




OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 25637

To cite this version:

Brochard, Catherine . *Caractérisation des cellules stromales mésenchymateuses équine dérivées de moelle osseuse - partie 1*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2019

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

CARACTERISATION DES CELLULES STROMALES MESENCHYMATEUSES EQUINES DERIVEES DE MOELLE OSSEUSE - PARTIE 1

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Catherine BROCHARD
Née, le 12 avril 1995 à Pontoise (95)

Directeur de thèse : Mme Isabelle RAYMOND

JURY

PRESIDENT :

Mr Jean-Christophe PAGES

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mme Isabelle RAYMOND

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mr Alain REGNIER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRES INVITES :

Mr Nicolas ESPAGNOLLE

Chargé de recherche EFS

Mr Jean-Gérard DESCAMPS

Technicien de recherche EFS

Mr Gabriel CUEVAS

Maître de Conférences à l'ENVT

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur par intérim : Frédéric Bousquet

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFÉRENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie - Analgésie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
- Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophthalmologie*
- M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
- M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*

Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean-Christophe Pagès

Professeur des universités et praticien hospitalier, chef de service en biologie cellulaire et cytologie, CHU Purpan,
Qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

A Madame le Professeur Isabelle RAYMOND LETRON

Professeur en Histologie et Anatomie Pathologique à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Service d'Histologie et Anatomie Pathologique,
Ma directrice de thèse, pour m'avoir proposé de travailler sur ce sujet d'actualité, pour la confiance qu'elle m'a accordée et pour son aide essentielle me permettant l'accès au laboratoire et à ses ressources sans restrictions.
Remerciements sincères.

A Monsieur le Professeur Alain Régnier

Professeur émérite en Ophtalmologie à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, service d'Ophtalmologie,
Pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant que second assesseur.

A Monsieur le Docteur Nicolas ESPAGNOLLE

Chargé des Recherches de l'EFS (Etablissement Français du Sang) au sein du laboratoire STROMALab,
Pour avoir fait partie intégrante de ce projet et nous avoir apporté ton aide et ton soutien tout au long de sa réalisation.
Remerciements chaleureux.

A Monsieur Jean-Gerard DESCAMPS

Assistant de Recherche au sein du laboratoire STROMALab,
Pour nous avoir encadrées et conseillées sur nos manipulations.
Remerciements chaleureux.

A Monsieur le Docteur Gabriel Cuevas

Ancien Maître de Conférences de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Service de chirurgie équine,
Pour avoir suivi de près puis de loin la mise en place de ce projet.

A toute l'équipe de STROMALab

Pour son accueil et son encadrement pendant la réalisation de nos manipulations.

A la direction de l'abattoir de Tecou

SARL BOTTA-MORE – Boucheries chevalines
Pour avoir accepté de participer à ce projet en nous fournissant les pièces anatomiques après l'abattage des chevaux. Merci en particulier à Monsieur Moret qui en a assuré le transport jusqu'à Toulouse.

Table des matières

Table des illustrations	4
Table des graphiques.....	5
Table des tableaux	5
Liste des abréviations	6
INTRODUCTION	7
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
I. Généralités sur les cellules souches : définition et mode d'action.....	9
A. Caractéristiques des cellules souches	9
B. Mécanisme d'action	11
II. Le cartilage articulaire : propriétés et enjeux de réparation.....	13
A. Anatomie des articulations du cheval	13
B. Propriétés du cartilage articulaire.....	14
1. Composition du cartilage	14
2. Structure du cartilage.....	17
3. Enjeux de réparation.....	18
4. Traitements disponibles	20
5. Le cheval, un modèle pour l'homme.....	35
III. Etude <i>in vitro</i> des cellules stromales mésenchymateuses équines	37
A. Mise en culture.....	37
1. Principes de la mise en culture	37
2. Repiquage	43
3. CFU.....	43
4. Différenciation.....	44
PARTIE EXPERIMENTALE - ELABORATION D'UN PROTOCOLE DE MISE EN CULTURE DES CELLULES STROMALES MESENCHYMATEUSES EQUINES ...	51
I. Matériel et méthode	51
A. Prélèvement de la moelle osseuse	51
1. Ponction sternum	51
2. Grattage des sternèbres	53
B. Mise en culture.....	54
1. Milieu de culture	54
2. Protocole de préparation à la mise en culture de cellules brutes.....	54
3. Comptage cellulaire.....	57
4. Ensemencement	57
5. Incubation	58
C. Congélation	59
D. Décongélation.....	59
E. Etude de la prolifération.....	59
1. Comptage des CFU-f (Colony forming unit-fibroblastic).....	59
2. Analyse de la prolifération des CSM	61

II. Résultats	62
A. Culture cellulaire	62
1. Nombre de cellules récupérées	62
2. CFU-f.....	62
3. Expansion et doublement des cellules	65
4. Congélation et essais de décongélation.....	66
III. Discussion et perspectives.....	69
CONCLUSION	75
Bibliographie.....	76
ANNEXES	83
Annexe 1: Fiche explicative du prélèvement des sternèbres à l'abattoir.....	83
Annexe 2: Protocole de coloration des CFU-f.....	84
Annexe 3: Protocole de prélèvement et de mise en culture des CSM équines.....	85
Annexe 4: Protocoles de différenciation utilisés en culture humaine.....	88
Annexe 5: Photographies des cultures cellulaires.....	92
Annexe 6: Références des milieux utilisés.....	94
Annexe 7: Références des flasques utilisées.....	94

Table des illustrations

FIGURE 1 : SOURCES DES CSM MULTIPOTENTES (GUGJOO ET AL., 2019)	11
FIGURE 2 : PROLIFERATION DES CSM SUITE A UNE LESION CARTILAGINEUSE SUPERFICIELLE (HUNZIKER, ROSENBERG, 1996)	13
FIGURE 3 : SQUELETTE DE CHEVAL (BARONE, 1976)	14
FIGURE 4 : REPRESENTATION D'UNE ARTICULATION SYNOVIALE (DYCE ET AL., 2009)	15
FIGURE 5 : STRUCTURE MOLECULAIRE DU CARTILAGE ARTICULAIRE (CHEN ET AL., 2006B)	16
FIGURE 6 : STRUCTURE DU CARTILAGE EN TROIS DIMENSIONS (SOPHIA FOX ET AL., 2009)	18
FIGURE 7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE LESION CARTILAGINEUSE SUPERFICIELLE (A) OU PROFONDE (B) (REDMAN ET AL., 2005)	20
FIGURE 8 : MECANISMES SE METTANT EN PLACE EN REPONSE A UN TRAUMATISME ARTICULAIRE (MCLLWRAITH, 2010)	22
FIGURE 9 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA REALISATION D'UNE GREFFE OSTEOCHONDRALE EN MOSAÏQUE AU SEIN DE LA MEME ARTICULATION (REDMAN ET AL., 2005)	27
FIGURE 10: GREFFES OSTEOCHONDRALES AUTOLOGUES EN MOSAÏQUE (BODO ET AL., 2004)	28
FIGURE 11 : PHOTOGRAPHIE MONTRANT LES DEUX GREFFES REALISEES SUR LES CONDYLES MEDIAL ET LATERAL DU METACARPE. (PEARCE ET AL., 2003)	30
FIGURE 12 : CONGRUENCE ARTICULAIRE DES GREFFONS OSTEOCHONDRALX ALLOGENIQUES EN POST-MORTEM (PEARCE ET AL., 2003)	31
FIGURE 13 : COUPE HISTOLOGIQUE DE LA REGION GREFFEE (PEARCE ET AL., 2003)	31
FIGURE 14 : IMPLANTATION DE CHONDROCYTES AUTOLOGUES DANS UNE ARTICULATION TIBIO-TARSIENNE D'UN CHEVAL (CLAIR ET AL., 2009)	33
FIGURE 15 : ASPECT DE LA 5EME STERNEBRE SUITE A L'ASPIRATION DE MOELLE OSSEUSE, EXAMEN TOMODENSITOMETRIQUE (EYDT ET AL., 2016)	38
FIGURE 16 : SEPARATION DES DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES PAR UTILISATION D'UN PERCOLL® OU D'UN FICOLL® (BOURZAC ET AL., 2010)	39
FIGURE 17 : MISE EN EVIDENCE DE LA MATRICE MINERALISEE PAR UNE COLORATION A L'ALIZARINE ROUGE (STEWART, STEWART, 2011)	44
FIGURE 18 : MISE EN EVIDENCE DES VACUOLES LIPIDIQUES DES ADIPOCYTES PAR UNE COLORATION AU OIL-RED-O (STEWART, STEWART, 2011)	46
FIGURE 19 : MISE EN EVIDENCE DES GAG SULFATES DES CHONDROCYTES PAR UNE COLORATION AU BLEU DE TOLUIDINE (STEWART, STEWART, 2011)	48
FIGURE 20 : PHOTOGRAPHIES ILLUSTRANT LA PONCTION DE MOELLE OSSEUSE AU NIVEAU DU STERNUM DU CHEVAL 1 (SOURCE PERSONNELLE)	52
FIGURE 21 : PHOTOGRAPHIES D'UN STERNUM EN COURS DE GRATAGE (SOURCE PERSONNELLE)	53
FIGURE 22: PHOTOGRAPHIE DE L'OS PRELEVE MIS DANS UN TUBE FALCON DE 50 (SOURCE PERSONNELLE)	54
FIGURE 23: PHOTOGRAPHIE DE LA MISE EN DIGESTION (SOURCE PERSONNELLE)	55
FIGURE 24: PHOTOGRAPHIES DE LA SOLUTION FILTREE (SOURCE PERSONNELLE)	55
FIGURE 25: PHOTOGRAPHIE DE L'OS APRES RINÇAGE (SOURCE PERSONNELLE)	56
FIGURE 26 : PHOTOGRAPHIE DE LA SOLUTION DEPOSEE SUR UN FICOLL AVANT CENTRIFUGATION (SOURCE PERSONNELLE)	56
FIGURE 27 : PHOTOGRAPHIE DU FICOLL APRES CENTRIFUGATION (SOURCE PERSONNELLE)	56
FIGURE 28 : PHOTOGRAPHIE DE LA LAME DE MALASSEZ APRES DEPOT DE LA SOLUTION (SOURCE PERSONNELLE)	57
FIGURE 29 : PHOTOGRAPHIE DE CELLULES VUES AU MICROSCOPE (X40) SUR LA LAME DE MALASSEZ (SOURCE PERSONNELLE)	57
FIGURE 30 : PHOTOGRAPHIES DES FLASQUES UTILISEES POUR LA MISE EN CULTURE (SOURCE PERSONNELLE)	58
FIGURE 31: PHOTOGRAPHIE DES F25 COLOREES EN COURS DE SECHAGE (SOURCE PERSONNELLE)	60
FIGURE 32 : PHOTOGRAPHIE ILLUSTRANT LE COMPTAGE AU MICROSCOPE DES CFU COLOREES (SOURCE PERSONNELLE)	60
FIGURE 33: PHOTOGRAPHIE D'UNE CFU-F VUE AU MICROSCOPE X 10 (SOURCE PERSONNELLE)	64
FIGURE 34: PHOTOGRAPHIE DES CSM VUES AU MICROSCOPE X 40 (SOURCE PERSONNELLE)	64
FIGURE 35: PHOTOGRAPHIE DES CELLULES DECONGELEES DU CV2 BRUTE APRES 4 JOURS DE CULTURE (SOURCE PERSONNELLE)	68
FIGURE 36: PHOTOGRAPHIE DES CELLULES DECONGELEES DU CV1 P0 APRES 4 JOURS DE CULTURE (SOURCE PERSONNELLE)	68

Table des graphiques

GRAPHIQUE 1: HISTOGRAMME REPRESENTANT LE NOMBRE DE CELLULES PRELEVEES POUR CHAQUE CHEVAL ..	62
GRAPHIQUE 2: HISTOGRAMME REPRESENTANT LA VIABILITE DES CSM APRES DECONGELATION.....	67

Table des tableaux

TABLEAU 1: QUANTITE D'HEPARINE AJOUTEE A LA PONCTION DE MOELLE OSSEUSE	38
TABLEAU 2: PARAMETRES UTILISES POUR LA PREMIERE CENTRIFUGATION.....	40
TABLEAU 3: PARAMETRES UTILISES POUR LA DEUXIEME CENTRIFUGATION.....	41
TABLEAU 4: RECENSEMENT DES DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE UTILISES	42
TABLEAU 5: MILIEUX DE CULTURE ET METHODES DE REVELATION PERMETTANT UNE DIFFERENCIATION OSTEOBLASTIQUE	45
TABLEAU 6: MILIEUX DE CULTURE ET METHODES DE REVELATION PERMETTANT UNE DIFFERENCIATION ADIPOCYTAIRE	47
TABLEAU 7: MILIEUX DE CULTURE ET METHODES DE REVELATION PERMETTANT UNE DIFFERENCIATION CHONDROCYTAIRE	49
TABLEAU 8: INFORMATIONS RELATIVES AU CHEVAL 1	51
TABLEAU 9: INFORMATIONS RELATIVES AUX CHEVAUX 2 ET 3	53
TABLEAU 10: CONDITIONS DE MISE EN CULTURE.....	58
TABLEAU 11: CONDITIONS CONCERNANT LA CONGELATION	59
TABLEAU 12: CFU ISSUES DE LA PREMIERE CULTURE DES CELLULES ISSUES DU CHEVAL 2	63
TABLEAU 13: CFU ISSUES DE LA CULTURE EN P0 DES CELLULES ISSUES DU CHEVAL 2 APRES 10 JOURS DE CULTURE.....	63
TABLEAU 14: CFU ISSUES DE LA CULTURE EN P1 DES CELLULES ISSUES DU CHEVAL 2 APRES 10 JOURS DE CULTURE.....	63
TABLEAU 15: RESULTATS OBTENUS AVEC LES CFU EN CULTURE BRUTE ET P0 DES CELLULES ISSUES DU CHEVAL 3	64
TABLEAU 16: RESULTATS OBTENUS SUITE A LA PREMIERE MISE EN CULTURE DES CELLULES ISSUES DU CHEVAL 1	65
TABLEAU 17: RESULTATS OBTENUS SUITE A LA MISE EN CULTURE DES CELLULES ISSUES DES CHEVAUX 2 ET 3.	66
TABLEAU 18: RESULTATS OBTENUS SUITE A LA DECONGELATION DES CELLULES ET A LEUR REMISE EN CULTURE	67

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AINS : Anti-Inflammatoire Non-
Stéroïdien

ALP : Phosphatase Alcaline

aP2 : Fatty acid-binding protein

ASP : Amphotéricine B,
Streptomycine, Pénicilline

BMP : Bone Morphogenetic Protein

CFU-f : Colony Forming Units -
fibroblastics

COX : Cyclo-Oxygénase

CSO : Concours de Saut d'Obstacle

CSM : Cellule Stromale
Mésenchymateuse

CSH : Cellule Souche
Hématopoïétiques

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle
Medium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

FGF : Fibroblast Growth Factor

GAG : Glycosaminoglycane

IBMX : Isobutylméthylxanthine

IGF : Insulin-like Growth Factor

IRM : Imagerie par Résonance
Magnétique

ISCT : International Society of Cell and
gene Therapy

IST : Insuline-Transferrine-Sélénium

LPL : Lipoprotein Lipase

MCDh : Micro Chromatique Detection
for haematology

MEM : Minimum Essential Medium

MO : Moelle Osseuse

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear
Cell

PBS : Phosphate-Buffered Saline

PGE2 : Prostaglandine E2

PGF2 : Prostaglandine F2

PPAR γ : Peroxisome Proliferator-
Activated Receptor gamma

PRP : Plasma Riche en Plaquettes

RT-PCR : Reverse Transcriptase –
Polymerase Chain Reaction

RT-qPCR : Reverse Transcriptase –
quantitative Polymerase Chain
Reaction

SVF : Sérum de veau foetal

TGF : Transforming Growth Factor

INTRODUCTION

La médecine régénérative est en plein essor et constitue un potentiel thérapeutique prometteur. L'objectif à terme serait de pouvoir soigner les lésions dégénératives, comme l'arthrose, ou les lésions affectant des tissus ayant un faible potentiel de cicatrisation dont notamment les tendons et le cartilage. L'injection de cellules souches comme les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) permettrait de favoriser la régénération d'un tissu lésé en modulant notamment l'inflammation ainsi que la néovascularisation (Stewart, 2011).

En médecine vétérinaire, la thérapie cellulaire se développe majoritairement dans la filière équine où les affections ostéoarticulaires sont fréquentes. Les chevaux peuvent être atteints par exemple d'ostéochondrite disséquante, d'arthrose ou de lésions secondaires à un traumatisme (Frisbie, 2005). Pour un cheval athlète, une lésion cartilagineuse est une cause fréquente de mise à la retraite. La cicatrisation est en effet longue, l'élasticité du tissu initial n'est jamais retrouvée et le taux de récurrence est élevé (Colbath et al., 2017). Plusieurs entreprises commercialisent déjà des cellules souches et les mettent à disposition des vétérinaires (dont Equistem® et Vetbiobank®).

Il n'y a pas de consensus quant à la culture de ces cellules en médecine équine, ce qui en fait un produit peu standardisé. L'objectif de l'étude menée conjointement par STROMALab et l'ENVT est de définir un protocole de production et de caractériser les CSM tout au long du processus, du prélèvement à leur utilisation *in vivo*. Cette première partie vise à mettre au point le mode de prélèvement ainsi que la mise en culture de CSM équines dérivées de moelle osseuse. Les travaux ultérieurs s'intéresseront aux propriétés immunomodulatrices des cellules souches, à leur capacité de prolifération et de différenciation, puis à leur implantation intra-articulaire via un biomatériau porteur adapté.

Ce travail comporte une première partie bibliographique et une deuxième partie expérimentale. L'étude bibliographique commence par une présentation des CSM. Elle s'intéresse ensuite aux lésions cartilagineuses et aux différents

traitements disponibles, avec notamment l'utilisation des CSM. Les différents protocoles permettant leur mise en culture et leur différenciation, issus de la littérature, sont alors décrits.

Dans la seconde partie expérimentale, le protocole de mise en culture des cellules s'appuie sur un protocole utilisé en recherche humaine et sur les divers protocoles issus de la bibliographie. Deux méthodes de prélèvements et deux milieux de culture sont comparés.

Ce projet a été réalisé dans le cadre de l'unité mixte de recherche STROMALab (Université de Toulouse, CNRS, ERL 5311, ENVIT, Inserm 41031).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les cellules souches : définition et mode d'action

A. Caractéristiques des cellules souches

Les cellules souches sont généralement définies comme étant des cellules indifférenciées capables de s'auto-renouveler par réplication mais également de se différencier dans des lignages cellulaires spécifiques (Taylor et al., 2007).

Cette différenciation peut se faire à différents niveaux : une **cellule souche totipotente** pourra se différencier dans tous les types cellulaires. Ces cellules se retrouvent chez le jeune embryon tout juste formé. Une cellule souche **pluripotente** pourra donner des cellules appartenant aux trois tissus embryonnaires (endoderme, mésoderme, ectoderme). Elles peuvent être issues d'une cellule souche embryonnaire, ou de cellules stimulées par l'introduction de plusieurs gènes : elles sont alors nommées « cellules souches pluripotentes induites » (Yamanaka, 2012). Enfin, une cellule souche **multipotente** ne pourra se différencier que dans certains tissus spécifiques (Fortier, 2005), (Baksh et al., 2004).

Les cellules souches adultes, par opposition aux cellules souches embryonnaires, peuvent être obtenues à partir des trois lignées : endoderme, mésoderme, ectoderme. Par exemple, les cellules souches **hématopoïétiques** (CSH), pouvant reconstituer le compartiment sanguin, proviennent du mésoderme.

Bien décrites dans le monde des cellules souches adultes, les **cellules stromales mésenchymateuses** (CSM) sont capables de se différencier en adipocytes, chondrocytes, ostéocytes, myocytes, hépatocytes, pneumocytes, ou encore en cellules appartenant au tissu nerveux (Fortier, 2005). Les études sur les CSM humaines ont permis de définir trois critères auxquels une cellule stromale mésenchymateuse doit répondre : (Dominici et al., 2006)

- elle adhère au plastique dans des conditions de culture standard ;
- elle exprime les clusters de différenciation CD105, CD73, CD90 et n'exprime pas CD45, CD34, CD14 et HLA-DR ; ce sont les critères minimums de l'ISCT (International Society of Cell and gene Therapy) ;
- elle est capable de se différencier en trois lignages qui sont : ostéoblastique, adipocytaire et chondroblastique.

Chez le cheval, les sources des CSM sont multiples et sont représentées dans la figure 1. Parmi elles peuvent être citées la moelle osseuse (MO), le tissu adipeux, le cordon ombilical ou encore la gelée de Wharton (tissu conjonctif embryonnaire). De façon plus anecdotique, les cellules peuvent être issues de tendons, de la membrane synoviale et du liquide synovial. Enfin, des études ont identifié de faibles concentrations de CSM circulantes dans le sang (Stewart, Stewart, 2011). Chez le cheval adulte, la moelle osseuse est communément prélevée au niveau du sternum ou de l'ilium et le tissu adipeux est récupéré à la base de la queue.

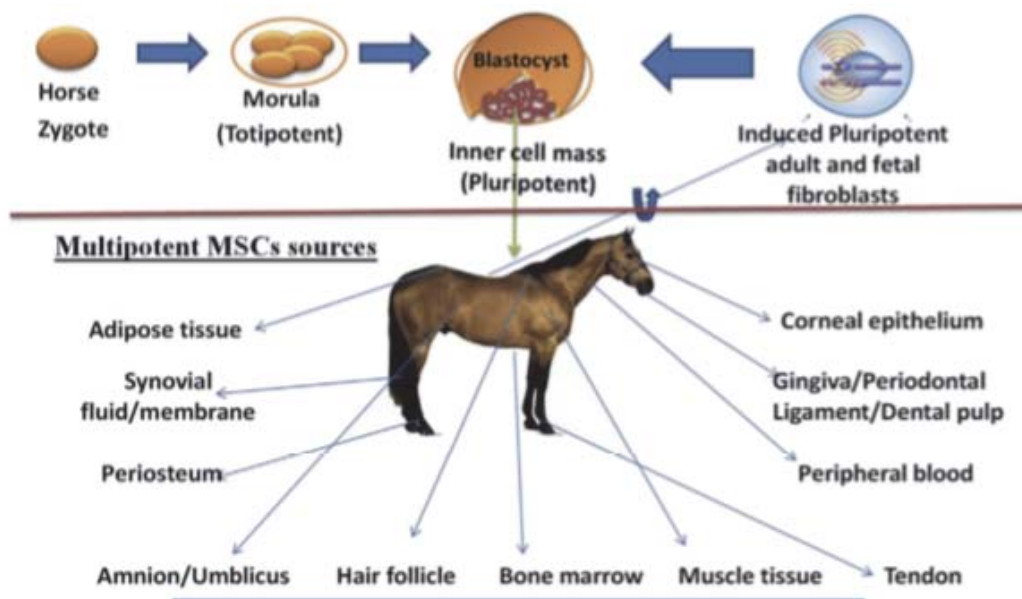


Figure 1 : Sources des CSM multipotentes (Gugjoo et al., 2019)

Les CSM équinés issues de **tissu adipeux** sont attractives en raison de la forte abondance de ce tissu, mais apparaîtraient comme ayant un potentiel de différenciation chondroblastique et ostéoblastique inférieur aux CSM issues de moelle osseuse (Frisbie, Smith, 2009). Cependant, les études de Ranera (Ranera et al., 2012) se sont intéressées à la comparaison des CSM issues de moelle osseuse

et de tissu adipeux. Aucune différence significative n'a été notée en regard de la prolifération, de la mort cellulaire précoce ou de la différenciation dans les lignées ostéoblastique, adipocytaire ou chondroblastique. Il semblerait que le taux de prolifération soit sujet à de fortes variations interindividuelles ; le nombre de progéniteurs diminuant notamment avec l'âge de l'animal (Pacini et al., 2007). D'après cette étude, lorsque les CSM sont issues de tissu adipeux, il est recommandé d'arrêter la culture avant d'atteindre la confluence, les taux d'apoptose et de nécrose tardifs étant plus élevés.

Les CSM issues du **cordon ombilical** présentent l'avantage de pouvoir être récupérées de façon non invasive. Elles sont néanmoins conservées pour la réalisation de banques et non pour être utilisées en réalisant une implantation autologue. Les CSM issues de la membrane synoviale ou du liquide synovial ont également été isolées et analysées chez différentes espèces n'incluant pas le cheval. Elles auraient montré une capacité d'expansion élevée et un potentiel de différenciation chondroblastique préférentiel (Colbath et al., 2017).

Les CSM issues de la **moelle osseuse** sont accessibles par ponction réalisée sur un cheval légèrement sédaté. De nombreuses études se sont intéressées à leur caractérisation. De par leur origine et leurs propriétés, elles sont communément préférées dans le traitement des affections musculo-squelettiques.

B. Mécanisme d'action

In vitro, les CSM sont capables, sous l'influence de cytokines, de migrer vers le site de la lésion et de se différencier en cellules appartenant au tissu cible afin de le restaurer au moins partiellement (Taylor et al., 2007).

Sous certaines conditions, les CSM peuvent être induites pour migrer de la membrane synoviale jusqu'à la lésion, d'y proliférer et de combler la cavité présente dans le tissu cartilagineux. Les études de Hunziker et Rosenberg (Hunziker, Rosenberg, 1996) menées sur des lapins ont montré une faible migration des CSM suite à une lésion cartilagineuse superficielle (figure 2).

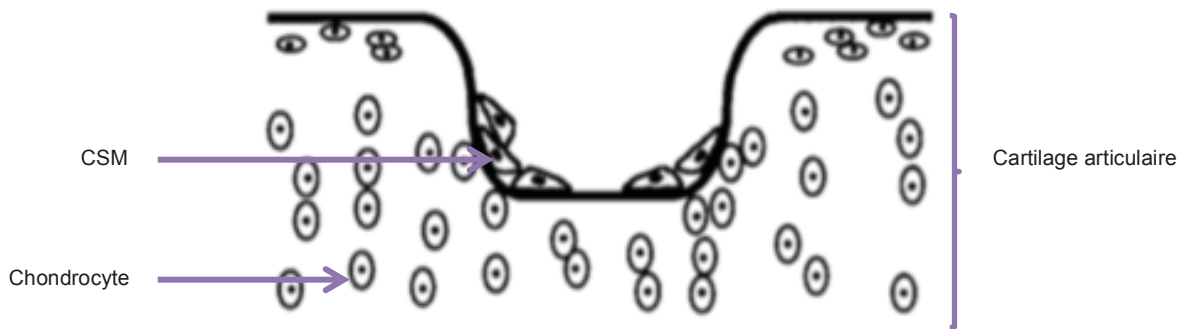


Figure 2 : Prolifération des CSM suite à une lésion cartilagineuse superficielle (Hunziker, Rosenberg, 1996)

Ils ont observé que quelques CSM avaient proliféré, préférentiellement dans les coins de la lésion et qu'ainsi le comblement de celle-ci n'était pas complet.

La thérapie cellulaire utilisant les CSM apparaît comme un nouvel outil à considérer de par leurs propriétés de réplication et leur potentiel de différenciation, mais également leurs propriétés trophiques et d'immunomodulation (Ardanaz et al., 2016).

