

---

## **Que penser de l'autorisation de mise sur le marché par l'Agence européenne des médicaments d'injections à base de cellules souches pour traiter l'arthrose chez les équidés ?**

**Auteur :** Ghekiere, Julie

**Promoteur(s) :** Gabriel, Annick

**Faculté :** Faculté de Médecine Vétérinaire

**Diplôme :** Master en médecine vétérinaire

**Année académique :** 2021-2022

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/14978>

---

*Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

**Que penser de l'autorisation de mise sur le marché  
par l'Agence européenne des médicaments de  
médicaments à base de cellules souches pour traiter  
l'arthrose chez les équidés ?**

*What about the European Medicines Agency's authorization of  
the marketing of stem cell medicines to treat osteoarthritis in  
equidae?*

**Julie Ghekiere**

**Travail de fin d'études  
présenté en vue de l'obtention du grade de Médecin  
Vétérinaire**

**ANNÉE ACADÉMIQUE 2021/2022**

**Le contenu de ce travail n'engage que son auteur**

**Que penser de l'autorisation de mise sur le marché  
par l'Agence européenne des médicaments  
d'injections à base de cellules souches pour traiter  
l'arthrose chez les équidés ?**

*What about the European Medicines Agency's authorization of  
the marketing of stem cell injections to treat osteoarthritis in  
equidae?*

**Julie Ghekiere  
Tuteur: Professeure Annick Gabriel**

**Travail de fin d'études  
présenté en vue de l'obtention du grade de Médecin  
Vétérinaire**

**ANNÉE ACADÉMIQUE 2021/2022**

**Le contenu de ce travail n'engage que son auteur**

# **Que penser de l'autorisation de mise sur le marché par l'Agence européenne des médicaments d'injections à base de cellules souches pour traiter l'arthrose chez les équidés ?**

**OBJECTIF DU TRAVAIL:** Évaluation de l'efficacité de l'utilisation de médicaments à base de cellules souches dans le traitement de l'arthrose chez les équidés

## **RESUME**

L'ostéoarthrose chez le cheval est une pathologie importante qui peut pénaliser le pronostic sportif de celui-ci, les enjeux économiques sont donc importants. C'est une maladie dégénérative qui touche principalement le cartilage articulaire. Les causes sont multiples et aboutissent toutes à un état inflammatoire délétère pour l'articulation. Les traitements principaux reposent sur une action anti-inflammatoire afin de limiter l'installation d'un cercle vicieux où la dégénérescence des chondrocytes entretient l'inflammation. Cependant ces anti-inflammatoires ont de nombreux effets indésirables et n'interviennent pas au niveau de la régénération du cartilage. De nombreux autres traitements ont alors vu le jour dans l'espoir de diminuer ces effets indésirables et de promouvoir cette régénération. Cependant, il manque encore d'études standardisées in vivo afin de conclure sur ces traitements. Parmi eux on peut trouver l'utilisation de cellules souches. Ce sont des cellules indifférenciées capables de se diviser afin de donner des cellules spécialisées ou bien de s'auto-renouveler. Elles ont d'abord été utilisées dans le but de les différencier en chondrocytes qui pourraient alors s'intégrer dans la matrice extracellulaire afin de régénérer celle-ci. Cependant les études in vivo démontrent plus que c'est ici encore l'effet immuno-modulateur et anti-inflammatoire qui sont bénéfiques. Des études sont en cours afin de créer des greffons de cartilage qui auraient été cultivés in vitro grâce à ces cellules souches différenciées. Cette technique semble prometteuse pour l'avenir.

***What about the European Medicines Agency's authorization of the marketing of stem cell injections to treat osteoarthritis in equidae?***

**AIM OF THE WORK**

**SUMMARY**

# Remerciements

# Table des matières

1. L'arthrose
  - 1.1 Anatomie et histologie de l'articulation
  - 1.2 La dégénérescence du cartilage
    - 1.2.1 Les causes
    - 1.2.2 Physiopathologie
  - 1.3 Traitements
  
2. Les cellules souches
  - 2.1 Origines et utilisation thérapeutique
  - 2.2 Différentiations
  - 2.3 Effets thérapeutiques
  
3. Études des différents médicaments à base de cellules souches disponibles sur le marché européen
  - 3.1 Arti-Cell Forte
  - 3.2 Horstem

## 1. L'arthrose

### 1.1 Anatomie et histologie de l'articulation

Une articulation a pour rôle de faire la jonction entre deux os afin de permettre leurs mouvements sans qu'ils ne s'abîment, grâce à une bonne transmission des forces. On distingue les diarthroses: articulations mobiles, des synarthrose où le mouvement est limité. Le squelette est majoritairement composé de diarthroses qui s'organisent en articulation dites synoviales. Ces synoviales sont composées de cartilage articulaire, de membrane synoviale et son fluide, d'os sous chondral et de ligaments.

L'arthrose touche plus particulièrement le cartilage articulaire. Il fait partie des cartilages de type hyalin. L'unique type cellulaire que l'on peut retrouver dans le cartilage est le chondrocyte. Il fabrique la MEC composée à 70% d'eau et en matière sèche à 50% de collagène, 35% de protéoglycanes, 10% de glycoprotéines, 3% de minéraux, 1% de lipides et 1% de substance micellaires.

Le collagène est ici représenté en majorité par du collagène de type 2 c'est à dire un trimer de 3 molécules identiques de collagène alpha 1.

Les proteoglycanes sont des associations de protéines et de glucosaminoglycane. Ceux présents en plus grande quantité dans le cartilage sont les aggrecanes. Grâce à la charge négative portée par les GAGs ils ont un fort pouvoir hydrophile ce qui leurs permet de retenir les molécules d'eau et donc de résister aux forces de compressions. Les aggrecanes peuvent aussi s'assembler autour d'une molécule d'acide hyaluronique afin de former un complexe stable.

Ce cartilage s'organise en différentes couches. Premièrement il y a la zone superficielle composée de chondrocytes de forme ovales positionnés entre des fibres de collagène parallèles entre elles et qui s'opposent aux frottements et assurent la résistance aux forces de cisaillement. Par la suite il y a la zone intermédiaire composée de chondrocytes plus ronds cette fois et repartis de manière plus éparse entre des fibres de collagène orientés de manière oblique et de diamètre plus important. Enfin il y a la zone profonde où les fibres de collagène ont une orientation perpendiculaire à la surface et s'opposent aux forces de compression.

