

# LES CELLULES STROMALES MÉSENCHYMATEUSES : 2001-2018 - ÉTAT DES LIEUX D'UNE INNOVATION THÉRAPEUTIQUE EN SANTÉ ANIMALE ET POINT DE VUE DE L'INDUSTRIE

## *MESENCHYMAL STROMAL CELLS: 2001-2018 CURRENT SITUATION OF THIS THERAPEUTIC INNOVATION IN ANIMAL HEALTHCARE AND INDUSTRY POINT OF VIEW*

Par Stéphane MADDENS<sup>(1)</sup>, Éric VIGUIER<sup>(2)</sup>, Jean Luc CADORE<sup>(3)</sup>  
(Communication présentée le 17 Mai 2018,  
Manuscrit accepté le 8 Février 2019)

### RÉSUMÉ

La médecine régénérative vétérinaire a fait d'énormes progrès en 20 ans. Le mécanisme d'action des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) a été complètement révisé ; les CSM sont passées du statut de cellules qui se différencient localement pour reformer un nouveau tissu persistant, à celui de cellules signalisatrices médicinales qui interagissent transitoirement avec le micro-environnement pour rétablir les conditions propices à une cicatrisation tissulaire efficace. De fait, l'utilisation des CSM qui a été longtemps restreinte à une approche autologue et principalement pour des applications orthopédiques, s'est élargie à l'approche allogénique vers d'autres affections inflammatoires ou dysimmunitaires de médecine interne. Cependant, la multitude des sources de CSM et des procédés de production rendent les études difficilement comparables entre elles. Le vétérinaire a aujourd'hui accès à un large choix de produits cellulaires mais ne dispose que des informations commerciales ou de la littérature scientifique spécialisée pour faire un choix. Cette revue fait l'état des lieux des connaissances actuelles sur le sujet en médecine vétérinaire tout en apportant un éclairage à l'aide de données scientifiques obtenues chez l'homme.

**Mots-clés :** cellules souches mésenchymateuses, CSM, vétérinaire, santé animale, thérapie cellulaire, médecine régénérative.

### ABSTRACT

*Great strides have been made in the last two decades in the field of veterinary regenerative medicine. Mesenchymal Stromal Cells' (MSCs) mechanism of action has been completely revisited. MSCs, wishfully thought as cells being able to differentiate themselves and replace damaged tissue, have turned out to be only transient but key signalling cells, interacting with the microenvironment to restore the conditions for an efficient tissue healing process. This new perception of their mechanisms of action has driven the expansion of their use, initially restricted to autologous treatments of orthopaedic conditions, to allogenic treatments to tackle diverse inflammatory and immune problems. However, both the diversity of the sources of MSCs and the use of different production processes, can render scientific data analysis confusing ; especially for veterinarians who now have at their fingertips a choice of a wide array of therapeutic cellular products.*

*In this review we aim to clarify the current state of the art in animal regenerative medicine, while lightening them with scientific data from studies in man.*

**Key-Words:** Mesenchymal Stem Cells, MSC, veterinary, cell therapy, regenerative medicine.

(1) Docteur en Pharmacie, PhD, MBA - Président fondateur Vetbiobank, Campus vétérinaire, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Étoile.  
E-mail : s.maddens@vetbiobank.com

(2) Docteur vétérinaire, professeur de chirurgie des Animaux de Compagnie, Dipl. ECVS, directeur de l'unité ICE UPSP2016 -A104 - VetAgro Sup, Campus vétérinaire, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Étoile

(3) Docteur vétérinaire, professeur de chirurgie des Animaux de Compagnie, Dipl. ECVS, Université de Lyon, VetAgro Sup, Unité ICE « Interaction Cellules Environnement ».  
1, avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Étoile

## INTRODUCTION

Les Cellules Stromales Mésoenchymateuses (CSM) font l'objet chez l'Homme d'une intense recherche clinique. Aujourd'hui plus de 1000 essais thérapeutiques sont enregistrés chez l'Homme dont 300 ont été finalisés (Clinical Trials disponibles à <https://clinicaltrials.gov/>. Accès le 20 Novembre 2018). Cet intérêt est né de la description en 1999 de leur potentiel d'expansion *ex vivo* et de différenciation *in vitro* par Pittenger *et al.* (Pittenger *et al.* 1999). Presque simultanément Fortier *et al.* décrivaient en 1998 le potentiel chondrogénique des CSM équine pour la régénération du cartilage, initiant les premières applications autologues commerciales en orthopédie chez le cheval (Fortier *et al.* 1998). Vingt ans plus tard, chez l'Homme, le mécanisme d'action des CSM a été complètement revu au point de renommer les CSM : Cellules de Signalisation Médicinales (Caplan, 2017). Le premier Médicament de Thérapie Innovante à base de CSM allogéniques (Alofisel®) a été approuvé par l'agence européenne du médicament pour le traitement des fistules anales dans la maladie de Crohn. Quelques mois auparavant, les autorités du Canada autorisaient la commercialisation de CSM allogéniques pour le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte réfractaire aux stéroïdes, chez l'enfant après greffe de moelle osseuse (Remestecel®). En ce qui concerne la médecine vétérinaire : les applications thérapeutiques se sont largement élargies : aux animaux de compagnie (chien et chat) et à d'autres maladies inflammatoires chroniques et/ou dysimmunitaires et le vétérinaire peut effectuer son choix technique parmi un large panel de produits aux caractéristiques très différentes - aucun produit n'a aujourd'hui encore obtenu d'autorisation de mise sur le marché. L'objectif de cette revue est de proposer aux vétérinaires praticiens un état des lieux des connaissances sur les CSM comme médicament de thérapie innovante (MTI), des utilisations cliniques explorées, et des caractéristiques des produits proposés. Une attention particulière sera apportée à l'utilisation allogénique.

## CELLULES SIGNALISATRICES MEDICINALES – UN MEDICAMENT PAS COMME LES AUTRES

### Pharmacodynamie : Abandon du concept de différenciation tissulaire directe et permanente et émergence des thérapies cellulaires allogéniques immunomodulatrices, transitoires.

Les premières utilisations des CSM en médecine vétérinaire étaient basées sur la capacité d'induire *in vitro*, en laboratoire, leur différenciation vers différents types cellulaires spécifiques du tissu souhaité (Pittenger *et al.* 1999). Logiquement, leur utilisation était cantonnée à une approche autologue de façon à garantir la pérennité des tissus néoformés attendus, sans rejet immunologique. Mais 20 ans plus tard, la littérature converge pour indiquer que les CSM, même autologues, ne persistent pas suffisamment longtemps dans les tissus après administra-

tion (von Bahr *et al.* 2012) et ne se différencient pas en tissu cible ou alors à un degré bien trop faible pour rendre compte de l'effet thérapeutique observé. D'autres mécanismes d'action doivent donc expliquer l'effet clinique observé. La découverte des capacités de sécrétion de cytokines, de facteurs de croissance solubles, d'exosomes et microvésicules contenant eux-mêmes des facteurs bioactifs - et d'interaction directe des CSM avec virtuellement tout type cellulaire a réorienté la compréhension de leur mécanisme d'action et ouvert dans le même temps de nouvelles perspectives d'utilisation (Caplan & Dennis, 2006). Les CSM promeuvent localement l'angiogénèse qui va favoriser l'afflux local de cellules souches endogènes pouvant faciliter la régénération tissulaire. Les facteurs de croissance sécrétés par les CSM vont avoir une action trophique sur les tissus du microenvironnement. Les CSM protègent les cellules des tissus de l'environnement contre la mort cellulaire programmée (effet anti-apoptotique) qui peut être massive lors de certaines atteintes tissulaires comme l'infarctus du myocarde. Un effet majeur des CSM est leur capacité à induire une immunomodulation de la plupart des acteurs cellulaires de l'immunité innée (macrophages, polynucléaires neutrophiles...) et acquise (lymphocytes T, B ...). Cette immunomodulation induit un phénotype plutôt anti-inflammatoire et régulateur (Hoogduijn *et al.* 2011). De façon intéressante, le potentiel immunomodulateur des CSM néonatales serait supérieur à celui des CSM adultes ou des fibroblastes (El Omar *et al.* 2014; Saulnier *et al.* 2016) Les CSM ont une action antifibrotique par la limitation de formation de tissu fibroblastique. Enfin, plus récemment, une fonction antibactérienne a été attribuée aux CSM avec la promotion des fonctions de phagocytose macrophagique et la sécrétion d'agents antibiotiques comme le peptide cathelicidin LL-37 (Alcayaga-Miranda *et al.* 2017). Aujourd'hui les CSM sont parfois présentées comme des cellules immunitaires à part entière (Hoogduijn, 2015) qui, par adaptation de leur sécrétome au microenvironnement rencontré, facilitent et orchestrent le rétablissement de l'homéostasie locale, favorable à une cicatrisation harmonieuse. De façon notable, les CSM interagissent avec leur microenvironnement cellulaire et tissulaire de façon immunologiquement non restreinte (sans nécessité de compatibilité immunologique entre le receveur et les CSM). D'autres mécanismes ont été mis à jour récemment et sont encore à l'étude (Galleu *et al.* 2017). L'ensemble de toutes ces propriétés des CSM ne nécessite plus leur implantation long terme après différenciation comme cela était initialement envisagé pour les applications autologues. Cela a permis d'ouvrir le champ à leur utilisation allogénique dans des contextes de nombreuses maladies inflammatoires chroniques ou aiguës avec ou sans composante dysimmunitaire (**tableau 1**).

