

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
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

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 pouvant pénaliser le pronostic sportif de celui-ci, les enjeux économiques associés sont donc importants. C'est une maladie dégénérative qui touche principalement le cartilage articulaire. Les causes sont multiples et aboutissent à un état inflammatoire délétère pour l'articulation. Les traitements principaux reposent sur une action anti-inflammatoire ayant pour but 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 vu le jour dans l'optique de promouvoir la régénérescence du cartilage articulaire, tout en évitant les effets secondaires liés aux anti-inflammatoires. Cependant, le manque d'études standardisées in vivo nous empêche d'avoir un avis franc 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 s'intégrer dans la matrice extracellulaire afin de la régénérer. Cependant les études in vivo démontrent que ce sont les effets immunomodulateurs anti-inflammatoires qui sont bénéfiques. De nombreuses nouvelles thérapies dérivées des cellules souches voient le jour comme la formation d'implant in vitro de cartilage à greffer directement sur le site lésé ou encore l'étude des effets des vésicules extra-cellulaires produites par ces cellules.

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

AIM OF THE WORK

Evaluation of the effectiveness of the use of stem cell drugs in the treatment of osteoarthritis in equidae

SUMMARY

Osteoarthritis in horses is an important pathology that can penalize their sports prognosis, so the associated economic stakes are important. It is a degenerative disease that mainly affects the articular cartilage. The causes are multiple and lead to an inflammatory state harmful to the joint. The main treatments are based on an anti-inflammatory action aimed at limiting the installation of a vicious circle where the degeneration of chondrocytes maintains inflammation. However, these anti-inflammatory drugs have many undesirable effects and do not interfere with in the regeneration of cartilage. Many other treatments have been developed to promote the regeneration of articular cartilage, while avoiding the side effects associated with anti-inflammatory drugs. However, the lack of standardized in vivo studies prevents us from having a frank opinion on these treatments. Among themselves is the use of stem cells. They are undifferentiated cells capable of dividing themselves in order to give specialized cells or to renew themselves. They were first used to differentiate themselves from chondrocytes which could then be integrated into the extracellular matrix in order to regenerate it. However in vivo studies prouve that it is here again most likely the immunomodulatory and anti-inflammatory effect that are beneficial. Numerous undergoing therapies derived from stem cells are emerging such as the formation of implant in vitro of cartilage to transplant straight in the harmed location as well as study of the effects of extracellular vesicles formed by those cells.

Remerciements

Je voudrais d'abord remercier mes parents et ma sœur d'avoir toujours cru en mon rêve de petite fille et de m'avoir toujours soutenue durant ces études.

À Léa, Marie, Marion, Mathilde, Sophie et Sarah, mes coloc de choc avec qui j'ai pu passer ces 6 années de folie.

À mes internes préférés, Colombe et Jérôme, sans qui nos nuits de garde n'auraient pas été les mêmes. Nos urgences de 3h du matin et nos pauses donuts vont me manquer.

À ma vétérinaire préférée, Noémie, qui m'a supporté pendant 6 semaines et qui m'a donné l'envie d'être une aussi bonne vétérinaire de terrain.

À la clinique Acy-Romance, merci de votre bienveillance et de m'avoir apporté de nombreuses connaissances lors de mon stage.

À ma promotrice de TFE, Professeure A. Gabriel et à toute l'équipe de la clinique équine de Liège, merci d'avoir rendu mes cliniques si intéressantes et de m'avoir donné l'envie de faire un internat.

Merci à tous.

Table des matières

Introduction

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

2.2 Prélèvement

2.3 Différentiation

2.3 Effets thérapeutiques

2.3.1 Homing cellulaire

2.3.2 Propriétés immunomodulatrices

2.3.3 Effets sur le cartilage articulaire

2.3.4 Limites de l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses

3. Étude d'un médicament à base de cellules souches allogéniques disponible sur le marché européen: Arti-Cell Forte® (Global STEM CELL Technology)

Conclusion

Bibliographie

Introduction

L'arthrose est une pathologie très répandue au sein des équidés puisqu'elle touche plus de 50% des chevaux de plus de 15 ans mais aussi dans certains cas les jeunes chevaux (van Weeren et al., 2016). Un grand nombre de ces chevaux ont une carrière sportive avec des enjeux financiers ou sont utilisés pour les loisirs de leur propriétaire. Dans les deux cas, l'arthrose peut se révéler être un facteur limitant pour ces activités. Dès lors, de nombreux traitements ont vu le jour afin de rendre aux équidés leurs pleines capacités. Cependant, l'arthrose est un phénomène dégénératif dont il est difficile de stopper l'avancée (Goodrich et al., 2006). En effet, les capacités de cicatrisation du cartilage sont très limitées. Des progrès en terme de médecine régénérative et de thérapie cellulaire ont vu le jour avec l'espoir de pouvoir remplacer ce cartilage lésé (Lo Monaco et al., 2018). L'agence européenne du médicament a récemment autorisé la mise sur le marché de cellules souches afin de soigner l'arthrose.

Dans ce travail nous allons développer dans un premier temps l'anatomie et l'histologie de l'articulation puis la physiopathologie et les traitements de l'arthrose. Par la suite nous discuterons des caractéristiques des cellules souches et de leurs utilisations thérapeutiques. Enfin, nous analyserons les données d'études sur un médicament contenant des cellules souches pour soigner l'arthrose autorisé sur le marché européen.

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 qui sont des articulations mobiles, des synarthroses dont le mouvement est limité. Le squelette est majoritairement composé de diarthroses qui s'organisent en articulations dites synoviales. Ces articulations sont composées de cartilage articulaire, de membrane synoviale et sa synovie, d'os sous-chondral et de ligaments (Figure 1).

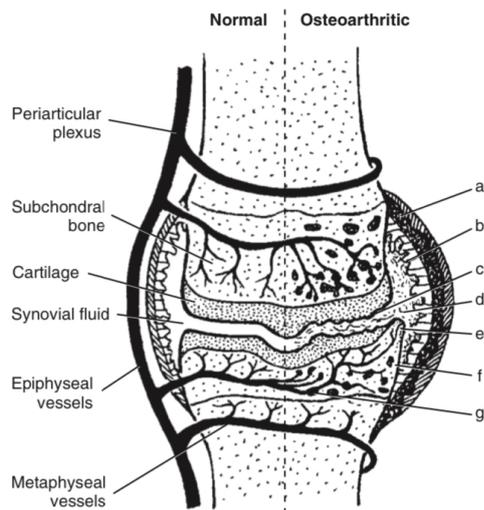


Figure-1. (David et al., 2019).

Une articulation synoviale normale (à gauche), comprenant le cartilage articulaire, le liquide synovial et les membranes synoviales, ainsi que les changements observés dans une articulation avec arthrose (à droite). Dans une articulation arthrosique, les anomalies suivantes peuvent être présentes : a, fibrose capsulaire ; b, synovite ; c, insuffisance cartilagineuse ; d, acide hyaluronique dépolymérisé ; e, ostéophytes ; f, kystes sous-chondraux ; g, engorgement vasculaire. (Modifié de March L. Articular cartilage in health and disease. In: Sambrook P, ed. The Musculoskeletal System. New York: Churchill Livingstone; 2001:86.)

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 matrice extracellulaire (MEC) composée à 70% d'eau. En matière sèche, elle contient 50% de collagènes, 35% de protéoglycanes (PGs), 10% de glycoprotéines, 3% de minéraux, 1% de lipides et 1% de substances micellaires. Le collagène est représenté en majorité par du collagène de type 2 c'est à dire un trimer de 3 molécules identiques de collagène alpha 1. Les PGs sont des associations de protéines et de glycosaminoglycanes (GAGs). Ceux présents en plus grande quantité dans le cartilage sont les agrécans. Grâce à la charge négative portée par les GAGs ils ont un fort pouvoir hydrophile ce qui leur permet de retenir les molécules d'eau et donc de résister aux forces de compression. Les agrécans peuvent aussi s'assembler autour d'une molécule d'acide hyaluronique afin de former un complexe stable.

Le cartilage s'organise en différentes couches (Figure 2). Premièrement il y a la zone superficielle composée de chondrocytes de forme ovale positionnés entre des fibres de collagène parallèles entre elles, 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 répartis de manière plus éparse entre des fibres de collagène orientées 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.