Le cartilage n'est ni vascularisé ni innervé il dépend donc du phénomène de diffusion pour lui apporter les nutriments nécessaires. De plus, les chondrocytes des couches plus proche des sont moins sensibles au manque d'oxygène.

Une couche de cartilage calcifié relie le cartilage articulaire de l'os sous-chondrale. Au contraire du cartilage celui-ci est innervé et vascularisé . Dans certains cas il peut aussi être touché par l'ostéoartrrose.

La membrane synoviale est composée d'une intima et d'une subintima. La subintima contient du tissu fibreux et graisseux. Elle est très bien vascularisée et innervée. L'intima contient plusieurs types cellulaires différents: les synoviocytes de type A spécialisés dans la phagocytose et les synoviocytes de type B spécialisés dans la sécrétion de protéines. Ces cellules participent activement à l'équilibre métabolique au sein de l'articulation. Elles régulent aussi la composition du liquide synovial, en produisant certains composant comme l'acide hyaluronique mais aussi en agissant comme filtre au niveau de l'endothelium de la subintima qui ne laisse passer que des molécules de moins de 10 kDa comme le glucose ou l'oxygène. ( David D. et al, 2019)

## 1.2 La dégénérescence du cartilage

### 1.2.1 Causes

Les causes de la dégénérescence du cartilage sont nombreuses et variées.

En effet on peut différencier dans un premier temps une dégénérescence causée par un problème intrinsèque à l'articulation. Par exemple plusieurs articles ont démontré que l'âge des individus influençait la qualité du cartilage et prédisposait à l'osteoarthrose. En effet les chondrocytes sénescents sont moins apte à produire une matrice extracellulaire homogène. ( Martin JA and Buckwalter JA, 2003 ) ( Sacitharan PK, 2019 ). L'alimentation a aussi un rôle à jouer dans la qualité du cartilage. En effet certaines carences en vitamines et minéraux peuvent être délétères à la formation d'un cartilage de qualité. ( Messina OD et al, 2019 ). De plus certains compléments comme le collagène de type 2 dénaturé peuvent même être utilisé afin de diminuer la douleur chez des chevaux arthrosique. ( Gencoglu H et al, 2020 )

On a aussi des causes extrinsèques c'est à dire des des forces trop importantes ou mal répartie qui s'appliquent sur un cartilage sain. Par exemple on retrouve les affections ostéo-chondrales juvéniles comme les OCD qui peuvent créer des lésions lors des contacts avec le cartilage en regards. [ Lélia Bertoni et al. , 2020 ]. En cas de lésions ou rupture ligamentaires ou tendineuses stabilisant l'articulation chez un modèle murin on induit aussi des lésions cartilagineuses. [ Lorenz J et al., 2014 ]. Lors d'exercice intense ou de mouvements répéter on fragilise aussi le cartilage articulaire. [

Caron J.P, 2003 ]. De même de mauvais aplomb ou une ferrure non adaptée modifient la répartition des forces de pression et donc induisent de l'ostéoarthrose. [ Lejeune J.P. et al., 2006 ]

Plusieurs études ont aussi montrer une relation entre la présence d'osteoarthrose et la présence de lésions au niveau de l'os sous chondral, faisant l'hypothèse que cet os sous chondral pourrait jouer un rôle dans la formation de cette pathologie. ( Cruz AM et al., 2008 ) (Lacourt M et al., 2012)

### 1.2.2 Physiopathologie

Les facteurs déclenchant l'ostéoarthrite sont nombreux et induisent un stress ressenti par les chondrocytes. Ceci se traduit par un déséquilibre entre synthèse et dégradation du cartilage.

Dans un premier temps, on aura une réponse anabolisme pour tenter de réparer le cartilage. Les chondrocytes vont sécréter des facteurs de croissance comme le « transforming growth factor » TGF-beta, l' « insulin like growth factor » IGF-1, ou encore le « basic fibroblast derived growth factor » bFGF . On va donc avoir une multiplication de chondrocytes mitotiques en cluster qui vont produire plus de protéoglycanes et de fibres de collagène de petite taille. Le cartilage se voit ramolli par hydratation en plus d'une perte de parallélisme des fibres de collagène ce qui favorise l'apparition de fissures ou d'ostéophytes. Les chondrocytes vont finir par se transformer en fibrochondrocytes produisant du collagène de type 1 puis vont mourir par apoptose. Ainsi, la MEC devient une matrice fibro-cartilagineuse perdant son pouvoir hydrophile et plus sensible aux contraintes mécaniques. ( Henrotin Y and Reginster JY,1999 )

Les fissures ou les ostéophytes peuvent libérer des fragments de cartilage dans le liquide synovial qui vont provoquer une inflammation de la membrane synoviale. En réponse à cette inflammation, cette membrane ainsi que les chondrocytes et les osteocytes de l'os sous chondral vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  qui agissent en synergie. Ces cytokines vont inhiber la synthèse des composants de la matrice extracellulaire et stimuler la production de métalloprotéases ( surtout la MMP13) ou de PGE2 via l'expression de la PA2 et la COX2.

L'IL1beta stimule aussi la production de monoxyde d'azote qui va entraîner l'apoptose des chondrocytes. Cette cytokine un antagoniste: le IL1Ra mais qui est lui même inhibé par le NO et qui est produit en quantité insuffisante pour contrecarrer la production d'IL1beta lors des crises.

Tous ces médiateurs pro-inflammatoires augmentent la dégradation du cartilage et donc la libération de fragments. C'est ainsi que s'installe un cercle vicieux d'auto-entretien de l'inflammation. ( Laadhar L et al., 2007 )

Les nocicepteurs se retrouvent majoritairement au niveau des ligaments et tendons entourant l'articulation mais aussi dans la membrane synoviale et l'os sous chondral. Ainsi, c'est

l'inflammation de ces éléments qui sera perçue comme douloureuse et provoquera la boiterie chez le cheval. ( David D. et al. 2019)

### 1.3 Traitements

Les traitements les plus couramment utilisés visent en premier lieu à réduire l'inflammation et donc la boiterie. Certains sont utilisés depuis de nombreuses années comme les AINS per os ou par voie parentérale qui permettent d'inhiber la COX2 responsable de la fabrication de PGE2 mais inhibe aussi la COX1 ce qui peut causer une toxicité gastrique et rénale . ( Whitfield-Cargile CM et al., 2021) ( Raidal SL et al, 2014 ). De plus des études ont montré que certains AINS comme le phenylbutazone et le meloxicam pouvaient causer une apoptose des chondrocytes et donc être délétère au cartilage. Cependant les scientifiques ont trouvé une molécule permettant de contrecarrer cette apoptose: un inhibiteur de la sEH soluble epoxide hydrolase ( Walters B et al., 2022 ) ( Tucker L et al., 2021 ).