Les effets thérapeutiques des CSM reposeraient sur la sécrétion essentiellement paracrine de **cytokines**, de **facteurs de croissance**, de **chimiokines** et de **protéines immunomodulatrices**, ainsi que leur capacité à se **différencier** en cellules appartenant au tissu cible. Ceci permettrait une réduction de l'inflammation par modulation de la réponse immunitaire et ainsi une aide précieuse à la régénération tissulaire (Gugjoo et al., 2019).

II. Le cartilage articulaire : propriétés et enjeux de réparation

A. Anatomie des articulations du cheval

Le cheval est un animal lourd dont le poids se répartit sur les quatre membres (figure 3).

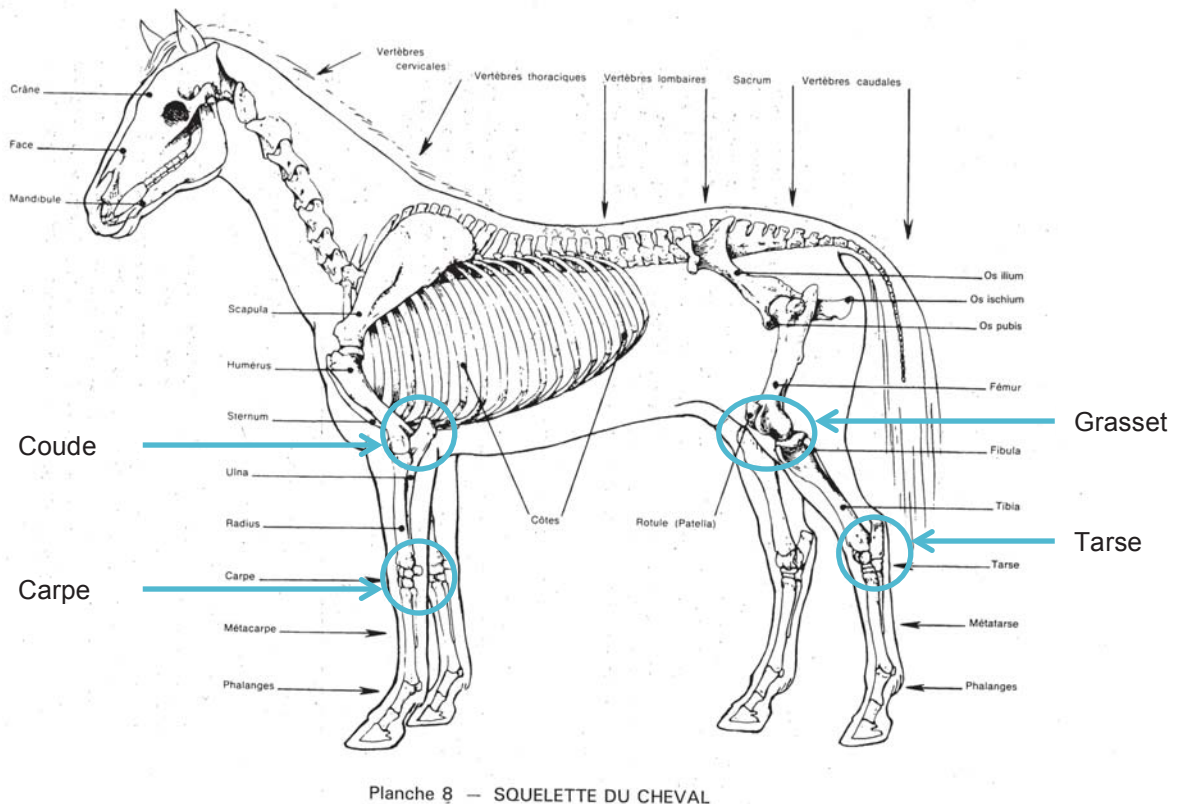


Figure 3 : Squelette de cheval (Barone, 1976)

Contrairement au chien ou au chat, la quadrupédie est obligatoire ; un cheval ne peut pas se tenir sur trois membres. Ceci est à prendre en compte lors d'une affection articulaire ou osseuse affectant l'un des membres, l'immobilisation de celui-ci et le repos strict avec une absence d'appui n'étant pas envisageable.

La gestion des lésions affectant le cartilage formant les articulations (figure 4) du grasset, du tarse, du coude et du carpe sont au cœur de notre étude. Ce sont en effet celles qui sont le plus souvent lésées suite aux efforts répétés par les chevaux athlètes (Redman S. N., 2005).

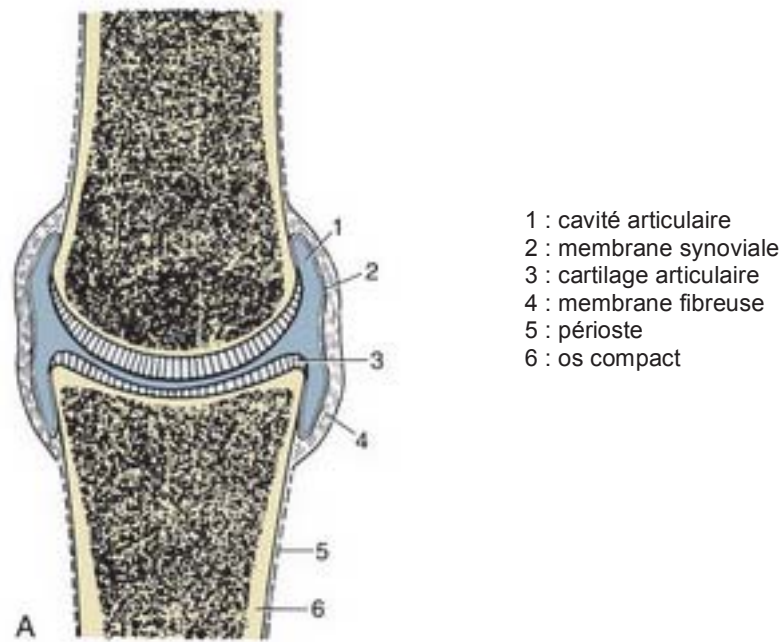


Figure 4 : Représentation d'une articulation synoviale (Dyce et al., 2009)

B. Propriétés du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est un cartilage hyalin qui se trouve à l'interface entre les os formant une articulation. Il a pour rôle essentiel de transmettre les forces de part et d'autre de l'articulation avec un faible coefficient de friction (Ambrosio, 2017). Sa structure complexe lui confère une grande résistance et une bonne élasticité. Cette plasticité lui permet de supporter et absorber de lourdes charges pendant le mouvement (Chen et al., 2006a). Ceci est permis grâce aux propriétés hydrophiles des molécules qui le composent autorisant le mouvement des molécules d'eau (Chevalier, Richette, 2005).

C'est un tissu dépourvu de vaisseaux sanguins, de vaisseaux lymphatiques et d'innervation. Il se nourrit par imbibition grâce au liquide synovial (Sophia Fox et al., 2009).

1. Composition du cartilage

La figure 5 est une représentation schématique des différents constituants du cartilage hyalin que nous allons détailler par la suite.

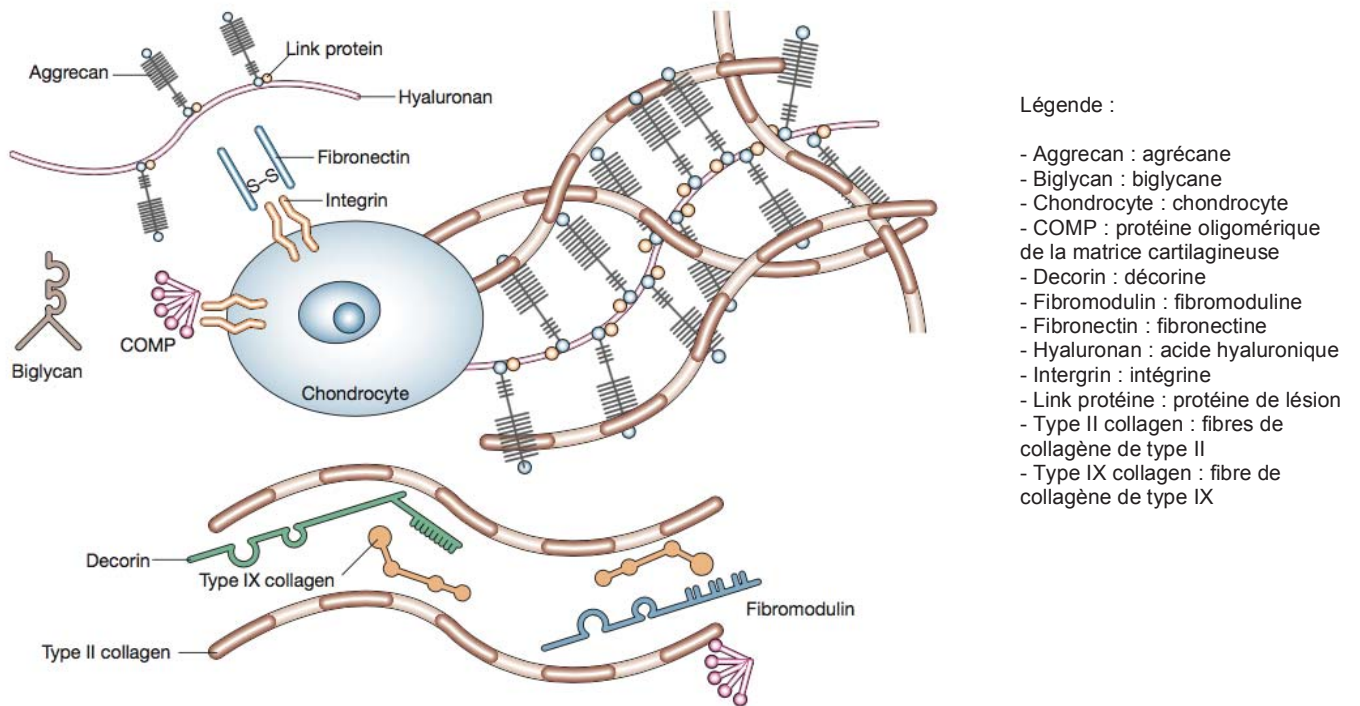


Figure 5 : Structure moléculaire du cartilage artériel (Chen et al., 2006b)

a) Chondrocytes

Ce sont les seules cellules présentes dans le cartilage artériel. Ces cellules hautement spécialisées dérivent des cellules stromales mésenchymateuses. Leur forme, leur nombre et leur taille varie en fonction de la zone du cartilage. Elles sont à l'origine de la production, de l'organisation et du maintien de la matrice extracellulaire. Elles se développent dans un environnement anaérobie et représentent 2 % du volume du cartilage (Alford, Cole, 2005).

La survie et la prolifération des chondrocytes dépendent de l'ensemble de l'environnement mécanique qui comprend les charges, la pression hydrostatique et les forces piézoélectriques, et de l'environnement chimique qui comprend notamment les facteurs de croissance.

b) Matrice extracellulaire

(1) Collagène

Ce sont les macromolécules les plus importantes du cartilage. Elles sont composées de trois chaînes peptidiques associées en triple hélice, stabilisées via

des liaisons hydrogènes. Ceci confère au collagène une forte résistance aux cisaillements et aux tensions. Les fibres majoritairement présentes sont de type II ; les types I, IV, V, VI, IX, X, XI sont également retrouvés.

(2) Protéoglycanes

Les protéoglycanes représentent le deuxième groupe de protéines de la matrice extracellulaire. Elles sont composées d'une protéine axiale liée par covalence à une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAG). Elles portent une charge négative (sur le groupe carboxyle ou sulfate) qui attire les molécules d'eau (H₂O). Ceci leur confère un caractère hydrophile (Chevalier, Richette, 2005).

Les protéoglycanes majoritairement présents sont les agrécans. Elles ont la capacité de se lier de façon non-covalente avec l'acide hyaluronique pour former des agrégats. Cela donne au cartilage ses propriétés osmotiques qui permettent d'assurer son hydratation et de mettre en tension le réseau des fibres de collagènes. La structure ainsi formée participe aux propriétés biomécaniques du cartilage et est essentielle pour assurer la résistance aux charges compressives (Sophia Fox et al., 2009).

Il existe d'autres protéoglycanes (décorine, biglycane, fibromoduline, ...) qui ne seront pas détaillées mais dont l'un des rôles est d'inhiber l'adhésion des cellules aux macromolécules (Hunziker, Rosenberg, 1996).

(3) Autres molécules

D'autres molécules sont présentes en moindre quantité, comme des lipides, des phospholipides, des glycoprotéines, des protéines autres que du collagène ; elles ne seront pas détaillées.

c) Eau

Les molécules d'eau sont abondamment présentes. Elles permettent d'une part la lubrification de l'articulation, et d'autre part le transport et la distribution de nutriments aux chondrocytes. Une grande partie de ces molécules est liée avec les

fibres de collagène, formant un gel compressible lorsqu'une pression est exercée et dont la résistance à la friction est élevée (Sophia Fox et al., 2009).

2. Structure du cartilage

La figure 6 est une représentation schématique de la structure en couches du cartilage.

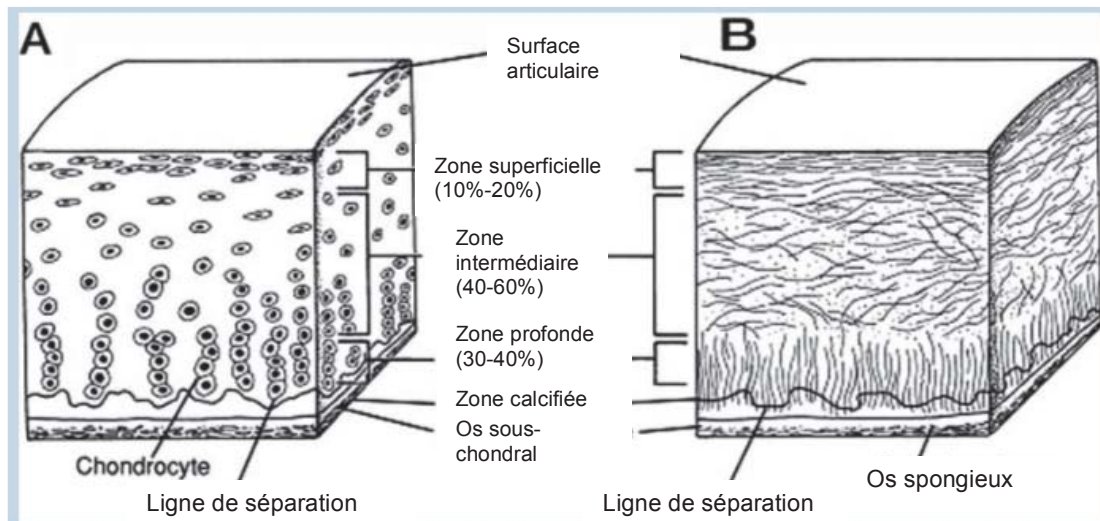


Figure 6 : Structure du cartilage en trois dimensions (Sophia Fox et al., 2009)

A : organisation des chondrocytes selon la zone
 B : organisation des fibres de collagènes selon la zone
 Copyright American Academy of Orthopaedic Surgeons

a) Zone profonde

Cette zone est au contact de l'os sous-chondral et représente 30 % à 40 % de l'épaisseur du cartilage. Les fibres de collagène sont larges et orientées perpendiculairement à la surface articulaire. Les chondrocytes sont répartis parallèlement à ces fibres de collagène. La densité en protéoglycanes y est importante et il y a peu de molécules d'eau. Ces caractéristiques confèrent à cette zone la plus grande résistance face aux forces compressives (Sophia Fox et al., 2009). Les fibres de collagène permettent également l'ancrage du cartilage à l'os sous-chondral.

b) Zone intermédiaire

Aussi appelée « zone de transition », cette zone constitue 40 % à 60 % de l'épaisseur du cartilage et représente la première ligne de résistance face aux forces compressives. Les fibres de collagène sont épaisses et orientées obliquement à la

surface articulaire. Les chondrocytes sont sphériques et présents en faible quantité (Sophia Fox et al., 2009).

c) Zone superficielle

Cette zone est située au niveau de la surface articulaire et est au contact direct du liquide synovial. Les fibres de collagène sont essentiellement de type II et IX. Elles sont empaquetées fermement et alignées parallèlement à la surface articulaire. Les chondrocytes sont présents en forte densité et sont de forme aplatie. L'intégrité de cette couche est indispensable pour la protection et le maintien des couches profondes (Sophia Fox et al., 2009).

3. Enjeux de réparation

Les études de L. Solchaga (Solchaga et al., 1996) ont suivi l'évolution d'une lésion cartilagineuse créée artificiellement dans la zone d'appui du condyle médial du grasset sur des agneaux. Après un mois, dans le cas où la lésion était superficielle et en l'absence de traitement, une absence de réparation des couches superficielles du cartilage a été notée ainsi qu'une dégénérescence de celui-ci. Après 6 mois, la dégénérescence était plus importante entraînant une diminution de l'épaisseur du cartilage et une modification de sa structure. Les couches superficielles avaient alors pris un aspect fibreux tandis que les couches profondes avaient perdu de leur homogénéité. Ceci met en évidence la difficulté de réparation spontanée du cartilage articulaire.

Les lésions cartilagineuses sont classées en deux catégories : les **lésions partielles** ou superficielles qui n'atteignent pas l'os sous-chondral (figure 7A), et les **lésions profondes** ou complètes (figure 7B). Il a été observé que les lésions superficielles ne cicatrisaient pas spontanément. Les hypothèses permettant de l'expliquer évoquent, par l'absence de vascularisation, une absence d'apport de cellules précurseurs, de macrophages, de cellules endothéliales et de CSM présentes dans la moelle osseuse. Une augmentation de la prolifération des chondrocytes provenant de la membrane synoviale est cependant notée dans les 24 heures suivant la lésion ainsi qu'une synthèse de matrice extracellulaire. Cette réponse serait néanmoins de courte durée et ne parviendrait pas à réparer la lésion.

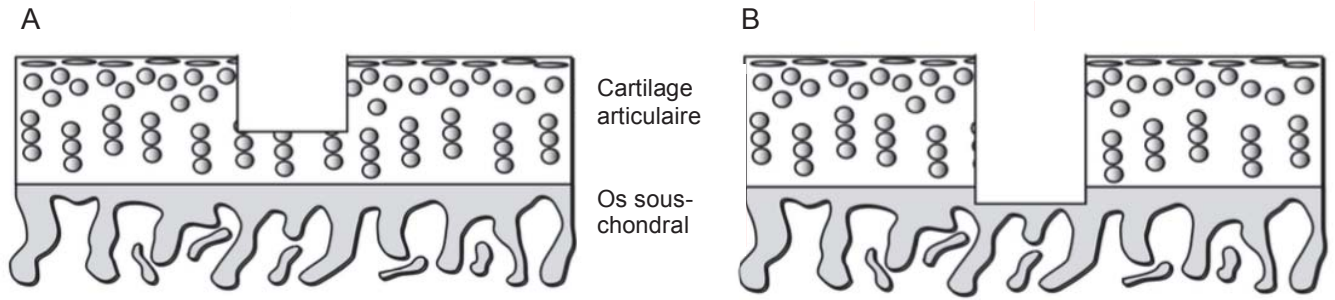


Figure 7 : Représentation schématique d'une lésion cartilagineuse superficielle (A) ou profonde (B) (Redman et al., 2005)

Lorsque la lésion est profonde et atteint l'os sous-chondral, une formation de fibrocartilage a lieu. Celui-ci présente peu à peu une dégénérescence ce qui accentue la lésion et son intégration dans le cartilage environnant n'est pas complète.

Les chondrocytes adultes sont des cellules peu actives. Le renouvellement des protéines de la matrice extracellulaire est très lent. Le cartilage articulaire a par conséquent de faibles capacités de régénération et est incapable de combler une perte de substance (Clair et al., 2009).

Une étude menée sur l'impact d'une atteinte superficielle, sans perte immédiate de cartilage, s'est intéressée au préjudice porté sur les chondrocytes. Leurs capacités métaboliques de réparation se retrouvent limitées, menant à une diminution de la concentration en protéoglycanes, une augmentation de l'hydratation et ainsi à l'altération de l'organisation des fibres de collagène. À la suite d'une lésion, les chondrocytes prolifèrent et augmentent la synthèse de matrice extracellulaire près du site de la lésion mais cela n'est pas suffisant pour restaurer la surface lésée. De plus, on assiste à une augmentation des forces de transmission et à la diminution de l'amortissement ; ce cercle vicieux étend la lésion du cartilage (Alford, Cole, 2005).

Suite à la création d'une lésion profonde, le saignement localisé initie une cascade qui commence par la formation d'un hématome. Il s'en suit la migration des cellules souches et la synthèse de collagène de type I qui résulte en la formation de fibrocartilage différent du cartilage hyalin produit initialement par les chondrocytes. Ce tissu de réparation a une rigidité, une capacité de résistance et des propriétés biomécaniques bien inférieures au tissu initial (Alford, Cole, 2005). En effet, la

structure en couche n'est pas respectée, les fibres de collagènes sont différentes et l'intégration du néo-cartilage n'est pas optimale. De plus, la présence de fibrocartilage et de tissu fibreux conduit le plus souvent à la formation d'arthrose (Morisset et al., 2007).

Par ailleurs, la conformation anatomique du cheval ne permet pas de mettre l'articulation au repos, l'appui sur les quatre membres étant indispensable. Ceci est à prendre en compte dans les enjeux de cicatrisation.

Ainsi, l'objectif des traitements est de parvenir à produire un tissu de réparation ayant les mêmes propriétés et la même fonction que le cartilage hyalin initial et s'intégrant correctement au sein du cartilage environnant (Redman S. N., 2005)

4. Traitements disponibles

a) Traitement médical

À la suite d'un traumatisme touchant une articulation, le traitement médical vise en premier lieu à entrainer une résolution rapide de la douleur, de la synovite et de l'inflammation capsulaire engendrées. Ces processus inflammatoires sont en effet à l'origine de la dégradation du cartilage articulaire conduisant à terme à la formation d'arthrose. La figure 8 ne sera pas détaillée mais donne un aperçu des molécules impliquées dans la cascade inflammatoire et leurs différents effets. Suite à un traumatisme, des cellules telles que les synoviocytes sont recrutées. Celles-ci sécrètent de nombreuses protéines dont des radicaux libres qui entraînent la dégradation de l'acide hyaluronique. Une cascade de réaction a lieu au sein du cartilage articulaire aboutissant à la dégradation de la matrice extracellulaire. Tous ces mécanismes sont, à terme, délétères pour le cartilage.

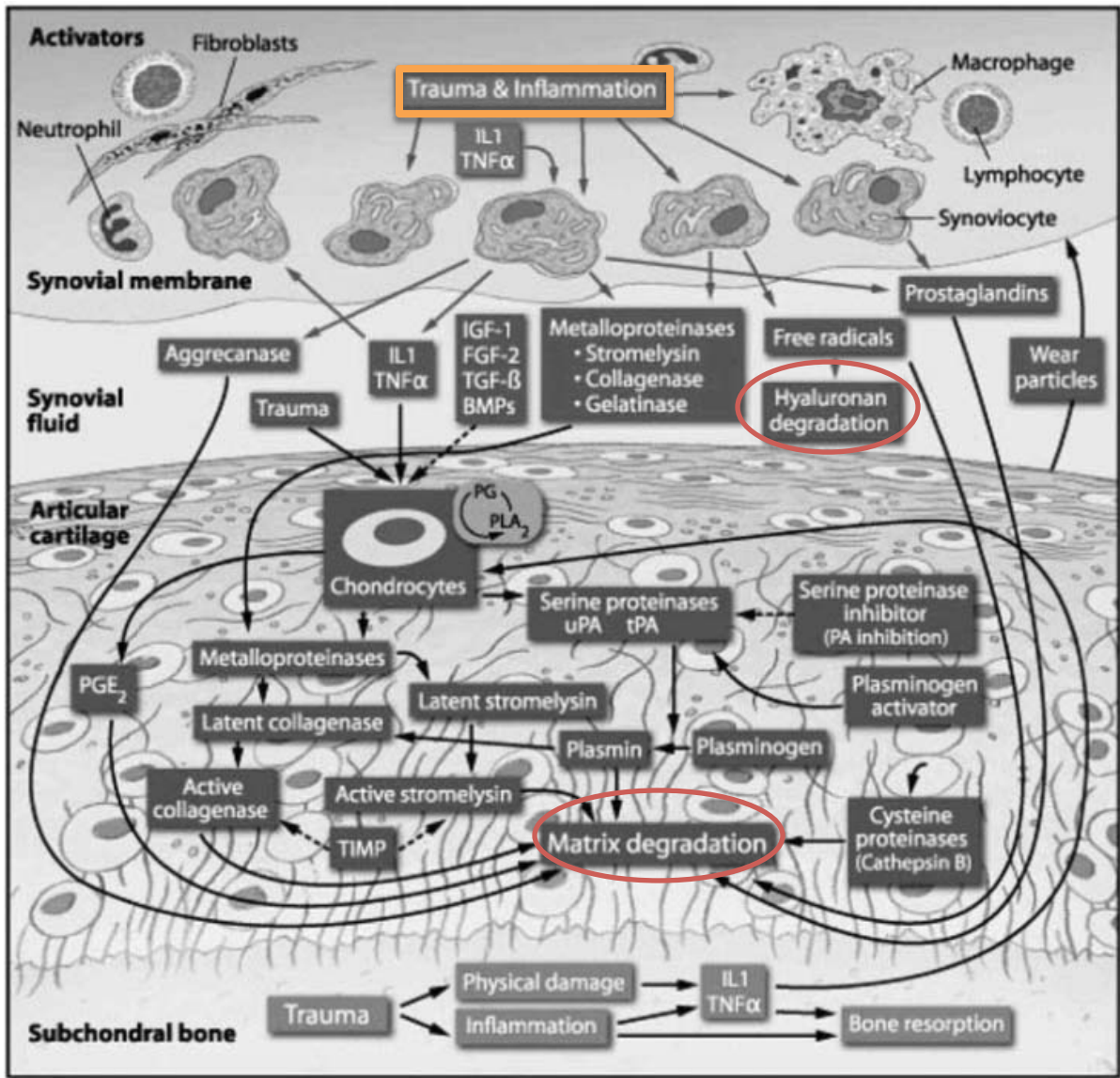


Figure 8 : Mécanismes se mettant en place en réponse à un traumatisme artériel (McIlwraith, 2010)

La mise au repos ainsi que la reprise d'activité progressive font partie intégrante du traitement, bien que les durées et les protocoles de reprise ne soient pas standardisés.

Le recours à la thérapie laser est rapporté et permettrait une diminution de l'inflammation de la capsule articulaire ainsi que de la douleur (Frisbie, Christopher E. Kawcak, et al., 2009).

Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) sont majoritairement employés pour leur activité inhibitrice des prostaglandines, notamment de la PGE₂. Celle-ci a été retrouvée dans le liquide synovial d'articulations arthrosiques et serait associée à la synovite et à la dégradation de la matrice cartilagineuse (McIlwraith,

2010). L'utilisation de phénylbutazone est historiquement décrite mais entrainerait des résultats cliniques variables. La gestion de la douleur serait meilleure grâce à une association de phénylbutazone avec de la flunixin méglumine malgré l'augmentation des risques d'apparition d'effets secondaires (tels que des ulcères gastriques ou une insuffisance rénale) (Dingle, 1993). L'effet des différentes **cyclo-oxygénases** (COX) impliquées dans la cascade inflammatoire a été étudié. Il semblerait que les COX-1 aient un effet dit « protecteur » alors que les COX-2 auraient un effet « délétère ». En effet, les COX-1 sont impliquées dans les fonctions physiologiques du système rénal et du tractus digestif. Des spécialités qualifiées de COX-2 sélectives comme le firocoxib et le carprofène pourraient alors être préférées (Meade et al., 1993). Cependant, bien que la gestion de l'inflammation entraîne une amélioration clinique, à long-terme, celle-ci aurait des effets délétères sur le métabolisme du cartilage. En effet, une étude menée (Beluche et al., 2001) sur l'utilisation de la phénylbutazone pendant 14 jours aurait conclu à l'observation d'une diminution de la synthèse des protéoglycanes. De plus, les AINS administrés par voie systémique peuvent entraîner de nombreux effets secondaires ; c'est pourquoi leur utilisation en traitement local, notamment par application de crèmes, contenant par exemple du diclofénac, peut être envisagée.