### Pharmacocinétique

#### Distribution

La notion de distribution pour les CSM est indissociable de celle de « homing » c'est-à-dire la capacité des CSM à se diriger vers le

Maladie (Ref)	Type d'Etude	Bras d'étude	Process de fabrication des CSM	Modalités d'intervention	Suivi (mois)	Résultats
<b>CHEVAL</b>						
<b>Arthrose</b> Tarse Méatarsaire (Nicpo et al.2013)(ii)	Contrôles : Corticoïde et Excipient	n=10 CSM n=3 Corticoïdes n=3 Excipient	CSM-G	5*10 <sup>6</sup> CSM autologues	6 mois	Pas d'amélioration de la boiterie à 30j ; diminution à 60j et 180 j vs. Corticoïdes.
<b>Arthrose</b> Grasset ; Boulet ; Paturon ; Pied (Broeckx et al.2014)	Non contrôlé	n=165 chevaux	CSM sang périphérique (GST, Belgique)	Dose non indiquée CSM allogéniques PRP excipient	4,5 mois	1,8% de synovite dans la première semaine. Amélioration du taux de retour au travail à 6 et 18 semaines. Amélioration non significative avec des CSM préférencées en chondrocytes
<b>Arthrose</b> Grasset après lésion méniscale ; ligamentaire ou du cartilage (Ferris et al.2014)	Contrôle vs. groupe historique	n=33	CSM-MO et arthroscopie	15*10 <sup>6</sup> CSM autologues et Acide Hyaluronique	2 ans	45% retour au travail avec niveau conservé 23% avec un retour au travail à un niveau inférieur 32% sans retour au travail 10% de poussée inflammatoire (flare) Amélioration retour chez les chevaux avec lésion méniscale.
<b>CHIEN</b>						
<b>Arthrose</b> <b>Hanche</b> (Vilar et al.2014)	Aveugle Contrôle vs. J0 2 groupes	Boiterie (n=9), Pas de boiterie (n=5)	CSM-G (Fat-Stem)	Autologue 30*10 <sup>6</sup> CSM Injection unique IA – Hanche	6 mois	Amélioration significative au tapis de marche, comparé à J0 pendant 3 mois
<b>Arthrose</b> <b>Hanche</b> (Vilar et al.2013)	Aveugle Contrôle vs. J0 2 groupes	Boiterie (n=8), Pas de boiterie (n=5)	CSM-G (Fat-Stem)	Autologue 30*10 <sup>6</sup> CSM + PRP- PRGF Endoret® Injection unique IA – Hanche	6 mois	Amélioration significative, à la plaque de force, comparé à J0 à 6 mois
<b>Arthrose</b> (Cuervo et al.2014)»container- title»»International Journal of Molecular Sciences» »pages»»13437-13460»»volumes»»15»»is sues»»8»»source»»PubMed»»abstract»»»PURPOSE: The aim of this study was to compare the efficacy and safety of a single intra-articular injection of adipose mesenchymal stem cells (aMSCs	Double aveugle Randomisé 2 groupes CSM vs PRP	CSM (n=18) PRP (n=17)	CSM-G (Fat-Stem)	Autologue 30*10 <sup>6</sup> CSM PRP-PRGF Endoret®	6 mois	Tous paramètres améliorés 1-6 mois post traitement par CSM ou PRP. (limitation fonction, flexion, évaluation analogique vétérinaire et propriétaire ; qualité de vie)  CSM > PRP à 6 mois sur la douleur
<b>Arthrose Genou</b> <b>post chirurgie du ligament croisé</b> (Taroni et al.2017)	Double aveugle Randomisé 2 groupes Contrôle vs. AINS anti Cox2	CSM (n=9) AINS (n=5)	CSM néonatales ombilicales	Allogénique 30*10 <sup>6</sup> CSM 1 mois AINS	6 mois	Comparabilité de l'amélioration post chirurgie de la locomotion et de la douleur articulaire (Evaluation clinique + analyse objective tapis de marche GaitRite®) Accélération de la cicatrisation osseuse chez les chiens CSM
<b>Arthrose</b> <b>Coude réfractaire</b> (Guercio et al.2012)	Ouverte Contrôle vs J0 2 groupes	CSM+PRP (n=2) AH (n=2)	CSM-G	Autologue 3-5*10 <sup>6</sup> CSM AH 10 mg/ml	1 mois	Amélioration clinique chez tous les sujets (boiterie, plage de mouvement, douleur)
<b>Arthrose</b> réfractaire (Cabon et al.2019)	Ouverte Non contrôlée Compassionnelle	CSM (n=22)	CSM néonatales ombilicales	Allogénique 10*10 <sup>6</sup> CSM	24 mois	Arthrose modérée à sévère en impasse thérapeutique Amélioration du score clinique fonctionnel à 6 mois et 1 an Réduction des prises d'AINS 75% Satisfaction propriétaire à 2 ans
<b>Dysplasie Hanche (réfractaire)</b> (Marx et al.2014)	Ouverte Contrôle vs J0 2 groupes	SVF (n=4) CSM (n=5)	CSM-G	3 sites d'acupuncture Autologue SVF (2-5*10 <sup>6</sup> cellules) Allogénique CSM (2-8*10 <sup>5</sup> total)	3 mois	Amélioration clinique classée en (aggravation ; amélioration ; pas de modification) chez tous les patients SVF > CSM

Dégénération disque intervertébral (DDIV) >6 m. absence douleur profonde (Penha <i>et al.</i> 2014)	Ouverte Contrôlé vs J0 + chirurgie décompressive	CSM (n=4)	CSM-MO	Autologue CSM (1*10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> de lésion médullaire sur 5 mm de long. CSM incluse dans gel	12-18 mois	Amélioration à l'examen neurologique de la sensibilité à la douleur, réflexes et ataxie.  IRM non modifiée
DDIV (>60 d), absence douleur profonde (Sarmiento <i>et al.</i> 2014)	Ouverte Contrôlé vs J0 + chirurgie décompressive	CSM (n=6)	CSM-MO foetales	Transcutané Intramédullaire Allogénique (1*10 <sup>6</sup> )	3 mois	Amélioration clinique de la locomotion par 3 kinésithérapeutes indépendants, chez tous les sujets Pas d'amélioration à l'IRM
DDIV aigüe absence douleur profonde (Kim <i>et al.</i> 2016)	Ouverte Randomisé Contrôlé Chirurgie décompressive +/- CSM	CSM (n=9) Contrôlé (n=25)	CSM-G	Intramédullaire pendant chirurgie Allogénique CSM (1*10 <sup>7</sup> cells) vs. chirurgie seule.	6 mois	Proportion de sujets dont l'examen neurologique est amélioré après traitement significativement supérieure avec CSM IRM ou CT-Scan
DDIV absence douleur profonde >42 j. après hémi-laminectomie (Besalti <i>et al.</i> 2015)	Ouverte Contrôlé vs J0 + chirurgie décompressive	CSM (n=7)	CSM-MO Prédifférenciées dans le lignage neural	5*10 <sup>6</sup> CSM pdt chirurgie et 2 j après.  Autologue Injection intramédullaire percutanée	2-4-8 mois	Amélioration des scores à 2 mois (n=1/7) 4 mois (n=5/7) et 8 mois (n=3/4) après traitements c chez 1/5 chiens Démarche Proprioception 1 ou 2 chiens montrent une amélioration des potentiels électriques somatosensitifs et moteurs Le score lésionnel médullaire ou l'IRM n'ont pas été réalisés après traitement.
Méningoencéphalite idiopathique (Zeira <i>et al.</i> 2015)	Ouverte Contrôlé vs J0 2 groupes + Traitement immuno- suppresseurs	CSM (n=7) Comparaison de deux voies d'administration	CSM-MO	Autologue CSM (2*10 <sup>6</sup> IT et 4*10 <sup>6</sup> pour IA ou 0,5*10 <sup>6</sup> /kg pour IV)	6-24 mois	Réponse plus rapide avec IT+IA vs. IT+IV
Cardiomyopathie dilatée (Pogue <i>et al.</i> 2013)	Ouverte vs. Contrôles historiques	CSM + traitement standard (n=15)	CSM-G Sciencell™ Research Laboratories	Allogénique CSM transduites par voie adénovirale avec Stromal Derived Factor (SDF-1)	24 mois	Médiane survie : 620 j pour tous les sujets et de 652 j si exclusion des chiens atteints d'insuffisance cardiaque congestive. Pas de différence avec contrôles historiques. Echographie Cardiaque montre progression maladie
Dermatite atopique non saisonnière (Hall <i>et al.</i> 2010)	Ouverte Contrôlé vs J0	CSM + traitement standard (n=5);	CSM-G	Autologue CSM (1*10 <sup>6</sup> ) en IV	3 mois	Pas de changement significatif. Score CADESI-03 Score de prurit visuel
Dermatite atopique (Villatoro <i>et al.</i> 2018)	Ouverte Non contrôlée	CSM (n=26)	CSM-G	1,5*10 <sup>6</sup> /kg Voie IV		Dermatite atopique réfractaire Diminution du prurit et score CADESI-4 et stabilisation jusqu'à 6 mois
Maladie inflammatoire de l'intestin chronique (> 5 mois) partiellement réfractaire (Pérez-Merino <i>et al.</i> 2015a, 2015b)	Ouverte Contrôlé vs J0	CSM (n=12)	CSM-G d'un seul donneur âgé de 2.5 ans	Allogénique CSM (2*10 <sup>6</sup> /kg) voie IV	1,5 mois	Amélioration scores CIBDAI et CCECAI, et des constantes biologiques (Albumine, Folates ; Cobalamine à 42 j) excepté Protéine C réactive
Kératoconjonctivite sèche (KCS) réfractaire (Villatoro <i>et al.</i> 2015)	Ouverte Contrôlé vs J0	Allogénique CSM-G	CSM-G	Allogénique (n=12 ou 24 yeux) 5*10 <sup>6</sup> CSM autour de la glande lacrymale et 3*10 <sup>6</sup> autour de la glande de la 3 <sup>ème</sup> paupière	9 mois	Amélioration significative à chaque temps de suivi (Test de Schirmer Ecoulement oculaire, Hyperhémie opacité cornéenne) et absence de progression de la maladie.