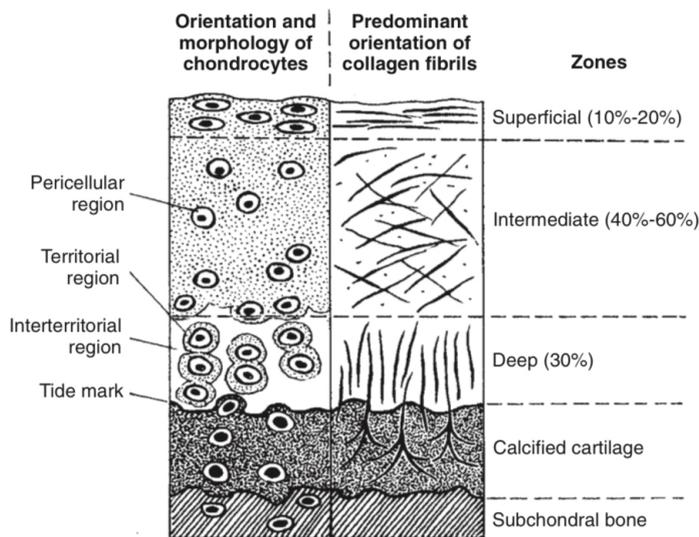


Figure 2. (David et al., 2019)

Cartilage articulaire normal avec orientation et morphologie des chondrocytes ainsi que l'orientation des fibrilles de collagène (Modifié de March L. Articular cartilage in health and disease. In: Sambrook P, ed. The Musculoskeletal System. New York: Churchill Livingstone; 2001:86.)

Le cartilage n'est ni vascularisé ni innervé, il dépend donc du phénomène de diffusion pour lui apporter les nutriments nécessaires. Une couche de cartilage calcifié relie le cartilage articulaire à l'os sous-chondral. Contrairement au cartilage, celui-ci est innervé et vascularisé. Dans certains cas il peut aussi être touché par l'ostéoarthrose.

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 également la composition du liquide synovial, en produisant certains composants comme l'acide hyaluronique. Elles agissent également comme filtre au niveau de l'endothélium de la subintima qui ne laisse passer que des molécules de moins de 10 kDa comme le glucose ou l'oxygène (David et al., 2019).

1.2 La dégénérescence du cartilage

1.2.1 Causes

Les causes de la dégénérescence du cartilage sont nombreuses et variées. 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 au développement de l'arthrose. En effet les chondrocytes

sénescents sont moins aptes à produire une matrice extracellulaire homogène (Martin et Buckwalter, 2003 ; Sacitharan, 2019). L'alimentation a aussi un rôle à jouer dans la qualité du cartilage. Certaines carences en vitamines et minéraux peuvent être délétères à la formation d'un cartilage de qualité (Messina et al., 2019). De plus certains compléments alimentaires comme le collagène de type 2 dénaturé peuvent être utilisés afin de diminuer la douleur chez des chevaux arthrosiques (Gencoglu et al., 2020).

On a aussi des causes extrinsèques, qui sont généralement des forces trop importantes et/ou mal réparties s'appliquant sur un cartilage sain. Par exemple on retrouve les affections ostéochondrales juvéniles comme les fragments d'ostéochondrose disséquante qui peuvent créer des lésions lors des contacts avec le cartilage en regard (Bertoni et al., 2020). Lorenz et collaborateurs (2014) montrent chez un modèle murin que lors de lésions ou de ruptures ligamentaires ou tendineuses, l'articulation va devenir instable et entraîner des lésions cartilagineuses. Lors d'exercices intenses ou de mouvements répétés, le cartilage articulaire est aussi fragilisé (Ross et Dyson, 2003). De même de mauvais aplombs ou une ferrure mal adaptée modifient la répartition des forces de pression et donc peuvent induire de l'arthrose (Lejeune et al., 2006).

Plusieurs études ont aussi montré une relation entre le développement d'ostéoarthrose et la présence de lésions au niveau de l'os sous-chondral, émettant l'hypothèse que cet os pourrait jouer un rôle dans la formation de cette pathologie (Cruz et al., 2008 ; Lacourt et al., 2012).

1.2.2 Physiopathologie

Les facteurs déclenchant l'ostéoarthrose 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 anabolique pour tenter de réparer le cartilage. Les chondrocytes vont sécréter des facteurs de croissance comme le « transforming growth factor » (TGF- β), l'« insulin like growth factor » (IGF-1), ou encore le « basic fibroblast derived growth factor » (bFGF). On va donc avoir une multiplication des chondrocytes mitotiques en cluster qui vont produire plus de protéoglycanes. Ces protéoglycanes vont engendrer un appel osmotique et donc ramollir le cartilage. Ces chondrocytes vont aussi produire des fibres de collagène de petite taille, on aura alors une perte de parallélisme de ces fibres 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 fibrocartilagineuse plus sensible aux contraintes mécaniques (Henrotin et Reginster, 1999).

Les fissures et les ostéophytes peuvent libérer des fragments de cartilage dans le liquide synovial, ce qui va provoquer une inflammation de la membrane synoviale. En réponse à cette inflammation, cette membrane ainsi que les chondrocytes et les ostéocytes de l'os sous-chondral vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 1 bêta (IL-1 β) et le « tumor necrosis factor alpha » (TNF- α) qui agissent en synergie. Ces cytokines vont inhiber la synthèse des composants de la matrice extracellulaire et stimuler la production de métalloprotéases matricielles 13 (MMP13) ou de prostaglandines E2 (PGE2) via l'expression de la phospholipase A2 (PA2) et la cyclooxygénase 2 (COX2). L'IL-1 β stimule aussi la production de monoxyde d'azote qui va entraîner l'apoptose des chondrocytes. 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 et al., 2007).

Les nocicepteurs se trouvent 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 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 anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Leur administration peut se faire per os ou par voie parentérale. Ils permettent d'inhiber à la fois la COX2 responsable de la fabrication de PGE2 mais aussi la COX1 ce qui peut causer une toxicité gastrique et rénale (Raidal et al., 2014 ; Whitfield-Cargile et al., 2021). Chez le cheval on trouve principalement le phénylbutazone qui est un AINS non sélectif efficace et bon marché. Cependant, il faut faire attention au surdosage et il est interdit pour les animaux non exclus de la chaîne alimentaire (Goodrich et Nixon, 2006).

Différentes molécules ont vu le jour pour essayer d'être plus sélectives au niveau de l'inhibition des COX afin de limiter les effets indésirables. Le méloxicam est un AINS qui agit majoritairement au niveau de la COX 2. Des études ont montré que cette molécule était moins néfaste pour la muqueuse gastrique que le phénylbutazone (D'Arcy-Moskwa et al., 2012) mais en ce

qui concerne la toxicité rénale aucune différence significative n'a été démontrée (Raidal et al., 2014). De plus, outre les preuves de toxicité via l'action des COX, des études ont montré que le phénylbutazone et le méloxicam pouvaient causer une apoptose des chondrocytes et donc être délétères pour le cartilage. Cependant les scientifiques ont trouvé une molécule permettant de contrecarrer cette apoptose: un inhibiteur de la soluble epoxide hydrolase (sEH) (Tucker et al., 2021 ; Walters et al., 2022). D'autres AINS comme la flunixin méglumine ou le kétoprofène peuvent aussi être utilisés et présentent moins d'effets indésirables (Goodrich et Nixon, 2006).

L'utilisation d'anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) par voie intra-articulaire est aussi une thérapie courante. Ces AIS vont inhiber la production de la PA2 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 acétonide qui est le plus couramment utilisé par les vétérinaires lors d'infiltrations au niveau du carpe, de l'articulation métacarpo/tarsophalangienne, de l'articulation interphalangienne distale et de l'articulation fémoro-tibiale. Tandis que c'est le méthylprednisolone acétate qui est le plus souvent utilisé lors d'infiltration des articulations intertarsienne et tarsometatarsienne. On retrouve par la suite d'autres molécules comme le bétaméthasone esters, l'isofluprédone acétate ou encore la dexaméthasone (Zanotto et Frisbie, 2021). La littérature diverge sur le sujet des risques liés à ces injections d'AIS. En effet certaines études se veulent plutôt rassurantes, démontrant qu'il n'y a pas de risque d'action délétère sur le cartilage (Malaise et al., 2021). Mais la plupart montrent qu'une utilisation prolongée ou de trop grandes quantités de corticostéroïdes pourraient être nocives pour le cartilage (Ferrao Blanco et al., 2022 ; Chen et al., 2022).

Au vu des effets indésirables des AINS et AIS, les scientifiques tentent de trouver des alternatives. Différentes plantes peuvent être données pour leurs propriétés anti-inflammatoires telles que l'harpagophytum procumbens. De récentes études ont mis en évidence que le principe actif contenu dans cette plante, l'harpagoside, pouvait augmenter l'expression des récepteurs CB2 du système endocannabinoïde impliqué dans les voies anti-inflammatoires (Mariano 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 et al., 2021).

Le curcuma est aussi connu pour ses effets anti-inflammatoires et chondroprotecteurs grâce au maintien de l'homéostasie des mitochondries des chondrocytes, et en agissant sur l'expression de certains gènes (Jin et al., 2022 ; Nakagawa et al., 2022).