Différentes molécules ont vu le jour pour essayer d'être plus sélectif au niveau de l'inhibition des COX afin de limiter ces effets indésirables. Chez le cheval on retrouve principalement le phenylbutazone qui est un AINS non sélectif efficace et bon marché mais dont il faut faire attention au surdosage et il est interdit pour les animaux non exclu de la chaîne alimentaire. (Goodrich LR and Nixon AJ, 2006) . Le méloxicam est quand à lui un AINS avec une activité préférentielle vis-à-vis de la COX 2. Des études ont montré que cette molécule était moins néfaste pour la muqueuse gastrique que le phenylbutazone ( D'Arcy-Moskwa E et al, 2012 ) mais en ce qui concerne la toxicité rénale peu de différence significative ont été démontrée. (Raidal SL et al., 2014). D'autres AINS comme la flunixin ou le ketoprofen peuvent aussi être utilisés et présentent moins d'effets indésirables. (Goodrich LR and Nixon AJ, 2006)

On peut aussi administrer par voie intra-articulaire des AIS qui vont inhiber la production de phospholipase A2 ce qui empêche la formation d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires. Cet acide arachidonique ne peut alors plus être oxygéné par les COX en prostaglandines. Une étude nous montre qu'en 2020, c'est le triamcinolone acetonide qui est le plus souvent utilisé lors d'injection du carpe, de l'articulation métacarpo/tarsophalangienne , l'articulation phalangienne distale et l'articulation femoro-tibiale tandis que c'est le methylprednisolone acetate qui est le plus souvent utilisé lors d'injection des articulations intertarsienne et tarsometatarsienne. On retrouve par la suite d'autres molécules comme le betamethasone esters, l'isflupredone acetate ou encore la dexamethasone. ( Zanotto GM and Frisbie DD, 2021). La littérature diverge sur le sujet des risques liés à ces injections d'AIS. En effet

certaines études ce veulent plutôt rassurantes, démontrants qu'il n'y a pas de risque d'action délétère sur le cartilage. ( Malaise O et al, 2021 ), mais la plupart montrent qu'utilisation prolongée ou de trop grandes quantités de corticostéroïdes pourraient être nocives pour le cartilage. ( Ferrao Blanco MN et al., 2022) ( Chen L et al., 2022).

Au vu des effets indésirables des AINS et AIS, les scientifiques tentent de trouver des alternatives. Différentes plantes peuvent être donnée pour leurs propriétés anti-inflammatoires tel que l'Harpagophytum procumbens. De récentes études ont mis en évidence que le principe actif contenue dans cette plante: l'harpagoside pouvait augmenter l'expression des récepteurs CB2 du système endocannabinoïde impliqué dans les voies anti-inflammatoires. ( Mariano A et al, 2021 ). De plus, une autre étude a montré qu'il n'y avait pas de différences significatives entre l'administration d'AINS comme le meloxicam et d'Harpagophytum procumbens dans la gestion de la douleur. (Farpour HR et al, 2021). Le curcuma aussi est connu pour ses effets anti-inflammatoires et chondroprotecteurs grâce au maintien de l'homéostasie des mitochondries des chondrocytes ainsi qu'en agissant sur l'expression de certains gènes. (Jin Z et al, 2022 , Nakagawa Y et al, 2022 ) Dans certains compléments alimentaires on peut aussi trouver de la glucosamine ou des chondroïtine sulphate qui agissent en synergie car la GS sert de substrat pour former les glycosaminoglycanes et le CS inhibe la dégradation de la matrice en jouant sur plusieurs acteurs inflammatoires. (Goodrich LR and Nixon AJ, 2006). De l'acide hyaluronique peut aussi être ajouté, mais les études scientifiques se concentrent plus sur ses effets lors d'injections IV et IA que per os. Il permettrait une meilleure viscosité et lubrification du liquide synovial et participerait à la diminution de la phagocytose au niveau du cartilage et autres phénomènes inflammatoires. (Goodrich LR and Nixon AJ, 2006).

Comme nous l'avons vu précédemment, l'ostéoarthrose peut aussi toucher l'os sous-chondral. Des injections de biphosphonates comme le tilduronate permettent d'inhiber la résorption osseuse par les ostéoclastes. Cependant il n'agit pas sur les dommages causé au cartilage et voir même peut les aggraver en cas de surdosage en intra articulaire. ( Bertuglia A et al, 2021 , Duesterdieck-Zellmer KF, 2012 ).

Les scientifiques se sont aussi tourné vers les plaquettes et leurs propriétés anti-inflammatoires et cicatrisantes. C'est ainsi que on retrouve maintenant couramment des injections de « platelet-rich products » PRP comme proposition de traitement de l'ostéoarthrose. Le PRP est obtenu en centrifugeant du sang prélevé chez le patient, le plasma riche en plaquette est alors récupéré et injecté dans l'articulation. Grâce à leurs dégranulations ces plaquettes libèrent des facteurs de croissance qui vont moduler les cytokines pro inflammatoire comme l'IL1. ( Garbin LC and Olver

CS, 2020). De la même façon, les scientifiques se sont aussi intéressés à une protéine inhibitrice endogène du récepteur à l'interleukine 1 produite par les monocytes. L'IRAP ou ( ACS = autologous conditioned serum) est donc aussi préparée à partir du sang du patient mis au contact de bille de brosilicate afin de stimuler la production de cette protéine. Une fois incubée le contenu est centrifugé et le sérum est récupéré afin d'être injecté en IA. Cependant la littérature est mitigée quand à son efficacité. ( Löfgren M et al, 2022 ,Tokawa PKA, 2022 ).