CHAT						
Entéropathie chronique (>3 mois) (Webb et al. 2015)	Aveugle (propriétaire) Randomisé Contrôlé	CSM-G (n=7) Excipient (n=4) Après les 2 mois de suivi, nouveau traitement ouvert, par CSM-G pour 3 mois supplément.	CSM-G Chat donneur moins d'un an SPF	Allogénique CSM ( $2 \times 10^6$ /kg) ou sérum physiologique deux fois à deux semaines d'intervalle	2 mois	Amélioration scores clinique et consistance des fèces par le propriétaire, mais pas des constantes biologiques (albumine, cobalamine, folates) chez les chats traités par CSM
Maladie Rénale chronique (créatinémie 1.6-5 g/dl) (Quimby et al. 2013)	Ouverte Contrôlé vs JO 3 groupes + Traitement standard	<b>Groupe 1</b> : $4 \times 10^7$ kg CSM congelées (n=6) ; <b>Groupe 2</b> : $8 \times 10^5$ /kg CSM congelées (n=5) ; <b>Groupe 3</b> : $8 \times 10^5$ kg CSM amplifiées à partir de graisse congelée (n=5).	CSM-G Chat donneur moins d'un an SPF	Allogénique CSM 3 injections, chacune à deux semaines d'intervalle	2 mois	4/5 chats du groupe 2 présentent des vomissements et tachypnée. Créatinémie : Diminution significative mais faible (-0.5 g/dl) dans groupe 1. Taux de filtration glomérulaire : Tendence à une augmentation dans groupe 2 MCP-1 et Interleukine 8 urinaire : diminution significative
Maladie Rénale chronique (Vidane et al. 2017)	Ouverte Contrôlé vs. JO	CSM (n=9)	CSM néonatales congelées	Allogénique Deux injections IV $2 \times 10^6$ CSM à 21 jours d'intervalle	2 mois	Amélioration modeste des paramètres biochimiques sanguins et urinaires (Créatinine et Urée) Pas de modification de l'architecture rénale
Maladie Rénale chronique (Quimby et al. 2016)	Contrôlé vs. Placebo Randomisé + Traitement standard.	CSM non cryoconservées	CSM-G Chat donneur moins d'un an SPF	Allogénique CSM $4 \times 10^6$ /kg, 3 injection IV à 2 semaines d'intervalle. Amplification à partir de CSM cryoconservées	2 mois	Pas d'effets secondaires Pas de différence significative pour les paramètres rénaux fonctionnels (Taux de filtration glomérulaire) ou de la créatininémie entre les chats des deux groupes.
Gingivostomatite chronique réfractaire extraction dentaire totale (Arzi et al. 2016)	Ouverte Contrôlé vs. JO	CSM (n=9)	CSM-G	Autologue 2 injections IV de $20 \times 10^6$ CSM à 1 mois d'intervalle	6-24 mois	55% de réponse clinique (n=5) Score inflammation orale Identification d'une population de lymphocyte chez le chat avant traitement qui pourrait être un paramètre prédictif de réponse aux CSM.
Gingivostomatite chronique réfractaire extraction dentaire totale (Arzi et al. 2017)	Ouverte Contrôlé vs. JO	CSM (n=7)	CSM-G Radiomarquées	Allogénique 2 injections IV de $20 \times 10^6$ CSM à 1 mois d'intervalle	6-24 mois	57% de réponse clinique (n=4) Score inflammation orale et Réponse immunitaire (Lymphocytes; cytokines; compatibilité CSM)

**Tableau 1** : Résumé de différentes études cliniques terrain évaluant les CSM chez le cheval, le chien ou le chat dans des situations de maladies inflammatoires chroniques.

**CSM-G** : CSM adultes de la graisse ; **CSM-MO** : CSM adultes de la moelle osseuse ; **PRP-PRGF** : Plasma Riche en facteurs Plaquettaires ; **IT** : voie intrathécale ; **SPF** : voie intrathécale ; **SPF** : Fracton Vasculaire Stromale (graisse) ; **IA** : voie intraartérielle ; **IRM** : Imagerie par Résonance Magnétique ; **IA** : Intra articulaire ; **AH** : Acide hyaluronique ; **IV** : voie intraveineuse ; **DDIV** : Dégénérescence Disque Intervertébral ; **AINS** : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

site de la lésion. Ce « homing » ou tropisme spécifique, diminue avec l'âge de la cellule (donc de l'hôte) et les conditions d'expansion, via la régulation de récepteurs de chimiokines (CXCR4) ou de métalloprotéinases (MMPs) (De Becker *et al.* 2007). Après injection intraveineuse, il y a un puissant effet de premier passage pulmonaire (Meseguer-Olmo *et al.* 2017) : du fait de leur taille les CSM sont bloquées par les capillaires pulmonaire d'où, par voie paracrine, elles sécrètent et diffusent des facteurs bioactifs (Schrepfer *et al.* 2007; Lee *et al.* 2009). Ensuite, une redistribution secondaire peut être observée selon les modèles (Lee *et al.* 2009; Eggenhofer *et al.* 2012). La voie intra-artérielle permet une meilleure biodistribution mais s'accompagne de micro-embolies (Moll *et al.* 2015). La voie locorégionale, en perfusion, permet une concentration des CSM autour des segments vasculaires concernés. L'administration intra-artérielle locorégionale permettrait une diffusion plus reproductible et plus persistante que la voie intraveineuse en locorégional/sous garrat (Solé *et al.* 2012). Lors d'une injection intrathécale, de façon attendue, la voie atlanto-occipitale (entre C1 et os occipital) permet une diffusion des cellules plus homogène le long du canal vertébral que la voie lombo-sacrale (Barberini *et al.* 2018). Les voies locales intramusculaire et sous-cutanée ont récemment été décrites et permettent d'augmenter localement la persistance des CSM par rapport aux autres voies (Braid *et al.* 2018). Les CSM ne diffusent que très peu vers d'autres tissus. Par voie intra-articulaire, les CSM ne diffusent pas ou de façon non significative (Meseguer-Olmo *et al.* 2017).

#### Suivi des concentrations plasmatiques

Plusieurs études se sont intéressées aux paramètres pharmacocinétiques des facteurs sécrétés par les CSM et responsables de l'effet thérapeutique. Les molécules sécrétées sont détectées jusqu'à 100 jours après l'injection intramusculaire des CSM (Braid *et al.* 2016). Une corrélation a été mise en évidence entre la durée de persistance des CSM dans la circulation après administration par voie intraveineuse et la durée pendant laquelle les facteurs sécrétés sont détectés dans le sang périphérique (Elman *et al.* 2014). La concentration plasmatique atteint un pic à 3 jours et l'aire sous la courbe est supérieure à celle obtenue par une administration séparée de ces mêmes facteurs au lieu des CSM (Elman *et al.* 2014). Cela met en évidence la production active de facteur biologique *in vivo* par les CSM et suggère que l'effet des CSM ne pourrait être complètement reproduit à l'identique par la seule administration isolée des facteurs sécrétés.

#### Posologie – À quel moment administrer les CSM ?

Compte tenu de la faible persistance des CSM dans l'organisme après injection, déterminer le moment approprié pour l'administration des CSM est important pour l'expression thérapeutique optimale du produit cellulaire. Il a été longtemps considéré que les CSM devaient être administrées une fois le processus inflammatoire résolu, ce dernier étant considéré dogmatiquement comme délétère pour les CSM. Aujourd'hui les études indiquent au contraire que, non seulement l'inflammation n'est pas néces-

sairement nocive pour les CSM mais que cette dernière active les fonctions immunomodulatrices des CSM (Barrachina *et al.* 2017; Merino *et al.* 2017; Najar *et al.* 2018). Les CSM « perçoivent » l'environnement inflammatoire, et adaptent en fonction leur réponse métabolique (Murphy *et al.* 2013). L'effet clinique est optimisé lorsque les CSM sont administrées pendant la phase inflammatoire (Saulnier *et al.* 2015; Maidhof *et al.* 2017). En revanche, les CSM ne sont pas considérées comme immédiatement actives après administration et leur action mettrait une semaine pour se traduire en une immunomodulation et une réponse sur l'inflammation. (Saulnier *et al.* 2015; Merino *et al.* 2017).

#### Métabolisation et Élimination – réponse immunitaire dirigée contre les CSM

Aujourd'hui il est admis que les CSM, autologues ou allogéniques, ne persistent pas au-delà de quelques semaines dans les tissus quelles que soient les voies d'administration (Hoogduijn *et al.* 2011). Ces résultats font évoluer le concept actuel vers celui de « Thérapie Cellulaire Transitoire » (Elman *et al.* 2014). Les CSM ont longtemps été considérées comme « immunoprivilégiées » c'est-à-dire n'induisant pas de réponse immunitaire spécifique comparée à d'autres types cellulaires comme les fibroblastes (Pigott *et al.* 2013; Ankrum *et al.* 2014; Kol *et al.* 2015). Si les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) II sont exprimées après stimulation inflammatoire, l'absence d'expression des molécules co-stimulatrices (Ex : CD80, CD86, CD40) rend la stimulation lymphocytaire inefficace ou tolérogène (Tse *et al.* 2003). Ce concept, conforté par une excellente tolérance clinique, est pourtant battu en brèche par un nombre grandissant d'études montrant une réponse anti CSM adultes (Schnabel *et al.* 2014; Berglund & Schnabel, 2017; Joswig *et al.* 2017). Celle-ci serait moindre pour les CSM néonatales considérées comme moins immunogènes (Barry *et al.* 2005; Prasanna *et al.* 2010). Aujourd'hui les CSM sont donc plutôt considérées comme « immuno-évasives », c'est-à-dire capable d'induire une réponse immunitaire atténuée (Ankrum *et al.* 2014). Contrairement à un dogme largement implanté, le caractère autologue ne protège pas complètement les CSM du système immunitaire; elles sont sensibles à la lyse via les lymphocytes Natural Killer activés (Hoogduijn *et al.* 2011). Elles peuvent également être éliminées par le système macrophagique représenté, par exemple dans le contexte articulaire, par les synoviocytes de la membrane synoviale (Joswig *et al.* 2017). Ainsi plusieurs études rapportent une infiltration lymphocytaire persistante de la membrane synoviale après injection intra-articulaire de CSM allogéniques ou autologues (Pigott *et al.* 2013). Cet infiltrat et cette réponse immunitaire « non spécifique » pourrait expliquer au moins pour partie, l'action clinique long-terme des CSM qui persiste plusieurs mois après la disparition de ces dernières (von Bahr *et al.* 2012; Pigott *et al.* 2013; Harman *et al.* 2016; Taroni *et al.* 2017). Ce résultat corrèle avec ceux obtenus dans une étude menée par VetAgro Sup dans un modèle expérimental d'arthrose avec un infiltrat lymphoplasmocytaire de la membrane synoviale (Saulnier *et al.* 2015). L'impact négatif ou positif de cette réponse immunitaire dans le pronostic clinique