Dans certains compléments alimentaires on peut aussi trouver de la glucosamine ou des chondroïtines sulfates qui agissent en synergie. La glucosamine sert de substrat pour former les GAGs et les chondroïtines sulfates inhibent la dégradation de la matrice en jouant sur plusieurs acteurs inflammatoires (Goodrich et Nixon, 2006).

De l'acide hyaluronique peut aussi être ajouté à la ration, mais les études scientifiques se concentrent plus sur ses effets lors d'injections intraveineuses (IV) et intra-articulaire (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 (Goodrich et Nixon, 2006).

Comme nous l'avons vu précédemment, l'ostéarthrose 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 causés au cartilage et peut même les aggraver en cas de surdosage en intra-articulaire (Duesterdieck-Zellmer, 2012 ; Bertuglia et al., 2021).

Les scientifiques se sont aussi tournés vers les plaquettes et leurs propriétés anti-inflammatoires et cicatrisantes. C'est ainsi que l'on retrouve maintenant couramment des injections de « platelet-rich products » (PRP) comme proposition de traitement de l'ostéarthrose. 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'IL-1 β (Garbin et Olver, 2020).

De la même façon, les scientifiques se sont aussi intéressés à une protéine endogène inhibitrice du récepteur à l'interleukine 1 (IRAP) produite par les monocytes. L'IRAP ou « autologous conditioned serum » (ACS) est donc aussi préparé en prélevant du sang du patient et en le mettant au contact de bille de borosilicate afin de stimuler la production de cette protéine. Une fois incubé, le contenu est centrifugé et le sérum est récupéré afin d'être injecté en IA. Cependant la littérature est mitigée quant à son efficacité (Löfgren et al., 2022 ; Tokawa, 2022).

De plus, le PRP et l'IRAP n'ont pas encore d'autorisation de mise sur le marché au niveau européen. Ces produits sont autologues et il n'existe donc pas encore de médicaments réglementés dont on connaît le contenu de manière rigoureuse (Garbin et al., 2022).

De nombreuses possibilités thérapeutiques ont été étudiées mais pour la plupart le manque d'études in vivo et standardisées ne permettent pas d'affirmer qu'une de ces manières de soigner l'arthrose soit vraiment prometteuse. Elles réduisent les dégâts causés par les facteurs inflammatoires mais restent limitées quant à la régénération du cartilage. Des études se sont penchées 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 (Stewart et Stewart, 2011).

2. Les cellules souches

2.1 Origines

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. Tout d'abord les cellules souches embryonnaires qui incluent les cellules totipotentes capables de se différencier en tous types cellulaires et de donner les annexes embryonnaires. Mais aussi les cellules pluripotentes, à partir du 4ème jour du blastocyste, qui perdent la capacité de donner les annexes embryonnaires. Ensuite, les cellules souches fœtales sont des cellules pluripotentes qui ont atteint 5 à 9 semaines de développement. Enfin, il existe des cellules souches multipotentes ou adultes capables de se différencier en type cellulaire appartenant à leur feuillet embryonnaire d'origine.

Ces cellules souches adultes sont dispersées à différents endroits de l'organisme. On en retrouve tout d'abord au niveau de la moelle osseuse, ce sont les cellules souches hématopoïétiques capables de se différencier en cellules sanguines, et les cellules souches mésenchymateuses (CSM) capables de donner différents tissus. On peut aussi trouver des cellules souches neurales, musculaires, de la peau ... (Zakrzewski et al., 2019).

Ces cellules souches sont entourées d'un micro-environnement appelé niche et qui a pour rôle de les maintenir dans un état indifférencié et d'auto-renouvellement. Les scientifiques portent un intérêt non négligeable à la composition cellulaire de ces niches et à l'identification des mécanismes moléculaires contrôlant le comportement des cellules souches (Birbrair, 2017).

2.2 Prélèvement

À l'heure actuelle, en médecine régénérative du cheval, les CSM sont principalement utilisées car elles sont facilement accessibles, simples à isoler et présentent un risque tératogène minimal contrairement aux cellules souches pluripotentes (Gugjoo et al., 2019).

Chez le cheval, on retrouve ces CSM dans de nombreux tissus comme la moelle osseuse, le tissu adipeux, le tissu embryonnaire, le liquide synovial et sa membrane, le cordon ombilical et le sang périphérique, le périoste, les muscles, les gencives, la pulpe dentaire, le ligament parodontal, l'endomètre et le follicule pileux.

Certaines caractéristiques des CSM varient en fonction du tissu d'origine. Par exemple, chez les chevaux, les CSM issues de la moelle osseuse (BM-CSM) semblent avoir un meilleur potentiel chondrogénique et ostéogénique ainsi qu'une meilleure capacité de migration que les CSM issues du tissu adipeux (AD-CSM) (Gugjoo et al., 2019). Cependant, il manque encore de preuves scientifiques afin de déterminer quelle origine est la plus efficace en fonction de la cible thérapeutique visée.

En général, pour les BM-CSM chez le cheval, la tubérosité coxale et le sternum sont les sites de ponction principaux. Chez ce dernier, c'est au niveau de la 5ème sternèbre que l'on va ponctionner les CSM. Sa position craniale à l'apex du cœur permet d'éviter les risques de ponction cardiaque ou de pneumo-péricarde. Le prélèvement se fait de manière écho-guidée et à l'aide d'une aiguille de biopsie médullaire de type Jamshidi (Kasashima et al., 2011).

Après le prélèvement, il faut isoler les CSM de la ponction. Plusieurs techniques ont été comparées dans la littérature. La méthode classique qui compte sur l'adhérence des CSM au plastique des boîtes de Pétri, et 2 protocoles de séparation par gradient de densité (Ficoll et Percoll). Les trois méthodes 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 meilleures capacités d'auto-renouvellement (Bourzac et al., 2010).

Les CSM sont généralement cultivées dans un milieu contenant du sérum foetal bovin (FBS) à des concentrations variables qui fournit différentes hormones, nutriments, protéines plasmatiques d'adhésion cellulaire et facteurs de croissance pour la prolifération (Gugjoo et al., 2018).

Enfin, 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 utiliser la cryogénie (Garvican et al., 2016).

2.3 Différenciation

In vivo, les cellules souches mésenchymateuses sont dépendantes de leur micro-environnement concernant leur différenciation. Leurs niches sont le lieu de nombreuses interactions entre types cellulaires différents. Des progrès ont été réalisés dans l'identification et la caractérisation de ces niches. En effet, en utilisant le séquençage d'ARN unicellulaire de cellules de moelle osseuse non hématopoïétique, des scientifiques ont réussi à définir des sous-populations spécifiques. Ils ont aussi réussi à cartographier les différents chemins de différenciation des CSM en ostéocytes, chondrocytes et adipocytes (Wolock et al, 2019).

Ces avancées permettent d'appliquer ces nouvelles connaissances à la différenciation in vitro des CSM en chondrocytes. Pour cela il faut les mettre au contact de différents composants comme le TGF- β 1, 2 et 3 et autres facteurs de croissance comme du IGF-1, « bone morphogenetic protein » (BMP6), bFGF, « epidermal growth factor » (EGF), « platelet derived growth factor » (PDGF). Il faut aussi ajouter des composants non protéiques comme de la dexaméthasone ou de l'acide ascorbique. Le tout cultivé dans un milieu de culture sans sérum ou dans des matériaux de micromasse. La concentration en oxygène est aussi importante. Le milieu hypoxique favorise la prolifération des CSM et l'expression de gènes spécifiques du cartilage (COL2A1 et SOX9) ainsi que la synthèse accrue des protéoglycanes et du collagène de type 2. Cela empêche aussi la maturation hypertrophique des chondrocytes dérivés des CSM. Les canaux calciques augmentent la concentration intracellulaire de calcium ce qui entraîne l'initiation des voies de signalisation permettant l'expression de gènes et la synthèse de protéines spécifiques du cartilage. La vérification de la différenciation en chondrocytes s'effectue en détectant la production de protéines spécifiques du cartilage et par l'absence de marqueur d'hypertrophie (gène COL10A1) ou de MMP-13. On peut aussi vérifier l'expression de COL2A1 et SOX9 au niveau génétique (Harrell et al., 2019).

2.4 Effets thérapeutiques

Les premières études concernant l'utilisation des cellules souches afin de soigner l'arthrose datent du début des années 2000. On pensait alors pouvoir utiliser les cellules souches afin de les différencier en chondrocytes et qu'elles pourraient fabriquer une nouvelle matrice extracellulaire. Les premières études *in vitro* semblaient très prometteuses (Mahmoudifar et Doran, 2010 ; Yoshimura H et al., 2007). Cependant, les études *in vivo* ont plus de mal à prouver qu'il existe un renouvellement du cartilage grâce au remplacement des chondrocytes apoptotiques par les cellules souches différenciées (Pas et al, 2017). Par contre, elles prouvent qu'il y a une amélioration significative des boiteries associées à cette arthrose (Freitag, 2019).