Enfin, les scientifiques se sont penchés sur la thérapie cellulaire avec ses espoirs de régénération tissulaire. En effet les cellules souches ont la possibilité d'évoluer en un type cellulaire voulu dans un environnement donné. Elles pourraient alors remplacer les chondrocytes apoptotiques ou sénescents afin de réparer la matrice extracellulaire endommagée. Cependant, différentes études in vivo ont démontrée que ce n'était pas exactement ce qu'il se passait et que ces cellules souches avaient plutôt une action anti-inflammatoire. (Stewart MC and Stewart AA, 2011)

De nombreuses possibilités thérapeutiques ont été étudiées mais pour la plupart le manque d'études in vivo et standardisé contrôlée randomisée en double aveugle ne permettent pas d'affirmer qu'une de ces manière de soigner l'arthrose est vraiment révolutionnaire. Elles limitent toutes les dégâts causés par les facteurs inflammatoires mais restent limités quand à la régénération du cartilage.

De plus, le PrP et l'Irap sont des thérapies toutes deux prometteuses mais aujourd'hui il n'existe pas d'autorisation de mise sur le marché au niveau Européen. Ces produits sont autologues et il n'existe donc pas encore de médicaments réglementé dont on connaît le contenu de manière rigoureuse. (Garbin LC et al, 2022). Concernant les cellules souches par contre il existe 2 produits commercialisés en Europe. Ce TFE va s'intéresser plus précisément à ces 2 médicaments que sont Arti-cell forte et Horstem.

## 2. Les cellules souches

### 2.1 Origines et utilisation thérapeutiques

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées capables de se diviser afin de donner des cellules spécialisées ou bien de s'auto-renouveler. Elles se classent en différentes catégories: les cellules souches embryonnaires: les totipotentes capables de se différencier en tous les types cellulaires issus des 3 feuillets et aussi donner les annexes embryonnaires et les pluripotentes à partir du 4ème jour du blastocyste qui perdent la capacité de donner les annexes embryonnaires; les cellules souches fœtales qui sont des cellules pluripotentes qui ont atteint 5 à 9 semaines de développement et enfin les cellules souches multipotentes ou adultes capables de se différencier en types cellulaires appartenant au feuillet embryonnaire d'origine correspondant. Ces cellules souches adultes sont dispersées à différents endroits de l'organisme. On en retrouve au niveau de la moelle osseuse: ce sont les cellules souches hématopoïétiques capables de se différencier en cellules sanguines, mais aussi les cellules souches mésenchymateuses capables de donner différents tissus. On peut aussi trouver des cellules souches neurales, musculaire, de la peau ... (Zakrzewski W et al, 2019)

Au niveau thérapeutique, les cellules souches totipotentes et pluripotentes sont difficilement exploitables car elles se trouvent uniquement au stade embryonnaire ou fœtale donc cela pose problème au niveau éthique chez l'homme. Les risques mitogène et tumorigène sont aussi fortement élevés chez ces cellules. ( Sell S, 2004)

Ce sont donc les cellules multipotentes adultes qui sont les meilleures candidates pour la thérapie cellulaire. Plus particulièrement les cellules souches mésenchymateuses puisqu'elles ont la capacité de se différencier entre autre en ostéoblaste et chondrocytes, ce qui était le but premier recherché afin de remplacer le tissu lésé lors d'ostéoarthrose. (Zakrzewski W et al, 2019)

Chez le cheval, on retrouve ces CMS à de nombreux endroits mais en plus grandes quantités au niveau de la moelle osseuse et du tissu adipeux. Ces deux types de cellules souches ont des caractéristiques similaires et chacune leurs avantages propres. Par exemple, chez les chevaux, les BMCSM semblent avoir un meilleur potentiel chondrogenique et ostéogénique ainsi qu'une meilleure capacité de migration que les ADMSC. Cependant il manque encore de preuves scientifiques afin de déterminer quelle origine est la plus efficace en fonction de la cible thérapeutique visée. (Voga, M et al, 2020)

En générale, pour les BMMSC chez le cheval, le sternum est le site de ponction principal plus précisément au niveau de la 5ème sternèbre pour sa position craniale à l'apex du cœur afin d'éviter

les risque de ponction cardiaque ou de pneumo péricarde. Le prélèvement se fait écho guidée et grâce à une aiguille de biopsie médullaire de type Jamshidi. (Kasashima Y et al, 2011).

## 2.2 Différenciations des MSC

Après le prélèvement, il faut isolé les CSM de la ponction. Plusieurs techniques sont été comparées dans la littérature: la méthode classique qui compte sur l'adhérence des CSM au plastique des boite de Pétri, et 2 protocoles de séparation par gradient de densité ( Ficoll et Percoll ). Les trois méthode sont efficaces mais le protocole Percoll permet de raccourcir le temps de culture et de produire des CSM en plus grande quantité et avec de meilleurs capacités d'auto renouvellement. ( Bourzac C et al, 2010). Par la suite, les cellules souches vont être mise en culture dans un milieu contenant 10% de sérum fœtal bovin afin d'apporter les protéines nécessaires. Des antibiotiques et antifongiques peuvent être ajouté au milieu de croissance. La composition exacte du milieu peut varier le but étant d'avoir une expansion cellulaire la plus rapide en maintenant les caractéristiques de multipotence. Diverses méthodes de conservation existent. Elles permettent toutes de conserver les cellules souches 24h au minimum puis la durée de vie diminue en fonction des différentes méthodes. On peut utiliser des fluides biologiques comme du PRP ou du sérum ou alors par cryogénie. (Garvican ER et al, 2016)

### Niches cellules souches

Il est possible in vitro de différencier les cellules souches en chondrocytes. Pour cela il faut les mettre en contact de différents composants comme le TGF-Beta 1 , 2 et 3 et autres facteurs de croissance comme du IGF1 , BMP6 , FGF2, EGF, PDGF. Il faut ajouter aussi des composant non protéique comme de la dexamethasone ou de l'acide ascorbique. Le tout cultivé dans un milieu de culture sans sérum ou dans des matériaux de micromasse. De plus l'oxygène est aussi important: le milieu hypoxique favorise la prolifération des CSM et l'expression de gène spécifique du cartilage ( COL2A1 et SOX9) ainsi que la synthèse accrue des proteoglycanes et du collagène de type 2. Cela empêche aussi la maturation hypertrophique des chondrocytes dérivés des CSM. Les. Canaux calcique augmentent aussi la concentration intracellulaire de calcium ce qui entraîne l'initiation des voies de signalisation permettant l'expression de gènes spécifiques du cartilage ainsi que la synthèse de protéines spécifiques. La vérification de la différenciation en chondrocytes s'effectue en détectant la production de protéines spécifiques du cartilage et l'absence de marqueur d'hypertrophie ( COL10A1) ou de MMP-13. On peut aussi vérifier l'expression de COL2A1 et SOX9 au niveau génétique. ( Harrell CR et al, 2019)