post-traitement fait l'objet d'un débat (Carrade *et al.* 2011; Pigott *et al.* 2013; Joswig *et al.* 2017). De prime abord, cette réponse a d'abord été considérée comme limitant la survie des cellules *in vivo*, donc leur efficacité clinique. En ligne avec le concept de médecine basée sur la preuve, il est important de noter qu'aucune étude n'a formellement démontré que cette réponse immunitaire interférait négativement sur la réponse clinique (Ankrum *et al.* 2014). Plus récemment, des études suggèrent au contraire que la réponse immunitaire, en entraînant l'élimination des CSM néonatales, induirait d'une part un statut macrophagique anti-inflammatoire M2 (Abumaree *et al.* 2013) et d'autre part le relargage des molécules bioactives contenues dans les CSM comme le Fibroblast Growth Factor 2 (Aizman *et al.* 2015). Par ailleurs, sur le plan de l'innocuité, ce mécanisme d'élimination des CSM allogéniques contribuerait à limiter, par rapport aux cellules autologues, les risques de formation de tissu ectopique ou de processus tumorigène (von Bahr *et al.* 2012).

Le système immunitaire du receveur, inné et/ou acquis, contribue donc au métabolisme et à l'élimination des CSM, autologues ou allogéniques, comme le foie métabolise une molécule chimique (Elman *et al.* 2014). La vitesse d'élimination dépend de plusieurs facteurs, comme l'immunocompétence du receveur ou le caractère plus ou moins immunogène des CSM. En médecine vétérinaire, l'immunocompétence est rarement compromise sauf par exemple lors d'un sepsis bactérien. Les CSM néonatales équines autologues et allogéniques semblent induire une réponse identique (Carrade *et al.* 2011) et les CSM néonatales ont une plus faible immunogénicité que les CSM adultes (Barry *et al.* 2005).

### Effets secondaires « désirables » ou effets indésirables ?

Les thérapies à base de CSM ont montré sur de grandes cohortes, un bon profil d'innocuité quelle que soit l'espèce étudiée (Lalu *et al.* 2012; Kol *et al.* 2015; Centeno *et al.* 2016). Toutefois, la multiplicité des produits cellulaires et des procédés de fabrication, le mécanisme complexe d'action et le caractère vivant et variable des CSM imposent une analyse de risque spécifique à chaque produit et à la mise en place d'un dispositif de (pharmaco)-vigilance actif par tous les industriels, en apportant une attention particulière aux évènements suivants :

#### Inflammation

Une inflammation locale modérée, non septique et transitoire, survenant généralement après 1 à 2 jours peut être observée dans environ 1 à 10% des cas après injection intra-articulaire de CSM (Peroni & Borjesson, 2011; Pigott *et al.* 2013; Ferris *et al.* 2014). Chez le cheval ce phénomène prend parfois la forme de « flare » ou poussée inflammatoire. L'observation de poussées inflammatoires lors de l'injection intra-articulaire de corticoïdes, d'acide hyaluronique ou de cellules autologues ou allogéniques tend à favoriser l'hypothèse d'une réaction non-spécifique (Marino *et al.* 2006; Carrade *et al.* 2011; Ardanaz *et al.* 2016). Cette phase inflammatoire pourrait précéder, voire induire, l'action

anti-inflammatoire ou immunomodulatrice plus rémanente (plus rémanente des CSM (Hoogdjuin *et al.* 2013; Merino *et al.* 2017). Cette observation serait en accord avec la description de résultats cliniques positifs particulièrement après survenue de ces réactions inflammatoires (Peroni & Borjesson, 2011).

#### Formation de tissu ectopique

Ce risque de différenciation indésirable des CSM, rapporté dans de rares publications est limité car la différenciation n'est pas un mécanisme prédominant *in vivo* (Harris *et al.* 2004). La majorité des études n'ont pas été en mesure de le mettre en évidence (von Bahr *et al.* 2012). L'absence de persistance prolongée des CSM allogéniques serait un facteur supplémentaire de réduction de ce risque (von Bahr *et al.* 2012).

#### Néoformation de tumeur par transformation maligne des CSM *ex vivo*

Lors de la phase d'expansion au laboratoire, les CSM adultes peuvent acquérir des anomalies chromosomiques qui pourraient conduire à leur transformation et à la génération de tumeurs après réinjection *in vivo*. Si ce risque était avéré, il serait aggravé dans le cas des cellules autologues comparé aux cellules allogéniques du fait de l'absence de réponse immunitaire contre ces CSM modifiées (Lee & Hong, 2017). Les rares publications rapportant ce risque ont été retirées car entachées d'artéfacts expérimentaux (Garcia *et al.* 2010). Plusieurs arguments convergent pour indiquer que ce risque n'est à ce jour pas fondé : les anomalies chromosomiques observées dans les premières phases d'expansion disparaissent lors des phases d'expansion ultérieures et ne s'accompagnent pas de transformation (Tarte *et al.* 2010). Le risque tumorigène n'a pas été à ce jour mis en évidence pour les CSM néonatales (Park *et al.* 2016; Cardoso *et al.* 2017). La faible persistance des CSM réduit ce risque. Dans une méta-analyse récente chez l'Homme portant sur 2372 patients, le risque tumoral est plus faible dans la population de patients traités par CSM autologues que dans la population générale (Centeno *et al.* 2016). Cette observation est corrélée par les résultats de l'étude clinique menée par VetAgro Sup au cours de laquelle il n'a pas été mis en évidence dans les 2-3 ans après le traitement, de relation entre une injection de CSM par voie intra-articulaire et une augmentation de processus tumoraux chez des chiens traités pour arthrose (Cabon Q. *Front Vet Sci* 2019. doi 10.3389/fvets.2017.00083).

#### Promotion de la tumorigénicité de cellules (pré) tumorales préexistantes via l'immunosuppression induite par les CSM

Analyser ce risque est justifié du fait du mécanisme d'action des CSM basé, entre autres, sur l'immunomodulation et la néovascularisation. Les études sont toutefois contradictoires ; la survenue de ce risque a été observée dans des modèles animaux, *in vitro*, ou chez des patients immuno-incompétents (Karnoub *et al.* 2007; Ning *et al.* 2008). En revanche, plusieurs méta-analyses ne parviennent pas à identifier ce risque dans des études

portant sur de grandes cohortes de patients traités (Lalu *et al.* 2012; Centeno *et al.* 2016). La présence d'une tumeur active chez un animal à traiter est considérée aujourd'hui comme une contre-indication, sur la base du principe de précaution. Cette contre-indication est relative en cas d'administration locale selon la localisation de la tumeur (Ex : synoviosarcome pour une injection intra-articulaire).

### Risque infectieux

Le risque infectieux des CSM est double. i) Il peut être directement lié au produit thérapeutique qui transmet un agent infectieux au receveur. Cet agent infectieux peut être introduit soit par le biais du donneur soit au cours de la production en laboratoire. Dans le premier cas, le risque est plus important en situation allogénique mais il est à tort considéré comme nul en situation autologue. En effet, à la suite d'un changement d'écologie (prélèvement des CSM dans la moelle osseuse et ré-administration des CSM en intra-articulaire), il existe un risque de réactivation de la pathogénicité d'un agent jusqu'ici latent (Pitel *et al.* 2010). Les cellules néonatales présentent un risque minimal par leur faible exposition à l'environnement et grâce à la protection conférée par la barrière foeto-maternelle (Hows, 2001). Pour limiter le risque, un screening infectieux de tous les prélèvements doit être réalisé avec des sensibles, comme l'amplification spécifique de séquences génomiques des agents microbiens (PCR). Dans le second cas (introduction d'un agent infectieux dans le produit pendant le processus de fabrication), l'agent infectieux provient de l'environnement de l'unité de production (les réactifs, l'atmosphère ambiante, les équipements et le personnel de production). Les produits doivent donc être fabriqués dans un environnement contrôlé et par du personnel hautement qualifié pour garantir des manipulations aseptiques. Les contrôles qualité doivent être réalisés par un laboratoire indépendant. ii) Le risque infectieux peut être aussi indirect, conséquence de l'action immunomodulatrice des CSM avec une réactivation d'un agent infectieux présent chez le receveur. Ce risque est jusqu'à présent considéré comme théorique.

### Risque thrombotique et embolique

Ce risque a été principalement associé à la voie d'administration intravasculaire, et plus particulièrement intra-artérielle (Sole *et al.* 2012; Pigott *et al.* 2013). Les CSM ont un effet prothrombogène (Moll *et al.* 2012). L'expression du facteur tissulaire peut être augmentée par la cryoconservation (Hoogduijn *et al.* 2016). La taille des CSM néonatales, plus petites de moitié environ que les CSM adultes, favorise leur passage dans la microcirculation (Moll *et al.* 2015).