En effet, les cellules souches ont d'autres propriétés que la différenciation cellulaire et qui sont bénéfiques contre notre pathologie.

2.4.1 Homing cellulaire

Les CSM ont comme avantage de pouvoir migrer vers les tissus lésés. Elles sont étroitement liées à des facteurs chimiques comme les chimiokines, les cytokines et les facteurs de croissance. L'un des principaux facteurs chimiques impliqués dans la migration des CSM est un facteur 1 dérivé des cellules stromales (SDF-1). C'est une chimiokine libérée à partir des tissus endommagés et envoyant des signaux chimio-attractants pour les cellules exprimant les récepteurs CXCR4 sur leur membrane externe. Toutefois, le CXCR4 des CSM non actives n'est présent qu'à de faibles concentrations à la surface des cellules, mais à des concentrations intracellulaires plus élevées. Lors de leur activation, les CSM peuvent rapidement transférer leur molécules CXCR4 à leur surface. En plus du CXCR4, d'autres récepteurs de chimiokine ont été identifiés comme le CCR6, le CCR9, le CXCR3 et le CXCR6. Parmi les facteurs de croissance, le facteur de croissance endothélial vasculaire, le facteur de croissance des hépatocytes, le bFGF, l'IGF-1 et le TGF- β 1 ont aussi une incidence importante sur l'orientation des CSM. Des facteurs mécaniques tels que la déformation mécanique, la contrainte de cisaillement ou la rigidité de la matrice sont également importants dans l'orientation des CSM. Ainsi, l'injection de CSM par voie systémique est alors possible. Cependant la migration des CSM après l'application IV est confrontée à divers obstacles. Par exemple elles sont souvent séquestrées, puis évacuées au niveau des poumons car elles ont un plus grand diamètre que les capillaires pulmonaires (30 μ m vs 14 μ m). De plus, les interactions moléculaires des CSM

avec l'endothélium pulmonaire peuvent être une autre raison de leur accumulation dans les poumons. Ainsi, les CSM ont une courte durée de vie et disparaissent souvent 24 h après la perfusion. Les effets bénéfiques à long terme des CSM sont donc en quelque sorte contradictoires par rapport à leur courte durée de vie. Cela peut-être expliqué par l'apoptose et la phagocytose des CSM qui induisent des effets à long terme (Voga et al., 2020).

2.4.2 Propriétés immunomodulatrices

Une autre propriété des CSM est leurs capacités d'immunomodulation en inhibant un très grand nombre de protagonistes pro-inflammatoires (Figure 3).

Tout d'abord, de manière paracrine, grâce à la production de facteurs solubles, elles peuvent inhiber l'activation de macrophage M1 pro-inflammatoires (produisant de l'IL-1 et du TNF- α) et induisent sa conversion en macrophage M2 anti-inflammatoires (produisant de l'IL-10). Elles diminuent la prolifération et la cytotoxicité des cellules natural killer (NK), préviennent l'activation de lymphocytes B autoréactifs et la production d'anticorps autoréactifs, suppriment l'activation de lymphocytes pro-inflammatoires CD4⁺ Th1 et promeuvent la production de lymphocytes immunosuppresseurs CD4⁺Tregs.

En effet, elles produisent du « TNF α -stimulated gene/protein 6 » (TSG-6) en réponse au TNF- α produit par les M1. Ce TSG-6 va interagir avec le récepteur CD44 sur les macrophages et diminuer des voies de signalement pro-inflammatoire. Elle produisent aussi du PGE2 qui se lie aux récepteurs EP2 et EP4 sur les macrophages et favorise la production d'immunosuppresseurs IL-10. Les PGE2 inhibent aussi la production d'interféron gamma (IFN- γ) dans les cellules NK et active les cellules CD4 + Tregs. L'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), produite elle aussi par les CSM, va catalyser la dégradation du tryptophane en kynurenine immunomodulatrice, qui, à son tour, favorise la conversion des macrophages M1 en phénotype M2 et, en même temps, induit la conversion des cellules effectrices CD4 + Th1 en Tregs. Le « growth related oncogene » (GRO) atténue la maturation et la fonction de présentation de l'antigène des cellules dendritiques inflammatoires, et supprime l'activation de la réponse immunitaire Th1. Enfin, elle produisent un antagoniste de l'IL-1 (IL-1Ra) qui se lie au récepteur de IL-1 et empêche son interaction avec celle-ci.

En conséquence, l'apoptose des chondrocytes ainsi que divers événements pro-inflammatoires y compris la synthèse et la libération d'enzymes dégradantes de matrice et de chimiokines sont inhibés (Harrell et al, 2019).

En plus des mécanismes paracrine, les CSM peuvent moduler la fonction des cellules immunitaires en fonction du contact cellulaire. Grâce à l'interaction entre la molécule « inhibitory molecule programmed death 1 » (PD-1) avec ses ligands PD-L1 et PD-L2 sur les lymphocytes T effecteurs, les CSM inhibent la prolifération des lymphocytes T activés. De plus, comme les CSM n'ont pas d'expression superficielle des molécules co-stimulatrices (CD80 et CD86), pendant l'interaction avec les lymphocytes T, les CSM ne fournissent pas de signal secondaire et, par conséquent, rendent les lymphocytes T anergiques. De même, les CSM induisent l'activation de protéines kinases dans les lymphocytes B, ce qui entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 (Harrell et al, 2019).

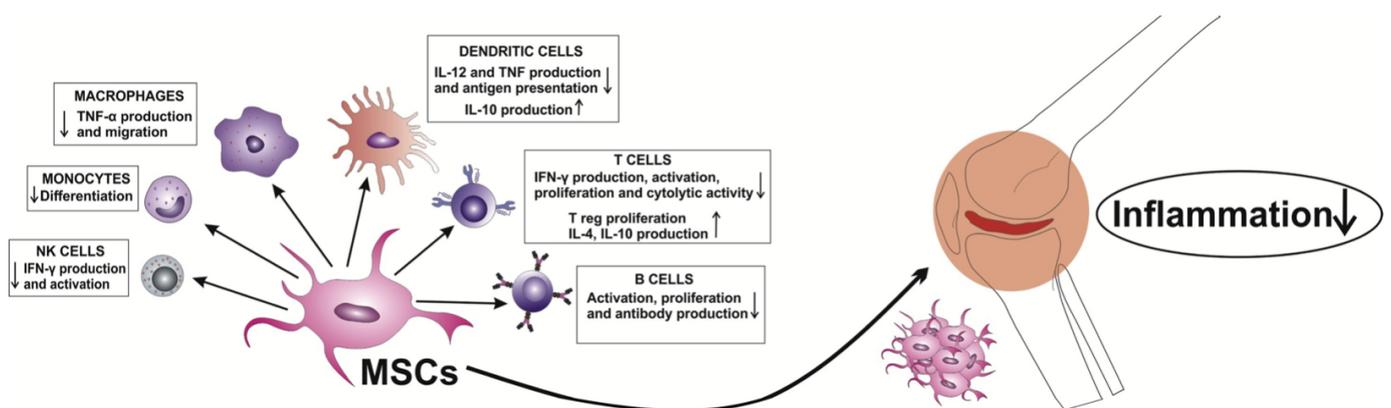


Figure 3: Action anti-inflammatoire des cellules souches mésenchymateuses (Harrell et al, 2019)

Les CSM sont aussi capables de sécréter des vésicules extra-cellulaires (VEC). Elles sont formées par bourgeonnement et contiennent des micro ARN, de l'ARN messager, des protéines et des mitochondries protégées par une membrane ce qui leur permet de parcourir de longues distances à l'intérieur du corps. Elles interagissent de la même manière que les CSM. Elles produisent aussi de la PGE2, du TGF- β 1, du TSG-6. Ces vésicules semblent prometteuses d'un point de vue thérapeutique car elles permettraient d'utiliser les capacités anti-inflammatoires des CSM sans injecter de cellules ce qui réduirait les effets secondaires comme les réactions immunitaires envers celles-ci. Cependant, en utilisant uniquement les VEC, on perd l'action juxtacrine des CSM.

En plus de transférer des molécules via des VEC, les CSM semblent capables de transférer des organelles comme des mitochondries par voie intercellulaire via des nanotubes (Al Naem et al., 2020 ; Hotham et al., 2021).

L'apoptose des CSM joue aussi un rôle important dans les effets immunomodulateurs. En effet celle-ci est induite par les cellules cytotoxiques indépendamment du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) par un contact physique entre les cellules. Les CSM apoptotiques sont ensuite phagocytées par des macrophages qui, finalement, livrent une activité immunosuppressive en produisant de l'IDO (Voga et al., 2020).