## 2.3 Effets thérapeutiques

Les premières études pour l'ostéoartrite date de 2003: pouvoir anti inflammatoire et pas de remplacement du cartilage

autologue vs allogénique

Allogénique : mais pb pas de certitude bcp de kit donc plus rigoureux autologue => les seuls autorisés sont Articell forte et Horstem do ça voir

## 3. Études des différents médicaments à base de cellules souches disponibles sur le marché européen

### 3.1 Arti-Cell Forte

Le CVMP a exprimé en juin 2018 son avis favorable quant à la commercialisation du tout premier médicament à base de cellules souches à usage vétérinaire. Ce médicament contient des ciMSCs associées à du EAP et se nomme Arti-Cell Forte. Il est indiqué pour la réduction de la boiterie légère à modérée liée à l'inflammation articulaire chez les chevaux. En effet il aurait comme propriétés d'activer les mécanismes chondroprotecteurs afin de stimuler la production de MEC et d'influencer le processus inflammatoire. On peut donc penser que ce médicament s'adresse aux chevaux atteints d'ostéoartrite mais ceci n'est pas précisé dans la publication de l'EMA.

Nous allons essayer de comprendre le fonctionnement d'Arti-Cell Forte et de discuter de son efficacité.

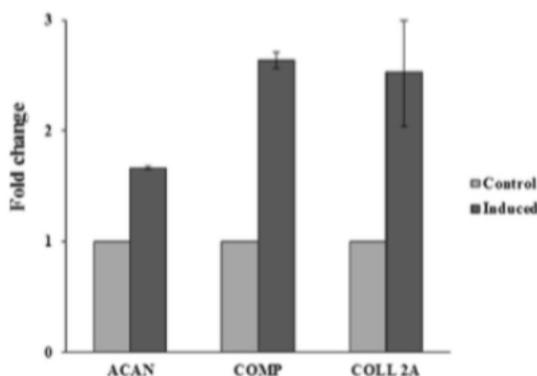
Arti-Cell Forte est produit par la firme GST NV. Un de leur premier essai avait pour but d'étudier les effets cliniques d'une injection de PRP et de MSCs non différenciées ou différenciées en chondrocytes. Cette étude a été menée de manière standardisée, randomisée mais pas en double aveugle ni accompagnée d'un contrôle négatif. Elle a comme avantage de concerner des chevaux atteints naturellement d'ostéoartrite.

Les chercheurs ont sélectionnés 20 chevaux présentant une boiterie légère à modérée depuis plus de 3 mois due à de l'ostéoartrite sur l'articulation métacarpo ou métatarso - phalangienne. Des radiographies et des CT ont été réalisées afin de mettre en évidence des signes d'ostéoartrite

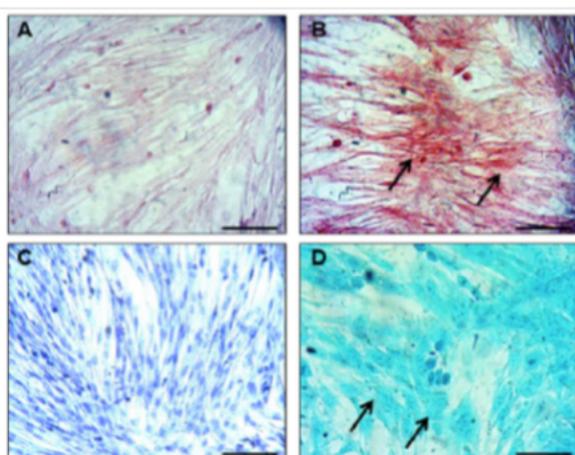
comme des ostéophytes ou des défauts du cartilage mais aucun autre détail n'a été donné sur le stade de la pathologie. Les chevaux ont été divisés en 4 groupes égaux recevant chacun au choix une injection de PRP seul, de MSC non différenciées seules, ou d'une combinaison de MSCs non différenciées + PRP ou de ciMSCs + PRP. Les injections ont été administrées en intra-articulaire. Par la suite, les vétérinaires ont pu donner leurs appréciations sur l'état clinique de l'animal grâce à un système de score (Figure 3) permettant de qualifier le test de flexion (entre 0 et 3), le niveau de boiterie (entre 0 et 5) et de l'épanchement articulaire ( entre 0 et 2 ) puis en faisant la somme des scores obtenus. Cette somme est traduite en un score évolutif allant de 0 à 5, 5 représentant les chevaux cliniquement sains. L'étude a duré 12 mois.

Les résultats (Figure 4) montrent que les traitements contenant les MSCs sont significativement plus efficaces à deux moments différents de l'étude ( $P= 0,033$ ;  $P= 0,012$ ) que ceux contenant le PRP seul mais il n'est pas possible de montrer une différence significative entre le traitement contenant les MSCs seules et ceux contenant les combinaisons. De même, ils n'obtiennent pas de différence significative ( $P= 0,530$ ;  $P= 0,207$ ) entre les résultats des 2 combinaisons même si celle contenant les ciMSCs semble être plus efficace.

	6 weeks	12 weeks	6 months	12 months
GROUP 1 Horse 1	4	2	2	1



**Figure 5.** D'après Broeckx et al., 2014a. Results of RT-PCR for the gene expression of collagen (Col) type II, aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in the native MSCs (Ctrl) and chondrogenic induced MSCs (Ind). Values are given as the mean of three measurements +/- SEM.



**Figure 6.** D'après Broeckx et al., 2014a. Representative images of peripheral blood (PB)-derived mesenchymal stem cells (MSCs) in their undifferentiated state (A & C) and chondrogenic induced (B & D) after Alcian Blue (A & B) and Safranin O (C & D) stainings. Glycosaminoglycan production (black arrows) can be noticed after induction. Scale bars re- present 50 micrometers.