Des **injections intra-articulaires de corticoïdes** dits retards sont également fréquemment réalisées. Parmi eux, peuvent être cités l'acétate de méthylprednisolone, l'acétonide de triamcinolone ou encore les esters de bétaméthasone. L'acétate de méthylprednisolone entrainerait une diminution significative de la concentration en PGF2 présentes dans le liquide synovial ainsi qu'une diminution de l'hyperplasie capsulaire et de la vascularite. Cependant, une absence d'analgésie et des effets délétères sur la structure histologique du cartilage sont aussi rapportés. Ceci n'a pas été mis en évidence après l'utilisation de l'acétonide de triamcinolone où une réduction de la douleur, une diminution du taux protéique et une augmentation de la concentration en acide hyaluronique et en GAG dans le liquide synovial ont été décrits (Frisbie et al., 1997). L'acétonide de triamcinolone aurait un effet protecteur et son utilisation serait recommandée pour les articulations très mobiles. Les corticoïdes peuvent être injectés seuls ou en association avec du hyaluronate de sodium.

L'**acide hyaluronique** est l'un des constituant de la matrice extracellulaire. Son utilisation sous forme d'injections intra-articulaires de hyaluronate de sodium aurait des propriétés analgésiques et anti-inflammatoires (Frisbie, Chris E. Kawcak, et al., 2009). Il peut être employé seul en cas de synovite légère à modérée. Il est recommandé de le combiner à d'autres molécules en cas d'atteinte plus grave. Cependant, une étude clinique (Carmona et al., 2009) a été menée afin d'étudier l'impact d'une administration orale d'acide hyaluronique sur l'inflammation synoviale et la présence de PGE2. Aucune différence significative n'a été mise en évidence suite à la prise ou non du traitement.

Les **glycosaminoglycanes polysulfatés**, dont le principal est la chondroïtine sulfate, peuvent être employés en injections intra-articulaires. Les propriétés associées seraient celles d'un chondroprotecteur. Ils sont utilisés traditionnellement en cas de lésion cartilagineuse. Les études montrent cependant des résultats contradictoires. L'étude clinique de Todhunter (Todhunter et al., 1993) a mis en évidence que des injections intra-articulaires de glycosaminoglycanes polysulfatés en post-opératoire immédiat étaient délétères pour la réparation du cartilage. Certaines études ont néanmoins objectivé une diminution significative de la dégradation du cartilage avec un taux de mortalité des chondrocytes amoindri et une augmentation de la densité des GAG (Caron et al., 1991). Sans pour autant pouvoir y attribuer d'effet bénéfique quant à la cicatrisation des lésions cartilagineuses. Ils peuvent également être injectés par voie intra-musculaire mais cette utilisation est peu réalisée et les études mettant en évidence des effets bénéfiques manquent.

Le recours à des injections intra-articulaires de **pentosane polysulfate** est anecdotique. Il n'aurait pas de propriétés analgésiques mais entrainerait une diminution significative de la fibrose du cartilage associée à un meilleur aspect histologique de celui-ci, à une stimulation de la synthèse d'agrécane et à une réduction du taux protéique du liquide synovial (Ghosh et al., 1993).

Enfin, les **compléments alimentaires** restent des traitements fréquemment mis en place. Les propriétés qui leurs sont accordées seraient de prévenir l'apparition de lésions et d'éviter la douleur ; les preuves scientifiques sur le sujet manquent cependant. Ils sont composés le plus souvent de glucosamines, précurseur des protéoglycanes, et de chondroïtine sulfate. Leur absorption par voie

orale chez l'homme est bonne (Setnikar et al., 1993) mais il est rapporté que la biodisponibilité chez le cheval serait faible (Adebowale et al., 2000). Par ailleurs des études sont menées sur l'utilisation des omégas 3 polyinsaturés qui permettrait d'agir sur certains médiateurs de l'inflammation, les résultats ne sont pour l'instant pas significatifs (McIlwraith, 2010) .

De nombreux traitements médicaux sont disponibles mais leur utilisation permet rarement une cicatrisation optimale du cartilage articulaire. D'autres types de traitements doivent donc être mis en place.

b) Traitement chirurgical palliatif

Le traitement palliatif consiste en un débridement de la zone lésée suivi d'un lavage articulaire. Ceci permet de retirer les débris de cartilage en partie responsables de la synovite et de diminuer la douleur (Ortved, Nixon, 2016).

Cependant, un débridement puis un lavage sous arthroscopie n'auraient pas d'effets bénéfiques sur les genoux arthrosiques (Alford, Cole, 2005). Le débridement des lésions cartilagineuses conduit inéluctablement à la formation de fibrocartilage. Une irrégularité de l'os sous-chondral persiste fréquemment.

Le débridement constitue une première étape pour stimuler et commencer la réparation du cartilage. Des traitements additionnels doivent ensuite être envisagés (Cokelaere et al., 2016).

c) Traitement réparateur : stimulation par la moelle osseuse

Le principe de cette technique repose sur l'envahissement de la lésion par de la moelle osseuse apportant des cellules stromales mésenchymateuses multipotentes et des facteurs de croissance. Il s'agit de créer une brèche dans l'os sous-chondral à la base de la lésion cartilagineuse afin de permettre l'écoulement de moelle osseuse. La brèche peut être créée par forage, microfractures ou abrasion (Cokelaere et al., 2016). Performer des microfractures est une méthode peu invasive et peu chère.

Des études expérimentales ont montré une amélioration dans la quantité de tissu réparé et un remodelage de l'os à 4 et 12 mois après microfractures effectuées sur toute l'épaisseur du cartilage calcifié mais sans pénétration de l'os sous-chondral. Le tissu cicatriciel obtenu à 12 mois se compose en surface d'un tissu fibreux, puis d'un mélange de fibrocartilage et de cartilage hyalin riche en fibre de collagène de type II (Frisbie et al., 1999).

Un suivi post-opératoire par imagerie par résonance magnétique (IRM) a montré que le cartilage de réparation était aminci et ne recouvrait pas entièrement la zone lésée (Clair et al., 2009).

Il est possible d'y ajouter des facteurs de croissance comme TGF- β 3 ou BMP-7. Il a été montré qu'ils induiraient chez les chondrocytes l'expression de certains gènes impliqués dans la production de collagène type II et IX, de protéines oligomériques de la matrice cartilagineuse et d'agrécanes, ce qui améliorerait la qualité de réparation du cartilage. Ceci est discuté par les études de Frisbie (Frisbie et al., 2006) qui indiquent que l'expression du gène codant pour la formation de collagène de type II est augmentée dans les six semaines suivant les microfractures mais que l'expression du gène codant pour les agrécane ne semble pas être influencée. Aucune différence significative n'est cependant rapportée à la suite de la réalisation ou non de microfractures.

En revanche, un article récent de Jack M. Bert (Bert, 2015) indique que le résultat obtenu suite aux microfractures est équivalent à un débridement simple et qu'il en résulte une destruction significative de l'os sous-chondral.

d) Traitement par restauration

(1) Greffe ostéochondrale autologue

Réaliser une greffe ostéochondrale autologue présente l'avantage d'apporter une reconstruction immédiate de la surface articulaire en transférant du cartilage hyalin et de l'os sous-chondral sous-jacent intacts. L'enjeu de ce transfert est de conserver des chondrocytes viables capables de produire et de maintenir la matrice extracellulaire (Alford, Cole, 2005).

Cette technique est relativement couramment utilisée en médecine humaine lors de lésions sur le condyle fémoral médial faisant suite à une rupture du ligament croisé crânial, d'ostéochondrite disséquante ou d'un traumatisme. De bons résultats cliniques sont rapportés chez les patients atteints de lésions au niveau du genou ou de la cheville (Hurtig et al., 2001).

La technique schématisée dans la figure 9 consiste à faire l'exérèse de cylindres de cartilages incluant l'os sous-chondral et à les greffer dans la zone lésée. Les greffons peuvent être issus d'une zone de l'articulation où les contraintes sont moindres ou de l'articulation controlatérale saine. La zone qui va recevoir la greffe est préalablement creusée afin d'assurer une bonne mise en place du greffon. La technique schématisée est dite « en mosaïque » et est la plus couramment réalisée.

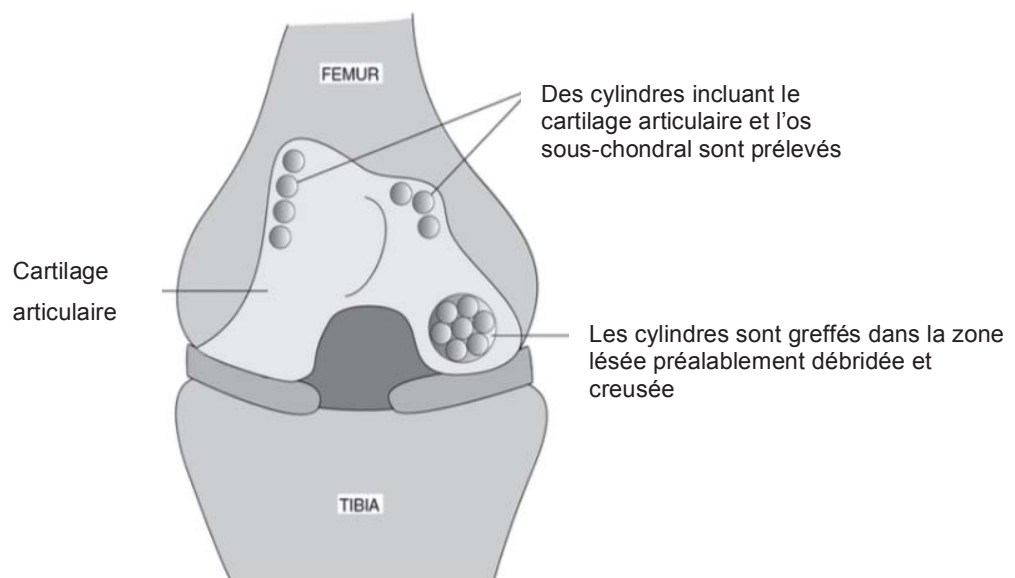


Figure 9 : Représentation schématique de la réalisation d'une greffe ostéocondrale en mosaïque au sein de la même articulation (Redman et al., 2005)

Bodo et son équipe (Bodo et al., 2004) ont mené une étude en médecine équine sur la réalisation de greffes ostéocondrales autologues en mosaïque. Les chevaux inclus dans l'étude présentaient des kystes osseux sous-chondraux au niveau des articulations du boulet ou du grasset, réfractaires aux traitements conservateurs (incluant notamment du repos et des injections intra-articulaires de corticoïdes), les traitements évoqués précédemment tels que le débridement et la réalisation de micro-fractures étant contre-indiqués. Les greffons sont récupérés

sous anesthésie générale au niveau de l'articulation controlatérale saine par arthrotomie. Une seconde arthrotomie est réalisée au niveau de l'articulation défectueuse, un forage est entrepris afin d'insérer correctement les greffons. La technique dite en mosaïque consiste à réaliser plusieurs greffes de faible diamètre afin de permettre une bonne cicatrisation de la zone donneuse.



Figure 10: Greffes ostéocondrales autologues en mosaïque (Bodo et al., 2004)

6 cylindres de 6,5 mm de diamètre et 40 mm de longueur ont été greffés sur le condyle fémoral médial d'un cheval

En post-opératoire, les chevaux ont été mis au repos strict pendant une semaine, puis modéré avec des balades en main pendant deux semaines. Ils ont reçu un traitement systémique à base d'anti-inflammatoires non stéroïdiens durant 4 à 6 semaines. Concernant le suivi sur le long-terme, 6 chevaux sur les 11 traités ont présenté une récupération clinique totale un an après l'intervention. Une récurrence a été notée sur l'un d'entre eux 4 ans plus tard. 2 chevaux ont présenté une légère boiterie persistante. 1 cheval présentait en parallèle une lésion méniscale et n'a pu reprendre qu'une activité modérée. Une arthroscopie a pu être réalisée sur 6 chevaux 6 mois après la greffe. Elle a révélé un cartilage articulaire congruent. Cependant, des protrusions et déformations au niveau du cartilage étaient visibles dans le cas où les greffons avaient été implantés très proches les uns des autres.

Une autre étude menée par Hurtig (Hurtig et al., 2001) sur 6 chevaux a révélé également de bons résultats. Les greffons ont été récupérés par arthroscopie au niveau de la trochlée fémorale et ont été implantés dans le troisième os carpal. Trois semaines après l'opération, les chevaux ne présentaient plus de boiterie. Les chevaux ont été euthanasiés après 9 mois ; l'examen de la surface articulaire a

révélé une bonne adhérence des greffons et l'absence de signes de dégénérescence et d'ostéophytes. La viabilité des chondrocytes au niveau du greffon était cependant inférieure à celle du cartilage sain de l'articulation controlatérale. La production de cartilage de type II était conservée. Par ailleurs, certains greffons ont présenté des fissures ; l'analyse histologique a notamment montré une perte de la couche superficielle des chondrocytes, des zones ayant une perte de matrice extracellulaire et des chondrocytes anormaux en périphérie.

La réalisation de greffes ostéochondrales autologues révèle des résultats intéressants avec un contrôle clinique satisfaisant permettant une reprise de l'activité initiale pour de nombreux chevaux. Aucune lésion ni défaut de cicatrisation ne sont rapportés au niveau du site de prélèvement, mais peu d'études ont été menées à ce sujet. Il serait intéressant d'étudier la viabilité des chondrocytes adjacents au site prélevé et la nature du néo-cartilage se formant afin de combler la lésion créée. Cette technique reste néanmoins risquée (risques anesthésique et septique) et invasive. L'arthroscopie peut se substituer à l'arthrotomie, ce qui présente l'avantage d'être moins délétère au niveau de l'articulation en diminuant cependant la liberté de mouvement au niveau du site opératoire. Les instruments chirurgicaux ne sont pas entièrement adaptés pour être utilisés en équine ; il s'agit majoritairement d'instruments issus de médecine humaine. Des complications sont fréquemment observées dont notamment des fissures intervenant au niveau du greffon, la formation d'ostéophytes, la mise en place d'une fibrose entre le greffon et le cartilage adjacent, une modification de la structure du cartilage, une dégénérescence du greffon, un rejet. Aucune étude n'a été menée afin de déterminer le temps de repos optimal. Les auteurs indiquent des temps différents. Il semblerait qu'un repos trop long ne soit pas bénéfique.

(2) Greffe ostéochondrale allogénique

L'article d'Alford et Cole (Alford, Cole, 2005) s'intéresse aux greffes ostéochondrales allogéniques chez les humains. Le prélèvement doit être effectué dans des conditions stériles dans les douze heures suivant le décès du donneur. Afin de limiter les risques de transmission de maladies, le prélèvement est immédiatement placé dans une solution antibiotique et est mis à 37°C pendant une journée, puis il est stocké à 4°C. L'élimination d'ADN viral éventuellement présent devrait se faire par irradiation à 30 kGy mais elle entraînerait la mort des

chondrocytes et une perte des propriétés mécaniques. Pour cette raison, cela n'est pas pratiqué dans le cadre d'une allogreffe réfrigérée.

La réussite de la greffe ostéochondrale repose sur le nombre de chondrocytes viables après l'implantation. Pour un meilleur taux de viabilité, le prélèvement est conservé dans une solution Ringer lactate ou dans un milieu de culture adapté et peut être conservé pendant 7 à 14 jours. Au-delà, une diminution significative de la viabilité cellulaire est observée.

Il est aussi possible d'utiliser des greffons congelés. Ceux-ci sont préférés lors de tumeurs osseuses touchant en particulier les genoux ou les hanches. Une bonne survie de la greffe est rapportée sur plusieurs années (Redman et al., 2005).

Le recours à des greffes ostéochondrales allogéniques est déconseillé en cas d'arthrose, d'arthropathie inflammatoire ou de nécrose avasculaire diffuse.

L'équipe de Pearce (Pearce et al., 2003) a mené une étude expérimentale visant à observer le devenir de greffes ostéochondrales allogéniques implantées dans les condyles métacarpiens distaux de chevaux (figure 11). Dix chevaux sains ont été inclus dans l'étude et ont été répartis en deux groupes : un groupe témoin (n=4) et un groupe traité (n=6). Les greffons ont été récupérés de façon aseptique sur des chevaux venant d'être euthanasiés avec du phénobarbital par voie intraveineuse. Ils ont ensuite été placés dans une solution de DMEM et ont été conservés 1 à 4 jours à 37°C. Tous les chevaux ont été anesthésiés et ont subi une arthrotomie. Les greffes ont été implantées par une technique de « press-fit » sur les 6 chevaux appartenant au second groupe.

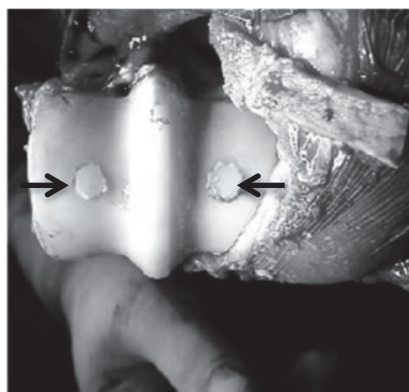


Figure 11 : Photographie montrant les deux greffes réalisées sur les condyles médial et latéral du métacarpe (Pearce et al., 2003)

Les deux greffons sont pointés par les flèches.

En post-opératoire, les 10 chevaux ont été mis au repos strict pendant 16 semaines et ont reçu de la morphine pendant 3 jours, des antibiotiques pendant 6 jours et des anti-inflammatoires non stéroïdiens pendant 14 jours. Un des chevaux a dû être euthanasié dans les 48 heures suite à une chute. A 25 semaines post-opératoires, la moitié des chevaux présentait une boiterie du membre traité, 2 chevaux présentaient des plaies entraînant une douleur et deux chevaux étaient sains. Les radiographies ont montré des anomalies sur 7 des 9 chevaux avec notamment des ostéophytes et un contour irrégulier au niveau de l'articulation. Après 25 semaines, ils ont été euthanasiés, la congruence articulaire a pu être observée (figure 12) et des analyses histologiques (figure 13), micro-radiographiques et biochimiques ont été réalisées. Sur les 10 greffes analysées, 9 étaient constituées de cartilage hyalin entre 90 % et 100 % et la viabilité des chondrocytes atteignait les 80 %. Des zones de fibrose étaient visibles entre le greffon et le site receveur. Deux greffons ont présenté une fissure. L'analyse de la membrane synoviale n'a pas mis en évidence de réaction immunitaire compatible avec un rejet de la greffe. Cette étude a cependant été menée sur des chevaux sains ; il conviendra d'étudier l'influence de ces greffes en tant que thérapie. La technique chirurgicale d'arthroscopie est une méthode invasive pouvant entraîner des boiteries à court et moyen terme.

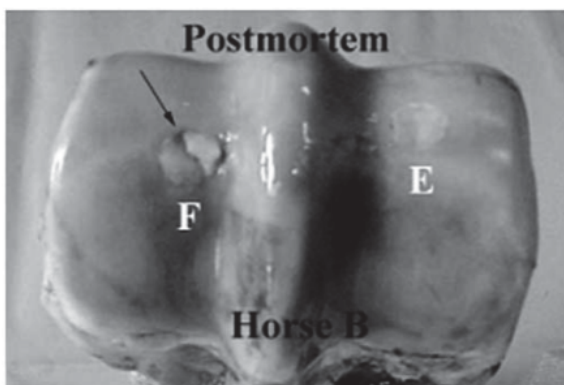


Figure 12 : Congruence articulaire des greffons ostéochondraux allogéniques en post-mortem (Pearce et al., 2003)

F : le greffon présente une fissure (indiquée par la flèche) et la congruence n'est pas satisfaisante
E : très bonne intégration du greffon



Figure 13 : Coupe histologique de la région greffée (Pearce et al., 2003)

Graft : tissu greffé
H : cartilage receveur. Une bonne intégration de la greffe est observée.
m : extension de la matrice au-dessus de la greffe

Ainsi, cette technique semble révéler une bonne qualité et viabilité du tissu

greffé. L'utilisation d'un donneur décédé permet de s'affranchir des éventuels effets secondaires liés au prélèvement. De plus, le greffon peut être récupéré au niveau de la zone anatomique à soigner, ce qui présente l'avantage de récupérer un tissu ayant les mêmes propriétés biochimiques et biomécaniques. L'une des limitations de cette technique était le risque de rejet de la greffe par le receveur. Dans cette étude aucun signe de réaction immunitaire n'a été mis en évidence. Une étude menée sur la réponse immunitaire de chiens ayant ou non reçu une greffe allogénique de cartilage n'a pas montré de réponse significative (Redman et al., 2005). Bien que les résultats soient satisfaisants, la greffe n'est pas systématiquement correctement intégrée à l'articulation et une fibrose peut se mettre en place.

(3) Thérapie cellulaire

(a) *Transplantation de chondrocytes*

La transplantation de chondrocytes autologues consiste en l'extraction de chondrocytes d'un site sain, leur isolement, leur mise en culture *in vitro* puis en leur implantation dans la zone lésée (Clair et al., 2009).

La technique est illustrée par la figure 14 et consiste à réaliser une fine biopsie de cartilage sain par arthroscopie au niveau de l'articulation controlatérale ou d'une zone non porteuse de l'articulation atteinte. Une digestion enzymatique permet de récupérer les chondrocytes afin de les mettre en culture et de les amplifier. A la fin de celle-ci, les chondrocytes sont remis en suspension suite à un traitement avec de la trypsine. Une arthrotomie est réalisée au niveau de l'articulation à traiter. Une greffe de périoste est suturée au niveau de la lésion et les chondrocytes sont injectés sous celle-ci.

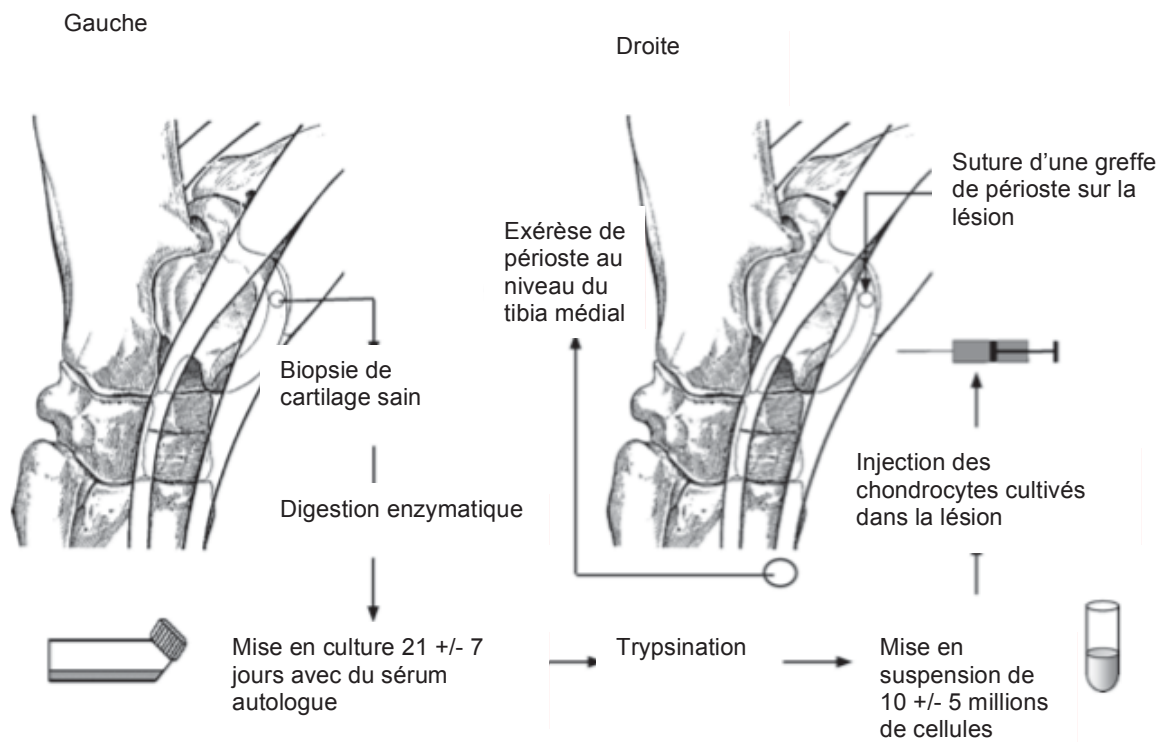


Figure 14 : Implantation de chondrocytes autologues dans une articulation tibio-tarsienne d'un cheval (Clair et al., 2009)

Dans le cas représenté ci-dessus, la lésion se situe à droite

Les études de Litzke, menées sur 8 chevaux suivis pendant deux ans, ont montré qu'en comparaison avec une lésion du cartilage articulaire non traitée, l'implantation de chondrocytes permettait de combler la perte de substance en induisant la formation d'un néo-cartilage bien intégré au cartilage adjacent et ancré à l'os sous-chondral. Il s'agirait ici d'un processus de réparation (Litzke et al., 2004).

L'équipe de Giannini s'est intéressée à l'implantation de chondrocytes autologues par arthroscopie pour traiter une lésion au niveau du talus chez l'homme. Vingt-deux mois après la greffe, des analyses histologique et immuno-histologique ont été effectuées afin d'étudier la nature du tissu de réparation. Une coloration « safranin-o », qui permet de colorer les glycosaminoglycanes, est utilisée et montre que la structure du cartilage hyalin semble respectée ; les fibres de collagènes sont majoritaires en zone superficielle. L'immuno-histologie met en évidence la présence de fibres de collagène de type II réparties au sein de la matrice extracellulaire (Giannini et al., 2008).

Cependant, des études menées en médecine canine en 1997 ne rapporteraient pas de différences significatives au niveau du tissu de réparation entre des animaux ayant eu une injection de chondrocytes ou non, laissant supposer que les chondrocytes implantés n'influenceraient pas la nature du néo-tissu. Ceci est

nuancé par une étude de 2005 qui indique qu'à trois mois post-implantation, le tissu de réparation est constitué de cartilage hyalin. Mais qu'à plus long terme, aucune différence n'est notée entre les animaux traités et non-traités (Redman et al., 2005).

Ainsi, l'implantation de chondrocytes autologues semble être une technique d'avenir puisque le tissu de réparation aurait, du moins à court terme, des propriétés proches du cartilage hyalin d'origine. Des résultats cliniques intéressants ont été rapportés, mais ceux-ci ne sont pas systématiquement observés. Cependant, le prélèvement des chondrocytes et leur mise en culture ne sont pas simples et nécessitent la mise en place d'un protocole standardisé.