2.4.3 Effets sur le cartilage articulaire

Les CSM différenciées et leurs VEC ont aussi la propriété de régénérer de la matrice extracellulaire cartilagineuse. Par exemple elles sécrètent des PGs et du collagène de type 2. Cependant, la principale source de remplacement du cartilage provient des cellules endogènes stimulées par l'action paracrine des CSM ou des VEC. En effet, elles sécrètent un facteur de croissance TGF- β 1 stimulant la prolifération des chondrocytes et de la MEC. Elles diminuent aussi l'expression de la MMP-13 responsable de la dégradation du cartilage. Les VEC favoriseraient aussi la formation de nouveau cartilage et les dépôts de collagène 2 et de GAGs. Les VEC dont les CSM ont surexprimé miR-140-5p peuvent stimuler la migration et la prolifération de chondrocytes. De plus, les BM-CSM peuvent sécréter des VEC enrobées de hyaluronane ce qui permettrait aux CSM de se diriger vers les défauts cartilagineux via le récepteur CD44. Cependant, les études sur la réparation du cartilage par les VEC restent rares et il est également possible d'avoir des effets dommageables au niveau articulaire lors de leur utilisation.

In vivo, les BM-CSM en particulier ont été utilisés dans une grande variété de petits et grands modèles animaux. Par exemple, une formation du tissu cartilagineux de type hyalin a été observée après le traitement d'un défaut ostéochondral canin avec des BM-CSM autologues. Malheureusement, il manque encore de solides rapports scientifiques décrivant le potentiel régénératif des CSM in vivo (Lo Monaco et al., 2018).

2.4.4 Limites de l'utilisation des CSM

Malgré leurs aptitudes non négligeables à améliorer la qualité de vie des patients atteints d'arthrose, il reste encore de nombreuses incertitudes concernant les CSM.

Premièrement, c'est en 2006 que la notion de caractérisation et de classification des CSM humaines a été introduite par la Société internationale de thérapie cellulaire (ISCT). Après avoir constaté que la grande diversité dans l'isolement, les méthodes de culture et d'utilisation des CSM ont rendu la comparaison et la normalisation des protocoles d'études cliniques et non cliniques très compliquées. Elles doivent pouvoir adhérer au plastique du matériel de culture, doivent exprimer des récepteurs de surface CD105, CD90, CD73, CD90 et être dépourvues de marqueurs hématopoïétiques CD45, CD34, CD14 ou CD11 b, CD79a ou CD19, et HLA-DR. En outre, les cellules devraient se différencier au moins en lignées ostéogéniques, chondrogéniques et adipogéniques dans les milieux respectifs. Les CSM équine répondent généralement aux critères établis d'adhérence plastique et de pluripotence, mais elles ne font pas consensus sur l'expression des marqueurs de surface. Les CSM équine expriment de façon variable différents marqueurs de surface comme CD29, CD90, CD44, CD166, CD13, CD146, CD117, CD40 et CD80, sans exprimer les antigènes CD45, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19, et le MHC de classe II. L'expression variable de CD13, CD73, CD105 et CD34 peut s'expliquer par les différences dans le type de sources de tissus cellulaires, les méthodes de prélèvement et les anticorps utilisés. De telles variabilités dans les caractéristiques cellulaires nécessitent des recherches uniformes et approfondies (Gugjoo et al., 2019 ; Al Naem et al., 2020).

Guest et collaborateurs (2022) ont souligné un autre problème qui réside dans le fait que la plupart des recherches sur les CSM pour soigner l'arthrose ont utilisé un large éventail de produits cellulaires pour la recherche et l'utilisation clinique. Ceux-ci sont souvent mal caractérisés et mal décrits, avec des descripteurs de résultats variables. Tout cela rend difficile l'évaluation objective de l'innocuité et de l'efficacité des CSM. Bien que cela n'ait pas été inattendu lorsque la technologie était en développement précoce, de nombreuses preuves sur la nature et la fonction des CSM ont été obtenues au cours des 20 dernières années. Malgré cela, il continue d'y avoir des études mal normalisées qui manquent de rigueur scientifique et entraînent un scepticisme chez les cliniciens concernant les CSM en tant que thérapie clinique. Par conséquent, il est nécessaire de normaliser les principaux paramètres liés à la recherche clinique sur les cellules souches animales afin d'améliorer la qualité des rapports de recherche et d'accroître la confiance dans la technologie. Cette étude

propose donc des lignes directrices permettant de comparer plus aisément les différentes études sur l'utilisation des CSM.

Enfin, actuellement 2 choix différents s'offrent aux cliniciens qui veulent utiliser les CSM dans leur arsenal thérapeutique, les cellules souches autologues qui sont prélevées et administrées au même individu ou alors les cellules souches allogéniques qui sont prélevées chez un donneur et utilisées chez un receveur de la même espèce. L'isolement et l'expansion des cellules souches autologues prennent du temps et sont associées à une procédure coûteuse. De plus, comme dit précédemment, il existe de nombreuses façons d'isoler et de cultiver ces CSM autologues en fonction des kits de prélèvements et des laboratoires. Il n'existe donc pas de consensus sur le contenu de ces injections une fois préparées. En outre, la qualité de l'échantillon de CSM pourrait être affectée par l'âge du patient ou par une maladie existante. Le besoin de produits à base de cellules souches provenant de jeunes donneurs en bonne santé est donc à la hausse (Voga et al., 2020).

Au niveau Européen il existe 2 produits allogéniques commercialisés. Le questionnement majeur se situe au niveau de l'immunotolérance face à ces CSM. En effet, les molécules de surface du MHC I sur les CSM allogéniques pourraient être reconnues par les cellules CD8+T réceptrices, conduisant à une cytotoxicité directe des cellules étrangères. De plus, les molécules du MHC II peuvent être reconnues par les cellules CD4+ T réceptrices, conduisant à une réponse immunitaire cytotoxique ou humorale. Indépendamment des nombreux résultats positifs des études encourageant l'utilisation de CSM allogénique, plusieurs études ont confirmé que les propriétés immunosuppressives des CSM n'excluent pas leur immunogénicité. D'autres recherches sont donc nécessaires pour déterminer les mécanismes potentiels de réglementation de l'expression des MHC sur les CSM. Les cellules souches autologues restent donc la source de cellules souches la plus couramment utilisée en médecine vétérinaire contemporaine (Voga et al., 2020).

De plus, certaines études analysent comment l'inflammation et la différenciation chondrogénique influencent l'équilibre immunomodulateur-immunogénicité des CSM. En effet nous pouvons aussi faire le choix d'injecter des CSM non différenciées, différenciées en chondrocytes ou préalablement mises en contact avec un environnement inflammatoire. Ici aussi il manque de données in vivo afin de pouvoir faire notre choix (Cequier et al., 2022).

3. Étude d'un médicament à base de cellules souches allogéniques disponible sur le marché européen: Arti-Cell Forte® (Global STEM CELL Technology)

Le comité pour les médicaments à usage vétérinaire (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 CSM différenciées en chondrocytes (ciMSCs) associées à du plasma allogénique équin (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 de réduire le processus inflammatoire. On peut donc penser que ce médicament s'adresse aux chevaux atteints d'ostéoarthrose mais ceci n'est pas précisé dans la publication de l'Agence européenne du médicament (EMA).

Nous allons nous pencher sur le fonctionnement d'Arti-Cell Forte® et discuter de son efficacité.

Arti-Cell Forte® est produit par la firme Global Stem cell Technology NV (GST NV). Un de leur premier essai avait pour but d'étudier les effets cliniques d'une injection de PRP et de CSM non différenciées ou différenciées en chondrocytes (Broeckx et al., 2014a). 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'ostéoarthrose.

L'étude concerne 20 chevaux présentant une boiterie légère à modérée depuis plus de 3 mois due à de l'ostéoarthrose sur l'articulation métacarpo ou métatarso - phalangienne. Des radiographies et des computer-tomographie (CT) ont été réalisées afin de mettre en évidence des signes d'ostéoarthrose 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 CSM non différenciées seules, ou d'une combinaison de CSM non différenciées avec du PRP ou de ciMSCs avec du 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 4) permettant de qualifier le test de flexion (entre 0 et 3), le niveau de boiterie (entre 0 et 5) et l'épanchement articulaire (entre 0 et 2). Ils ont ensuite fait la somme des scores obtenus, et traduit cela en un score évolutif allant de 0 à 5, 5 représentant les chevaux cliniquement sains. L'étude a duré 12 mois. Les résultats (Figure 5) montrent que les traitements contenant les CSM sont significativement plus efficaces que ceux contenant uniquement le PRP et ce en prenant la moyenne des scores à 6 et 12 semaines post injection ($P= 0,033$) et en

prenant la moyenne des scores à 6 et 12 mois ($P= 0,012$). Il n'est pas possible de montrer une différence significative entre le traitement contenant les CSM 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.

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.