Cependant, il faut noter que le nombre de chevaux traités dans chaque catégorie est faible et donc il est difficile de mettre en évidence des différences significatives. Les chercheurs ont donc mené une autre étude sur 165 chevaux atteints d'ostéoarthrite sur différentes articulations et en évaluant leur capacité à retourner à l'entraînement après une injection d'une des 2 combinaisons. Ici aussi on observe un meilleur pronostic pour ceux ayant reçu les ciMSCs mais toujours non significatif par rapport à ceux ayant reçu les MSCs.

Cette tendance à de meilleurs pronostics peut être expliquée par des analyses in vitro des effets de la différenciation de MSCs en chondrocytes. Les chercheurs ont pu mettre en évidence une augmentation de microARN permettant la synthèse d'aggrécanes, de fibres de collagène de type 2 et de COMP (Figure 5). De même on observe une augmentation de la synthèse de glycosaminoglycanes (Figure 6). Ces résultats peuvent faire penser qu'une fois dans l'articulation, les ciMSCs peuvent alors remplacer les chondrocytes et former de la MEC. Cependant, les chercheurs n'ont pas analysé l'état du cartilage à la fin de l'étude donc nous n'avons pas de réelles preuves de régénération du cartilage.

Pour prouver son efficacité de manière rigoureuse la firme a alors mené un nouvel essai. Celui-ci n'a pas encore été publié dans un journal « peer review » mais le résumé a été publié lors d'une conférence. On apprend que cette étude est une étude standardisée, randomisée, en double aveugle et contrôlée par un placebo qui vise à prouver l'efficacité des ciMSCs comme traitement contre l'ostéoarthrite. Dans cette étude, les chercheurs ont pris 12 chevaux cliniquement sains auxquels ils ont créé artificiellement des lésions représentatives de ce que pourrait provoquer l'arthrose sur l'articulation métacarpo-phalangienne. 5 semaines après la chirurgie, ils leur ont injecté soit un mélange de ciMSC + EAP soit une solution saline à 0,9% comme placebo. Ils ont ensuite effectué plusieurs tests comme un scoring de la boiterie, des radiographies de l'articulation et des analyses de liquide synovial. A la fin de l'étude ils ont euthanasié les chevaux afin d'évaluer l'articulation macroscopiquement et histologiquement. Les résultats nous montrent une diminution significative de la boiterie par rapport au placebo. Post mortem on obtient une diminution des lignes d'usure et de l'hyperhémie synoviale ainsi qu'une augmentation des COMP et du collagène de type 2 sur l'articulation. Cette étude a pour avantage d'être rigoureuse et de mettre en évidence des preuves de régénération du cartilage. Cependant cette étude ne porte que sur 12 chevaux, ne dure que 11 semaines et ne concerne qu'un seul type d'articulation touchée avec des lésions bien

particulières correspondantes à un certain stade d'arthrose que l'on ne retrouve pas forcément chez les chevaux atteints naturellement.

En 2018, des chercheurs de chez GST NV publient le premier article mentionnant le produit Arti-Cell Forte . Cette étude a pour but d'observer les possibles effets secondaires d'une injection de MSCs afin de pouvoir en assurer la sécurité. Les chercheurs vont tester une injection de ciMSCs mélangées à de l'EAP sur 16 chevaux cliniquement sains afin de voir si cela induit une boiterie, un gonflement de l'articulation ou d'autres effets secondaires. Cette étude est réalisée de manière standardisée, en double aveugle, randomisée et avec un contrôle placebo: une solution saline à 0,9%.

Les chercheurs n'obtiennent pas de différence significative entre une injection de placebo et de Arti-Cell Forte. Les deux injections s'accompagnent d'un léger épanchement articulaire et d'une légère inflammation avec augmentation de température locale. Ainsi, grâce à cette étude nous savons que Arti-Cell Forte est un produit sûr.

En conclusion, sur base de la littérature actuelle nous pouvons nous rendre compte que Arti-Cell Forte n'est pas encore le produit miracle tant attendu permettant de guérir l'arthrose. En effet, il répond bien à l'intitulé retrouvé dans l'annonce de l'EMA: il ne permet de réduire que des boiteries légères à modérées. Les résultats obtenus quant à la régénération du cartilage restent peu convaincants. Il faudrait réaliser des études sur un plus grand nombre de chevaux présentant des stades d'ostéoarthrite différents et sur une plus longue durée. De plus, la firme devrait préciser quels stades d'ostéoarthrite doivent présenter les chevaux afin d'obtenir la même efficacité que dans leurs études.

### 3.2 Horstem

## Bibliographie

- 1) SECTION XII Musculoskeletal systemM Synovial Joint Biology and Pathobiology David D. Frisbie and Sherry A. Johnson chap 79 Équine chirurgie édition 2019
  
- 2) An experimentally induced osteoarthritis model in horses performed on both metacarpophalangeal and metatarsophalangeal joints: Technical, clinical, imaging, biochemical, macroscopic and microscopic characterization . Lélia Bertoni, Sandrine Jacquet-Guibon, Thomas Branly, Florence Legendre, Mélanie Desancé, Céline Mespoulhes, Martine Melin, Daniel-Jean Hartmann, Amandine Schmutz, Jean-Marie Denoix, Philippe Galéra, Magali Demoor, Fabrice Audigié . PLoS One. 2020; 15(6): e0235251. Published online 2020 Jun 25. doi: 10.1371/journal.pone.0235251 . PMID: PMC7316256

