- De la thèse à l'emploi ; connaître le marché de l'emploi : 6 h
- Création d'entreprise innovante : 6 h
- Protéger, valoriser et diffuser les résultats et produits de la recherche en sciences technologiques et santé : 3 h
- Comprendre le fonctionnement d'une entreprise : 12 h
- Intelligence économique et stratégique : 6 h
- De la thèse à l'emploi ; CV et lettre de motivation : 6 h
- Manager l'innovation : 12 h
- Valoriser son doctorat auprès des institutions européennes : 3 h
- Valoriser son doctorat auprès des institutions européennes déplacement à Bruxelles : 21 h
- Imagerie cellulaire : 15 h
- Spectrométrie : 8 h

Effet de deux hydrolysats de collagène de poisson sur le métabolisme des chondrocytes articulaires humains et équins. Applications pour le traitement de l'arthrose et l'ingénierie du cartilage.

Le cartilage articulaire est composé d'un type cellulaire majoritaire, le chondrocyte, et d'une abondante matrice extracellulaire riche en collagènes. Le cartilage possède une faible capacité de réparation intrinsèque. Ainsi, la répétition de lésions chondrales génère un microenvironnement inflammatoire propice au développement de l'arthrose, caractérisée par la dégradation irréversible du cartilage. Les thérapies actuelles visent à améliorer le confort de vie de patient en diminuant la douleur et l'inflammation. Nos travaux se positionnent dans ce contexte et avaient pour but d'évaluer les effets d'hydrolysats de collagènes d'origine marine (Promérims® 30, 40 et 60) sur la viabilité et le phénotype de chondrocytes articulaires équins et humains. Au-delà de l'intérêt économique pour la filière équine, le cheval constitue un excellent modèle d'étude pour les affections locomotrices observées chez l'Homme. Dans une première partie, nous avons transposé le modèle de culture d'organoïdes cartilagineux initialement développé chez l'Homme au modèle équin. Cette étape avait pour but de développer le modèle de culture le plus pertinent afin de tester ultérieurement les effets des Promérims®, *in vitro*, sur un tissu cartilagineux de nature hyaline, comparable au cartilage *in vivo*. Nous avons montré que la culture de chondrocytes équins au sein d'une éponge de collagène de type I/III durant 7 jours en hypoxie en présence de BMP-2 permet d'obtenir un organoïde de nature hyaline.

Ensuite, nous avons démontré que les Promérims® n'altèrent pas la viabilité des chondrocytes cultivés en monocouche. Au contraire, les Promérims® permettent d'augmenter l'activité métabolique, la viabilité, et de retarder la survenue de la sénescence. Les Promérims® semblent également favoriser la prolifération (P30-P40) et la migration (P60) des chondrocytes lors de tests de blessure *in vitro*. Nous avons ensuite évalué les effets des Promérims® sur des organoïdes cartilagineux cultivés en hypoxie en absence ou en présence de BMP2 et/ou d'IL-1. Nous avons montré que les Promérims® induisaient une diminution de l'expression des transcrits de protéases (*MMP-1* et *-3*, *HTRA1*, *ADAMTS5*) impliquées dans la dégradation du cartilage lors de l'arthrose. Les Promérims® favorisent également l'accumulation de protéines matricielles (collagènes de type II et I). L'environnement pro-inflammatoire, inhérent à l'arthrose, potentialise les effets des Promérims®. Les Promérims® induisent des effets semblables sur les chondrocytes équins et humains, bien que leurs effets soient globalement plus modérés sur les cellules humaines.

L'ensemble de ces travaux suggère que les hydrolysats de collagènes d'origine marine (Promérim®) pourraient présenter un bénéfice en vue de retarder l'évolution de l'arthrose tant chez le cheval que chez l'Homme.

Mots clés : Cartilage, arthrose, chondrocytes humains et équins, hydrolysats de collagènes marins, collagènes, inflammation, interleukine-1, « bone morphogenetic protein-2 ».

Effect of two fish collagen hydrolysates on the metabolism of human and equine articular chondrocytes. Applications for the treatment of osteoarthritis and cartilage engineering.

Articular cartilage is composed of a main cell type, chondrocyte, and an abundant extracellular matrix rich in collagens. Cartilage has a low intrinsic repair capacity. Thus, the repetition of chondral lesions generates an inflammatory microenvironment, which leads to the development of osteoarthritis, characterized by the irreversible degradation of cartilage. Current therapies aim to improve patient comfort by reducing pain and inflammation. In this context, our work aimed to assess the effects of marine collagen hydrolysates (Promerims® 30, 40 and 60) on the viability and phenotype of equine and human articular chondrocytes. Beyond the economic interest for the equine sector, the horse is an excellent study model for locomotor disorders observed in humans. In the first part of our study, we developed a culture model of equine cartilage organoids based on a protocol initially developed in human. The aim of this step was to develop the most relevant culture model to, subsequently, test *in vitro* the effects of Promerims® on a hyaline-like cartilage, comparable to the *in vivo* cartilage. We have shown that the culture of equine chondrocytes in a type I/III collagen sponge for 7 days in hypoxia in the presence of BMP-2 produces an organoid of a hyaline nature.

Then, we demonstrated the safety of Promerims® for chondrocytes cultured as monolayers. Promerims® increase metabolic activity, viability and delay the onset of senescence. Promerims® also appear to promote the proliferation (P30-P40) and migration (P60) of chondrocytes in *in vitro* wound healing assays. We then evaluated the effects of Promerims® on cartilage organoids grown in hypoxia in the absence or presence of BMP2 and/or IL-1. We showed that Promerims® induced a decrease in the expression of protease transcripts (*MMP-1* and *-3*, *HTRA1*, *ADAMTS5*) involved in the degradation of cartilage that occurs during osteoarthritis. Promerims® also promoted the accumulation of matrix proteins (type II and I collagens). The pro-inflammatory environment, inherent to osteoarthritis, enhances the effects of Promerims®. Promerims® induce similar effects on equine and human chondrocytes, although their effects are generally more moderated on human cells.

Altogether, these data suggest that collagen hydrolysates of marine origin (Promerim®) could be of interest to delay osteoarthritis outcomes in both horses and humans.

Keywords: Cartilage, osteoarthritis, equine and human chondrocytes, marine collagen hydrolysates, collagens, inflammation, interleukin-1, bone morphogenetic protein-2.