## UTILISATION DES CSM EN MÉDECINE VÉTÉRINAIRE

L'excellent profil d'innocuité des CSM facilite sur le plan éthique la conception d'études cliniques avec des animaux de propriétaires. En plus d'éviter le recours à des modèles animaux expé-

rimentaux, ce type d'études présente l'avantage de refléter plus fidèlement la complexité des mécanismes physiopathologiques de la maladie dans toutes ses formes d'expression clinique. C'est la capacité à transposer les résultats de ces études, non seulement aux situations réelles rencontrées par les praticiens sur le terrain, mais également au contexte de la médecine humaine qui est mise en avant (Hoffman & Dow, 2016). De la même façon, les études sur les maladies dégénératives liées à l'âge chez le Chien seraient particulièrement informatives pour mieux comprendre les mécanismes du vieillissement chez l'Homme (Hoffman *et al.* 2018). Toutefois ces études présentent également des inconvénients dont il est important de tenir compte : i) les contraintes imposées au propriétaire par le recrutement au sein d'une étude (suivis cliniques réguliers...) sélectionnent des animaux à un stade sévère, souvent en impasse thérapeutique, et génèrent une proportion importante d'animaux « perdus de vue » qui ne suivent pas l'intégralité du protocole. ii) la variabilité interindividuelle des animaux, associée à celle inhérente du produit biologique testé, imposerait d'augmenter la taille des groupes d'étude. iii) les attentes légitimes des propriétaires d'animaux limitent la faisabilité d'études en double aveugle, contrôlées contre placebo ou même contre traitement standard, qui généralement a déjà été éprouvé. iv) les objectifs et paramètres d'évaluation sont soit trop indirects (Ex : le niveau athlétique retrouvé un an après traitement par des chevaux traités pour une tendinite), soit subjectifs (évaluation vétérinaire de la boiterie par des score visuels), soit difficiles (coût d'une IRM) voire impossible éthiquement à mettre en œuvre (caractère invasif d'une biopsie ou d'une arthroscopie de contrôle...).

En dépit de ces limites, il est toujours possible d'analyser les résultats des études publiées en identifiant et tenant compte des biais. La Table 1 recense les principales études cliniques évaluant les CSM chez le Cheval, le Chien ou le Chat pour des maladies inflammatoires chroniques (références des études incluses dans la table). Ces études sont pour la plupart menées par des start-ups ou par des groupes académiques avec un financement limité, parfois d'origine caritative. Cette contrainte de financement, inhérente à ces structures, limite les capacités à mener de telles études, souvent très longues quand il s'agit de maladies dégénératives comme l'arthrose. Contrairement à certaines études, parfois contradictoires sur l'efficacité des CSM, comme dans l'insuffisance rénale, la majorité des études montrent une efficacité clinique des CSM dans la prise en charge de l'arthrose ou de la maladie du disque intervertébral, sans toutefois mettre en évidence de modifications franches de l'imagerie. Ces études sont généralement réalisées sur des périodes courtes de 3-6 mois, à l'exception de l'étude récente menée par VetAgro Sup qui évalue l'évolution sur une période de deux ans des chiens atteints d'arthrose après administration d'une seule injection de CSM allogéniques néonatales sur deux ans (Cabon Q. Front Vet Sci 2019. doi 10.3389/fvets.2017.00083). Les résultats cliniques très encourageants obtenus avec les CSM au travers de ces études pourraient être consolidés grâce à un réseau de centres investigateurs cliniques permettant d'élargir la base de recrutement/inclusion et la formation de vétérinaires praticiens motivés aux Bonnes Pratiques Cliniques (BPC) de vétérinaires praticiens motivés.



## DIFFÉRENTS PRODUITS CELLULAIRES ET DIFFÉRENTS USAGES

Les études sont également difficilement comparables entre elles, car elles sont souvent réalisées avec des produits cellulaires différents, fabriqués et testés selon des méthodologies différentes.

La plupart des produits cellulaires disponibles aujourd'hui diffèrent sur plusieurs paramètres relatifs à i) leur origine : le donneur peut être l'animal lui-même (autologue) ou un autre donneur sain (allogénique), ii) l'âge du donneur : les CSM peuvent être collectées en phase prénatale, néonatale ou postnatale (adulte), iii) la nature du tissu à partir duquel sont extraites les CSM : moelle osseuse, tissu adipeux, placenta/cordon ombilical..., iv) au degré de modification des CSM au cours de leur préparation qui fait intervenir généralement une phase d'expansion : les CSM peuvent être natives- induites *in vitro* dans des étapes de prédifférenciation ou stimulées (« primées ») pour augmenter leur potentiel ; elles peuvent être aussi associées à une matrice bioactive et être cryoconservées ou non.

### Autologue ou Allogénique ?

En situation autologue, la maladie sous-jacente de l'animal à traiter pourrait avoir un impact négatif sur le statut biologique des CSM obtenues (Wang *et al.* 2013). En particulier l'exposition chronique de CSM à une inflammation ou à un excès de facteurs biochimiques toxiques, comme par exemple l'urémie pour les affections rénales, pourrait affecter la fonctionnalité des CSM et expliquer les résultats négatifs de certaines études cliniques menées avec des cellules autologues (Idziak *et al.* 2014). Si en médecine humaine, la faisabilité d'une utilisation allogénique des CSM ne semble plus faire débat (Ankrum *et al.* 2014), avec en particulier l'approbation du premier médicament à base de CSM allogénique pour les fistules anales réfractaires dans la maladie de Crohn, la littérature vétérinaire récente fait encore état de controverses. La principale d'entre elles repose sur la détection par certaines études sur les CSM adultes, d'une réponse inflammatoire ou immunitaire plus importante avec les cellules allogéniques (Berglund & Schnabel, 2017). Toutefois, alors que la preuve du caractère délétère sur le résultat clinique reste à apporter par les détracteurs de l'approche allogénique, émerge le questionnement quant au rôle actif de l'élimination des CSM par l'organisme sur leur mécanisme d'action (Hoogduijn *et al.* 2013; de Witte *et al.* 2018).

L'âge du donneur est important

Les CSM diminuent quantitativement et qualitativement avec l'âge du donneur (Volk *et al.* 2012). L'impact de ce paramètre peut être majeur en situation autologue car il n'est pas possible de choisir l'âge du donneur qui est celui du patient/animal parfois âgé lorsqu'il s'agit de maladies dégénératives liée à l'âge (ex. arthrose). Il est important également en situation allogénique pour la sélection des donneurs, car l'amplification lors d'une phase de culture avec des doublements cellulaires successifs accélère la sénescence des cellules (Stolzing *et al.* 2008). La standardisation de l'âge des donneurs et le recours à des donneurs les plus jeunes possibles est une recommandation justifiée.

L'âge du donneur influence également l'immunogénicité des CSM (expression des molécules du CMH-I, CMH-II et des cofacteurs de présentation d'antigène) qui bien que traditionnellement considérée comme limitée, augmente avec l'âge, l'inflammation et la pré-différenciation. Les CSM néonatales sont considérées comme moins immunogènes que les CSM adultes ; elles joueraient un rôle important dans le maintien chez la mère de la tolérance foetale vis-à-vis des antigènes paternels au cours de la gestation (Barry *et al.* 2005).

### Le tissu d'origine des CSM

La littérature chez l'animal est abondante sur la comparaison *in vitro* des potentiels de différenciation des CSM selon leur origine tissulaire. Ces études visaient à identifier, pour chaque besoin médical (reconstruction osseuse, cartilage, nerveuse), le tissu source de CSM le plus adapté. Avec l'évolution de la compréhension du mécanisme d'action *in vivo* des CSM, ces études perdent beaucoup de leur portée. De plus, la grande variabilité des protocoles d'extraction, d'amplification et de différenciation rend incontestablement difficile la comparaison des études entre elles et explique en grande partie les résultats contradictoires. En revanche, d'autres études se focalisent sur les nouvelles fonctionnalités des CSM. Les CSM adultes sont globalement comparables entre elles. En revanche les CSM néonatales présentent plusieurs avantages spécifiques, avec une plus faible immunogénicité et un potentiel immunomodulateur supérieur (El Omar *et al.* 2014; Saulnier *et al.* 2016). De plus, en raison de leur relative plus faible immunogénicité, les cellules néonatales semblent être la source de choix pour une utilisation allogénique des CSM (Prasanna *et al.* 2010; Deuse *et al.* 2011).

### Prédifférenciation *in vitro* ou cellules natives ?

Bien que la différenciation des CSM en tissu ne soit plus considérée comme le mode d'action des CSM, certains laboratoires continuent de proposer des cellules allogéniques prédifférenciées, pour favoriser la voie de différenciation tissulaire (Global Stem Cell Technologies, GST, Belgique, Noorwegenstraat 4 B-9940 Evergem). Les preuves médicales de l'implantation durable de ces CSM et de l'avantage thérapeutique de cette étape restent à apporter au travers d'études comparatives. En revanche il a été montré que la prédifférenciation induit l'immunogénicité des CSM. (Ryan *et al.* 2014).

## LES ENJEUX INDUSTRIELS DU DÉVELOPPEMENT DES CSM EN MÉDECINE VÉTÉRINAIRE – VISION INDUSTRIELLE

### Intégration des paramètres éthiques et du bien-être animal dans la conception des procédés industriels

#### Minimiser l'impact sur les ressources naturelles

Les procédés industriels de production de CSM reposent sur le prélèvement de ressources biologiques naturelles. Ils entrent donc dans le cadre du protocole de Nagoya entré en vigueur en

2014 qui vise un partage juste et équitable des avantages découlant de l'utilisation des ressources biologiques de la nature dans un but commercial, de recherche.