- 3) Lorenz J, Grassel S. Experimental osteoarthritis models in mice. *Methods Mol Biol.* 2014;1194:401-19. doi: 10.1007/978-1-4939-1215-5\_23. PMID: 25064117.
- 4) Cruz AM, Hurtig MB. Multiple pathways to osteoarthritis and articular fractures: is subchondral bone the culprit? *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2008 Apr;24(1):101-16. doi: 10.1016/j.cveq.2007.12.001. PMID: 18314038.
- 5) CARON J.P. Osteoarthritis. In : Ross M.W., Dyson S.J., *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse.* Saunders : Philadelphia, 2003, 572-591
- 6) Lejeune J.P., Schneider N., Henrotin Y., and SerTEYN D. L'ostéo-arthropathie dégénérative du cheval: pathogénie et moyens diagnostiques. *Annales de Médecine Vétérinaire* (2006)150 :p173-192
- 7) . Martin JA, Buckwalter JA. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 2:106-10. doi: 10.2106/00004623-200300002-00014. PMID: 12721352.
- 8) Sacitharan PK. Ageing and Osteoarthritis. *Subcell Biochem.* 2019;91:123-159. doi: 10.1007/978-981-13-3681-2\_6. PMID: 30888652.
- 9) Messina OD, Vidal Wilman M, Vidal Neira LF. Nutrition, osteoarthritis and cartilage metabolism. *Aging Clin Exp Res.* 2019 Jun;31(6):807-813. doi: 10.1007/s40520-019-01191-w. Epub 2019 Apr 13. PMID: 30982220.
- 10) Gencoglu H, Orhan C, Sahin E, Sahin K. Undenatured Type II Collagen (UC-II) in Joint Health and Disease: A Review on the Current Knowledge of Companion Animals. *Animals (Basel).* 2020 Apr 17;10(4):697. doi: 10.3390/ani10040697. PMID: 32316397; PMCID: PMC7222752.
- 11) Lacourt M, Gao C, Li A, Girard C, Beauchamp G, Henderson JE, Laverty S. Relationship between cartilage and subchondral bone lesions in repetitive impact trauma-induced equine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012 Jun;20(6):572-83. doi: 10.1016/j.joca.2012.02.004. Epub 2012 Feb 15. PMID: 22343573.

- 12) Henrotin Y, Reginster JY. Anabolic events in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 1999 May;7(3):310-2. doi: 10.1053/joca.1998.0175. PMID: 10329309.
- 13) Laadhar L, Zitouni M, Kalle-Sellami M, Mahjoub M, Sellami S, Makni S. Physiopathologie de l'arthrose. Du cartilage normal au cartilage arthrosique: facteurs de prédisposition et mécanismes inflammatoires [Physiopathology of osteoarthritis. From normal cartilage to osteoarthritic cartilage: risk factors and inflammatory mechanisms]. *Rev Med Interne*. 2007 Aug;28(8):531-6. French. doi: 10.1016/j.revmed.2007.01.012. Epub 2007 Feb 7. PMID: 17316922.
- 14) Whitfield-Cargile CM, Coleman MC, Cohen ND, Chamoun-Emanuelli AM, DeSolis CN, Tetrault T, Sowinski R, Bradbery A, Much M. Effects of phenylbutazone alone or in combination with a nutritional therapeutic on gastric ulcers, intestinal permeability, and fecal microbiota in horses. *J Vet Intern Med*. 2021 Mar;35(2):1121-1130. doi: 10.1111/jvim.16093. Epub 2021 Mar 3. PMID: 33656183; PMCID: PMC7995434.
- 15) Raidal SL, Hughes KJ, Charman AL, Nielsen SG, Phillips JK, Noble GK. Effects of meloxicam and phenylbutazone on renal responses to furosemide, dobutamine, and exercise in horses. *Am J Vet Res*. 2014 Jul;75(7):668-79. doi: 10.2460/ajvr.75.7.668. PMID: 24959734.
- 16) Tucker L, Trumble TN, Groschen D, Dobbs E, Baldo CF, Wendt-Hornickle E, Guedes AGP. Targeting Soluble Epoxide Hydrolase and Cyclooxygenases Enhance Joint Pain Control, Stimulate Collagen Synthesis, and Protect Chondrocytes From Cytokine-Induced Apoptosis. *Front Vet Sci*. 2021 Aug 5;8:685824. doi: 10.3389/fvets.2021.685824. PMID: 34422942; PMCID: PMC8375305.
- 17) Walters B, Trumble TN, Wendt-Hornickle E, Kennedy M, Guedes A. Effects of cyclooxygenase and soluble epoxide hydrolase inhibitors on apoptosis of cultured primary equine chondrocytes. *Res Vet Sci*. 2022 Apr 12;147:44-49. doi: 10.1016/j.rvsc.2022.04.002. Epub ahead of print. PMID: 35447388.
- 18) D'Arcy-Moskwa E, Noble GK, Weston LA, Boston R, Raidal SL. Effects of meloxicam and phenylbutazone on equine gastric mucosal permeability. *J Vet Intern Med*. 2012 Nov-

Dec;26(6):1494-9. doi: 10.1111/j.1939-1676.2012.01004.x. Epub 2012 Oct 20. PMID: 23083114.

- 19) Goodrich LR, Nixon AJ. Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *Vet J.* 2006 Jan;171(1):51-69. doi: 10.1016/j.tvjl.2004.07.008. PMID: 16427582
- 20) Zanotto GM, Frisbie DD. Current joint therapy usage in equine practice: Changes in the last 10 years. *Equine Vet J.* 2021 Jun 18. doi: 10.1111/evj.13489. Epub ahead of print. PMID: 34143532.
- 21) Malaise O, Paulissen G, Deroyer C, Ciregia F, Poulet C, Neuville S, Plener Z, Daniel C, Gillet P, Lechanteur C, Brondello JM, de Seny D, Malaise M. Influence of Glucocorticoids on Cellular Senescence Hallmarks in Osteoarthritic Fibroblast-like Synoviocytes. *J Clin Med.* 2021 Nov 16;10(22):5331. doi: 10.3390/jcm10225331. PMID: 34830613; PMCID: PMC8617749.
- 22) Ferrao Blanco MN, Bastiaansen Jenniskens YM, Kops N, Chavli A, Narcisi R, Botter SM, Leenen PJM, van Osch GJVM, Fahy N. Intra-articular injection of triamcinolone acetonide sustains macrophage levels and aggravates osteophytosis during degenerative joint disease in mice. *Br J Pharmacol.* 2022 Jun;179(11):2771-2784. doi: 10.1111/bph.15780. Epub 2022 Jan 26. PMID: 34907535.
- 23) Chen L, Ni Z, Huang J, Zhang R, Zhang J, Zhang B, Kuang L, Sun X, Zhang D, Su N, Qi H, Yang J, Jin M, Luo F, Chen H, Zhou S, Du X, Ouyang J, Wang Z, Xie Y, Tan Q, Chen L. Long term usage of dexamethasone accelerating accelerates the initiation of osteoarthritis via enhancing chondrocyte apoptosis and the extracellular matrix calcification and apoptosis of chondrocytes. *Int J Biol Sci.* 2021 Oct 3;17(15):4140-4153. doi: 10.7150/ijbs.64152. PMID: 34803488; PMCID: PMC8579451.
- 24) Mariano A, Di Sotto A, Leopizzi M, Garzoli S, Di Maio V, Gulli M, Dalla Vedova P, Ammendola S, Scotto d'Abusco A. Antiarthritic Effects of a Root Extract from *Harpagophytum procumbens* DC: Novel Insights into the Molecular Mechanisms and Possible Bioactive Phytochemicals. *Nutrients.* 2020 Aug 23;12(9):2545. doi: 10.3390/nu12092545. PMID: 32842461; PMCID: PMC7551290.