		6 weeks	12 weeks	6 months	12 months
GROUP 1	Horse 1	4	2	2	1
	Horse 2	4	5	4	4
	Horse 3	3	3	3	3
	Horse 4	3	2	2	2
	Horse 5	3	3	3	3
	Average	3.4	3	2.8	2.6
	STD	0.5	1.2	0.8	1.1
GROUP 2	Horse 6	3	4	5	5
	Horse 7	0	1	2	2
	Horse 8	3	4	5	5
	Horse 9	4	4	5	4
	Horse 10	5	5	5	5
	Average	3	3.6	4.4	4.2
	STD	1.9	1.5	1.3	1.3
GROUP 3	Horse 11	3	4	4	5
	Horse 12	4	5	5	3
	Horse 13	4	5	5	4
	Horse 14	5	5	5	5
	Horse 15	3	4	4	4
	Average	3.8	4.6	4.6	4.2
STD	0.8	0.5	0.5	0.8	
GROUP 4	Horse 16	4	4	5	5
	Horse 17	5	5	5	5
	Horse 18	4	4	4	4
	Horse 19	5	5	5	5
	Horse 20	4	5	5	5
	Average	4.4	4.6	4.8	4.8
STD	0.5	0.5	0.4	0.4	

Figure 4. Broeckx et al., 2014a

Scores d'évolution clinique avec moyenne et écart-type (SDT) à différents moments pour les différents groupes traités : 1 = plasma riche en plaquettes (PRP), 2 = cellules souches mésenchymateuses (CSM), 3 = PRP+CSM et 4 = PRP+ CSM différenciées en chondrocytes

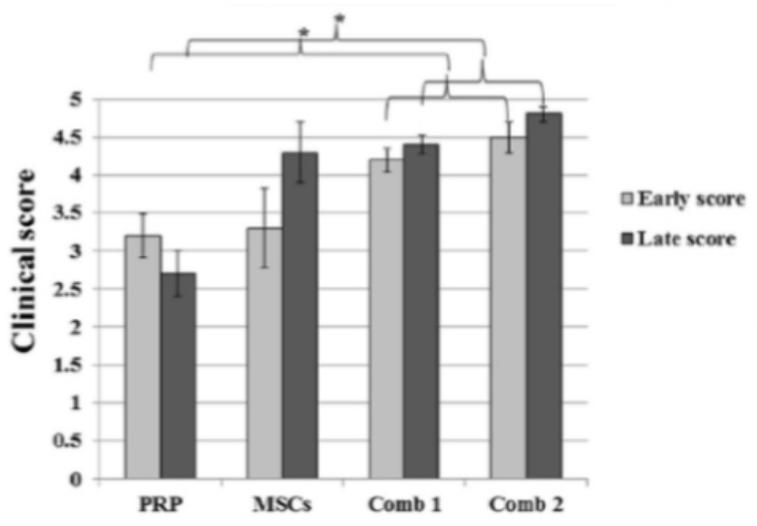


Figure 5. Broeckx et al., 2014a

Somme des scores d'évolution clinique obtenus dans la figure 4.
 Early score = score précoce; c'est la moyenne des scores d'évolution à 6 et 12 semaines
 Late score = score tardif; c'est la moyenne des scores d'évolution à 6 et 12 mois.
 * Score précoce: $P = 0,033$
 * Score tardif: $P = 0,012$

Broeckx et collaborateurs (2014b) ont donc mené une autre étude sur 165 chevaux atteints d'ostéoarthrose sur différentes articulations afin d'évaluer leur capacité à retourner à l'entraînement en fonction du choix d'injection de ciMSMs ou de CSM. Ici aussi on observe un meilleur pronostic sportif pour ceux ayant reçu les ciMSCs mais toujours non significatif par rapport à ceux ayant reçu les CSM. Cette tendance à de meilleurs pronostiques peut être expliquée par des analyses in vitro des effets de la différenciation de CSM en chondrocytes (Broeckx et al., 2014a). 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 protéine de matrice oligomérique cartilagineuse (COMP) (Figure 6) . De même on observe une augmentation de la synthèse de glycosaminoglycanes (Figure 7). 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 scientifiques 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.

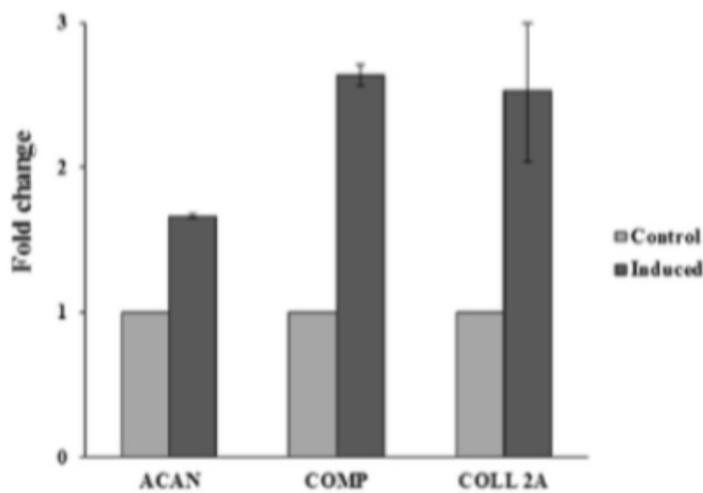


Figure 6. Broeckx et al., 2014a

Résultats de la RT-PCR pour l'expression génique du collagène (Col) de type II, de l'aggrécane et de la protéine de matrice oligomérique cartilagineuse (COMP) dans les CSM (Ctrl) et les CSM différenciées en chondrocytes (Ind).

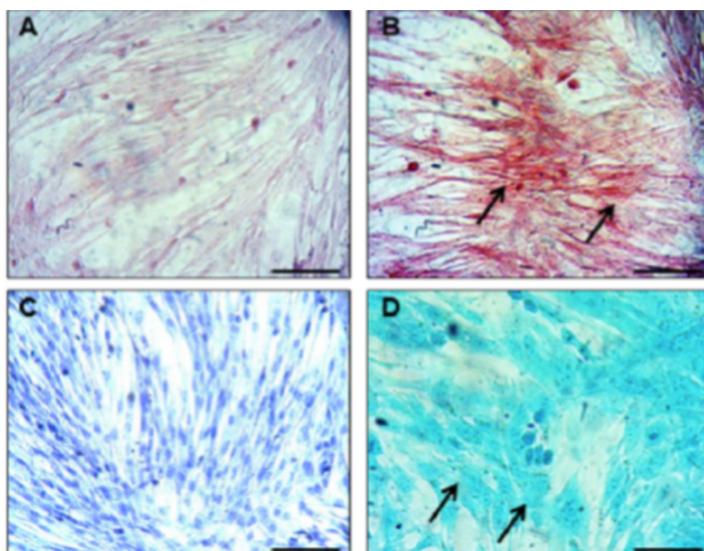


Figure 7. Broeckx et al., 2014a

Images représentatives de cellules souches mésenchymateuses (CSM) dans leur état indifférencié (A et C) et chondrogéniquement induites (B et D) après coloration à l'Alcian Blue (A et B) et Safranin O (C et D). La production de glycosaminoglycane (flèches noires) peut être remarquée après induction. Les barres d'échelle représentent 50 µm.

Pour prouver son efficacité de manière rigoureuse la firme a alors mené un nouvel essai (Broeckx et al., 2019). Cette étude est une étude standardisée, randomisée, en double aveugle et contrôlée par un placebo et vise à prouver l'efficacité des ciMSCs comme traitement contre l'ostéoarthrose. 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, des GAGs et du collagène de type 2 sur l'articulation (Figure 8).