### **Concevoir des procédés industriels qui respectent le bien-être animal**

Les CSM allogéniques sont produites à partir de prélèvements réalisés sur des animaux donneurs, vivants et sains. Leur potentiel d'expansion étant limité, des prélèvements réguliers sont nécessaires. Pour les cellules adultes, le prélèvement est généralement invasif. Le moins invasif est le prélèvement sanguin chez le cheval (Global Stem Cell Technologies, GST, Belgique, Noorwegenstraat 4 B-9940 Evergem). A noter toutefois que la faible représentation des CSM dans le sang (1 CSM pour 10e8 cellules mononucléées) nécessite le recueil de volumes importants pour avoir un nombre de CSM de départ élevé (Kuznetsov *et al.* 2001). Les biopsies tissulaires, de gencives (ScarCell Therapeutics, Hôpital Pitié-Salpêtrière 20 Rue Leblanc, 75015 Paris, France), de tissu adipeux (StemT, Hôpital des Armées Percy 1 Rue du Lieutenant Raoul Batany, 92190 Clamart France), de moelle osseuse ou de liquide synovial sont plus invasives, et peuvent nécessiter une anesthésie du donneur. Pour garantir la qualité microbiologique des prélèvements, le recours à des élevages SPF (Specific Pathogens Free) peut s'avérer nécessaire. Seuls les tissus néonataux, riches en CSM, ne nécessitent pas de geste invasif (Verbiobank, Campus vétérinaire VetAgro Sup, 1 av. Bourgelat 68280 Marcy l'Etoile France). Avec le consentement des propriétaires des animaux, ils sont collectés au moment de la naissance ou lors de césariennes réalisées pour des raisons médicales. Ces tissus sont de fait, considérés comme des résidus chirurgicaux.

### **Les forces médico-économiques en jeu autour des innovations thérapeutiques vétérinaires : le cas des CSM et de la médecine régénérative.**

Les enquêtes menées auprès des propriétaires d'animaux montrent de façon concordante une attente forte de leur part vis-à-vis des vétérinaires traitants, pour des traitements innovants, plus technologiques et avec un profil d'innocuité renforcé. Les coûts associés au développement industriel et réglementaire d'une innovation thérapeutique médicale sont élevés (environ 50-100 millions €), avec un risque intrinsèque d'échec élevé, et des délais longs (10-15 ans) d'obtention d'autorisation de mise sur le marché (AMM). Toutefois, et contrairement à la situation en santé humaine, le prix d'une biothérapie animale doit s'adapter aux spécificités médico-économiques du marché de la santé animale. La taille des marchés accessibles est limitée par une segmentation par espèce. L'élasticité des prix de vente est faible, et ceux-ci sont plafonnés par la capacité financière des propriétaires. Les sociétés d'assurances et mutuelles, bien qu'en développement, jouent un rôle encore mineur pour atténuer ce phénomène car seuls 5% environ des chiens sont assurés en France. Les assurances pour chevaux couvrent rarement les traitements de maladies comme l'arthrose. De plus les schémas de remboursements actuels proposés par ces structures incluent

des plafonds de dépenses qui ne tiennent pas compte des prix de ces biothérapies innovantes (anticorps monoclonaux, thérapie cellulaire...). L'approche autologue est peu compatible avec une approche industrielle pour plusieurs raisons : elle est lourde à mettre en œuvre chez l'animal à traiter, avec un prélèvement et un traitement qui nécessitent deux consultations séparées, voire deux anesthésies - l'une pour le prélèvement et l'autre pour l'injection. Les contraintes logistiques liées à un produit biologique fragile, limitent la centralisation de la fabrication par un laboratoire sur un vaste territoire. La fabrication du produit à partir des CSM est complexe, coûteuse et soumise à de nombreux aléas qui peuvent aboutir dans certains cas à des échecs de production (Abraham *et al.* 2017). En l'absence de mutualisation des dépenses de santé, le coût de fabrication d'un produit autologue confine de façon durable l'accessibilité de cette approche à une certaine catégorie d'animaux et donc de propriétaires. En thérapie cellulaire humaine, ce sont les structures académiques/hospitalières qui n'étant pas soumises aux mêmes contraintes réglementaires et de rentabilité que les sociétés industrielles, prennent en charge les approches autologues, dans un partage cohérent des vocations. Dans le cadre de l'approche allogénique, les enjeux d'échelle d'industrialisation des procédés de production sont clé dans la capacité à atteindre un prix de vente accessible au plus grand nombre de propriétaires. A ce titre, si les cellules souches embryonnaires ou les cellules pluripotentes induites, non abordées en détail ici, présentent le plus fort potentiel d'industrialisation, les inquiétudes quant à leur profil d'innocuité limitent à ce jour leur transposition clinique. Les CSM néonatales du fait de leur innocuité établie et de leur potentiel d'amplification supérieur à celui des CSM prélevées sur des animaux adultes, représentent à ce jour une technologie attractive sur le plan industriel.

### **Le contexte réglementaire**

La réglementation autour de cette nouvelle classe thérapeutique des CSM, avec une pharmacologie très particulière, est en cours de formulation pour la médecine vétérinaire, comme cela s'est fait en humaine avec la classe des Médicaments de Thérapie Innovante (MTI). Un groupe d'experts (ADVENT) a été constitué au sein de l'Agence Européenne du Médicament (EMA) pour réfléchir aux différents questionnements. Dans l'intervalle, les CSM, bien qu'ayant une pharmacologie totalement spécifique, sont considérées au même titre qu'un corticoïde ce qui rend complexe leur évaluation dans le cadre du dossier d'autorisation de mise sur le marché.

Avec la diversification de l'offre commerciale portée par des start-ups innovantes, généralement grâce à des financements limités, plusieurs centaines de traitements sont aujourd'hui réalisés en France chaque année. Les produits utilisés, peuvent provenir de laboratoires basés dans d'autres pays européens, et ont des profils de qualité et sécurité très variables. En l'absence d'AMM aujourd'hui pour l'ensemble de ces produits, le laboratoire et le vétérinaire engagent leur responsabilité professionnelle. Le besoin de régulation devient donc nécessaire. Avec un contexte réglementaire adapté, les laboratoires pourront,

comme cela se fait en médecine humaine, disposer d'un cadre explicite et adapté pour enregistrer leurs produits. Les contraintes de coûts induites par l'ensemble des études nécessaires à l'évaluation de ce médicament et l'application des règles de production applicables au médicament vétérinaire (Bonnes Pratiques de Fabrication) peuvent rendre ces produits innovants économiquement inadaptés au marché vétérinaire. Le paramètre clé du succès durable de cette innovation thérapeutique réside donc dans la capacité des acteurs industriels à établir des processus de fabrication industrielle à large échelle, automatisés, capable d'absorber ces coûts de développement incontournables. Tous les types cellulaires ne sont pas équivalents

à ce titre. Parmi ceux-ci, les cellules néonatales obtenues à la naissance, représentent un bon compromis entre les cellules adultes qui ont une faible capacité d'industrialisation et à l'autre extrémité les cellules embryonnaires qui ont un potentiel d'industrialisation théoriquement infini mais qui soulèvent des questionnements éthiques. Ainsi, tout l'enjeu autour de cette innovation thérapeutique est de lui fournir un écosystème de développement et de fabrication, capable de garantir la qualité et la sécurité des produits tout en permettant leur mise sur le marché à un prix acceptable par le plus grand nombre propriétaires. Ces derniers pourront alors en faire bénéficier leurs animaux dont ils ont la charge.

**Note : les auteurs signalent au moment de la publication que si aucune AMM n'a été délivrée à ce jour, le comité d'évaluation des médicaments vétérinaires à l'EMA, a attribué récemment deux avis positifs, chacun pour un produit cellulaire destiné au traitement des affections inflammatoires articulaires du cheval.**

## REMERCIEMENTS

Certains travaux cités dans cette revue ont été réalisés grâce au travail des équipes de Vetbiobank, du CERREC et du Centre de Ressources Biologiques CRYOANIM (Dr. Buff S. VetAgro Sup), du CHEV (Costantzer P. VetAgro Sup), de l'unité de recherche ICE (Pr Viguier E. VetAgro Sup) et du GREMERES (Pr Lepage O. VetAgro Sup), dans le cadre du partenariat scientifique entre Vetbiobank et VetAgro Sup campus vétérinaire de Lyon. Ces travaux ont été soutenus sur le plan opérationnel par VetAgro Sup, campus vétérinaire de Lyon, sous les directions successives du Dr Martinot et du Dr Soubeyran. Ils ont reçu le soutien financier de la Banque Publique d'Investissement Rhône Alpes Auvergne, de la Région Rhône Alpes Auvergne et de l'Institut Français du Cheval et de l'Équitation au travers de son fond d'innovation et de sa Station Expérimentale de Chamberet (Wimel L.)