- 25) Farpour HR, Rajabi N, Ebrahimi B. The Efficacy of *Harpagophytum procumbens* (Teltonal) in Patients with Knee Osteoarthritis: A Randomized Active-Controlled Clinical Trial. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2021 Oct 19;2021:5596892. doi: 10.1155/2021/5596892. PMID: 34712343; PMCID: PMC8548091.
- 26) Jin Z, Chang B, Wei Y, Yang Y, Zhang H, Liu J, Piao L, Bai L. Curcumin exerts chondroprotective effects against osteoarthritis by promoting AMPK/PINK1/Parkin-mediated mitophagy. *Biomed Pharmacother.* 2022 May 9;151:113092. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113092. Epub ahead of print. PMID: 35550528.
- 27) Nakagawa Y, Mori K, Yamada S, Mukai S, Hirose A, Nakamura R. The Oral Administration of Highly-Bioavailable Curcumin for One Year Has Clinical and Chondro-Protective Effects: A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Prospective Study. *Arthrosc Sports Med Rehabil.* 2022 Jan 13;4(2):e393-e402. doi: 10.1016/j.asmr.2021.10.016. PMID: 35494290; PMCID: PMC9042777.
- 28) Bertuglia A, Basano I, Pagliara E, Bottegaro NB, Spinella G, Bullone M. Effect of intravenous tiludronate disodium administration on the radiographic progression of osteoarthritis of the fetlock joint in Standardbred racehorses. *J Am Vet Med Assoc.* 2021 Sep 15;259(6):651-661. doi: 10.2460/javma.259.6.651. PMID: 34448617.
- 29) Duesterdieck-Zellmer KF, Driscoll N, Ott JF. Concentration-dependent effects of tiludronate on equine articular cartilage explants incubated with and without interleukin-1 $\beta$ . *Am J Vet Res.* 2012 Oct;73(10):1530-9. doi: 10.2460/ajvr.73.10.1530. PMID: 23013178.
- 30) Garbin LC, Olver CS. Platelet-Rich Products and Their Application to Osteoarthritis. *J Equine Vet Sci.* 2020 Mar;86:102820. doi: 10.1016/j.jevs.2019.102820. Epub 2019 Nov 16. PMID: 32067662.
- 31) Löfgren M, Ekman S, Ekholm J, Engström M, Fjordbakk CT, Svala E, Holm Forsström K, Lindahl A, Skiöldebrand E. Conditioned serum in vitro treatment of chondrocyte pellets and

osteoarthritic explants. *Equine Vet J.* 2022 May 6. doi: 10.1111/evj.13582. Epub ahead of print. PMID: 35514185.

- 32) Tokawa PKA, Brossi PM, Baccarin RYA. Autologous conditioned serum in equine and human orthopedic therapy: A systematic review. *Res Vet Sci.* 2022 Sep;146:34-52. doi: 10.1016/j.rvsc.2022.03.009. Epub 2022 Mar 15. PMID: 35325755.
- 33) Stewart MC, Stewart AA. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2011 Aug;27(2):243-61. doi: 10.1016/j.cveq.2011.06.004. PMID: 21872757.
- 34) Garbin LC, Contino EK, Olver CS, Frisbie DD. A safety evaluation of allogeneic freeze-dried platelet-rich plasma or conditioned serum compared to autologous frozen products equivalents in equine healthy joints. *BMC Vet Res.* 2022 Apr 18;18(1):141. doi: 10.1186/s12917-022-03225-4. PMID: 35436878; PMCID: PMC901456
- 35) Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther.* 2019 Feb 26;10(1):68. doi: 10.1186/s13287-019-1165-5. PMID: 30808416; PMCID: PMC6390367.
- 36) Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004 Jul;51(1):1-28. doi: 10.1016/j.critrevonc.2004.04.007. PMID: 15207251.
- 37) Kasashima Y, Ueno T, Tomita A, Goodship AE, Smith RK. Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. *Equine Vet J.* 2011 May;43(3):288-94. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00215.x. Epub 2010 Sep 23. PMID: 21492205.
- 38) Adams MK, Goodrich LR, Rao S, Olea-Popelka F, Phillips N, Kisiday JD, McIlwraith CW. Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BMDMSCs) from the ilium and sternum: are there differences? *Equine Vet J.* 2013 May;45(3):372-5. doi: 10.1111/j.2042-3306.2012.00646.x. Epub 2012 Sep 26. PMID: 23009322; PMCID: PMC3581704.

- 39) Voga, M., Adamic N., Vengust M., et Majdic G., 2020. Stem Cells in Veterinary Medicine—Current State and Treatment Options. *Frontiers in Veterinary Science* 7 : 278. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00278>.
- 40) Bourzac C, Smith LC, Vincent P, Beauchamp G, Lavoie JP, Laverty S. Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. *Equine Vet J*. 2010 Sep;42(6):519-27. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00098.x. PMID: 20716192.
- 41) Garvican ER, Cree S, Bull L, Smith RK, Dudhia J. Erratum to: Viability of equine mesenchymal stem cells during transport and implantation. *Stem Cell Res Ther*. 2016 Nov 9;7(1):161. doi: 10.1186/s13287-016-0423-z. Erratum for: *Stem Cell Res Ther*. 2014 Aug 08;5(4):94. PMID: 27829446; PMCID: PMC5103379.
- 42) Al Naem M, Bourebaba L, Kucharczyk K, Röcken M, Marycz K. Therapeutic mesenchymal stromal stem cells: Isolation, characterization and role in equine regenerative medicine and metabolic disorders. *Stem Cell Rev Rep*. 2020 Apr;16(2):301-322. doi: 10.1007/s12015-019-09932-0. PMID: 31797146.
- 43) Harrell CR, Markovic BS, Fellabaum C, Arsenijevic A, Volarevic V. Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis: Current knowledge and future perspectives. *Biomed Pharmacother*. 2019 Jan;109:2318-2326. doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.099. Epub 2018 Nov 29. PMID: 30551490.