(b) Utilisation d'une matrice

Une matrice constituée d'un biomatériau peut servir de support aux cellules précurseurs et leur apporter les facteurs favorisant leur différenciation et leur maturation. Elle doit être stable d'un point de vue structural et mécanique et être compatible avec l'environnement biochimique présent dans l'articulation. Les matrices en trois dimensions sont les plus utilisées en médecine régénérative du cartilage. Elles peuvent être naturelles ou synthétiques. Les plus couramment employées sont constituées d'acide hyaluronique ou de collagène puisqu'elles contiennent un substrat naturellement présent dans le cartilage articulaire. Des essais cliniques réalisés avec l'implantation de chondrocytes autologues ayant été mis en culture dans une matrice en acide hyaluronique ont montré des résultats encourageants avec 96,7% du tissu de réparation composé de cartilage hyalin (Redman et al., 2005).

Le PRP (plasma riche en plaquettes) est également fréquemment utilisé en tant que matrice. Il est étudié depuis 1998 par l'équipe de Marx (Marx et al., 1998) qui l'a utilisé pour la première fois afin d'induire la régénération d'os mandibulaire par l'injection de CSM. Ils suggèrent que l'utilisation de PRP aurait permis d'accélérer la formation de tissu osseux. Les propriétés du PRP reposent sur la formation d'un environnement idéal à l'activation des mécanismes de réparation (Anitua et al., 2007), de par l'apport en facteurs de croissance et de TGF β . Il est obtenu par des centrifugations de tubes contenant du sang. Cependant, de nombreux protocoles existent, ce qui en fait un produit peu uniformisé. Concernant les lésions cartilagineuses, il permettrait d'aider à la régénération du cartilage en apportant des

facteurs de croissance nécessaires à la prolifération des chondrocytes et à la synthèse de fibres de collagène de type II (Tsuzuki et al., 2013).

*(c) Implantation de cellules stromales
mésenchymateuses*

Une approche alternative consisterait en l'injection de cellules stromales mésenchymateuses directement dans l'espace articulaire. Des avantages sur le long terme sont rapportés (Smith et al., 2014).

Il a été montré que les CSM avaient une affinité particulière pour les lésions articulaires. Des études *in vivo* menées sur des rats ont confirmé leur recrutement sur le site de la lésion et leur participation dans les mécanismes de réparation avec notamment la synthèse de matrice extracellulaire (Agung et al., 2006).

Cependant, l'utilisation actuelle des CSM chez le cheval ne se montre pas conclusive quant à l'induction d'une réelle régénération des tissus. Ses bénéfices semblent plus probablement liés à la capacité de ces cellules à moduler les différents mécanismes de réparation.

Dans ce sens, les études de M. Wilke menées sur des lésions articulaires provoqués au niveau de la jonction fémoro-patellaire sur 6 chevaux ont montré que l'implantation de CSM mêlées à du fibrinogène par arthroscopie avait un effet bénéfique sur la cicatrisation à court-terme. Cependant, par comparaison avec une implantation de fibrinogène seule, aucune différence significative quant à la nature du tissu de réparation sur le long-terme n'a été notée (Wilke et al., 2007).

A l'heure actuelle, de nombreuses publications portent sur l'utilisation des CSM dans le traitement des lésions cartilagineuses, mais aucune n'apporte de preuve réelle quant à son efficacité. En effet, le nombre de chevaux inclus dans les études est souvent peu important et les études ne sont pas randomisées en double aveugle. La gestion en post-opératoire n'est pas standardisée (administration d'AINS ou non, période de repos, reprise progressive de l'activité, etc). De plus, les résultats obtenus ne sont pas comparés à un groupe témoin et les critères utilisés sont souvent subjectifs et non standardisés. Ceci est fréquemment rencontré dans le milieu du cheval. Les résultats obtenus semblent néanmoins prometteurs ; il

conviendrait à l'avenir de pouvoir réaliser des études remplissant les critères de la « médecine basée sur les faits » (evidence-based medicine) (Clegg, Pinchbeck, 2011).

5. Le cheval, un modèle pour l'homme

Les thérapies cellulaires sont en plein essor en médecine ostéoarticulaire humaine, mais certains points restent sans réponse. Le recours à un modèle animal permettrait de faire avancer les recherches. Il conviendrait en effet de déterminer les biomatériaux utilisables, de pouvoir choisir la source cellulaire la plus efficace, d'étudier le nombre d'injections nécessaires, et surtout de comprendre les mécanismes d'action.

L'utilisation de CSM pour soigner les affections ostéoarticulaires a été testée chez les rongeurs, mais ceux-ci ne sont pas représentatifs des enjeux retrouvés en médecine humaine. En effet, par leur petite taille, les forces exercées sur les articulations ne sont pas comparables. Le cheval se rapproche du modèle humain du fait de la taille des articulations, le volume de liquide synovial, l'épaisseur du cartilage et les forces exercées sur celui-ci. L'épaisseur du cartilage a en effet été mesurée au niveau du grasset de plusieurs espèces animales et comparée à celle du genou de l'homme. Avec une épaisseur de cartilage de 1,75 mm, le cheval est l'animal dont l'épaisseur est la plus proche de celle des hommes qui atteint 2,35 mm (Chu et al., 2010). Les localisations anatomiques ne sont néanmoins pas identiques du fait de la différence majeure entre la bipédie et la quadrupédie (Smith et al., 2014).

Le cheval se place ainsi comme modèle en ce qui concerne les lésions d'arthrose post-traumatiques, les lésions du cartilage articulaire et les tendinites (Colbath et al., 2017). Les chevaux de sport, dont le niveau d'exercice peut être comparé à celui d'un homme athlète, présentent naturellement divers troubles qui peuvent ainsi être étudiés : traumatisme du cartilage articulaire, arthrose, lésions du ménisque, ostéochondrite disséquante, lésions de tendons ou de ligaments. De par leur taille, les articulations sont aisément accessibles par arthroscopie ce qui permet un accès peu invasif. Tout ceci fait du cheval un bon modèle pour des essais

précliniques permettant l'avancée des traitements des troubles orthopédiques de l'homme.

III. Etude *in vitro* des cellules stromales mésenchymateuses équines

A. Mise en culture

1. Principes de la mise en culture

Les cellules stromales mésenchymateuses équines dérivées de la moelle osseuse sont étudiées depuis une cinquantaine d'années (Friedenstein et al., 1970) et divers protocoles de mise en culture ont pu être mis en place.

Les chevaux utilisés sont habituellement des chevaux adultes en bonne santé. La moyenne d'âge calculée à partir des différents articles est de 11,5 ans ; les chevaux étant âgés de 3 jours à 20 ans (Arnhold et al., 2007) (Bourzac et al., 2010) (Iacono et al., 2015) (Radcliffe et al., 2010) (Ranera et al., 2012) (Vidal et al., 2006).

Tous les protocoles de mise en culture suivent la même trame. La moelle osseuse préalablement récupérée est centrifugée une première fois. Le culot ainsi obtenu est récupéré et rincé avant d'être centrifugé une deuxième fois. Le culot est de nouveau récupéré et suspendu dans le milieu de culture. La suspension finale est disposée dans des flasques et mise en incubation à 37°C dans une atmosphère modifiée calibrée avec 5 % de CO₂ et 90 % d'humidité. La confluence est généralement atteinte au bout de 15 jours, le milieu étant changé deux fois par semaine. L'adhérence au plastique des CSM permet un changement de milieu aisé par une simple aspiration de l'ancien milieu et son remplacement par un nouveau.

a) Ponction de moelle osseuse

Dans la majorité des cas, la moelle osseuse est récupérée au niveau du sternum par une ponction au niveau de la 4^{ème}, 5^{ème} ou 6^{ème} sternèbre. Une ponction de 10 mm de profondeur dans la 5^{ème} sternèbre permettrait une récolte de moelle osseuse optimale (Eydt et al., 2016).

Lors de cet acte, le cheval est généralement sédaté. Une anesthésie locale avec de la lidocaïne, une tonte et un lavage aseptique de la zone sont réalisés. L'aiguille est insérée perpendiculairement dans la sternèbre sur 10 mm de profondeur (figure 15) ; la ponction peut ensuite être réalisée.

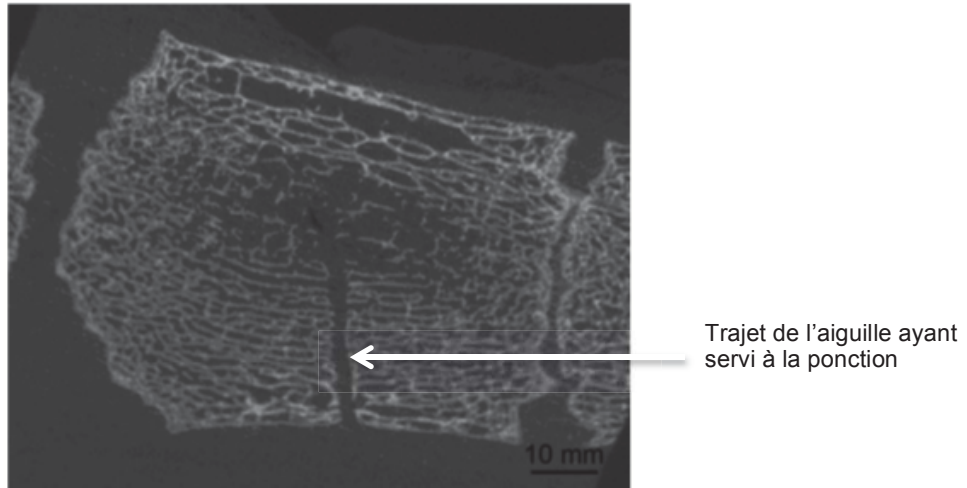


Figure 15 : Aspect de la 5ème sternèbre suite à l'aspiration de moelle osseuse, examen tomодensitométrique (Eydt et al., 2016)

La moelle osseuse peut également être ponctionnée de façon plus anecdotique au niveau de la tubérosité coxale et de la crête iliaque.

b) Préparation de la moelle osseuse

Afin d'éviter la coagulation du prélèvement, de l'héparine de haut poids moléculaire peut être ajoutée dans la seringue au moment de la ponction. Si l'utilisation d'héparine est effectivement souvent rapportée, peu d'études renseignent avec précision les concentrations utilisées. Ce tableau résume les valeurs chiffrées disponibles :

Tableau 1: Quantité d'héparine ajoutée à la ponction de moelle osseuse

Quantité prélèvement	Quantité d'héparine	Article
2 ml	1000 UI soit 500 UI/ml	(Smith et al., 2010)
40 ml	1000 UI/ml	(Vidal et al., 2006)
60 ml	8500 UI/ml	(Worster et al., 2001)
3 x 60 ml	6 000 UI/ml	(Wilke et al., 2007)

La moyenne est peu fiable au vu du faible effectif mais peut donner un ordre de grandeur. D'après ces quatre sources, il faudrait ajouter en moyenne 4000 UI d'héparine par millilitre de moelle osseuse ponctionnée.

c) *Milieu de séparation*

Avant la première centrifugation, un milieu de séparation des lymphocytes peut être utilisé (Ficoll®, Percoll®). Un gradient de densité permet de séparer les différents types cellulaires (figure 16). Les CSM se retrouvent dans la couche dite des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC).

L'aspirât est délicatement déposé sur le milieu de séparation avant la centrifugation

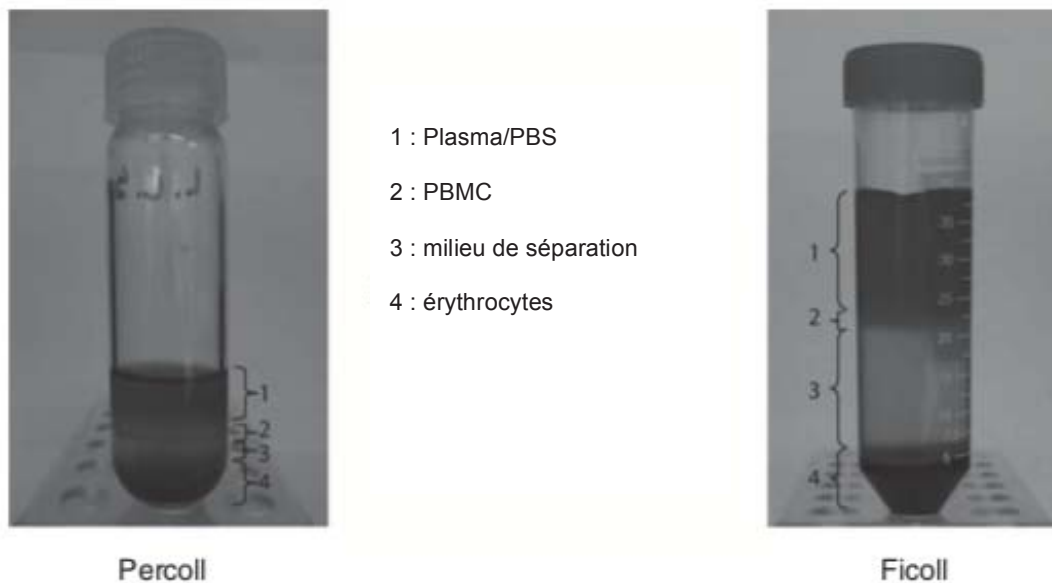


Figure 16 : Séparation des différents types cellulaires par utilisation d'un Percoll® ou d'un Ficoll® (Bourzac et al., 2010)

d) *Première centrifugation*

La solution (MO pure, MO héparinée, +/- déposé sur milieu de séparation) est centrifugée une première fois.

Le tableau présenté en page suivante récapitule les différents paramètres de centrifugation utilisés.

Tableau 2: paramètres utilisés pour la première centrifugation

Milieu de séparation	Vitesse	Temps	Température	Article
Sans	1000 g	15 min	Ambiante	(Bourzac et al., 2010)
Avec	400 g	30 min	Ambiante	(Smith et al., 2010)
Avec	350 g	30 min	4°C	(Vidal et al., 2006)
Avec	350 g	30 min	Ambiante	(Maia et al., 2013)
Avec	300 g	15 min	Ambiante	(Worster et al., 2001)
Avec	300 g	15 min	Ambiante	(Wilke et al., 2007)
Avec	1700 g	20 min	Ambiante	(Ranera et al., 2012)
Sans	1000 g	15 min	Ambiante	(Eydt et al., 2016)

La première centrifugation peut s'effectuer entre 300 g et 1700 g pendant 15 à 30 minutes. Une solution de séparation est utilisée dans la majorité des cas.

e) Première suspension

Le surnageant est aspiré et jeté ; le culot est resuspendu, soit dans une solution tampon de phosphate salin (PBS), soit dans le milieu de culture.

Lorsqu'un milieu de séparation a été utilisé, c'est la phase correspondant aux PBMC qui est récupérée.

f) *Deuxième centrifugation*

Tableau 3: paramètres utilisés pour la deuxième centrifugation

Milieu de séparation	Vitesse	Temps	Température	Article
Sans	1000 g	15 min	Ambiante	(Bourzac et al., 2010)
Sans	400 g	25 min	Au moins 20°C	(Bourzac et al., 2010)
Sans	702 g	10 min	Ambiante	(Smith et al., 2010)
Sans	280 g	5 min	4°C	(Vidal et al., 2006)
Sans	350 g	30 min	Ambiante	(Maia et al., 2013)
Sans	300 g	15 min	Ambiante	(Worster et al., 2001)
Sans	800 g	20 min	Ambiante	(Wilke et al., 2007)
Avec	250 g	5 min	Ambiante	(Eydt et al., 2016)

La deuxième centrifugation peut s'effectuer entre 250 et 1000 g pendant 5 à 30 minutes à 4°C ou à température ambiante, supérieure ou égale à 20°C.

g) *Milieu de culture et deuxième suspension*

Après la centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans le milieu de culture.

Le tableau ci-dessous recense les différents milieux de culture cités dans la littérature pouvant être utilisés.

Tableau 4: recensement des différents milieux de culture utilisés

Milieu de base	Complémentation	Article
DMEM low-glucose	<ul style="list-style-type: none"> - Pyruvate - 10 % SVF - 1 % pénicilline, streptomycine, amphotéricine B 	(Bourzac et al., 2010)
DMEM	<ul style="list-style-type: none"> - 4500 mg/l glucose - L-glutamine - Pyruvate de sodium - 10 % SVF - 50 UI/ml pénicilline - 50 µg/ml streptomycine 	(Smith et al., 2010)
DMEM low-glucose	<ul style="list-style-type: none"> - 1 % glutamine - 1 % streptomycine/pénicilline - 10 % SVF 	(Barrachina et al., 2018)
DMEM Ham's F12	<ul style="list-style-type: none"> - 1 % antibiotique/anti-fongique - 10 % SVF 	(Vidal et al., 2006)
Mélange DMEM low-glucose et DMEM Ham's F12	<ul style="list-style-type: none"> - 20 % SVF - 1 % pénicilline - 1 % streptomycine - 1,2 % amphotéricine B 	(Maia et al., 2013)
DMEM Ham's F12	<ul style="list-style-type: none"> - 10 % SVF - 50 µg /ml d'acide ascorbique - 30 µg/ml d'acide α-cétoglutarique - 300 µg/ml de L-glutamine - 100 U/ml pénicilline de sodium - 100 µg/ml streptomycine - 25 mM of tampon HEPES 	(Worster et al., 2001) (Wilke et al., 2007)
DMEM low-glucose	<ul style="list-style-type: none"> - 10 % SVF - 1 % glutamine - 1 % pénicilline/streptomycine 	(Ranera et al., 2012)
MEMα	<ul style="list-style-type: none"> - 20 % SVF - 2 ng/ml L-glutamine - 50 µg/ml streptomycine 	(Arnhold et al., 2007)
DMEM	<ul style="list-style-type: none"> - 10 % SVF - 1 % pénicilline/streptomycine - 1 % MEM NEAA 	(Eydt et al., 2016)

Ainsi, les milieux de culture fréquemment utilisés sont le DMEM, le DMEM low-glucose ou le DMEM Ham's F12. Une complémentation avec du sérum de veau est systématiquement faite (entre 10 % et 20 %). Des antibiotiques (pénicilline, streptomycine) sont ajoutés dans la majorité des milieux. On retrouve parfois des acides aminés et des antifongiques.

h) Mise en culture

Les cellules sont ensuiteensemencées dans des boîtes de culture et mises dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère modifiée calibrée avec 5 % de CO₂. Le milieu est changé au bout de 5 jours puis 2 fois par semaine jusqu'à atteindre 80 % de confluence.

La première mise en culture sera désignée comme une « primo-culture » ou une « culture brute ».

2. Repiquage

Une fois 80 % de la confluence atteinte, les cellules sont traitées avec de la trypsine afin d'être décollées de leur support sans être endommagées. Elles peuvent alors être comptées, congelées, réensemencées. Les articles indiquent une confluence atteinte après 21 jours de culture en brute, et une quinzaine de jours lors des passages suivants.

Lorsque les cellules sont réensemencées, on parle de « passage ». Les différents passages sont désignés par un chiffre :

- premier passage → P0 ;
- deuxième passage → P1 ;

Et ainsi de suite.

3. CFU

Le comptage des CFU-f (colony forming units fibroblastics) permet de définir le potentiel clonogénique d'une population cellulaire. Les cellules sontensemencées

en faible densité afin de pouvoir estimer le nombre de progéniteurs capables de se diviser et de former une colonie.

Pour cela, des flasques T25 sontensemencées. Les CFU-f formées au bout de 10 jours seront comptées et permettront de calculer le pourcentage de progéniteurs par la formule suivante :

$$\% \text{ progéniteurs} = \frac{\text{Nombre de colonies}}{\text{Nombre de cellules ensemencées}} \times 100$$

4. Différenciation

La propriété principale des CSM est de pouvoir se différencier dans les 3 lignées cellulaires : ostéoblastes, adipocytes, chondrocytes.

Après 21 jours de culture, les cellules peuvent être repiquées dans des milieux de culture spécifiques influençant leur différenciation.

a) *Potentiel de différenciation ostéoblastique*

Les ostéoblastes peuvent se reconnaître à leur matrice minéralisée. Cette caractéristique est mise en évidence avec des colorations à l'alizarine rouge (figure 17) ou au Von Kossa qui permettent de colorer les dépôts calciques.

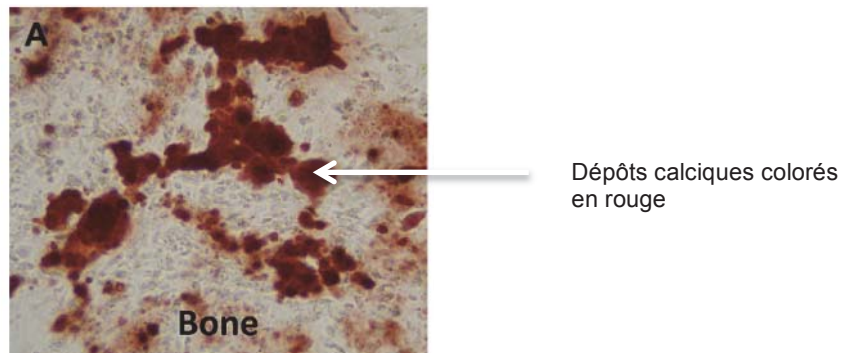


Figure 17 : Mise en évidence de la matrice minéralisée par une coloration à l'alizarine rouge (Stewart, Stewart, 2011)

De plus, dans ces cellules, la phosphatase alcaline est très active et certains gènes spécifiques sont exprimés. Parmi eux se retrouvent : *Runx2*, *osterix*, *osteopontine*, *osteonectine*, *bone sialic protein*, *ALP*. Une réaction de RT-PCR permet d'étudier l'expression de ces gènes par l'intermédiaire de l'expression de leur ARN messager (Stewart, Stewart, 2011).

Le tableau ci-dessous regroupe les milieux de culture utilisés afin d'orienter la différenciation des cellules en ostéoblastes ainsi que les méthodes de reconnaissance mises en œuvre :

Tableau 5: Milieux de culture et méthodes de révélation permettant une différenciation ostéoblastique

Milieu de culture	Méthode de révélation	Article
Milieu de culture non défini - β -glycérophosphate - Dexaméthasone - Acide ascorbique + BMP	Coloration alizarine rouge	(Stewart, Stewart, 2011)
DMEM Ham's F12 - 10 % SVF - 1 % antibiotique/antifongique - 10 mmol/l β -glycérophosphate - 20 nmol/l dexaméthasone - 50 mg/ml acide ascorbique	Coloration alizarine rouge	(Vidal et al., 2006)
DMEM low-glucose - 10 % SVF - 100 nM dexaméthasone - 10 mM β -glycérophosphate - 50 μ M acide ascorbique	Coloration alizarine rouge : accumulation de calcium après 7 jours et jusqu'à 3 semaines	(Radcliffe et al., 2010)
DMEM-TCM 199 - 10 % SVF - 100 UI/ml pénicilline - 100 μ g/ml streptomycine - 10 mM β -glycérophosphate - 0,1 μ M dexaméthasone - 50 μ M acide ascorbique	Après 3 semaines : Coloration alizarine rouge et von Kossa	(Iacono et al., 2015)
DMEM low-glucose - 10 nM dexaméthasone - 10 mM β -glycérophosphate - 100 μ M acide ascorbique	Au passage 3 : Culture 7 jours Coloration alizarine rouge Activité de la phosphatase alcaline RT-qPCR	(Ranera et al., 2012)
MEM α - 10 % SVF - 0,1 μ M dexaméthasone - 10 mM β -glycérophosphate - 0,05 mM acide ascorbique	Concentration phosphatase alcaline par coloration bleu tetrazolium Et von Kossa	(Arnhold et al., 2007)

Dans ces six études, le milieu était systématiquement complété en β -glycérophosphate, dexaméthasone et acide ascorbique. A ceux-ci peuvent s'ajouter du sérum de veau, des antibiotiques et antifongiques.

Le BMP (bone morphogenetic protein) utilisé dans l'expérience de Stewart (Stewart, Stewart, 2011) aurait pour propriété d'accélérer la différenciation et la synthèse d'une matrice minéralisée.

b) Potentiel de différenciation adipocytaire

Les adipocytes sont caractérisés par la présence de vacuoles lipidiques intracellulaires. Cette caractéristique est mise en évidence avec une coloration à l'oil-red-o (figure 18) qui permet de colorer en rouge les lipides.

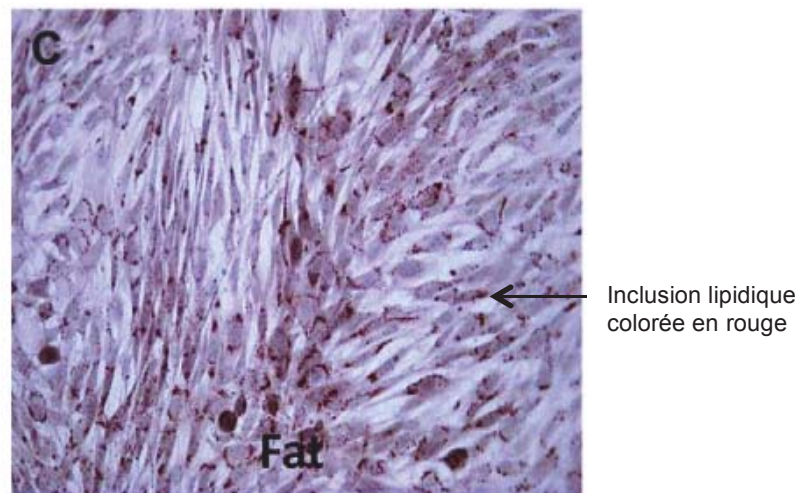


Figure 18 : Mise en évidence des vacuoles lipidiques des adipocytes par une coloration au oil-red-o (Stewart, Stewart, 2011)

De plus, dans ces cellules certains gènes spécifiques sont exprimés. Parmi eux se retrouvent : *PPARY*, *aP2*, *LPL* (Stewart, Stewart, 2011).

Le tableau présenté sur la page suivante regroupe des milieux de culture utilisés afin d'orienter la différenciation des cellules en adipocytes ainsi que les méthodes d'identification mises en œuvre.