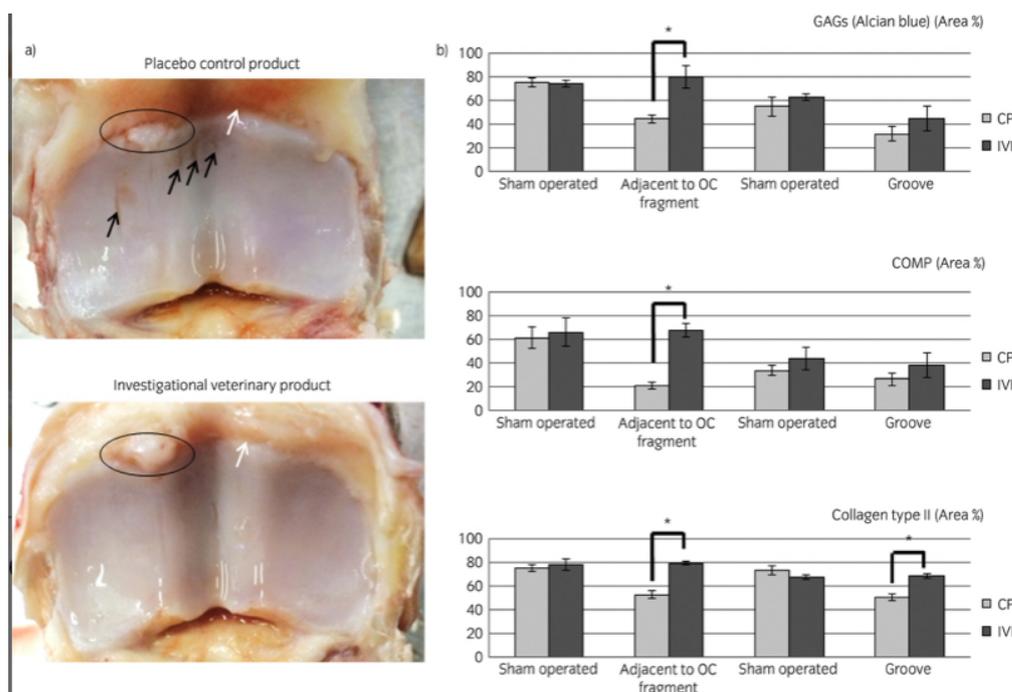


Figure 8. Broeckx et al., 2019

Examen macroscopique post mortem (semaine 11) de l'articulation métacarpo-phalangienne d'un cheval ayant reçu le placebo (CP) et d'un cheval ayant reçu la solution de ciCSM + EAP (IVP). Des lignes d'usure indiquées par les flèches noires sont visibles dans l'articulation CP, mais pas dans le joint IVP. L'hyperémie synoviale indiquée par la flèche blanche est également plus prononcée dans l'articulation traitée par PC que dans l'articulation traitée par IVP.

b) Pourcentage de surface moyenne occupée par des glycosaminoglycanes (GES), par des protéines de matrice oligomérique du cartilage (COMP) et par du collagène de type II, grâce à l'analyse histologique et immunohistochimique à différents endroits du cartilage articulaire.

*Différence significative entre les groupes de traitement avec $P < 0,05$.

Cette étude a pour avantage d'avoir un niveau de preuve élevé et met en évidence la 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 correspondant à un certain stade d'arthrose que l'on ne retrouve pas forcément chez les chevaux atteints naturellement.

En 2018, des scientifiques de chez GST NV publient le premier article mentionnant le produit Arti-Cell Forte ® (Broeckx et al., 2018). Cette étude a pour but d'observer les possibles effets secondaires d'une injection de CSM afin de pouvoir en assurer la sécurité. Les scientifiques 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 aucune différence significative sur ces paramètres 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.

Sur base de la littérature actuelle nous pouvons nous rendre compte que Arti-Cell Forte ® n'est pas encore la solution révolutionnaire 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'ostéoarthrose différents et sur une plus longue durée. De plus, la firme devrait préciser quels stades d'ostéoarthrose doivent présenter les chevaux afin d'obtenir la même efficacité que dans leurs études.

Conclusion

Malgré les espoirs en terme de régénération de cartilage apportés par les études in vitro, de nombreux questionnements demeurent face à l'efficacité des cellules souches à régénérer le cartilage in vivo. En effet, le manque de connaissance sur la caractérisation des CSM équines, le manque d'études standardisées, randomisées et à long terme, le manque d'homogénéité de production de cellules souches autologues et les incertitudes dans les choix de type de cellules souches mésenchymateuses à utiliser nous empêchent d'avoir un avis tranché sur la question. De plus, nous manquons de recul face à une technologie qui reste à un prix très élevé et qui fait face à d'autres thérapies comme IRAP et le PRP qui sont plus répandues et plus accessibles. Le potentiel de différenciation en chondrocytes de ces cellules souches aurait dû leur apporter un avantage par rapport à ces thérapies mais ce sont leurs propriétés anti-inflammatoires qui sont prouvées, ce qui les relègue au même plan. De nombreuses études sont actuellement en cours afin de mieux comprendre ces CSM et de nouvelles thérapies dérivées des CSM voient le jour comme la formation d'implant in vitro de cartilage à greffer directement sur le site lésé (Epanomeritakis et al., 2022) ou encore l'étude des effets des VEC produites par ces cellules (Contentin et al., 2022).

Bibliographie

Adams MK., Goodrich LR., Rao S., Olea-Popelka F., Phillips N., Kisiday JD., McIlwraith CW., 2013. Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BMDMSCs) from the ilium and sternum: are there differences? *Equine Vet J.* (3):372-5.

Al Naem M., Bourebaba L., Kucharczyk K., Röcken M., Marycz K., 2020. Therapeutic mesenchymal stromal stem cells: Isolation, characterization and role in equine regenerative medicine and metabolic disorders. *Stem Cell Rev Rep.* (2):301-322.

Bertoni L., Jacquet-Guibon S., Branly T., Legendre F., Desancé M., Mespoulhes C., Melin M., Hartmann DJ., Schmutz A., Denoix JM., Galéra P., Demoor M., Audigié F., 2020. An experimentally induced osteoarthritis model in horses performed on both metacarpophalangeal and metatarsophalangeal joints: Technical, clinical, imaging, biochemical, macroscopic and microscopic characterization. *PLoS One* 15(6):e0235251.

Bertuglia A., Basano I., Pagliara E., Bottegaro NB., Spinella G., Bullone M., 2021. Effect of intravenous tiludronate disodium administration on the radiographic progression of osteoarthritis of the fetlock joint in Standardbred racehorses. *J Am Vet Med Assoc.* 259(6):651-661.

Birbrair A., 2017. *Stem Cell Microenvironments and Beyond.* *Adv Exp Med Biol.* 2017;1041:1-3.

Bourzac C., Smith LC., Vincent P., Beauchamp G., Lavoie JP., Laverty S., 2010. Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. *Equine Vet J.* (6):519-27.

Broeckx S., Zimmerman M., Crocetti S., Suls M., Mariën T., Ferguson SJ., Chiers K., Duchateau L., Franco-Obregón A., Wuertz K., Spaas JH., 2014a. Regenerative therapies for equine degenerative joint disease: a preliminary study. *PLoS ONE* 9:e85917.

Broeckx S., Suls M., Beerts C., Vandenberghe A., Seys B., Wuertz-Kozak K., Duchateau L., Spaas JH., 2014b. Allogenic mesenchymal stem cells as a treatment for equine degenerative joint disease: a pilot study. *Curr Stem Cell Res Ther.* ;9(6):497-503

Broeckx SY., Martens AM., Bertone AL., Van Brantegem L., Duchateau L., Van Hecke L., Dumoulin M., Oosterlinck M., Chiers K., Hussein H., Pille F., Spaas JH., 2019. The use of equine chondrogenic-induced mesenchymal stem cells as a treatment for osteoarthritis: A randomised, double-blinded, placebo-controlled proof-of-concept study. *Equine Vet J.* ;51(6):787-794

Broeckx SY., Spaas JH., Chiers K., Duchateau L., Van Hecke L., Van Brantegem L., Dumoulin M., Martens AM., Pille F., 2018. Equine allogeneic chondrogenic induced mesenchymal stem cells: A GCP target animal safety and biodistribution study. *Res Vet Sci.* ;117:246-254

Cequier A., Romero A., Vázquez FJ., Vitoria A., Bernad E., Fuente S., Zaragoza P., Rodellar C., Barrachina L., 2022. Equine Mesenchymal Stem Cells Influence the Proliferative Response of Lymphocytes: Effect of Inflammation, Differentiation and MHC-Compatibility. *Animals (Basel).* ;12(8):984.

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., 2021. 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.* ;17(15):4140-4153.

Contentin R., Jammes M., Bourdon B., Cassé F., Bianchi A., Audigié F., Branly T., Velot É., Galéra P., 2022. Bone Marrow MSC Secretome Increases Equine Articular Chondrocyte Collagen Accumulation and Their Migratory Capacities. *Int J Mol Sci.* ;23(10):5795.

Cruz AM., Hurtig MB., 2008. Multiple pathways to osteoarthritis and articular fractures: is subchondral bone the culprit? *Vet Clin North Am Equine Pract.* (1), p.101-16.

D'Arcy-Moskwa E., Noble GK., Weston LA., Boston R., Raidal SL., 2012. Effects of meloxicam and phenylbutazone on equine gastric mucosal permeability. *J Vet Intern Med.*(6):1494-9.

David D. Frisbie and Sherry A., 2019. *Synovial Joint Biology and Pathobiology. Équine Surgery* 5th Edition, section XII Musculoskeletal System, chapitre 79

Duesterdieck-Zellmer KF., Driscoll N., Ott JF., 2012. Concentration-dependent effects of tiludronate on equine articular cartilage explants incubated with and without interleukin-1 β . *Am J Vet Res.* (10):1530-9.

Farpour HR., Rajabi N., Ebrahimi B., 2021. The Efficacy of *Harpagophytum procumbens* (Teltonal) in Patients with Knee Osteoarthritis: A Randomized Active-Controlled Clinical Trial. *Evid Based Complement Alternat Med.* ; 2021:1-8.