## BIBLIOGRAPHIE

- Abraham E, Ahmadian BB, Holderness K, Levinson Y, McAfee E. Platforms for Manufacturing Allogeneic, Autologous and iPSC Cell Therapy Products: An Industry Perspective. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2017.
- Abumaree MH, Al Jumah MA, Kalionis B, Jawdat D, Al Khaldi A, Abomaray FM, et al. Human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages. *Stem Cell Rev.* 2013;9:620–41.
- Aizman I, Vinodkumar D, McGrogan M, Bates D. Cell Injury-Induced Release of Fibroblast Growth Factor 2: Relevance to Intracerebral Mesenchymal Stromal Cell Transplantations. *Stem Cells and Development.* 2015;24:1623–34.
- Alcayaga-Miranda F, Cuenca J, Khoury M. Antimicrobial Activity of Mesenchymal Stem Cells: Current Status and New Perspectives of Antimicrobial Peptide-Based Therapies. *Frontiers in Immunology.* 2017;8.
- Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature Biotechnology.* 2014;32:252–60.
- Ardanaz N, Vázquez FJ, Romero A, Remacha AR, Barrachina L, Sanz A, et al. Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. *BMC Veterinary Research.* 2016;12.
- Arzi B, Clark KC, Sundaram A, Spriet M, Verstraete FJM, Walker NJ, et al. Therapeutic Efficacy of Fresh, Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Severe Refractory Feline Chronic Gingivostomatitis: Allogeneic Stem Cell Therapy for Feline Oral Inflammation. *STEM CELLS Translational Medicine.* 2017;6:1710–22.
- Arzi B, Mills-Ko E, Verstraete FJM, Kol A, Walker NJ, Badgley MR, et al. Therapeutic Efficacy of Fresh, Autologous Mesenchymal Stem Cells for Severe Refractory Gingivostomatitis in Cats: Autologous MSCs for Severe Refractory FCGS. *STEM CELLS Translational Medicine.* 2016;5:75–86.
- Barberini DJ, Aleman M, Aristizabal F, Spriet M, Clark KC, Walker NJ, et al. Safety and tracking of intrathecal allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in healthy and diseased horses. *Stem Cell Research & Therapy.* 2018;9.
- Barrachina L, Remacha AR, Romero A, Vázquez FJ, Albareda J, Prades M, et al. Inflammation affects the viability and plasticity of equine mesenchymal stem cells: possible implications in intra-articular treatments. *Journal of Veterinary Science.* 2017;18:39.
- Barry FP, Murphy JM, English K, Mahon BP. Immunogenicity of Adult Mesenchymal Stem Cells: Lessons from the Fetal Allograft. *Stem Cells and Development.* 2005;14:252–65.
- Berglund AK, Schnabel LV. Allogeneic major histocompatibility complex-mismatched equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells are targeted for death by cytotoxic anti-major histocompatibility complex antibodies. *Equine Veterinary Journal.* 2017;49:539–44.
- Besalti O, Can P, Akpınar E, Aktas Z, Elcin AE, Elcin YM. Intraspinal Transplantation of Autologous Neurogenically-Induced Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Paraplegic Dogs without Deep Pain Perception Secondary to Intervertebral Disk Disease. *Turk Neurosurg.* 2015;25:625–32.
- Braid LR, Hu W-G, Davies JE, Nagata LP. Engineered Mesenchymal Cells Improve Passive Immune Protection Against Lethal Venezuelan Equine Encephalitis Virus Exposure. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5:1026–35.
- Braid LR, Wood CA, Wiese DM, Ford BN. Intramuscular administration potentiates extended dwell time of mesenchymal stromal cells compared to other routes. *Cytotherapy.* 2018;20:232–44.
- Broeckx S, Zimmerman M, Crocetti S, Suls M, Mariën T, Ferguson SJ, et al. Regenerative Therapies for Equine Degenerative Joint Disease: A Preliminary Study. *Kerkis I, organizer. PLoS ONE.* 2014;9:e85917.
- Cabon Q, Febre M, Gomez N, Cachon T, Pillard P, Carozzo C, Saulnier N, Robert C, Livet V, Plantier N, Saas P, Maddens S and Viguier E. Long-term safety and efficacy of

- single or repeated intra-articular injection of allogeneic neonatal mesenchymal stromal cells for managing pain and lameness in moderate to severe canine osteoarthritis without anti-inflammatory pharmacological support: Pilot clinical study. *Front Vet Sci.* 2019; doi:10.3389/fvets.2017.00083
- Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!: Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine.* 2017;6:1445–51.
  - Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2006;98:1076–84.
  - Cardoso MT, Pinheiro AO, Vidane AS, Casals JB, de Oliveira VC, Gonçalves N, et al. Characterization of teratogenic potential and gene expression in canine and feline amniotic membrane-derived stem cells. *Reprod Domest Anim.* 2017;52 Suppl 2:58–64.
  - Carrade DD, Owens SD, Galuppo LD, Vidal MA, Ferraro GL, Librach F, et al. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytotherapy.* 2011;13:419–30.
  - Centeno CJ, Al-Sayegh H, Freeman MD, Smith J, Murrell WD, Bubnov R. A multi-center analysis of adverse events among two thousand, three hundred and seventy two adult patients undergoing adult autologous stem cell therapy for orthopaedic conditions. *International Orthopaedics.* 2016;40:1755–65.
  - Cuervo B, Rubio M, Sopena J, Dominguez JM, Vilar J, Morales M, et al. Hip osteoarthritis in dogs: a randomized study using mesenchymal stem cells from adipose tissue and plasma rich in growth factors. *Int J Mol Sci.* 2014;15:13437–60.
  - De Becker A, Van Hummelen P, Bakkus M, Vande Broek I, De Wever J, De Waele M, et al. Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica.* 2007;92:440–9.
  - de Witte SFH, Luk F, Sierra Parraga JM, Garghesha M, Merino A, Korevaar SS, et al. Immunomodulation By Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells (MSC) Is Triggered Through Phagocytosis of MSC By Monocytic Cells: The Fate of MSC Post Infusion. *STEM CELLS.* 2018;
  - Deuse T, Stubbendorff M, Tang-Quan K, Phillips N, Kay MA, Eiermann T, et al. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2011;20:655–67.
  - Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Frontiers in Immunology.* 2012;3.
  - El Omar R, Beroud J, Stoltz J-F, Menu P, Velot E, Decot V. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Eng Part B Rev.* 2014;20:523–44.
  - Elman JS, Murray RM, Wang F, Shen K, Gao S, Conway KE, et al. Pharmacokinetics of Natural and Engineered Secreted Factors Delivered by Mesenchymal Stromal Cells. Mezey E, organizador. *PLoS One.* 2014;9:e89882.
  - Ferris DJ, Frisbie DD, Kisiday JD, McIlwraith CW, Hague BA, Major MD, et al. Clinical outcome after intra-articular administration of bone marrow derived mesenchymal stem cells in 33 horses with stifle injury. *Vet Surg.* 2014;43:255–65.
  - Fortier LA, Nixon AJ, Williams J, Cable CS. Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res.* 1998;59:1182–7.
  - Galleu A, Riffo-Vasquez Y, Trento C, Lomas C, Dolcetti L, Cheung TS, et al. Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation. *Science translational medicine.* 2017;9:eaam7828.
  - Garcia S, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Garcia-Castro J, Bernad A. Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research.* 2010;316:1648–50.
  - Guercio A, Di Marco P, Casella S, Cannella V, Rusotto L, Purpari G, et al. Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. *Cell Biol Int.* 2012;36:189–94.
  - Hall MN, Rosenkrantz WS, Hong JH, Griffin CE, Mendelsohn CM. Evaluation of the potential use of adipose-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of canine atopic dermatitis: a pilot study. *Vet Ther.* 2010;11:E1-14.
  - Harman R, Carlson K, Gaynor J, Gustafson S, Dhupa S, Clement K, et al. A Prospective, Randomized, Masked, and Placebo-Controlled Efficacy Study of Intraarticular Allogeneic Adipose Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis in Dogs. *Frontiers in Veterinary Science.* 2016;3.
  - Harris MT, Butler DL, Boivin GP, Florer JB, Schantz EJ, Wenstrup RJ. Mesenchymal stem cells used for rabbit tendon repair can form ectopic bone and express alkaline phosphatase activity in constructs. *Journal of Orthopaedic Research.* 2004;22:998–1003.
  - Hoffman AM, Dow SW. Concise Review: Stem Cell Trials Using Companion Animal Disease Models: Stem Cell Trials in Companion Animal Diseases. *STEM CELLS.* 2016;34:1709–29.
  - Hoffman JM, Creevy KE, Franks A, O'Neill DG, Promislow DEL. The companion dog as a model for human aging and mortality. *Aging Cell.* 2018;e12737.
  - Hoogduijn MJ. Are mesenchymal stromal cells immune cells? *Arthritis Research & Therapy.* 2015;17.
  - Hoogduijn MJ, de Witte SFH, Luk F, van den Hout-van Vroonhoven MCGN, Ignatowicz L, Catar R, et al. Effects of Freeze-Thawing and Intravenous Infusion on Mesenchymal Stromal Cell Gene Expression. *Stem Cells and Development.* 2016;25:586–97.
  - Hoogduijn MJ, Roemeling-van Rhijn M, Engela AU, Korevaar SS, Mensah FKF, Franquesa M, et al. Mesenchymal Stem Cells Induce an Inflammatory Response After Intravenous Infusion. *Stem Cells and Development.* 2013;22:2825–35.
  - Hoogduijn MJ, Roemeling-van Rhijn M, Korevaar SS, Engela AU, Weimar W, Baan CC. Immunological Aspects of Allogeneic and Autologous Mesenchymal Stem Cell Therapies. *Human Gene Therapy.* 2011;22:1587–91.
  - Hows JM. Status of umbilical cord blood transplantation in the year 2001. *J Clin Pathol.* 2001;54:428–34.
  - Idziak M, Pędzisz P, Burdzińska A, Gala K, Pączek L. Uremic toxins impair human bone marrow-derived mesenchymal stem cells functionality *in vitro*. *Exp Toxicol Pathol.* 2014;66:187–94.
  - Joswig AJ, Mitchell A, Cummings KJ, Levine GJ, Gregory CA, Smith R, et al. Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model. *Stem Cell Research & Therapy.* 2017;8.
  - Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2007;449:557–63.
  - Kim Y, Lee SH, Kim WH, Kweon O-K. Transplantation of adipose derived mesenchymal stem cells for acute thoracolumbar disc disease with no deep pain perception in dogs. *J Vet Sci.* 2016;17:123–6.
  - Kol A, Wood JA, Carrade Holt DD, Gillette JA, Bohannon-Worsley LK, Puchalski SM, et al. Multiple intravenous injections of allogeneic equine mesenchymal stem cells do not induce a systemic inflammatory response but do alter lymphocyte subsets in healthy horses. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:73.
  - Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating Skeletal Stem Cells. *The Journal of Cell Biology.* 2001;153:1133–40.
  - Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston BW, Marshall JC, et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS ONE.* 2012;7:e47559.