Tableau 6: Milieux de culture et méthodes de révélation permettant une différenciation adipocytaire

Milieu de culture	Méthode de révélation	Article
<p>Milieu de culture non défini</p> <ul style="list-style-type: none"> - 10 % SVF - Dexaméthasone, - Isobutylméthylxanthine (IBMX) - Insuline <p>+/- Indométhacine</p>	Vacuoles lipidiques colorées au oil-red-o	(Stewart, Stewart, 2011)
<p>DMEM Ham's F12</p> <ul style="list-style-type: none"> - 3 % SVF - 1 % antibiotiques/antifongiques - 33 mM biotine - 17 mM pantothénate - 100 nM insuline - 1 mM dexaméthasone - 0,5 mM IBMX - 5 mM rosiglitazone (Avandia) - 5 % sérum de lapin <p>Incubation pendant 3 jours Puis: changement de milieu: le même sans IBMX et rosiglitazone</p>	Vacuoles lipidiques colorées au oil-red-o	(Vidal et al., 2006)
<p>DMEM-TCM 199</p> <ul style="list-style-type: none"> - 15 % sérum de lapin - 100 UI/ml pénicilline - 100 µg/ml streptomycine - 1 µM dexaméthasone (6 jours) - 0,5 mM IBMX (3 jours) - 10 µg/ml insuline bovine - 200 µM indométhacine <p>Retrait IBMX après 3 jours, retrait dexaméthasone après 6 jours</p>	Vacuoles lipidiques colorées au oil-red-o après 3 semaines	(Iacono et al., 2015)
<p>DMEM low-glucose</p> <ul style="list-style-type: none"> - 15 % sérum de lapin - 1 µM dexaméthasone - 0,5 mM IBMX - Insuline - 200 µM indométhacine 	Passage 3, 15 jours RT-qPCR	(Ranera et al., 2012)
<p>Induction 3 jours : DMEM high-glucose</p> <ul style="list-style-type: none"> - 10 % SVF - 100 UI/ml pénicilline - 100 µg/ml streptomycine - 1 µM dexaméthasone - 0,5 mM IBMX - 10 µM insuline - 100 µM indométhacine <p>Maintenance 3 jours : αMEM</p> <ul style="list-style-type: none"> - 20 % SVF - 10 µM insuline 	3 cycles induction/maintenance Coloration oil-red-o	(Arnhold et al., 2007)

Dans ces cinq études, le milieu était systématiquement complété en dexaméthasone, isobutylmethylxanthine (analogue de la théophylline, inhibiteur non sélectif des diverses formes de phosphodiesterase des nucléotides cycliques) et en insuline. A ceci peuvent s'ajouter du sérum de veau fœtal et/ou de lapin, de l'indométhacine (anti-inflammatoire non stéroïdien), de la biotine (vitamine B8), du pantothénate (vitamine B5), de la rosiglitazone (agoniste sélectif des récepteurs nucléaires PPAR γ), des antibiotiques et antifongiques.

c) *Potentiel de différenciation chondrocytaire*

Les chondrocytes peuvent se reconnaître par leur matrice riche en protéoglycanes. Cette caractéristique est mise en évidence avec une coloration au bleu de méthylène qui permet de colorer les groupes sulfatés des molécules de glycosaminoglycanes. De plus, la présence d'agrécane peut être révélée par western blot. Les chondrocytes sécrètent du collagène de type II ; celui-ci peut être étudié par immunohistochimie ou par un test Elisa. Les colorations fréquemment utilisées font appel au Bleu alcian, au Bleu de toluidine (figure 18) ou à la Safranine O (Stewart, Stewart, 2011)

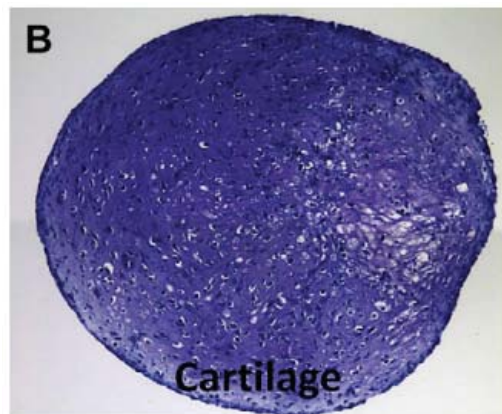


Figure 19 : Mise en évidence des GAG sulfatés des chondrocytes par une coloration au bleu de toluidine (Stewart, Stewart, 2011)

De plus, dans ces cellules, la phosphatase alcaline est très active et certains gènes spécifiques sont exprimés. Parmi eux se retrouvent : *Sox 9*, *collagen type II*, *aggrecan*, *link protein mRNAs* et *EF-1 α* (Stewart, Stewart, 2011).

Le tableau suivant regroupe des milieux de culture utilisés afin d'orienter la différenciation des cellules en chondrocytes ainsi que les méthodes d'identification mises en œuvre.

Tableau 7: Milieux de culture et méthodes de révélation permettant une différenciation chondrocytaire

Milieu de culture	Méthode de révélation	Article
Culture en 3 dimensions Sérum medium free <ul style="list-style-type: none"> - Acide ascorbique - Insuline - Transferrine - Sélénium + TGF- β ou BMPs	GAG sulfatés colorés au bleu de toluidine	(Stewart, Stewart, 2011)
DMEM high-glucose <ul style="list-style-type: none"> - 5 ng TGF-β1/mL - 37,5 μg acide ascorbique - 1 % solution d'insuline-transferrine-sélénium - 300 μg/ml L-glutamine - 100 U/ml pénicilline - 100 μg/ml streptomycine (La première mise en culture avait été faite avec 100 ng de FGF2 /ml)	<ul style="list-style-type: none"> - Solution digérée avec 0,1% papaine à 65°C pendant 16 h. Coloration au Bleu de méthylène pour détecter les GAG sulfatés - Test Elisa [Native type II collagen detection kit, Chondrex Inc, Redmond, Wash.] pour détecter coll II - RT-PCR: EF-1 , aggrecan et collagène type II. - Coloration au Bleu de toluidine 15 jours	(Stewart et al., 2007)
<i>Non renseigné</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Immunohisto - In situ hybridization : expression collagène type I et II - Bleu de méthylène : GAG 	(Worster et al., 2001)
DMEM-TCM 199 <ul style="list-style-type: none"> - 1 % SVF - 100 UI/ml pénicilline - 100 μg/ml streptomycine - 6,25 μg/ml insuline - 50 mM acide ascorbique - 0,1 μM dexaméthasone - 10 ng/ml FGF-β1 	Coloration au bleu alcian après 3 semaines	(Iacono et al., 2015)
Culture en 3 dimensions DMEM high-glucose <ul style="list-style-type: none"> - 10 % SVF - 40 μg/ml proline - 50 μg/ml acide ascorbique - 0,1 μM dexaméthasone - insuline-transferrine-sélénium - 10 ng/ml TGF-β3 	21 jours Coloration au bleu Alcian	(Ranera et al., 2012)
Culture en 3 dimensions MEM α <ul style="list-style-type: none"> - 2 % SVF - 6,25 μg/ml insuline- transferrine-sélénium - 50 mM acide ascorbique - 0,1 μM dexaméthasone (culture de base avec 10 ng/ml de TFG- β 1)	Bleu de toluidine	(Arnhold et al., 2007)

Dans ces six études, le milieu était systématiquement supplémenté en acide ascorbique et en insuline. A ceci peuvent s'ajouter une solution d'insuline-transferrine-sélénium, de la dexaméthasone, du SVF, de la proline, de la L-glutamine et des antibiotiques. La culture se réalise généralement en 3 dimensions.

L'ajout de facteurs de croissance semble intéressant afin de stimuler la synthèse de la matrice cartilagineuse. En effet, les études de Stewart (Stewart et al., 2007) se sont concentrées sur l'éventuel intérêt de supplémenter le milieu de culture avec du FGF-2 (fibroblast growth factor). Les résultats de ces expériences indiquent que l'ajout de 100 ng/mL de FGF-2 lors de la première phase d'expansion n'a pas d'effet sur le nombre de cellules obtenues à la fin du premier cycle. En revanche, la différenciation de ces cellules en chondrocytes semble plus efficace puisqu'une augmentation significative des concentrations en collagène de type II et en GAG est observée. Dans un objectif de traiter des lésions cartilagineuses, il pourrait donc être intéressant de supplémenter le milieu de culture avec 100 ng de FGF-2 par millilitre de solution. Par ailleurs, la culture en présence de FGF-2 permettrait de limiter la sénescence cellulaire (Stewart, Stewart, 2011).

De plus, les études de Woster (Worster et al., 2001) ont montré que l'ajout de TGF- β 1 et/ou d'IGF-I avait un effet bénéfique sur la production de collagène de type II. La chondrogenèse serait optimale lorsque l'expansion cellulaire est réalisée avec du TGF- β 1 dans le milieu de culture, puis lorsque de l'IGF-I est ajouté au milieu de différenciation. Dans des modèles de culture en trois dimensions, IGF-I permettrait d'inhiber la dégradation des protéoglycanes tout en stimulant leur expression phénotypique. La synthèse de collagène de type II serait également favorisée (Litzke et al., 2004).

PARTIE EXPERIMENTALE -

ELABORATION D'UN PROTOCOLE DE MISE EN CULTURE DES CELLULES STROMALES MESENCHYMATEUSES EQUINES

A partir des éléments retrouvés dans la bibliographie, nous avons travaillé à la mise en place d'un protocole permettant l'extraction, la mise en culture, la congélation et la décongélation des CSM équine dérivées de moelle osseuse au sein du laboratoire toulousain STROMALab, sous la supervision du Dr Nicolas Espagnol et de M. Jean-Gerard Descamps.

I. Matériel et méthode

Dans cette partie, les différents essais réalisés permettant la mise en place du protocole d'extraction et de culture des cellules vont être développés. Deux méthodes de prélèvement, l'extraction à partir d'une ponction de moelle osseuse ou d'un grattage d'os spongieux, vont être comparées. Deux milieux de culture, le α MEM et le DMEM F12, vont être utilisés.

A. Prélèvement de la moelle osseuse

1. Ponction sternum

La ponction de moelle osseuse doit se réaliser suite à la signature d'un consentement éclairé par le propriétaire du cheval.

Nous avons réalisé une ponction de moelle osseuse sur le premier cheval inclus dans notre étude (figure 20).

Tableau 8: informations relatives au cheval 1

	Désignation	Identité	Historique
Cheval 1	CV1	Hongre Knabstrupper de 9 ans	Retraité du CSO pour cause de cécité bilatérale

- Site de ponction : 4^{ème} sternèbre
- Matériel : aiguille de prélèvement de moelle Jamshidi, 2 seringues de 20 ml héparinée (2,5 ml d'héparine), anesthésique local (lidocaïne), compresses et gants stériles
- Préparation du site : tonte large autour du sternum, contention chimique à l'aide d'une sédation avec de la détomidine (Detogesic® 0,5 mL IV) et du butorphanol (Butador® 0,2 ml IV), nettoyage chirurgical du site de ponction.
- Réalisation : le site de ponction est repéré visuellement grâce à la ligne du coude. L'aiguille de Jamshidi est enfoncée dans la 4^{ème} sternèbre avec un mouvement de rotation, puis le mandrin est retiré. Vingt-deux millilitres de moelle osseuse sont aspirés dans chaque seringue héparinée. L'aiguille de Jamshidi est retirée et une compression est réalisée.

Les ponctions de moelle osseuse peuvent également se réaliser sous contrôle échographique.

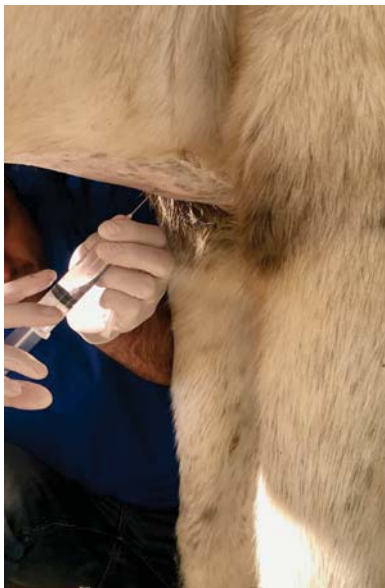


Figure 20 : Photographies illustrant la ponction de moelle osseuse au niveau du sternum du cheval 1 (source personnelle)

2. Grattage des sternèbres

Des sternums ont été récupérés à l'abattoir de Téco. Les animaux avaient été abattus dans les 24 heures. Une fiche explicative (annexe 1) quand à la pièce à prélever a été mise à disposition des techniciens de l'abattoir.

Tableau 9 : informations relatives aux chevaux 2 et 3

	Désignation	Identité	Historique
Cheval 2	CV2	Jument ONC de 23 ans	Abattage
Cheval 3	CV3	Hongre ONC de 22 ans	Abattage

L'os spongieux a été récupéré par grattage ; la procédure est décrite ci-dessous :

- Site : 4^{ème}, 5^{ème} et 6^{ème} sternèbres
- Matériel : champ stérile, curette de chirurgie, gants, tube Falcon de 50 ml
- Préparation de la pièce : le sternum est fendu en deux
- Réalisation : l'os spongieux est gratté à l'aide de la curette et récupéré dans un tube Falcon de 50 ml



Figure 21 : Photographies d'un sternum en cours de grattage (source personnelle)

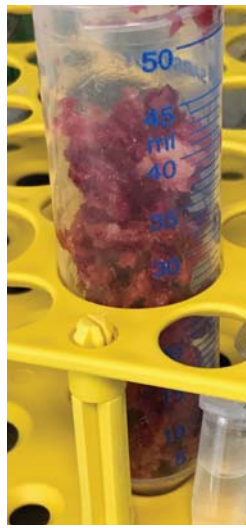


Figure 22: Photographie de l'os prélevé mis dans un tube Falcon de 50 ml (source personnelle)

B. Mise en culture

Toutes les manipulations ont été réalisées au sein du laboratoire STROMALab sous hotte à flux d'air laminaire.

1. Milieu de culture

Dans un premier temps, les manipulations ont été réalisées en parallèle avec deux milieux de culture : le DMEM F12, fréquemment utilisé dans la bibliographie, et le α MEM, communément utilisé à STROMALab pour les cultures de CSM humaines. Les milieux ont été supplémentés avec 10 % de SVF, et 1 % d'antibiotiques et antifongique (ASP : amphotéricine B, streptomycine, pénicilline).

2. Protocole de préparation à la mise en culture de cellules brutes

Le protocole de mise en culture a été élaboré en regroupant les éléments issus de la bibliographie et du protocole suivi au laboratoire afin de mettre en culture les CSM humaines issues de têtes fémorales de patients. Le prélèvement est constitué soit de la solution obtenue à partir de l'os spongieux, soit de la ponction de moelle osseuse.

a) *Protocole d'extraction des cellules à partir d'os spongieux*

Le protocole d'extraction des cellules à partir de l'os a été établi en s'inspirant du protocole utilisé en culture humaine pour récupérer les cellules à partir de têtes fémorales.

Comme décrit précédemment, l'os spongieux est gratté à l'aide d'une curette et le prélèvement est mis dans un tube Falcon de 50 ml. Trente millilitres du milieu de culture supplémenté en ASP y sont ajoutés, ainsi que 1 ml de dispase et 1 ml de collagénase. Le tube est fermé hermétiquement avec du Parafilm® (figure 23) et conservé une nuit à 4°C.



Figure 23: Photographie de la mise en digestion (source personnelle)

Le lendemain, le tube est placé dans un bain-marie à 37°C pendant deux heures afin que la digestion enzymatique puisse avoir lieu. Le surnageant est récupéré et passé sur un filtre 100 µm (figure 24). Les fragments osseux sont rincés (figure 25) avec du PBS et à nouveau filtrés.



Figure 24: Photographies de la solution filtrée (source personnelle)



Figure 25: Photographie de l'os après rinçage (source personnelle)

Il s'ensuit une centrifugation à 1500 rpm pendant 5 minutes. Le culot obtenu est resuspendu dans 20 ml de PBS.

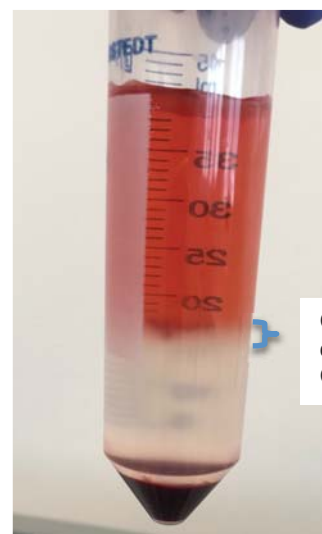
b) Protocole d'extraction de cellules à partir d'une suspension de moelle osseuse

Une mise en culture a été menée à partir de cellules issues d'une ponction de moelle osseuse au niveau du sternum.

La première étape consiste en un dépôt de 20 ml du prélèvement sur 15 ml d'une solution de séparation des lymphocytes (Ficoll®) suivi d'une centrifugation à 1200 rpm pendant 25 minutes, accélération 9, frein 4.



Figure 26 : Photographie de la solution déposée sur un Ficoll® avant centrifugation (source personnelle)



Couche PBMC contenant les CSM

Figure 27 : Photographie du Ficoll® après centrifugation (source personnelle)

La phase PBMC ainsi que la couche supérieure sont récupérées et mises dans un tube Falcon de 50 ml avec 20 ml de PBS. Une nouvelle centrifugation a lieu à 1500 rpm pendant 5 minutes. Le culot récupéré est rincé avec 30 ml de PBS et une seconde centrifugation à 1500 rpm pendant 5 minutes est lancée. Le culot ainsi obtenu est resuspendu dans 20 ml de milieu de culture.

3. Comptage cellulaire

Le comptage cellulaire est réalisé avec une coloration au Bleu de Trypan dilué au 100^{ème}. Dix microlitres de solution sont déposés sur une cellule de Malassez. Le comptage s'effectue au microscope (grossissement x40).

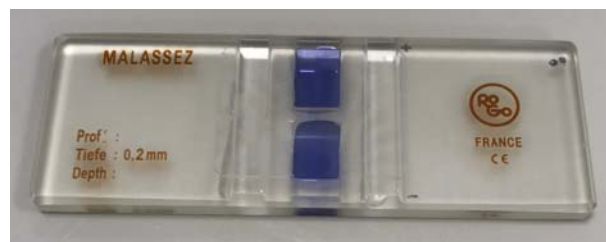


Figure 28 : Photographie de la lame de Malassez après dépôt de la solution (source personnelle)

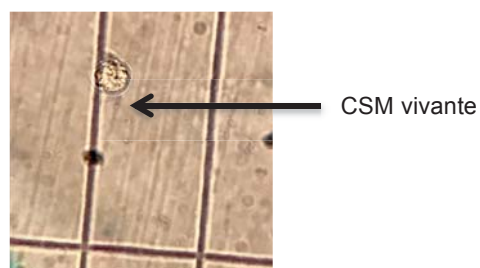


Figure 29 : Photographie de cellules vues au microscope (X40) sur la lame de Malassez (source personnelle)

4. Ensemencement

Plusieurs tailles de flasques ont été utilisées et les densités d'ensemencement des CSM varient en fonction du stade de la culture.

Tableau 10: conditions de mise en culture

Taille flasque	Nombre de cellules ensemencées	Quantité de milieu de culture ajouté	Objectif															
T600	$50 \cdot 10^3 / \text{cm}^2$	110 mL	Prolifération brute vers P0															
T600	$10^3 / \text{cm}^2$	110 mL	Prolifération PO vers P1															
T600	$2 \cdot 10^3 / \text{cm}^2$	110 mL	Prolifération P1 vers P2															
F150	$50 \cdot 10^3 / \text{cm}^2$	25 mL	F75	$50 \cdot 10^3 / \text{cm}^2$	15 mL	Cytogénétique brute	F25	$50-25-10 \cdot 10^3$	5 mL	CFU-f Brute	F25	200-100-50	5 mL	CFU-f PO, P1	F25	25	5 mL	CFU-f P2
F75	$50 \cdot 10^3 / \text{cm}^2$	15 mL	Cytogénétique brute															
F25	$50-25-10 \cdot 10^3$	5 mL	CFU-f Brute															
F25	200-100-50	5 mL	CFU-f PO, P1															
F25	25	5 mL	CFU-f P2															



Figure 30 : Photographies des flasques utilisées pour la mise en culture (source personnelle)

5. Incubation

Les différentes flasques sont placées dans un incubateur à 37°C avec une atmosphère contrôlée avec 5 % de CO₂. Le milieu de culture est changé deux fois par semaine.

A chaque passage, une fois les 80 % de confluence atteints, les cellules sont trypsinées et comptées avant d'être réensemencées.

C. Congélation

La solution de congélation est constituée de 90 % SVF et 10 % de DMSO. Le tube contenant les CSM est centrifugé à 1500 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans la solution de congélation. Les cryotubes sont remplis par 1 ml de solution et sont rapidement placés à -80°C.

Le nombre de cellules congelées par cryotube varie en fonction du stade de culture.

Tableau 11: conditions concernant la congélation

Etat de la culture	Nombre de cellules congelées/cryotube
Brute	$50 \cdot 10^6$
PO	$2 \cdot 10^6$
P1	$2 \cdot 10^6$

D. Décongélation

La décongélation s'effectue en plaçant rapidement le cryotube au bain-marie à 37°C. Lorsque le dernier glaçon est atteint, 1 ml de PBS est ajouté au goutte à goutte en agitant bien le tube afin de diluer le DMSO et de limiter l'action délétère sur les CSM. Le contenu du cryotube est ensuite transféré dans 10 ml de PBS et centrifugé à 1500 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est aspiré et le culot est resuspendu dans le milieu de culture. A ce stade, un comptage peut être réalisé et les cellules peuvent êtreensemencées.

E. Etude de la prolifération

1. Comptage des CFU-f (Colony forming unit-fibroblastic)

Le comptage des CFU-f peut se réaliser directement après les 9 à 11 jours de culture à l'aide du microscope. Une colonie CFU-f est comptabilisée lorsqu'elle se compose d'au moins cinquante cellules.

Une coloration peut être réalisée afin de favoriser la visualisation des colonies et ainsi faciliter leur comptage. Pour cela, le milieu de culture est aspiré et les flasques sont laissés ouverts 24h afin d'être asséchés. Le lendemain, elles sont colorées suivant le protocole utilisé à STROMALab avec les réactifs RAL stainer MCDh (annexe 2). La lecture et le comptage au microscope s'effectuent une fois les boîtes asséchées.



Figure 31: Photographie des F25 colorées en cours de séchage (source personnelle)

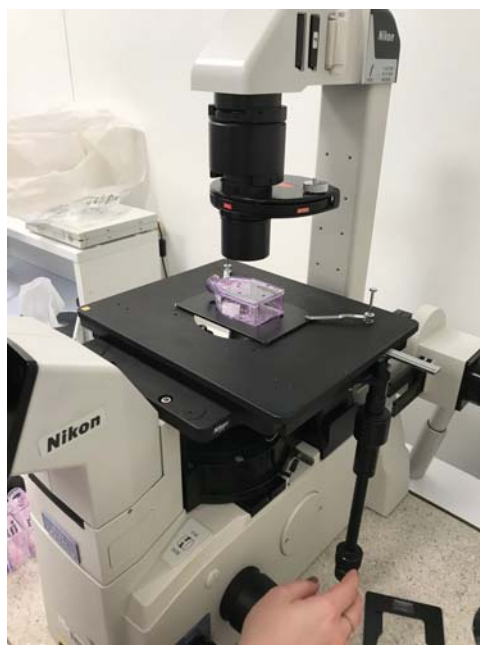


Figure 32 : Photographie illustrant le comptage au microscope des CFU colorées (source personnelle)

2. Analyse de la prolifération des CSM

Le comptage des CFU-f et du nombre de cellules obtenues à la suite d'un passage de culture nous permet d'étudier la prolifération des CSM.

Nous pouvons calculer le nombre de cellules issues de chaque progéniteur par la formule ci-dessous :

$$\text{Expansion} = \frac{\text{Nombre de cellules récoltées}}{\text{Nombre de cellulesensemencées} \times \% \text{progéniteurs}}$$

Le nombre de doublement correspond au nombre de fois qu'une CSM s'est divisée lors de la culture. Il est calculé grâce à la formule suivante :

$$\text{Nombre de doublement} = \log_2(\text{expansion})$$

Nous pouvons ensuite obtenir le temps de doublement qui indiquent le temps nécessaire pour qu'une CSM se divise. Il est exprimé en heures et est obtenu par la formule suivante :

$$\text{Temps de doublement} = \frac{\text{Nombre de jours de culture} \times 24}{\text{Nombre de doublement}}$$

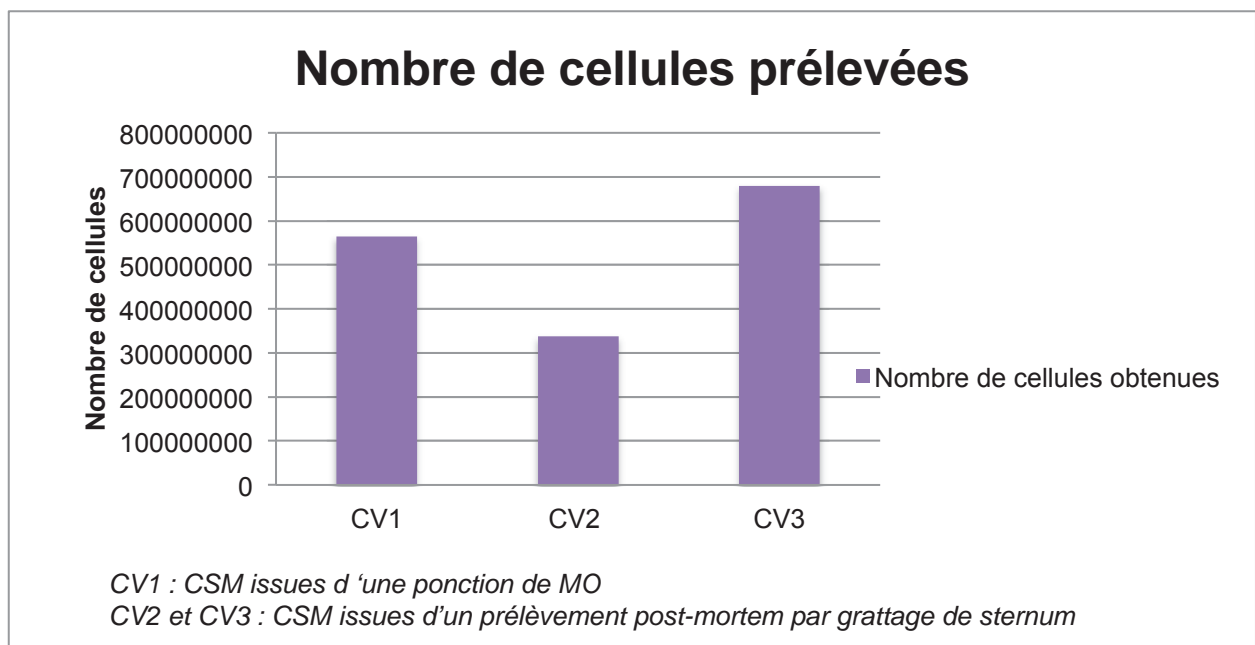
II. Résultats

A. Culture cellulaire

1. Nombre de cellules récupérées

L'extraction des cellules est réalisée à partir du prélèvement de moelle osseuse pour le cheval 1 et à la suite du grattage du sternum pour les chevaux 2 et 3. L'histogramme ci-dessous (graphique 1) montre le nombre total de cellules obtenues avant la première mise en culture.

Graphique 1: Histogramme représentant le nombre de cellules récupérées à partir de chaque cheval



2. CFU-f

Concernant le premier cheval, les primo-cultures n'ont abouti à aucune colonie que ce soit en milieu MEM α ou DMEM F12. Les colonies n'ont pas pu être comptées en P0 du fait de l'obtention de la confluence au bout des 10 jours de culture ce qui a rendu la lecture illisible. Il a donc été décidé pour le deuxième cheval de réduire la densité d'ensemencement.

Les tableaux ci-dessous (tableaux 12,13,14) regroupent les résultats obtenus avec le deuxième cheval en culture brute, en P0 et en P1. Les pourcentages de progéniteurs ont pu être calculés.

Tableau 12: CFU issues de la première culture des cellules issues du cheval 2

CV2 – brute	Nombre de cellules ensemencées	Nombre de colonies comptées	% progéniteurs
DMEM F12	50 000	5	0,010
	25 000	0	0,000
	10 000	0	0,000
MEM α	50 000	9	0,018
	25 000	7	0,028
	10 000	2	0,020

Les cultures ne donnant pas de bons résultats avec le milieu DMEM F12, il a été décidé de ne garder uniquement le milieu MEM α pour la suite des études.