Epanomeritakis IE., Lee E., Lu V., Khan W., 2022. The Use of Autologous Chondrocyte and Mesenchymal Stem Cell Implants for the Treatment of Focal Chondral Defects in Human Knee Joints-A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci.* ;23(7):4065.

Ferrao Blanco MN., Bastiaansen Jenniskens YM., Kops N., Chavli A., Narcisi R., Botter SM., Leenen PJM., van Osch GJVM., Fahy N., 2022. Intra-articular injection of triamcinolone acetonide sustains macrophage levels and aggravates osteophytosis during degenerative joint disease in mice. *Br J Pharmacol.* (11):2771-2784.

Freitag J., Bates D., Wickham J., Shah K., Huguenin L., Tenen A., Paterson K., Boyd R., 2019. Adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Regen Med.* (3):213-230.

Garbin LC., Contino EK., Olver CS., Frisbie DD., 2022. 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.* ;18(1):141.

Garbin LC., Olver CS., 2020. Platelet-Rich Products and Their Application to Osteoarthritis. *J Equine Vet Sci.* 86:102820.

Garvican ER., Cree S., Bull L., Smith RK., Dudhia J., 2016. Erratum to: Viability of equine mesenchymal stem cells during transport and implantation. *Stem Cell Res Ther.* ;7(1):161.

Gencoglu H., Orhan C., Sahin E., Sahin K., 2020 Undenatured Type II Collagen (UC-II) in Joint Health and Disease: A Review on the Current Knowledge of Companion Animals. *Animals (Basel)* ;10(4):697.

Goodrich LR., Nixon AJ., 2006. Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *Vet J.* (1):51-69.

Guest DJ., Dudhia J., Smith RKW., Roberts SJ., Conzemius M., Innes JF., Fortier LA., Meeson RL., 2022. Position Statement: Minimal Criteria for Reporting Veterinary and Animal Medicine Research for Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Orthopedic Applications. *Front Vet Sci.* ;9:817041.

Gugjoo MB., Amarpal, Makhdoomi DM., Sharma GT., 2019. Equine Mesenchymal Stem Cells: Properties, Sources, Characterization, and Potential Therapeutic Applications. *J Equine Vet Sci.* ;72:16-27.

Harrell CR., Markovic BS., Fellabaum C., Arsenijevic A., Volarevic V., 2019. Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis: Current knowledge and future perspectives. *Biomed Pharmacother.* ;109:2318-2326.

Henrotin Y., Reginster JY., 1999. Anabolic events in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* (3):310-2.

Hotham WE., Thompson C., Szu-Ting L., Henson FMD., 2021. The anti-inflammatory effects of equine bone marrow stem cell-derived extracellular vesicles on autologous chondrocytes. *Vet Rec Open.* ;8(1):e22.

Jin Z., Chang B., Wei Y., Yang Y., Zhang H., Liu J., Piao L., Bai L., 2022. Curcumin exerts chondroprotective effects against osteoarthritis by promoting AMPK/PINK1/Parkin-mediated mitophagy. *Biomed Pharmacother.* ;151:113092.

Kasashima Y., Ueno T., Tomita A., Goodship AE., Smith RK., 2011. Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. *Equine Vet J.* (3):288-94.

Laadhar L., Zitouni M., Kalle-Sellami M., Mahjoub M., Sellami S., Makni S., 2007. 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.* (8):531-6. French.

Lacourt M., Gao C., Li A., Girard C., Beauchamp G., Henderson JE., Laverty S., 2012. Relationship between cartilage and subchondral bone lesions in repetitive impact trauma-induced equine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.*(6):572-83.

Lejeune J.P., Schneider N., Henrotin Y., and Serteyn D, 2006. L'ostéo-arthropathie dégénérative du cheval: pathogénie et moyens diagnostiques. *Annales de Médecine Vétérinaire* 150 :p173-192

Lo Monaco M., Merckx G., Ratajczak J., Gervois P., Hilkens P., Clegg P., Bronckaers A., Vandeweerdt JM., Lambrichts I., 2018. Stem Cells for Cartilage Repair: Preclinical Studies and Insights in Translational Animal Models and Outcome Measures. *Stem Cells Int.* ;2018:9079538.

Löfgren M., Ekman S., Ekholm J., Engström M., Fjordbakk CT., Svala E., Holm Forsström K., Lindahl A., Skiöldebrand E., 2022. Conditioned serum in vitro treatment of chondrocyte pellets and osteoarthritic explants. *Equine Vet J.* doi: 10.1111/evj.13582.

Lorenz J., Grässel S., 2014. Experimental osteoarthritis models in mice. *Methods Mol Biol.*; vol.1194, p. 401-19.

Mahmoudifar N., Doran PM., 2010. Chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in polyglycolic acid mesh scaffolds under dynamic culture conditions. *Biomaterials*. (14):3858-67.

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., 2021. Influence of Glucocorticoids on Cellular Senescence Hallmarks in Osteoarthritic Fibroblast-like Synoviocytes. *J Clin Med*. ;10(22):5331.

Mariano A., Di Sotto A., Leopizzi M., Garzoli S., Di Maio V., Gulli M., Dalla Vedova P., Ammendola S., Scotto d'Abusco A., 2020 Antiarthritic Effects of a Root Extract from *Harpagophytum procumbens* DC: Novel Insights into the Molecular Mechanisms and Possible Bioactive Phytochemicals. *Nutrients*. ;12(9):2545.

Martin JA., Buckwalter JA., 2003. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am*. ;85-A Suppl 2:106-10.

Messina OD., Vidal Wilman M., Vidal Neira LF., 2019. Nutrition, osteoarthritis and cartilage metabolism. *Aging Clin Exp Res*. (6):807-813.

Nakagawa Y., Mori K., Yamada S., Mukai S., Hirose A., Nakamura R., 2022. 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*. ;4(2):e393-e402.

Pas HI., Winters M., Haisma HJ., Koenis MJ., Tol JL., Moen MH., 2017. Stem cell injections in knee osteoarthritis: a systematic review of the literature. *Br J Sports Med*. ;51(15):1125-1133.

Raidal SL., Hughes KJ., Charman AL., Nielsen SG., Phillips JK., Noble GK., 2014. Effects of meloxicam and phenylbutazone on renal responses to furosemide, dobutamine, and exercise in horses. *Am J Vet Res*. (7):668-79.

Ross M.W., Dyson S.J., 2003. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. Saunders : Philadelphia, p.572-591

Sacitharan PK., 2019 Ageing and Osteoarthritis. *Subcell Biochem.* ;91:123-159.

Stewart MC., Stewart AA., 2011. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. *Vet Clin North Am Equine Pract.* (2):243-61.

Tokawa PKA., Brossi PM., Baccarin RYA., 2022 Autologous conditioned serum in equine and human orthopedic therapy: A systematic review. *Res Vet Sci.* ;146:34-52.

Tucker L., Trumble TN., Groschen D., Dobbs E., Baldo CF., Wendt-Hornickle E., Guedes AGP., 2021. Targeting Soluble Epoxide Hydrolase and Cyclooxygenases Enhance Joint Pain Control, Stimulate Collagen Synthesis, and Protect Chondrocytes From Cytokine-Induced Apoptosis. *Front Vet Sci.* 5;8:685824.

van Weeren PR., Back W., 2016. Musculoskeletal Disease in Aged Horses and Its Management. *Vet Clin North Am Equine Pract.* ;32(2):229-47.

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.

Walters B., Trumble TN., Wendt-Hornickle E., Kennedy M., Guedes A., 2022 Effects of cyclooxygenase and soluble epoxide hydrolase inhibitors on apoptosis of cultured primary equine chondrocytes. *Res Vet Sci.* ;147:44-49.

Whitfield-Cargile CM., Coleman MC., Cohen ND., Chamoun-Emanuelli AM., DeSolis CN., Tetrault T., Sowinski R., Bradbery A., Much M., 2021. 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.* (2):1121-1130.

Wolock SL., Krishnan I., Tenen DE., Matkins V., Camacho V., Patel S., Agarwal P., Bhatia R., Tenen DG., Klein AM., Welner RS., 2019. Mapping Distinct Bone Marrow Niche Populations and Their Differentiation Paths. *Cell Rep.* ;28(2):302-311.e5.

Yoshimura H., Muneta T., Nimura A., Yokoyama A., Koga H., Sekiya I., 2007. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.* (3):449-62.

Zakrzewski W., Dobrzyński M., Szymonowicz M., Rybak Z., 2019. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther.* ;10(1):68.

Zanotto GM., Frisbie DD., 2021. Current joint therapy usage in equine practice: Changes in the last 10 years. *Equine Vet J.* doi: 10.1111/evj.13489.

Site internet:

<https://www.ema.europa.eu/medicines/veterinary/summaries-opinion/arti-cell-forte> Consulté le 04/03/2022