Tableau 13: CFU issues de la culture en P0 des cellules issues du cheval 2 après 10 jours de culture

CV2 – P0	Nombre de cellules ensemencées	Nombre de colonies comptées	% progéniteurs
MEM α	200	confluence	/
	100	confluence	/
	50	29	58

Tableau 14: CFU issues de la culture en P1 des cellules issues du cheval 2 après 10 jours de culture

CV2 – P1	Nombre de cellules ensemencées	Nombre de colonies comptées	% progéniteurs
MEM α	50	17	34
	25	7	28
	25	10	40

En ensemençant 50 000 cellules en primo-culture, 50 cellules en P0 et 50 cellules en P1, les colonies étaient difficilement comptables du fait de leur grande taille et de leur chevauchement éventuel. De plus, à partir de 200 ou 100 cellules en P0, la confluence était atteinte suite aux 10 jours de culture. L'aspect étant

satisfaisant en partant de 25 000 cellules en brute et 25 cellules en P1, il a été décidé que les F25 seraientensemencées à ces densités. Concernant P0, une densité de 25 cellules par boîte est choisie.

Ainsi, pour le cheval 3, trois F25 ont pu êtreensemencées à la même densité pour chaque passage, nous permettant de calculer des moyennes et le pourcentage de progéniteurs (tableau 15).

Tableau 15: Résultats obtenus avec les CFU de différents stades issues du cheval 3

CV3	Nombre de cellulesensemencées	Nombre de colonies comptées	Moyenne	%progéniteurs
Brute	25 000	12	13	0,052
	25 000	13		
	25 000	14		
P0	25	12	14,3	57,2
	25	16		
	25	15		
P1	25	10	8,3	33,2
	25	8		
	25	7		

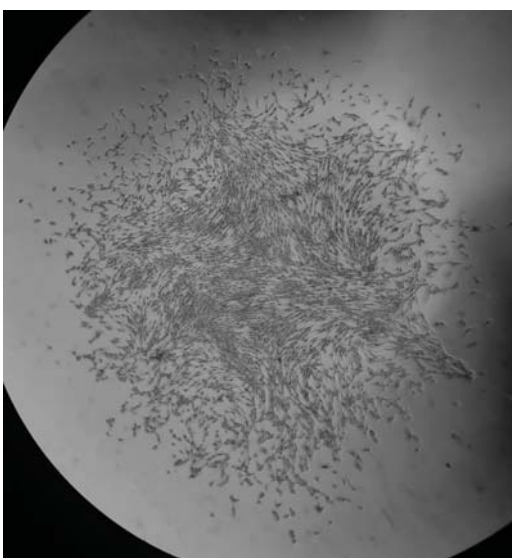


Figure 33: Photographie d'une CFU-f vue au microscope x 10 (source personnelle)

La forme circulaire d'une colonie est mise en évidence.



Figure 34: Photographie des CSM vues au microscope x 40 (source personnelle)

L'aspect allongé des CSM peut être noté.

3. Expansion et doublement des cellules

Avec le cheval 1, nous avonsensemencé en primo-culture une F150, une F75 et une F25 à 50.10^3 cellules/cm² par milieu de culture (DMEM F12 et MEM α). Après 21 jours de culture, les cellules ont été trypsinées et comptées. Les CFU n'ayant pas donné de résultats conclusifs, nous ne pouvons pas calculer l'expansion.

Tableau 16: Résultats obtenus suite à la première mise en culture des cellules issues du cheval 1

	CV1	Nombre de cellulesensemencées	Nombre de cellulesobtenues
DMEM F12	F150	7 500 000	7 400 000
	F75	3 750 000	0
MEMα	F150	7 500 000	7 600 000
	F75	3 750 000	<i>Non connu</i>

Avec le deuxième cheval, nous avonsensemencé en culture brute une T600 et une F75 à 50.10^3 cellules/cm² en DMEM F12 et en MEM α . Une contamination a été mise en évidence dans les flasques contenant le milieu DMEM F12 au bout, respectivement, du 6^{ème} et du 13^{ème} jour de culture. Les boîtes ont été éliminées et une désinfection de l'incubateur et de la hotte a été entreprise. Suite à cet incident, et au vue des résultats de prolifération et des CFU meilleurs pour le milieu MEM α , il a été décidé de ne plus utiliser de DMEM F12.

Des résultats, présentés dans le tableau ci-dessous (tableau 17) ont pu être obtenus en culture brute, P0 et P1 avec le milieu MEM α pour le cheval 2 et le cheval 3 :

Tableau 17: Résultats obtenus suite à la mise en culture des cellules issues des chevaux 2 et 3

Cheval	Passage	Nombre de cellules ensemencées	Nombre de jours de culture	Nombre de cellules obtenues	% progéniteurs	Expansion	Nombre de doublement	Temps de doublement (en heures)
CV2	Brute	30.10 ⁶	11	21.10 ⁶	0,022	3 182	11,6	22,7
	P0	2,4.10 ⁶	11	5,49.10 ⁶	58	3,9	2	133
	P1	1,2.10 ⁶	14	42,96.10 ⁶	34	105,3	6,7	50
CV3	Brute	30.10 ⁶	13	60.10 ⁶	0,052	3 846	11,9	26,2
	P0	1,2.10 ⁶	9	19,4.10 ⁶	57	28,2	4,8	44,8

4. Congélation et essais de décongélation

Avec le cheval 1, nous avons pu congeler 5 cryotubes contenant 52.10⁶ cellules avec le milieu DMEM F12 et 5 cryotubes contenant 58.10⁶ cellules avec le milieu MEM α en brute, ainsi que 4 cryotubes contenant 1,85.10⁶ cellules en milieu MEM α en P0.

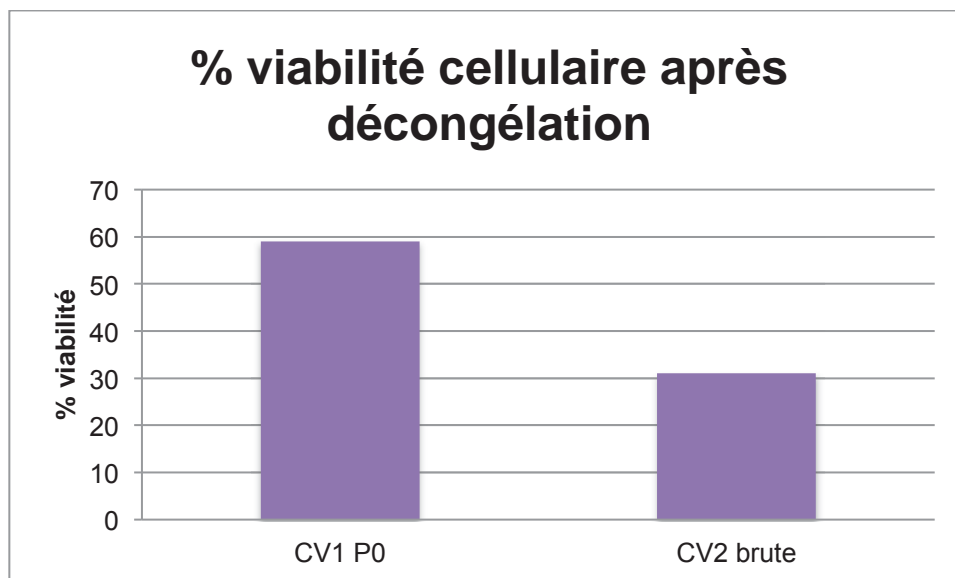
Avec le cheval 2, nous avons pu congeler 3 cryotubes contenant 49,3.10⁶ cellules avec le milieu MEM α en brute. Nous avons également conservé 1 cryotubes contenant 18,6.10⁶ cellules et 1 cryotube avec 3,27. 10⁶ cellules en P0. Enfin en P1, nous avons conservé 2 cryotubes contenant 2.10⁶ cellules.

Avec le cheval 3, nous avons pu congeler 8 cryotubes contenant 50.10⁶ cellules avec le milieu MEM α en brute. Nous avons également conservé 10 cryotubes contenant 2.10⁶ cellules et 2 cryotubes avec 12,6.10⁶ cellules en P0.

Une décongélation a été entreprise pour un cryotube contenant des cellules issues du cheval 1 à P0 et un cryotube contenant des cellules issues du cheval 2 en primo-culture. Les pourcentages de viabilité, calculés à partir de la formule suivante :

$\frac{\text{Nombre de cellules vivantes}}{\text{Nombre de cellules comptées après décongélation}} \times 100$, sont représentés dans le graphique 2.

Graphique 2: Histogramme représentant la viabilité des CSM après décongélation



Les cellules décongelées ont également étéensemencées et mises en culture afin d'étudier leur capacité à proliférer suite à la décongélation.

Tableau 18: Résultats obtenus suite à la décongélation des cellules et à leur remise en culture

Cheval	Passage avant congélation	Boite	Nombre de cellulesensemencées	Nombre de cellulesobtenues	Nombre de jours de culture
CV1	P0	F75	300 000	$4,2 \cdot 10^6$	11
			225 000	$5,45 \cdot 10^6$	11
			150 000	$4,55 \cdot 10^6$	11
CV2	Brute	F75	1 500 000	0	21

La remise en culture des cellules décongelées en P0 a abouti à une prolifération. En effet, même si nous ne pouvons calculer cette prolifération des CSM, la confluence a été obtenue au bout de 11 jours de culture. De plus, les cellules avaient un aspect fibroblastique comparable à celui des cellules n'ayant pas

subi de congélation. En revanche, la remise en culture des cellules congelées en brute n'a pas permis de prolifération. En effet, très peu de cellules ont adhéré au plastique et nous avons observé une mortalité cellulaire importante.

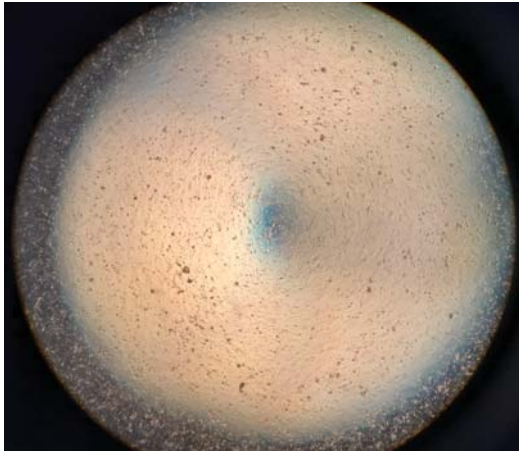


Figure 35: Photographie des cellules décongelées du CV2 brute après 4 jours de culture (source personnelle)

Les cellules forment des amas, ne sont pas fusiformes et n'adhèrent pas au plastique.

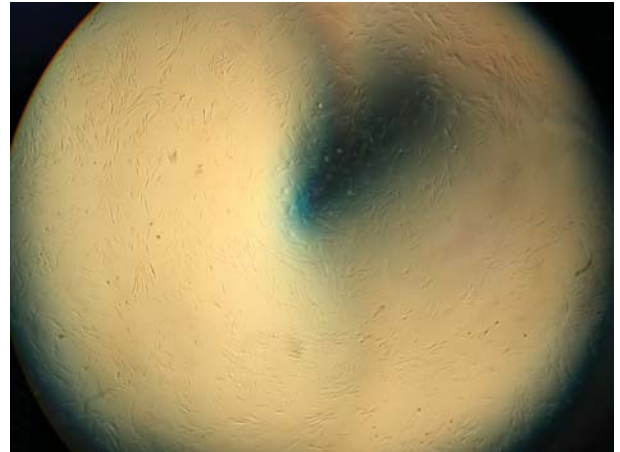


Figure 36: Photographie des cellules décongelées du CV1 P0 après 4 jours de culture (source personnelle)

L'aspect fusiforme des cellules est identifiable.

III. Discussion et perspectives

L'objectif de ce travail était de définir un protocole standardisé permettant, au sein de STROMALab, de récolter et mettre en culture des cellules stromales mésenchymateuses équines. Les protocoles testés étaient basés sur les protocoles utilisés au laboratoire pour la culture de CSM humaines et sur les protocoles disponibles dans la bibliographie.

Les CSM équines communément mises en culture proviennent de moelle osseuse issue du sternum, de l'ilium ou de la tubérosité coxale, et sont récupérées par ponction sur un cheval sédaté. La mise en culture du prélèvement effectué sur le cheval 1 a été difficile en raison de la formation importante de caillots. Seulement 500 UI/ml d'héparine avaient été ajoutés au prélèvement. Deux millilitres d'héparine supplémentaires ont été ajoutés dans chaque seringue afin de dissoudre les caillots. Afin d'éviter la coagulation ayant eu lieu dans les seringues, il conviendra d'augmenter la quantité d'héparine et d'assurer une bonne homogénéisation du prélèvement après la ponction.

L'originalité de cette étude réside dans l'origine des cellules. En effet, pour les chevaux 2 et 3, les sternums utilisés provenaient d'un abattoir et donc d'animaux ayant été abattus et réfrigérés dans les 24 heures précédant le prélèvement. Cependant, par cette méthode, les cellules proviennent de chevaux relativement âgés (22 et 23 ans dans notre étude) alors que les chevaux donateurs sont communément d'âge moyen (11,5 ans en moyenne). Schröck et son équipe ont étudié l'influence de l'euthanasie sur les propriétés des CSM (Schröck et al., 2017). Ils ont récupéré de la moelle osseuse issue du sternum sur des chevaux anesthésiés, puis après l'euthanasie de ces mêmes chevaux. Il en ressort que l'âge du donneur a plus d'influence que le statut anesthésié ou euthanasié. En effet, la vitesse de prolifération des cellules diminue avec l'âge de l'animal. Aucune différence significative n'est notée quant au potentiel de différenciation en adipocytes, ostéocytes ou chondrocytes. Dans cette étude, les cellules ont été récupérées 30 minutes après l'euthanasie. Nous manquons encore d'informations concernant le temps maximal acceptable après l'euthanasie garantissant des cellules de bonne

qualité. L'utilisation des prélèvements post-mortem présente un avantage éthique puisque la récolte de moelle osseuse devient un acte non douloureux, non invasif et s'affranchit des risques liés à la sédation et à la ponction. Cela répond également aux critères de la règle des trois R (Reduce, Refine, Replace) (Ibrahim, 2006). De plus, c'est une pièce anatomique qui constitue une réserve de cellules importante permettant la constitution d'une banque. Cependant, l'utilisation de ces cellules ne pourra se faire qu'en injection allogénique. Il conviendra de veiller à ce que les conditions d'hygiène lors de l'abattage et du transport des pièces soient irréprochables. Au laboratoire STROMALab, les têtes fémorales sont récupérées dans des conditions stériles suite à leur exérèse chirurgicale.

Le nombre de cellules obtenues suite aux premières centrifugations et avant la mise en culture est variable d'un cheval à l'autre. Suite au grattage du sternum, nous avons quasiment obtenu le double de cellules avec le cheval 3 par rapport au cheval 2. Ceci peut s'expliquer par le fait que la quantité grattée pour le cheval 3 était supérieure. Toutefois, nous ne pouvons exclure une variation individuelle ou une meilleure conservation suite à l'abattage. Il nous est impossible de conclure quand à la richesse cellulaire potentiellement liée au type de prélèvement (ponction ou grattage).

Peu de complications sont rapportés quand à l'utilisation thérapeutique de cellules allogéniques. Selon l'étude de Pig (Pig et al., 2013), l'injection intra-articulaire de cellules allogéniques induirait une réponse inflammatoire aiguë plus importante qu'avec une injection de cellules autologues. Ils n'ont cependant pas montré de différences significatives en ce qui concerne le suivi clinique (incluant des paramètres comme la circonférence du boulet, la présence d'un œdème, un scoring de douleur). Dans la même démarche, l'étude d'Ardanaz (Ardanaz et al., 2016) a comparé l'effet de l'injection intra-articulaire de CSM autologues ou allogéniques dans des articulations de chevaux sains. Une réaction inflammatoire a eu lieu quelque soit le type de cellules injectées et s'est résolue spontanément en une dizaine de jours. Aucune réaction d'hypersensibilité n'a été observée que ce soit à la première ou à la seconde injection de cellules allogéniques.

Lors de la mise en place du protocole, deux milieux de cultures ont été testés en parallèle : le MEM α et le DMEM F12. Ceux-ci étaient complétés avec 10 % de SVF et 1 % d'ASP. Le milieu MEM α est utilisé en routine à STROMALab pour les cultures cellulaires humaines et donne de bons résultats. Nous n'avons pas suffisamment de données afin de comparer les deux milieux lors de la culture des CSM équine ; mais le milieu DMEM F12 induisait un changement d'état des cellules. Il a donc été choisi de n'utiliser que le milieu MEM α . Ce milieu est peu utilisé dans la bibliographie équine et constitue également l'une des originalités de notre étude.

La confluence était systématiquement atteinte en moins de 15 jours (durée retrouvée dans la bibliographie) avec une densité d'ensemencement et les conditions environnementales similaires. Cette multiplication rapide nous a conduit à diminuer la densité d'ensemencement. Ainsi, lors de la primoculture, les boîtes seront ensemencées à $50 \cdot 10^3$ cellules/cm² puis à 2 000 cellules/cm² lors des différents passages. Le temps de culture devra être le même pour les différentes boîtes afin d'obtenir des résultats pouvant être comparés. Pour la culture, le temps sera limité à 14 jours.

Lors de l'étude des CFU, deux méthodes ont été utilisées afin de compter les colonies, l'une avec et l'autre sans coloration. Une fois l'œil du manipulateur aiguisé, le comptage sans coloration était suffisamment rapide et fiable pour être choisi comme standard. Concernant le nombre de cellules à ensemercer, les flasques en cultures brutes seront ensemencées avec 25 000 cellules/boîte, puis à 25 cellules/boîte pour les passages suivants. La culture se déroulera sur 9 jours, avec un changement de milieu au 5^{ème} et 7^{ème} jour.

En primo-culture, nous avons obtenu un pourcentage de progéniteurs de 0,022 % pour le cheval 2 et de 0,052 % pour le cheval 3. Les résultats sont supérieurs en P0 avec environ 58 % de progéniteurs pour les deux chevaux. En P1, le pourcentage de progéniteurs est de 34 %. Nos résultats sont supérieurs à ceux recensés dans la littérature (Bourzac et al., 2010), (Arnhold et al., 2007). Ceci peut s'expliquer notamment par la différence du milieu utilisé ; respectivement DMEM low glucose enrichi en pyruvate supplémenté à 10 % de SVF et MEM α enrichi en L-glutamine supplémenté à 20 % de SVF. De plus, le mode de prélèvement et d'extraction peut

jouer un rôle. Dans les deux articles cités, les cellules étaient extraites suite à une ponction de moelle osseuse au niveau du sternum. Au sein de STROMALab, les résultats obtenus en culture humaine avec le milieu MEM α indiquent des pourcentages de progéniteurs allant de 20 % à 30 % après 10 jours de culture en P1 (Espagnol et al., 2014).

Le pourcentage de progéniteurs obtenu grâce aux CFU nous a permis d'étudier la prolifération. En primo-culture, nous avons obtenu en moyenne 0,022 % de progéniteurs pour le cheval 2 et 0,052 % pour le cheval 3. En P0, ce pourcentage est plus important ; il atteint 58% pour le cheval 2 et 57,2 % pour le cheval 3. En P1, les résultats indiquent 34 % pour le cheval 2 et 33,2 % pour le cheval 3. Nous obtenons ainsi des temps de doublement d'environ 1 jour en primo-culture pour les deux chevaux, 2 jours en P0 pour le cheval 3 et 2 jours en P1 pour le cheval 2. Le temps de doublement de 133 heures, soit 5 jours et demi, obtenu en P0 pour le cheval 2 nous semble étonnant au vue du reste des valeurs, nous menant à envisager une éventuelle erreur lors des manipulations et du comptage. Cependant, d'autres auteurs indiquent des temps de doublement similaires à nos valeurs. En effet, les moyennes réalisées pour les cultures allant de P0 à P4 par Vidal (Vidal et al., 2006), Ranera (Ranera et al., 2012), et Iacono (Iacono et al., 2015) indiquent respectivement des temps de doublement de 1,4 ; 2,47 et 3,2 jours.

Ainsi, nous avons obtenu des pourcentages de progéniteurs plus élevés que ceux rapportés dans la littérature mais des temps de doublements du même ordre de grandeur. Nos cultures étaient systématiquement arrêtées avant les 15 jours usuellement nécessaires pour atteindre une confluence de 80 %. Ceci nous mène à penser que nos conditions de prélèvements et de mise en culture nous ont permis une meilleure extraction des CSM de la moelle osseuse par rapport aux protocoles décrits dans la littérature, la vitesse de prolifération étant néanmoins similaire.

Les essais de décongélation indiquent que le pourcentage de viabilité en primo-culture de 30 % n'est pas satisfaisant. Il est également relativement bas en P0 puisqu'il peine à atteindre les 60 %. Une viabilité de 83 % a été obtenue lors des études d'Arnhold (Arnhold et al., 2007). Les cryotubes étaient placés à -80°C dans de l'isopropanol. Nos résultats inférieurs peuvent s'expliquer par le caractère novice

des manipulateurs. Il conviendra de réitérer les manipulations et éventuellement de modifier le protocole si les résultats ne s'améliorent pas. De plus, les essais ont été réalisés seulement sur deux cryotubes ce qui ne permet pas d'interpréter statistiquement les résultats obtenus.

La remise en culture des cellules issues de P0 avec le cheval 1 donne des résultats encourageants avec une population s'étant multipliée de 14 à 30 fois. Cependant, pour des raisons de mise en place du protocole, le pourcentage de progéniteurs n'a pas pu être calculé pour cette culture. Nous ne pouvons donc pas déterminer le nombre de doublement ni le temps de doublement des CSM. Il serait intéressant de réitérer les expériences de décongélation et de mise en culture afin de comparer les résultats à ceux obtenus lors d'une culture sans étape de congélation. En effet, suite à la création d'une banque, les cellules seront conservées congelées et pourront être décongelées à la demande, remises en culture, puis injectées au patient. Nous avons ainsi mis en évidence que nos cellules pouvaient être congelées et décongelées tout en conservant une certaine capacité de prolifération que nous souhaiterions pouvoir quantifier. Il sera intéressant dans un second temps d'étudier si le potentiel de différenciation est également conservé. La durée maximale de conservation devra également être déterminée.

Le protocole ainsi mis au point est disponible en annexe 3.

La suite de ce travail s'attachera à poursuivre la caractérisation de l'expansion des cellules. En effet, le protocole de prélèvement et de mise en culture des cellules étant à présent mis au point, il conviendra de réaliser d'autres cultures dans les conditions standardisées afin d'obtenir des résultats plus nombreux et statistiquement exploitables concernant la culture des CSM équine. Des essais pourront être lancés sur du plus long terme afin de déterminer combien de passages il est possible de réaliser avant d'atteindre l'épuisement des cellules. Ceci permettra d'appréhender l'auto renouvellement de ces cellules et estimer leur phase de plateau.

Ensuite, le mode d'action des CSM au sein du contexte inflammatoire de l'articulation pourra être étudié. L'un des modes d'action des CSM reposerait sur des

effets d'immunosuppression qu'il serait intéressant d'analyser. Cet aspect n'a pas été détaillé dans cette première partie mais fera l'objet de l'une des parties suivantes.

L'une des propriétés des CSM étant de pouvoir se différencier dans trois lignages (adipocytes, chondrocytes, ostéocytes) la prochaine étape sera de pouvoir le mettre en évidence. Il n'a pas été possible de lancer ces manipulations dans le temps imparti mais celles-ci seront abordées dans la suite de l'étude. Un travail de synthèse bibliographique en amont a néanmoins été réalisé afin de mettre au point un premier protocole. Celui-ci s'appuie sur les milieux de différenciation utilisés dans la bibliographie. Ainsi, le milieu de différenciation adipocytaire pourra se composer d'un milieu MEM α + 10 % SVF + 1 % ASP, complémenté avec 1 μ M de dexaméthasone, 0,5 mM d'IBMX, 200 μ M d'indométhacine et 10 μ M d'insuline. Le milieu de différenciation ostéoblastique pourra se composer du même milieu de base, complémenté avec 100 nM de dexaméthasone et 50 μ M d'acide ascorbique. Enfin, le milieu de différenciation chondrocytaire pourra se composer de DMEM high-glucose + 10 % SVF + 1 % ASP, complémenté avec 0,1 μ M de dexaméthasone, 50 μ M d'acide ascorbique, 1 % d'IST et 40 μ g/ml de L-proline. Les protocoles utilisés pour la différenciation à STROMALab pourront être utilisés dans un premier temps en modifiant les milieux de culture. Ceux-ci sont disponibles en annexe 4.

Enfin à très long terme, une fois tout le travail de caractérisation des CSM effectué, la recherche d'un biomatériau pouvant servir de matrice aux CSM pourra être entreprise. Il s'agira de déterminer quel type de matrice sera le plus adapté afin d'induire la différenciation en chondrocytes mais également afin de favoriser la synthèse de collagène de type II et de matrice extracellulaire ayant les mêmes propriétés que la matrice initiale.

CONCLUSION

Ce travail nous a permis de vérifier que certains critères propres aux cellules stromales mésenchymateuses humaines étaient vérifiés dans le modèle équin. Les cellules que nous avons caractérisées adhèrent au plastique et prennent une morphologie fusiforme rapidement après leur mise en culture. Il conviendra d'étudier leur potentiel de différenciation dans les lignages chondroblastique, ostéoblastique et adypocytaire. L'enjeu de ce travail était de déterminer un protocole de culture et d'amplification standardisé réalisable au sein du laboratoire STROMALab. Les comparaisons de deux méthodes de prélèvement (ponction de moelle osseuse au niveau du sternum sur animal sédaté et récupération de l'os spongieux sur sternum d'animaux abattus) ainsi que de deux milieux de culture (MEM α et DMEM F12) nous ont permis de mettre celui-ci en place. Le milieu de culture sélectionné est similaire à celui utilisé pour les cultures cellulaires humaines. Il s'agit du MEM α supplémenté à 10 % en sérum de veau fœtal et à 1 % d'une solution antibiotique et antifongique (amphotéricine B, streptomycine, pénicilline). Le prélèvement des cellules optimal est le grattage des 4^{ème} et 5^{ème} sternèbres sur des sternums récupérés sur des carcasses à l'abattoir. Il s'agit d'une source de cellules originale et éthique qui présente comme avantages de s'affranchir des risques liés à la méthode de prélèvement par ponction de moelle osseuse, d'offrir une source quasiment illimitée de cellules et de valoriser une pièce anatomique peu utilisée pour la consommation humaine. La viabilité des cellules et leur capacité d'expansion en culture fraîche ou après décongélation se sont révélées satisfaisantes. La création d'une banque de cellules et leur utilisation en injection allogénique à des fins thérapeutiques semble envisageable si tous les résultats *in vitro* sont cohérents. La poursuite de l'étude est néanmoins nécessaire afin de déterminer les protocoles de différenciation et d'étudier les propriétés immunomodulatrices des cellules. Une fois la caractérisation terminée, d'autres travaux pourront étudier la mise en place d'une matrice qui servira de support à la prolifération et différenciation cellulaire une fois injecté dans le patient équin à des fins thérapeutiques.

Bibliographie

- ADEBOWALE, Abimbola O, COX, Donna S, LIANG, Zhongming et EDDINGTON, Natalie D, 2000. Analysis of Glucosamine and Chondroitin Sulfate Content in Marketed Products and the Caco-2 Permeability of Chondroitin Sulfate Raw Materials. In : . 2000. p. 8.
- AGUNG, Muhammad, OCHI, Mitsuo, YANADA, Shinobu, ADACHI, Nobuo, IZUTA, Yasunori, YAMASAKI, Takuma et TODA, Katsuhiko, 2006. Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration. In : *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 21 novembre 2006. Vol. 14, n° 12, p. 1307-1314. DOI 10.1007/s00167-006-0124-8.
- ALFORD, J. Winslow et COLE, Brian J., 2005. Cartilage Restoration, Part 1: Basic Science, Historical Perspective, Patient Evaluation, and Treatment Options. In : *The American Journal of Sports Medicine*. février 2005. Vol. 33, n° 2, p. 295-306. DOI 10.1177/0363546504273510.
- AMBROSIO, Luigi, 2017. *Biomedical Composites Ed. 2* [en ligne]. S.l. : Elsevier Science. [Consulté le 24 octobre 2018]. ISBN 978-0-08-100752-5. Disponible à l'adresse : <http://univ-toulouse.scholarvox.com/catalog/book/docid/88849187?searchterm=cartilage>.
- ANITUA, Eduardo, SÁNCHEZ, Mikel, ORIVE, Gorka et ANDÍA, Isabel, 2007. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. In : *Biomaterials*. 1 novembre 2007. Vol. 28, n° 31, p. 4551-4560. DOI 10.1016/j.biomaterials.2007.06.037.
- ARDANAZ, N., VÁZQUEZ, F. J., ROMERO, A., REMACHA, A. R., BARRACHINA, L., SANZ, A., RANERA, B., VITORIA, A., ALBAREDA, J., PRADES, M., ZARAGOZA, P., MARTÍN-BURRIEL, I. et RODELLAR, C., 2016. Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. In : *BMC Veterinary Research*. 31 mars 2016. Vol. 12, n° 1, p. 65. DOI 10.1186/s12917-016-0692-x.
- ARNHOLD, Stefan J., GOLETZ, Iris, KLEIN, Helmut, STUMPF, Gerald, BELUCHE, Lisa A., ROHDE, Carsten, ADDICKS, Klaus et LITZKE, Lutz F., 2007. Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. In : *American Journal of Veterinary Research*. octobre 2007. Vol. 68, n° 10, p. 1095-1105. DOI 10.2460/ajvr.68.10.1095.
- BAKSH, D., L. SONG et TUAN, R. S., 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. In : *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2004. Vol. 8, n° 3, p. 301-316. DOI 10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x.
- BARONE, Robert, 1976. *Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 1 Fasc.1. Ostéologie Texte*. 2 éd. revue et mise à jour. Paris : Vigot frères. Anatomie comparée des mammifères domestiques 1. ISBN 978-2-7114-0703-3. A.03.00-BAR-A(1)
- BARRACHINA, Laura, REMACHA, Ana Rosa, ROMERO, Antonio, ZARAGOZA, Pilar, VÁZQUEZ, Francisco José et RODELLAR, Clementina, 2018. Differentiation of equine bone marrow derived mesenchymal stem cells increases the expression of immunogenic

- genes. In : *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1 juin 2018. Vol. 200, p. 1-6. DOI 10.1016/j.vetimm.2018.04.004.
- BELUCHE, Lisa A., BERTONE, Alicia L., ANDERSON, David E. et ROHDE, Carsten, 2001. Effects of oral administration of phenylbutazone to horses on in vitro articular cartilage metabolism. In : *American Journal of Veterinary Research*. 1 décembre 2001. Vol. 62, n° 12, p. 1916-1921. DOI 10.2460/ajvr.2001.62.1916.
- BERT, Jack M., 2015. Abandoning Microfracture of the Knee: Has the Time Come? In : *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. mars 2015. Vol. 31, n° 3, p. 501-505. DOI 10.1016/j.arthro.2014.12.018.
- BODO, Gabor, HANGODY, Laszlo, MODIS, Laszlo et HURTIG, Mark, 2004. Autologous Osteochondral Grafting (Mosaic Arthroplasty) for Treatment of Subchondral Cystic Lesions in the Equine Stifle and Fetlock Joints. In : *Veterinary Surgery*. 2004. Vol. 33, n° 6, p. 588-596. DOI 10.1111/j.1532-950X.2004.04096.x.
- BOURZAC, C., SMITH, L. C., VINCENT, P., BEAUCHAMP, G., LAVOIE, J.-P. et LAVERTY, S., 2010. Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols: Assessment of equine MSC isolation methods. In : *Equine Veterinary Journal*. septembre 2010. Vol. 42, n° 6, p. 519-527.
- CARMONA, J. U., ARGÜELLES, D., DEULOFEU, R., MARTÍNEZ-PUIG, D. et PRADES, M., 2009. Effect of the administration of an oral hyaluronan formulation on clinical and biochemical parameters in young horses with osteochondrosis. In : *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*. 2009. Vol. 22, n° 6, p. 455-459. DOI 10.3415/VCOT-09-01-0001.
- CARON, J. P., EBERHART, S. W. et NACHREINER, R., 1991. Influence of polysulfated glycosaminoglycan on equine articular cartilage in explant culture. In : *American journal of veterinary research*. octobre 1991. Vol. 52, n° 10, p. 1622-1625.
- CHEN, Faye H, ROUSCHE, Kathleen T et TUAN, Rocky S, 2006a. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. In : *Nature Clinical Practice Rheumatology*. juillet 2006. Vol. 2, n° 7, p. 373-382.
- CHEN, Faye H, ROUSCHE, Kathleen T et TUAN, Rocky S, 2006b. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. In : *Nature Clinical Practice Rheumatology*. juillet 2006. Vol. 2, n° 7, p. 373-382. DOI 10.1038/ncprheum0216.
- CHEVALIER, X. et RICHETTE, P., 2005. Cartilage articulaire normal : anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement. In : *EMC - Rhumatologie-Orthopédie*. 1 janvier 2005. Vol. 2, n° 1, p. 41-58. DOI 10.1016/j.emcrho.2004.10.005.
- CHU, Constance R., SZCZODRY, Michal et BRUNO, Stephen, 2010. Animal Models for Cartilage Regeneration and Repair. In : *Tissue Engineering Part B: Reviews*. février 2010. Vol. 16, n° 1, p. 105-115. DOI 10.1089/ten.teb.2009.0452.
- CLAIR, Benjamin L., JOHNSON, Adam R. et HOWARD, Timothy, 2009. Cartilage Repair: Current and Emerging Options in Treatment. In : *Foot & Ankle Specialist*. août 2009. Vol. 2, n° 4, p. 179-188. DOI 10.1177/1938640009342272.
- CLEGG, Peter D. et PINCHBECK, Gina L., 2011. Evidence-Based Medicine and Stem Cell Therapy: How Do We Know Such Technologies are Safe and Efficacious? In : *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. août 2011. Vol. 27, n° 2, p. 373-382. DOI 10.1016/j.cveq.2011.04.002.

COKELAERE, Stefan, MALDA, Jos et VAN WEEREN, René, 2016. Cartilage defect repair in horses: Current strategies and recent developments in regenerative medicine of the equine joint with emphasis on the surgical approach. In : *The Veterinary Journal*. 1 août 2016. Vol. 214, p. 61-71. DOI 10.1016/j.tvjl.2016.02.005.

COLBATH, Aimée C., FRISBIE, David D., DOW, Steven W., KISIDAY, John D., MCILWRAITH, C. Wayne et GOODRICH, Laurie R., 2017. Equine Models for the Investigation of Mesenchymal Stem Cell Therapies in Orthopaedic Disease. In : *Operative Techniques in Sports Medicine*. 1 mars 2017. Vol. 25, n° 1, p. 41-49. DOI 10.1053/j.otsm.2016.12.007.

DINGLE, J. T., 1993. Prostaglandins in human cartilage metabolism. In : *Journal of lipid mediators*. 1993. Vol. 6, n° 1-3, p. 303-312.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F.C, KRAUSE, D.S., DEANS, R.J., KEATING, A., PROCKOP, D.J. et HORWITZ, E.M., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. In : *Cytotherapy*. 2006. Vol. 8, n° 4, p. 315-317. DOI 10.1080/14653240600855905.

DYCE, Keith M., SACK, Wolfgang O. et WENSING, C. J. G., 2009. *Textbook of Veterinary Anatomy - E-Book*. S.l. : Elsevier Health Sciences. ISBN 978-1-4377-0875-2.

ESPAGNOLLE, Nicolas, GUILLOTON, Fabien, DESCHASEAUX, Frédéric, GADELORGE, Mélanie, SENSÉBÉ, Luc et BOURIN, Philippe, 2014. CD146 expression on mesenchymal stem cells is associated with their vascular smooth muscle commitment. In : *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. janvier 2014. Vol. 18, n° 1, p. 104-114. DOI 10.1111/jcmm.12168.

EYDT, Carina, GEBUREK, Florian, SCHRÖCK, Carmen, HAMBRUCH, Nina, ROHN, Karl, PFARRER, Christiane et STASZYK, Carsten, 2016. Sternal bone marrow derived equine multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs): investigations considering the sampling site and the use of different culture media. In : *Veterinary Medicine and Science*. 2016. Vol. 2, n° 3, p. 200-210. DOI 10.1002/vms3.36.

FORTIER, Lisa A., 2005. Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applications. In : *Veterinary Surgery*. septembre 2005. Vol. 34, n° 5, p. 415-423.

FRIEDENSTEIN, A. J., CHAILAKHJAN, R. K. et LALYKINA, K. S., 1970. THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS. In : *Cell Proliferation*. octobre 1970. Vol. 3, n° 4, p. 393-403. DOI 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x.

FRISBIE, D. D., KAWCAK, C. E., TROTTER, G. W., POWERS, B. E., WALTON, R. M. et MCILWRAITH, C. W., 1997. Effects of triamcinolone acetonide on an in vivo equine osteochondral fragment exercise model. In : *Equine Veterinary Journal*. 1997. Vol. 29, n° 5, p. 349-359. DOI 10.1111/j.2042-3306.1997.tb03138.x.

FRISBIE, D. D. et SMITH, R. K. W., 2009. Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics: Update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. In : *Equine Veterinary Journal*. 14 décembre 2009. Vol. 42, n° 1, p. 86-89.

FRISBIE, D. D., TROTTER, G. W., POWERS, B. E., RODKEY, W. G., STEADMAN, J. R., HOWARD, R. D., PARK, R. D. et MCILWRAITH, C. W., 1999. Arthroscopic Subchondral Bone Plate Microfracture Technique Augments Healing of Large Chondral Defects in the Radial Carpal Bone and Medial Femoral Condyle of Horses. In : *Veterinary Surgery*

[en ligne]. 1 juillet 1999. [Consulté le 10 août 2019]. Disponible à l'adresse : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1053/jvet.1999.0242>.

FRISBIE, David D., 2005. Future Directions in Treatment of Joint Disease in Horses. In : *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. décembre 2005. Vol. 21, n° 3, p. 713-724. DOI 10.1016/j.cveq.2005.07.001.

FRISBIE, David D., KAWCAK, Chris E., MCILWRAITH, C. Wayne et WERP, Natasha M., 2009. Evaluation of polysulfated glycosaminoglycan or sodium hyaluronan administered intra-articularly for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis. In : *American Journal of Veterinary Research*. 1 février 2009. Vol. 70, n° 2, p. 203-209. DOI 10.2460/ajvr.70.2.203.

FRISBIE, David D., KAWCAK, Christopher E. et MCILWRAITH, C. Wayne, 2009. Evaluation of the effect of extracorporeal shock wave treatment on experimentally induced osteoarthritis in middle carpal joints of horses. In : *American Journal of Veterinary Research*. 31 mars 2009. Vol. 70, n° 4, p. 449-454. DOI 10.2460/ajvr.70.4.449.

FRISBIE, David D., MORISSET, Sophie, HO, Charles P., RODKEY, William G., STEADMAN, J. Richard et MCILWRAITH, C. Wayne, 2006. Effects of Calcified Cartilage on Healing of Chondral Defects Treated with Microfracture in Horses. In : *The American Journal of Sports Medicine*. novembre 2006. Vol. 34, n° 11, p. 1824-1831. DOI 10.1177/0363546506289882.

GHOSH, P., ARMSTRONG, S., READ, R., NUMATA, Y., SMITH, S., MCNAIR, P. et MARSHALL, R., 1993. Animal models of early osteoarthritis: their use for the evaluation of potential chondroprotective agents. In : *Agents and actions. Supplements*. 1993. Vol. 39, p. 195-206.

GIANNINI, Sandro, BUDA, Roberto, VANNINI, Francesca, DI CAPRIO, Francesco et GRIGOLO, Brunella, 2008. Arthroscopic Autologous Chondrocyte Implantation in Osteochondral Lesions of the Talus: Surgical Technique and Results. In : *The American Journal of Sports Medicine*. mai 2008. Vol. 36, n° 5, p. 873-880. DOI 10.1177/0363546507312644.

GUGJOO, Mudasar Bashir, AMARPAL, MAKHDOOMI, Dil Mohammad et SHARMA, Gutulla Taru, 2019. Equine Mesenchymal Stem Cells: Properties, Sources, Characterization, and Potential Therapeutic Applications. In : *Journal of Equine Veterinary Science*. janvier 2019. Vol. 72, p. 16-27. DOI 10.1016/j.jevs.2018.10.007.

HUNZIKER, Ernst B et ROSENBERG, Lawrence C, 1996. Repair of Partial-Thickness Defects in Articular Cartilage: Cell Recruitment from the Synovial Membrane. In : *THE JOURNAL OF BONE AND JOINT SURGERY*. 1996. Vol. 78, n° 5, p. 13.

HURTIG, Mark, PEARCE, Simon, WARREN, Stacey, KALRA, Manpreet et MINIACI, Anthony, 2001. Arthroscopic Mosaic Arthroplasty in the Equine Third Carpal Bone. In : *Veterinary Surgery*. 2001. Vol. 30, n° 3, p. 228-239. DOI 10.1053/jvet.2001.23348.

IACONO, Eleonora, MERLO, Barbara, ROMAGNOLI, Noemi, ROSSI, Barbara, RICCI, Francesca et SPADARI, Alessandro, 2015. Equine Bone Marrow and Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells: Cytofluorimetric Characterization, In Vitro Differentiation, and Clinical Application. In : *Journal of Equine Veterinary Science*. 1 février 2015. Vol. 35, n° 2, p. 130-140. DOI 10.1016/j.jevs.2014.12.010.

IBRAHIM, Darian M., 2006. Reduce, Refine, Replace: The Failure of the Three R's and the

Future of Animal Experimentation. In : *University of Chicago Legal Forum*. 2006. Vol. 2006, p. 195.

LITZKE, L.-F., WAGNER, E., BAUMGAERTNER, W., HETZEL, U., JOSIMOVIĆ-ALASEVIĆ, O. et LIBERA, J., 2004. Repair of Extensive Articular Cartilage Defects in Horses by Autologous Chondrocyte Transplantation. In : *Annals of Biomedical Engineering*. 1 janvier 2004. Vol. 32, n° 1, p. 57-69. DOI 10.1023/B:ABME.0000007791.81433.1a.

MAIA, Leandro, LANDIM-ALVARENGA, Fernanda C., DA MOTA, Ligia S. L. Silveira, DE ASSIS GOLIM, Marjorie, LAUFER-AMORIM, René, DE VITA, Bruna, BARBERINI, Danielle Jaqueta, LISTONI, Amanda Jeronimo, DE MORAES, Carolina Nogueira, HECKLER, Marta Cristina Thomas et AMORIM, Rogério Martins, 2013. Immunophenotypic, immunocytochemistry, ultrastructural, and cytogenetic characterization of mesenchymal stem cells from equine bone marrow: Isolation and Characterization of Equine'S MSCs. In : *Microscopy Research and Technique*. juin 2013. Vol. 76, n° 6, p. 618-624.

MARX, Robert E, CARLSON, Eric R, EICHSTAEDT, Ralph M, SCHIMMELE, Steven R, STRAUSS, James E et GEORGEFF, Karen R, 1998. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. In : *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 1 juin 1998. Vol. 85, n° 6, p. 638-646. DOI 10.1016/S1079-2104(98)90029-4.

MCILWRAITH, C Wayne, [sans date]. Management of Joint Disease in the Sport Horse. In : . p. 22.

MEADE, E. A., SMITH, W. L. et DEWITT, D. L., 1993. Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. In : *Journal of Biological Chemistry*. 25 mars 1993. Vol. 268, n° 9, p. 6610-6614.

MORISSET, Sophie, FRISBIE, David D, ROBBINS, Paul D, NIXON, Alan J et MCILWRAITH, C Wayne, 2007. IL-1ra/IGF-1 Gene Therapy Modulates Repair of Microfractured Chondral Defects: In : *Clinical Orthopaedics and Related Research*. septembre 2007. Vol. 462, p. 221-228. DOI 10.1097/BLO.0b013e3180dca05f.

ORTVED, Kyla F. et NIXON, Alan J., 2016. Cell-based cartilage repair strategies in the horse. In : *The Veterinary Journal*. 1 février 2016. Vol. 208, p. 1-12. DOI 10.1016/j.tvjl.2015.10.027.

PACINI, Simone, SPINABELLA, Silvia, TROMBI, Luisa, FAZZI, Rita, GALIMBERTI, Sara, DINI, Francesca, CARLUCCI, Fabio et PETRINI, Mario, 2007. Suspension of Bone Marrow-Derived Undifferentiated Mesenchymal Stromal Cells for Repair of Superficial Digital Flexor Tendon in Race Horses. In : *Tissue Engineering*. décembre 2007. Vol. 13, n° 12, p. 2949-2955. DOI 10.1089/ten.2007.0108.

PEARCE, Simon G., HURTIG, Mark B., BOURE, Ludovic P., RADCLIFFE, Rolfe M. et RICHARDSON, Dean W., 2003. Cylindrical Press-Fit Osteochondral Allografts for Resurfacing the Equine Metatarsophalangeal Joint. In : *Veterinary Surgery*. 2003. Vol. 32, n° 3, p. 220-230. DOI 10.1053/jvet.2003.50032.

PIG, J. H., ISHIHARA, A., WELLMAN, M. L., RUSSELL, D. S. et BERTONE, A. L., 2013. Inflammatory effects of autologous, genetically modified autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. In : *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*. 2013. Vol. 26, n° 06,

p. 453-460. DOI 10.3415/VCOT-13-01-0008.

RADCLIFFE, Catherine H., FLAMINIO, M. Julia B.F. et FORTIER, Lisa A., 2010. Temporal Analysis of Equine Bone Marrow Aspirate During Establishment of Putative Mesenchymal Progenitor Cell Populations. In : *Stem Cells and Development*. février 2010. Vol. 19, n° 2, p. 269-282.

RANERA, B., ORDOVÁS, L., LYAHYAI, J., BERNAL, M. L., FERNANDES, F., REMACHA, A. R., ROMERO, A., VÁZQUEZ, F. J., OSTA, R., CONS, C., VARONA, L., ZARAGOZA, P., MARTÍN-BURRIEL, I. et RODELLAR, C., 2012. Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. In : *Equine Veterinary Journal*. 1 janvier 2012. Vol. 44, n° 1, p. 33-42. DOI 10.1111/j.2042-3306.2010.00353.x.

REDMAN S. N., Oldfield S. F., Archer C. W., 2005. Current strategies for articular cartilage repair. In : *European Cells and Materials*. 14 avril 2005. Vol. 9, p. 23-32. DOI 10.22203/eCM.v009a04.

SCHRÖCK, Carmen, EYDT, Carina, GEBUREK, Florian, KAISER, Lena, PÄBST, Felicitas, BURK, Janina, PFARRER, Christiane et STASZYK, Carsten, 2017. Bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells from horses after euthanasia. In : *Veterinary Medicine and Science*. 2017. Vol. 3, n° 4, p. 239-251. DOI 10.1002/vms3.74.

SETNIKAR, I., PALUMBO, R., CANALI, S. et ZANOLO, G., 1993. Pharmacokinetics of glucosamine in man. In : *Arzneimittel-Forschung*. octobre 1993. Vol. 43, n° 10, p. 1109-1113.

SMITH, R. K. W., KORDA, M., BLUNN, G. W. et GOODSHIP, A. E., 2010. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. In : *Equine Veterinary Journal*. 5 janvier 2010. Vol. 35, n° 1, p. 99-102.

SMITH, Roger KW, GARVICAN, Elaine R et FORTIER, Lisa A, 2014. The current 'state of play' of regenerative medicine in horses: what the horse can tell the human. In : *Regenerative Medicine*. septembre 2014. Vol. 9, n° 5, p. 673-685. DOI 10.2217/rme.14.42.

SOLCHAGA, L, FORRIOL, F et CANADELL, J, [sans date]. Réparation du cartilage articulaire par matériaux biologiques. In : . p. 11.

SOPHIA FOX, Alice J., BEDI, Asheesh et RODEO, Scott A., 2009. The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. In : *Sports Health: A Multidisciplinary Approach*. novembre 2009. Vol. 1, n° 6, p. 461-468. DOI 10.1177/1941738109350438.

STEWART, Allison A., BYRON, Christopher R., PONDENIS, Holly et STEWART, Matthew C., 2007. Effect of fibroblast growth factor-2 on equine mesenchymal stem cell monolayer expansion and chondrogenesis. In : *American Journal of Veterinary Research*. septembre 2007. Vol. 68, n° 9, p. 941-945.

STEWART, Matthew C., 2011. Cell-based Therapies: Current Issues and Future Directions. In : *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. août 2011. Vol. 27, n° 2, p. 393-399.

STEWART, Matthew C. et STEWART, Allison A., 2011. Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Sources, and Mechanisms of Action. In : *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. août 2011. Vol. 27, n° 2, p. 243-261.

TAYLOR, S. E., SMITH, R. K. W. et CLEGG, P. D., 2007. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? In : *Equine Veterinary Journal*. 1 mars 2007. Vol. 39, n° 2, p. 172-180. DOI 10.2746/042516407X180868.

TODHUNTER, R. J., MINOR, R. R., WOOTTON, J. a. M., KROOK, L., BURTON-WURSTER, N. et LUST, G., 1993. Effects of exercise and polysulfated glycosaminoglycan on repair of articular cartilage defects in the equine carpus. In : *Journal of Orthopaedic Research*. 1993. Vol. 11, n° 6, p. 782-795. DOI 10.1002/jor.1100110603.

TSUZUKI, Nao, SEO, Jong-pil, YAMADA, Kazutaka, HANEDA, Shingo, FURUOKA, Hidefumi, TABATA, Yasuhiko et SASAKI, Naoki, 2013. The effect of a gelatin β -tricalcium phosphate sponge loaded with mesenchymal stem cells (MSC), bone morphogenic protein-2, and platelet-rich plasma (PRP) on equine articular cartilage defect. In : *The Canadian Veterinary Journal*. juin 2013. Vol. 54, n° 6, p. 573-580.

VIDAL, Martin A., KILROY, Gail E., JOHNSON, Jill R., LOPEZ, Mandi J., MOORE, Rustin M. et GIMBLE, Jeffrey M., 2006. Cell Growth Characteristics and Differentiation Frequency of Adherent Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells: Adipogenic and Osteogenic Capacity. In : *Veterinary Surgery*. octobre 2006. Vol. 35, n° 7, p. 601-610.

WILKE, Markus M., NYDAM, Daryl V. et NIXON, Alan J., 2007. Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. In : *Journal of Orthopaedic Research*. juillet 2007. Vol. 25, n° 7, p. 913-925. DOI 10.1002/jor.20382.

WORSTER, Allison A, BROWER-TOLAND, Brent D, FORTIER, Lisa A, BENT, Stephen J, WILLIAMS, Janice et NIXON, Alan J, 2001. Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor- β 1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. In : *Journal of Orthopaedic Research*. 2001. p. 12.

YAMANAKA, Shinya, 2012. Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future. In : *Cell Stem Cell*. 14 juin 2012. Vol. 10, n° 6, p. 678-684. DOI 10.1016/j.stem.2012.05.005.

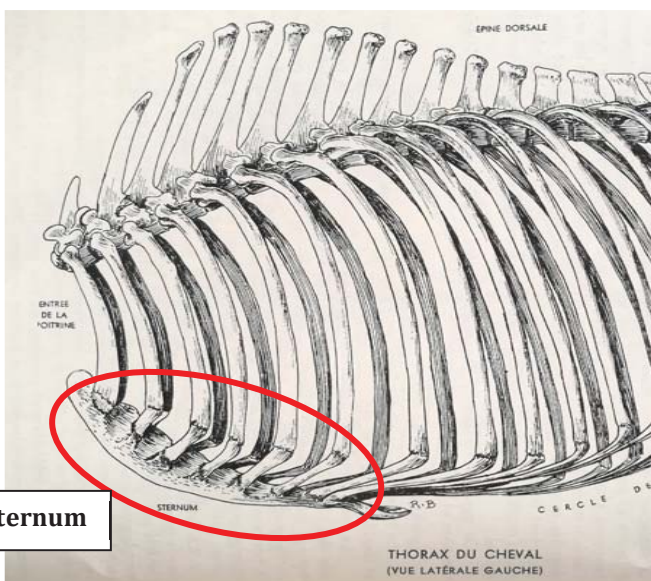
ANNEXES

Annexe 1: Fiche explicative du prélèvement des sternèbres à l'abattoir

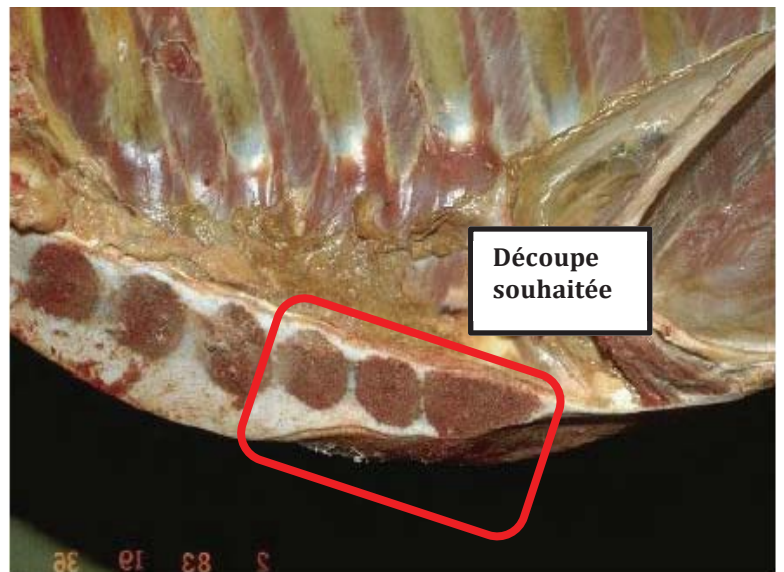
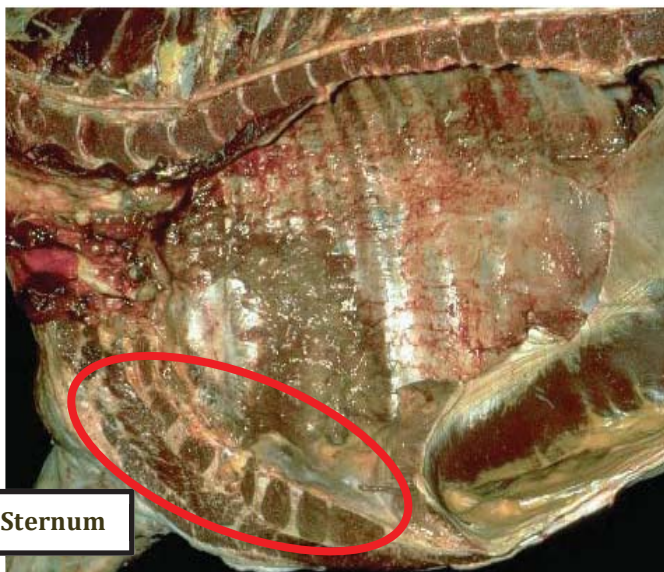
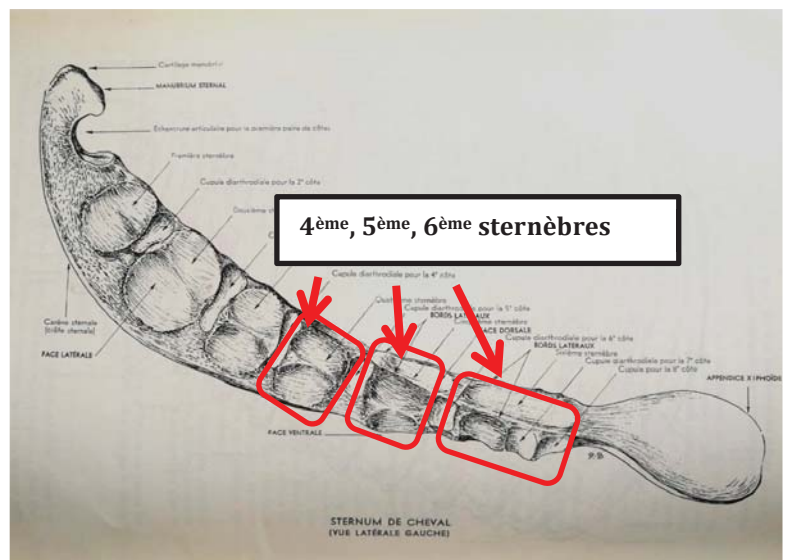
Sternum : partie osseuse en face ventrale du thorax. Les dernières sternèbres peuvent être plus ou moins soudées entre elles en fonction de l'âge de l'animal.

Sternèbres : os composants le sternum, le noyau (centre) est rond chez les chevaux.

OBJECTIF : prélèvement des sternèbres 4-5-6 (les 3 dernières)



Sternum



Annexe 2: Protocole de coloration des CFU-f

A la fin des 11 jours de culture :

- Aspiration du milieu puis rinçage avec 5 mL de PBS
- Séchage pendant 24h minimum

Coloration au kit RAL Stainer MCDh

MCDh = Micro Chromatique Detection for haematology, kit pour la coloration de frottis sanguins et médullaires

Cette coloration utilise successivement 4 réactifs :

- MCDh 1 : Fixation des cellules par un mélange d'alcool éthylique et de colorants neutres préparant la coloration des granulations basophiles.
- MCDh 2 : Solution permettant la libération des colorants neutres et la coloration des hématies, du cytoplasme des granulocytes neutrophiles et des granulations éosinophiliques.
- MCDh 3 : Solution aqueuse de couleur bleue permettant la coloration du cytoplasme des monocytes et des lymphocytes et la coloration des granulations azurophiles en rouge (de métachromasie).
- MCDh 4 : Solution permettant l'élimination de l'excès de colorant par l'action d'agents de rinçage. Veiller à réaliser une dilution à 12,5% avec de l'eau distillée avant son utilisation.

Mode opératoire

Pour une flasque T25 _ Ajout et retrait des 4 réactifs suivant ces étapes :

- 3 mL de MCDh 1 : 7 minutes sans agitation
- 3 mL de MCDh 2 : 3 minutes avec agitation
- 3 mL de MCDh 2 : 30 secondes avec agitation
- 3 mL de MCDh 3 : 30 secondes avec agitation
- 3 mL de MCDh 4 : 10 secondes avec agitation

Séchage de la flasque pendant au moins 24h avant le comptage.

Annexe 3: Protocole de prélèvement et de mise en culture des CSM équine

Extraction des CSM à partir d'un sternum de cheval

- Préparer le champ de travail : champ stérile, compresses stériles, éthanol, curette
- Décongeler 1 tube de dispase et un tube de collagénase NB4
- Gratter l'os spongieux avec la curette
- Mettre 25 mL de prélèvement/tube Falcon de 50 ml + 30 ml MEM α -1%ASP + 1 ml Dispase + 1 ml Collagénase
- Fermer le/les tubes de manière étanche avec du parafilm®
- Réserver une nuit à 4°C
- Nettoyer la curette en suivant les instructions de nettoyage

Le lendemain :

- Laisser digérer au bain-marie sous agitation à 37°C pendant 2h (agiter manuellement toutes les 45 min)
- Récupérer le surnageant et filtrer à 100 μ m (filtre jaune)
- Laver le culot osseux avec du PBS et le rajouter au surnageant après filtration
- Centrifuger à 1500 rpm 5 min
- Resuspendre le culot dans 20 ml de PBS
- (si présence d'agrégats, traiter à la DNase _ 4°C, PULMOZYME 100 μ L/20.10⁶ c/ml)
- Déposer les 20 ml de la solution sur 15 ml de Ficoll®
- Centrifuger à 1200 rpm 25 min, accélération 9, frein 4, 4°C
- Récupérer la phase PBMC, la mettre dans un autre tube falcon de 50, ajouter 20 ml de PBS
- Centrifuger à 1500 rpm 5 min
- Récupérer le culot et le rincer à nouveau avec 30 ml de PBS
- Centrifuger à 1500 rpm 5 min
- Récupérer le culot et le resuspendre dans 20 ml de milieu de culture

Comptage au bleu de Trypan

- Réaliser une dilution au 10^{ème} (450 µl de bleu + 50 µl de solution) ou au 100^{ème} (4500 µl de bleu + 50 µl de solution)
- Compter sur la lame de Malassez

Changement de milieu

Attendre 4-5 jours puis changer les milieux 2 fois par semaine.

Si débris, rincer avec du PBS et changer le milieu plus régulièrement.

Temps de culture moyen pour atteindre 80 % de confluence :

CFU : 11 jours

T600 : 14 jours

Trypsination

- Aspirer et jeter le milieu de culture
- Laver au PBS sans décoller les cellules
- Ajouter de la trypsine à 0,05 % (5 ml pour F25, 8 ml pour une F150, 32 ml pour T600), laisser reposer 5 minutes à 37°C
- Agiter/taper sur la boîte pour décoller les cellules
- Ajouter 20 ml de milieu de culture
- Décoller les cellules en faisant des allers-retours avec une pipette
- Aspirer le contenu et le placer dans un tube falcon 50 ml
- Centrifuger 1500 rpm pendant 5 min
- Retirer le surnageant
- Resuspendre dans 20 ml de PBS
- Compter sur cellule de Malassez

Congélation

- Solution de congélation : SVF 10 % DMSO
- Centrifuger la solution 1500 rpm 5 min
- Aspirer le surnageant, resuspendre le culot avec la solution de congélation
→ aller doucement et agiter au fur et à mesure

- Répartir 1 ml dans chaque ampoule et courir au congélateur -80°C

Décongélation

- Solution de décongélation : 10 ml PBS
- Décongeler le cryotube au bain-marie à 37°C jusqu'au dernier glaçon (et sans immerger le bouchon)
- Mettre 1 ml de solution dans la décongélation dans le cryotube au goutte à goutte en agitant bien le tube
- Transférer le contenu du cryotube dans la solution de décongélation au goutte à goutte, bien homogénéiser
- Centrifuger 1500 rpm 5 min
- Aspirer le surnageant
- Resuspendre le culot dans le milieu de culture
- Réaliser un comptage au bleu de Trypan
- Ensemencer

Annexe 4: Protocoles de différenciation utilisés en culture humaine

Différenciation ostéoblastique

Une des caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses est leur pluripotentialité et notamment leur capacité à se différencier en ostéoblastes. Pour induire cette différenciation, les cellules sont cultivées pendant 21 jours en milieu approprié avec deux changements de milieu par semaine. La différenciation est mise en évidence par 2 phénomènes : une augmentation de l'activité phosphatase alcaline des cellules (en plaque 96 puits) et une minéralisation de la matrice extracellulaire des cellules (en plaque 6 puits). Le milieu de différenciation est le même pour les deux types de mise en évidence, à une exception près : la minéralisation nécessite en plus un ajout de phosphate dans le milieu sous forme de phosphate inorganique pendant les 14 premiers jours de différenciation et sous forme de β Glycérophosphate pendant les 7 derniers jours de différenciation.

Matériel

MEM α : Gibco, ref : 22561.021

SVF: Hyclone, Perbio, ref :CH30160.03

Ciprofloxacine 200X

Dexaméthasone

Acide ascorbique: Sigma, ref: A8960

Phosphate inorganique: Sodium Phosphate Monobasic, Sigma, ref: S5011

β Glycérophosphate: Glycérol-2-phosphate Disodium Salt hydrate, Sigma, ref: G9891

Plaque 6 puits

Plaque 96 puits noires (pour lecture en fluorescence)

Ensemencement des cellules en plaque (plaque 6 et 96 puits)

Pour chaque échantillon, ensemercer :

- 16 puits de plaque 96 puits **NOIRE** avec 1600 cellules/ puits en MES (= 2 colonnes de plaques 96 puits) (5000 cellules/cm², 100 μ l/ puits)
- 3 puits de plaques 6 puits avec 45000 cellules/ puits en MES (5000 cellules/cm², 2ml/ puits)

Différenciation des cellules en ostéoblastes

Dès que les cellules ont adhéré (environ 24 heures après l'ensemencement), le milieu est changé et remplacé par du MES (Témoins négatifs) ou du milieu de différenciation (puits positifs).

1- Préparation extemporanée du milieu de différenciation « OS » à chaque changement de milieu

Remarque : Il faut utiliser du MES neuf à chaque changement de milieu pour éviter les problèmes de pH.

Volume à préparer : $V = (\text{nb d'échantillons} \times 2,8) + 2 = \dots\dots\dots \text{ml}$

Préparation du milieu de différenciation OS :

Milieu MES (MEM α , 10% SVF, 0,5% ciprofloxacine) avec les suppléments suivants :

- Dexaméthasone 100 nM (solution mère à 10 μ M à diluer au 1/100^e)
- Acide ascorbique à 50 μ M (solution mère à 5mM à diluer au 1/100^e).

2- Répartition du milieu de différenciation dans les puits de **plaque 96 puits**

(culture de 21 jours avec des changements de milieu 2 fois par semaine)

Plaques 96 puits

(dans le but de mettre en évidence **l'activité phosphatase alcaline**)

- Puits témoins (8 puits/ échantillon = 2 demi-colonnes): les cellules sont remises en milieu MES (100 μ l/ puits).
- Puits positifs (8 puits/ échantillon = 2 demi-colonnes): les cellules sont mises en milieu de différenciation « OS».

3- Répartition du milieu de différenciation dans les puits de **plaque 6 puits**

(culture de 21 jours avec des changements de milieu 2 fois par semaine)

La culture de 21 jours est découpée en 2 parties :

- 1 première de 14 jours avec du milieu OS + Phosphate inorganique
- 1 seconde de 7 jours avec du milieu OS + β Glycérophosphate

- Préparation d'une solution de Phosphate inorganique à 300 mM

(pour les changements de milieu correspondant aux 14 premiers jours de culture)

(La solution peut être conservée plusieurs mois et est déjà prête à + 4°C)

Dissoudre la poudre dans de l'eau distillée : $m = 0,3 \times V(L) \times 119,98 = \dots\dots\dots g$

Filter la solution avec un filtre à 0,2 μ m pour la stériliser.

- Préparation extemporanée d'une solution de β Glycérophosphate à 50mg/ml (=

231,4 mM) (pour les changements de milieu correspondant aux 7 derniers jours de culture)

Volume à préparer = (nb d'échantillons x 0,0869) + 1,5 = $\dots\dots\dots$ ml

Dissoudre la poudre dans de l'eau distillée.

Filter la solution avec un filtre à 0,2 μ m pour la stériliser.

Plaques 6 puits

(dans le but de mettre en évidence **la minéralisation de la matrice extracellulaire**)

La mise en évidence de la minéralisation nécessite de faire 3 puits : 2 puits T- et 1 puits positif :

- Puits témoin (1 puits/ échantillon) :
les cellules sont remises en milieu MES (2ml/ puits)
- Puits témoin + Pi / β Glycérophosphate (1 puits/ échantillon) :

les cellules sont remises en MES auquel on ajoute :
20 μ l / puits de solution de Phosphate inorganique 300mM pendant les 14 premiers jours de différenciation (milieu final à 3mM)

ou 86,9 μ l / puits de solution de β Glycérophosphate préparée extemporanément pendant les 7 derniers jours de différenciation (milieu final à 10mM)

- Puits positif (1 puits/ échantillon):

les cellules sont mises en milieu de différenciation « OS » auquel on ajoute :

20 μ l / puits de solution de Phosphate inorganique pendant les 14 premiers jours

86,9 μ l / puits de solution de β Glycérophosphate préparée extemporanément pendant les 7 derniers jours

A partir de la mise en milieu de différenciation, les cellules sont cultivées pendant 21 jours avec 2 changements de milieu par semaine.

Au terme de ces 21 jours :

- l'activité phosphatase alcaline des cellules différenciées sera mise en évidence et quantifiée par l'Attophos

- la minéralisation de la matrice extracellulaire des cellules différenciées sera mise en évidence et quantifiée par coloration avec le rouge d'alizarine

Différenciation adipocytaire

Une des caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses est leur pluripotentialité et notamment leur capacité à se différencier en adipocytes. Pour induire cette différenciation, les cellules sont cultivées pendant 21 jours en milieu approprié avec des changements de milieu 2 fois par semaine.

Matériel :

MEM α : Gibco, ref : 22561.021

SVF: Hyclone, Perbio, ref :CH30160.03

Ciprofloxacine 200X

Dexaméthasone

IsoButyl MethylXanthine (IBMX): Sigma, ref: I5879

Indométhacine: Sigma, ref: I7378

Plaque 4 puits ou 24 puits: Nunc, ref: 176740 ou 142475

Composition du milieu de différenciation adipocytaire (milieu AD)

Milieu MES (MEM α , 10% SVF, 0.5% ciprofloxacine) avec les suppléments suivants :

- Dexaméthasone 1 μ M (solution mère à 1mM à diluer au 1/1000è)
- IBMX 0,45 mM (solution mère à 50mM à diluer au 1/111è).
- Indométhacine 60 μ M (solution mère à 100 mM à diluer au 1/1666è)

Ensemencement des cellules en plaque 24 puits ou en F25

Ensemencer les cellules à 2.10^4 cellules/ cm^2 en milieu standard.

Différenciation des cellules en adipocytes

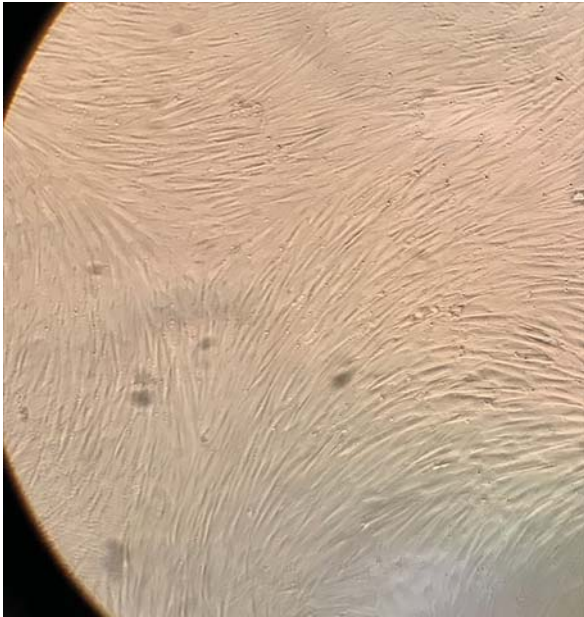
Le lendemain (à environ 80% de confluence), le milieu est changé :

- **T- MES** : les cellules sont remises en milieu MES
- **Diff**: les cellules sont mises en milieu de différenciation « AD ».

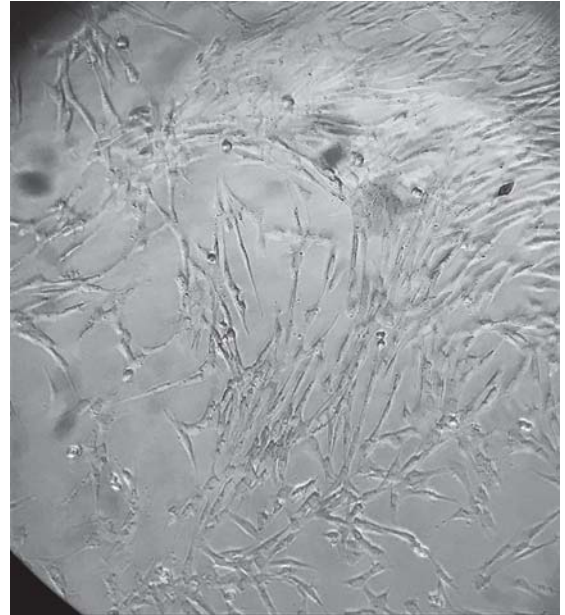
A partir de la mise en milieu de différenciation, les cellules sont cultivées pendant 21 jours avec 2 changements de milieu par semaine

Au terme de ces 21 jours, les cellules peuvent être colorées (cf protocole coloration Nile Red ou Oil Red O) ou utilisées pour extraire les ARN totaux et quantifier les gènes de diff AD.

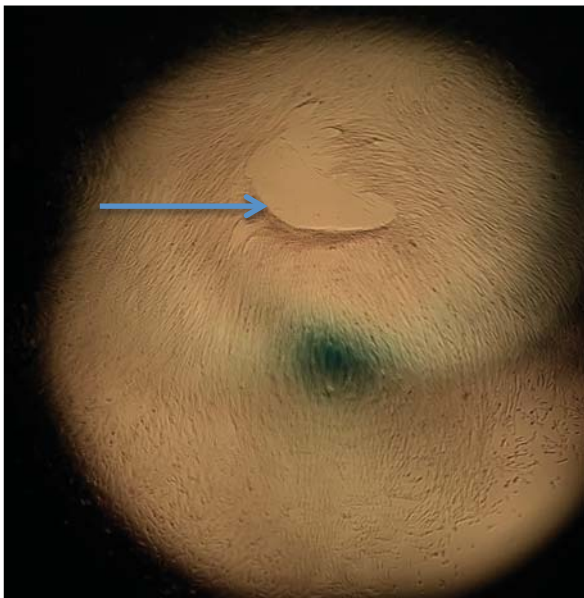
Annexe 5: Photographies des cultures cellulaires



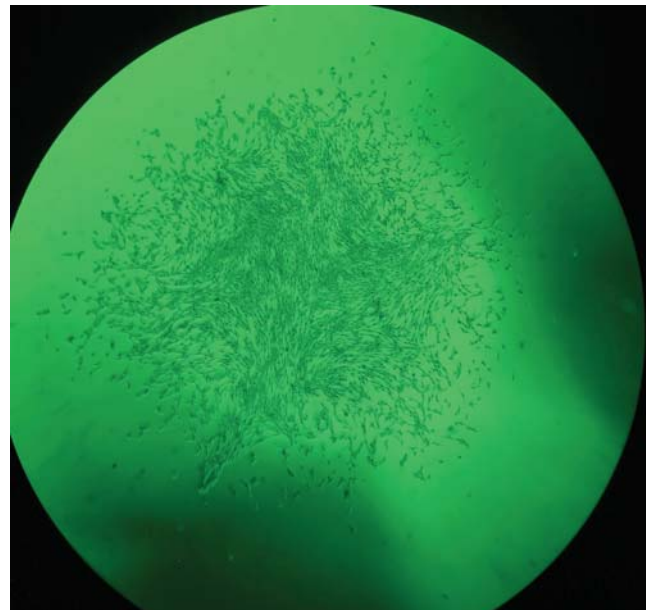
CV1 : Photographie des cellules en MEM α à P0 après 10 jours de culture. (x100)
Cellules fusiformes et adhérentes au plastique.



CV2 : Photographie des cellules en DMEM F12 en primo-culture après 9 jours de culture. (x100)
Cellules fusiformes et adhérentes au plastique.



CV2 : Photographie des cellules en MEM α en primo-culture après 12 jours de culture. (x40)
La densité cellulaire est tellement importante qu'une zone de décollement est observée (indiquée par la flèche).



CV2 : Photographie des cellules en MEM α après 10 jours de culture. (x40)
Nous observons une CFU : colonie circulaire de plus de 50 cellules formée à partir d'un progéniteur.



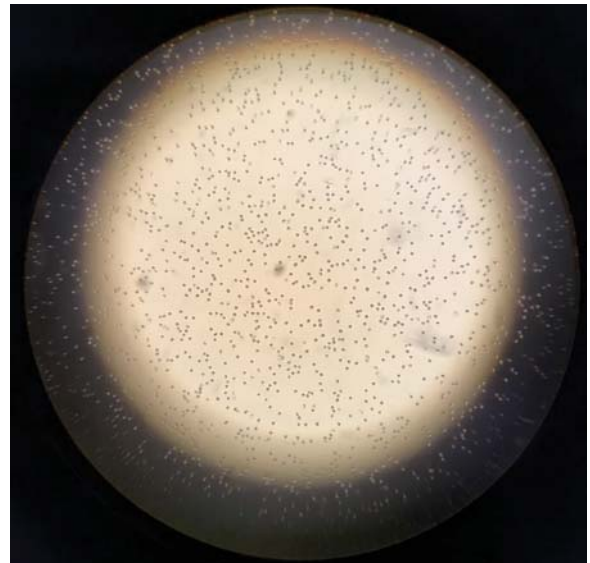
CV2 : Photographie des cellules en MEM α en P0 après 1 jour de culture. (x100)
Peu de cellules fusiformes sont observées.



CV2 : Photographie des cellules en MEM α en P0 après 4 jours de culture. (x100)
Les cellules s'allongent et la densité augmente.



CV3 : Photographie des cellules en MEM α en primo-culture après 2 jours de culture. (x100)
Deux CSM sont présentes et entourées en rouge.
Les autres cellules sont principalement des érythrocytes qui seront éliminées après rinçage.



CV1 : Photographie des cellules en DMEM F12 en primo-culture après 5 jours de culture. (x40)
Aucune CSM n'est visible.

Annexe 6: Références des milieux utilisés

Produit	Composition	Référence	Numéro de lot	Fournisseur
Milieu de séparation des lymphocytes	Densité 1,077+/-0,001	CMSMSL01-01	893523	Eurobio
MEM alpha medium	Ribonucleosides [-] Desoxyribonucleosides [-]	22561-021 322561-029	2007953 2010414	Gibco (life technologies)
DMEM/F12 (1 :1)	D-Glucose 4,5 g/L [+] L-Glutamine [+] HEPES 25 mM [+]	31330-038	1791385	Gibco (life technologies)
DPBS (Dulbecco's PBS)	CaCl ₂ [-] MgCl ₂ [-]	14190-094	2007851	Gibco (life technologies)
SVF		10270-106	42Q2771K	
0,05% Trypsine-EDTA		25300-054	2009469	Gibco (life technologies)

Solution antibiotique et antifongique utilisée : ASP (Invitrogen)

- Amphotéricine 0,25 µg/ml
- Streptomycine 100 µg/ml
- Pénicilline 100 U/ml

Annexe 7: Références des flasques utilisées


Désignation	Nombre de cm ²	référence	Numéro de lot	fournisseur
F25	25	90025	20120485	TRP
F75	75	90075	20110392	TRP
F150	150			TRP
T600	600	PFHYS0616	R6KA85842	Millicell® HY FLASK

AGREMENT SCIENTIFIQUE

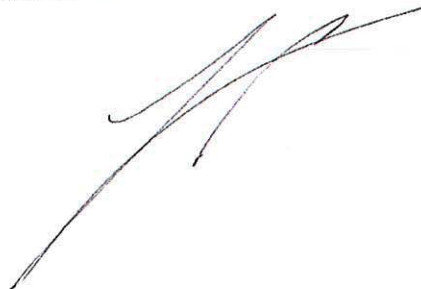
En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Isabelle RAYMOND, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de Catherine BROCHARD intitulée « Caractérisation des cellules stromales mésenchymateuses équines dérivées de moelle osseuse – partie 1 » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 08/10/2019
Professeure Isabelle RAYMOND
Enseignant-chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Jean-Christophe PAGES



Mme Catherine BROCHARD
a été admis(e) sur concours en : 2014
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 18/07/2018
a validé son année d'approfondissement le : 16/07/2019
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Vu :
Le Directeur par intérim de l'Ecole
Nationale Vétérinaire de Toulouse
Frédéric BOUSQUET

Par délégation,

Caroline LACROUX
Directrice de l'enseignement
et de la vie étudiante

Vu et autorisation de l'impression :
Présidente de l'Université Paul Sabatier
Madame Régine ANDRE-OBRECHT

La Présidente de l'Université Paul Sabatier,
par délégation,
Le Vice-Président de la CEVU
Richard GUILLET

NOM : BROCHARD

PRENOM : Catherine

TITRE : CARACTERISATION DES CELLULES STROMALES MESENCHYMATEUSES EQUINES DERIVEES DE MOELLE OSSEUSE – PARTIE 1

RESUME : En médecine équine, la gestion des lésions affectant le cartilage articulaire n'est pas entièrement satisfaisante. Il en résulte en effet la formation d'un tissu cicatriciel dont les propriétés biologiques et biomécaniques ne permettent pas une récupération fonctionnelle optimale. La thérapie cellulaire consistant à injecter des cellules stromales mésenchymateuses semble être une option intéressante bien que les mécanismes d'action ne soient pas entièrement élucidés. Cette étude porte sur la mise au point d'un protocole de prélèvement et de mise en culture de cellules stromales mésenchymateuses équines dérivées de moelle osseuse au sein du laboratoire StromaLab. Le protocole mis en place utilise des cellules récupérées par grattage de sternums issus d'un abattoir. Le milieu de culture choisi se compose de α MEM supplémenté à 10% en sérum de veau fœtal et à 1% d'une solution antibiotique. La prolifération des cellules et leur capacité à supporter les processus de congélation et décongélation nous permet d'envisager une utilisation de celles-ci en thérapie allogénique par la constitution d'une banque de cellules. Il conviendra d'étudier leur capacité à se différencier dans les lignées ostéoblastique, adypocytaire et surtout chondroblastique, mais également leurs propriétés immunomodulatrices.

MOTS-CLES : Cellules stromales mésenchymateuses, équine, thérapie cellulaire, lésion cartilagineuse, culture cellulaire, prolifération

.....

ABSTRACT : The management of lesions affecting articular cartilage is not entirely satisfactory in equine medicine. These lesions result in the formation of scar tissue whose biological and biomechanical properties do not allow optimal functional recovery. Cell therapy involving the injection of mesenchymal stromal cells appears to be an attractive option although the mechanisms of action are not yet fully understood. This study focuses on the development of a protocol for harvesting and culturing equine mesenchymal stromal cells derived from bone marrow in the StromaLab laboratory. The protocol established uses cells recovered by scraping sternums provided by a slaughterhouse. The chosen culture medium is composed of α MEM supplemented with 10% of fetal bovine serum and 1% of an antibiotic solution. The proliferation of these cells and their ability to tolerate the freezing and thawing process allows us to consider their usage in allogenic therapy by the constitution of a cell bank. Their ability to differentiate in the osteogenic, adipogenic and especially the chondroblastic lineaments, but also their immunomodulatory properties, should be studied.

KEYWORDS : Mesenchymal stem cells, horse, cell therapy, cartilage damage, cell culture, proliferation