- Lee H-Y, Hong I-S. Double-edged sword of mesenchymal stem cells: Cancer-promoting versus therapeutic potential. *Cancer Science*. 2017;108:1939–46.
- Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, *et al.* Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell*. 2009;5:54–63.
- Maidhof R, Rafiuddin A, Chowdhury F, Jacobsen T, Chahine NO. Timing of mesenchymal stem cell delivery impacts the fate and therapeutic potential in intervertebral disc repair. *J Orthop Res*. 2017;35:32–40.
- Marino AA, Waddell DD, Kolomytkin OV, Pruett S, Sadasivan KK, Albright JA. Assessment of immunologic mechanisms for flare reactions to Synvisc. *Clin Orthop Relat Res*. 2006;442:187–94.
- Marx C, Silveira MD, Selbach I, da Silva AS, Braga LMG de M, Camassola M, *et al.* Acupoint injection of autologous stromal vascular fraction and allogeneic adipose-derived stem cells to treat hip dysplasia in dogs. *Stem Cells Int*. 2014;2014:391274.
- Merino A, Ripoll E, De Ramon L, Bolaños N, Goma M, Bestard O, *et al.* The Timing of Immunomodulation Induced by Mesenchymal Stromal Cells Determines the Outcome of the Graft in Experimental Renal Allograft Transplantation. *Cell Transplantation*. 2017;26:1017–30.
- Meseguer-Olmo L, Montellano AJ, Martínez T, Martínez CM, Revilla-Nuin B, Roldán M, *et al.* Intraarticular and intravenous administration of 99mTc-HMPAO-labeled human mesenchymal stem cells (99mTc-AH-MSCS): In vivo imaging and biodistribution. *Nuclear Medicine and Biology*. 2017;46:36–42.
- Moll G, Ignatowicz L, Catar R, Luecht C, Sadeghi B, Hamad O, *et al.* Different Procoagulant Activity of Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells Derived from Bone Marrow and Placental Decidua. *Stem Cells Dev*. 2015;24:2269–79.
- Moll G, Rasmusson-Duprez I, von Bahr L, Connolly-Andersen A-M, Elgue G, Funke L, *et al.* Are Therapeutic Human Mesenchymal Stromal Cells Compatible with Human Blood? *STEM CELLS*. 2012;30:1565–74.
- Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med*. 2013;45:e54.
- Nagoya. Protocole de Nagoya. Disponible sur <https://www.cbd.int/abs/about/default.shtml/> (consulté le 8.02.2019)
- Najar M, Krayem M, Merimi M, Burny A, Meuleman N, Bron D, *et al.* Insights into inflammatory priming of mesenchymal stromal cells: functional biological impacts. *Inflammation Research*. 2018;
- Nicpoń J, Marycz K, Grzesiak J. Therapeutic effect of adipose-derived mesenchymal stem cell injection in horses suffering from bone spavin. *Pol J Vet Sci*. 2013;16:753–4.
- Ning H, Yang F, Jiang M, Hu L, Feng K, Zhang J, *et al.* The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia*. 2008;22:593–9.
- Park S-J, Kim H-J, Kim W, Kim O-S, Lee S, Han S-Y, *et al.* Tumorigenicity Evaluation of Umbilical Cord Blood-derived Mesenchymal Stem Cells. *Toxicological Research*. 2016;32:251–8.
- Penha EM, Meira CS, Guimarães ET, Mendonça MVP, Gravelly FA, Pinheiro CMB, *et al.* Use of autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow for the treatment of naturally injured spinal cord in dogs. *Stem Cells Int*. 2014;2014:437521.
- Pérez-Merino EM, Usón-Casaús JM, Duque-Carrasco J, Zaragoza-Bayle C, Mariñas-Pardo L, Hermida-Prieto M, *et al.* Safety and efficacy of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for treatment of dogs with inflammatory bowel disease: Endoscopic and histological outcomes. *Vet J*. 2015a;206:391–7.
- Pérez-Merino EM, Usón-Casaús JM, Zaragoza-Bayle C, Duque-Carrasco J, Mariñas-Pardo L, Hermida-Prieto M, *et al.* Safety and efficacy of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for treatment of dogs with inflammatory bowel disease: Clinical and laboratory outcomes. *Vet J*. 2015b;206:385–90.
- Peroni JF, Borjesson DL. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Activities of Stem Cells. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2011;27:351–62.
- Pigott JH, Ishihara A, Wellman ML, Russell DS, Bertone AL. Investigation of the immune response to autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2013;156:99–106.
- Pitel P-H, Pronost S, Scrive T, Léon A, Richard E, Fortier G. Molecular detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in the bone marrow of asymptomatic horses. *Vet Parasitol*. 2010;170:182–4.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143–7.
- Pogue B, Estrada AH, Sosa-Samper I, Maisenbacher HW, Lamb KE, Mincey BD, *et al.* Stem-cell therapy for dilated cardiomyopathy: a pilot study evaluating retrograde coronary venous delivery. *J Small Anim Pract*. 2013;54:361–6.
- Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB. Pro-Inflammatory Cytokines, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ , Influence Immune Properties of Human Bone Marrow and Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells Differentially. *Verfaillie CM, organizador. PLoS ONE*. 2010;5:e9016.
- Quimby JM, Webb TL, Habenicht LM, Dow SW. Safety and efficacy of intravenous infusion of allogeneic cryopreserved mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: results of three sequential pilot studies. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4:48.
- Quimby JM, Webb TL, Randall E, Marolf A, Valdes-Martinez A, Dow SW. Assessment of intravenous adipose-derived allogeneic mesenchymal stem cells for the treatment of feline chronic kidney disease: a randomized, placebo-controlled clinical trial in eight cats. *J Feline Med Surg*. 2016;18:165–71.
- Ryan AE, Lohan P, O'Flynn L, Treacy O, Chen X, Coleman C, *et al.* Chondrogenic differentiation increases antidonor immune response to allogeneic mesenchymal stem cell transplantation. *Mol Ther*. 2014;22:655–67.
- Sarmento CAP, Rodrigues MN, Bocabello RZ, Mess AM, Miglino MA. Pilot study: bone marrow stem cells as a treatment for dogs with chronic spinal cord injury. *Regen Med Res*. 2014;2:9.
- Saulnier N, Loriau J, Febre M, Robert C, Rakic R, Bonte T, *et al.* Canine placenta: A promising potential source of highly proliferative and immunomodulatory mesenchymal stromal cells? *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2016;171:47–55.
- Saulnier N, Viguier E, Perrier-Groult E, Chenu C, Pillet E, Roger T, *et al.* Intra-articular administration of xenogeneic neonatal Mesenchymal Stromal Cells early after meniscal injury down-regulates metalloproteinase gene expression in synovium and prevents cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23:122–33.
- Schnabel LV, Pezzanite LM, Antczak DF, Felipe MJ, Fortier LA. Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*. 2014;5:13.
- Schrepfer S, Deuse T, Reichensperner H, Fischbein MP, Robbins RC, Pelletier MP. Stem Cell Transplantation: The Lung Barrier. *Transplantation Proceedings*. 2007;39:573–6.
- Sole A, Spriet M, Galuppo LD, Padgett KA, Borjesson DL, Wisner ER, *et al.* Scintigraphic evaluation of intra-arterial and intravenous regional limb perfusion of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the normal equine distal limb using 99mTc-HMPAO: Regional limb perfusion of stem cells. *Equine Veterinary Journal*. 2012;44:594–9.
- Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells:

- Consequences for cell therapies. Mechanisms of Ageing and Development. 2008;129:163–73.
- Taroni M, Cabon Q, Fèbre M, Cachon T, Saulnier N, Carozzo C, *et al.* Evaluation of the Effect of a Single Intra-articular Injection of Allogeneic Neonatal Mesenchymal Stromal Cells Compared to Oral Non-Steroidal Anti-inflammatory Treatment on the Postoperative Musculoskeletal Status and Gait of Dogs over a 6-Month Period after Tibial Plateau Leveling Osteotomy: A Pilot Study. *Frontiers in Veterinary Science.* 2017;4.
  - Tarte K, Gaillard J, Lataillade J-J, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, *et al.* Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood.* 2010;115:1549–53.
  - Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation.* 2003;75:389–97.
  - Vidane AS, Pinheiro AO, Casals JB, Passarelli D, Hage M, Bueno RS, *et al.* Transplantation of amniotic membrane-derived multipotent cells ameliorates and delays the progression of chronic kidney disease in cats. *Reprod Domest Anim.* 2017;52 Suppl 2:316–26.
  - Vilar JM, Batista M, Morales M, Santana A, Cuervo B, Rubio M, *et al.* Assessment of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in osteoarthritic dogs using a double blinded force platform analysis. *BMC Vet Res.* 2014;10:143.
  - Vilar JM, Morales M, Santana A, Spinella G, Rubio M, Cuervo B, *et al.* Controlled, blinded force platform analysis of the effect of intra-articular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells associated to PRGF-Endoret in osteoarthritic dogs. *BMC Vet Res.* 2013;9:131.
  - Villatoro AJ, Fernández V, Claros S, Ricollanos GA, Becerra J, Andrades JA. Use of adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in a canine model. *Biomed Res Int.* 2015;2015:527926.
  - Villatoro AJ, Hermida-Prieto M, Fernández V, Fariñas F, Alcoholado C, Rodríguez-García MI, Mariñas-Pardo L, Becerra J. Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in dogs with refractory atopic dermatitis: clinical efficacy and safety. *Vet Rec.* 2018;183:654.
  - Volk SW, Wang Y, Hankenson KD. Effects of Donor Characteristics and Ex Vivo Expansion on Canine Mesenchymal Stem Cell Properties: Implications for MSC-Based Therapies. *Cell Transplantation.* 2012;21:2189–200.
  - von Bahr L, Batsis I, Moll G, Hägg M, Szakos A, Sundberg B, *et al.* Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation. *Stem Cells.* 2012;30:1575–8.
  - Wang J, Liao L, Wang S, Tan J. Cell therapy with autologous mesenchymal stem cells-how the disease process impacts clinical considerations. *Cytotherapy.* 2013;15:893–904.
  - Webb TL, Webb CB. Stem cell therapy in cats with chronic enteropathy: a proof-of-concept study. *J Feline Med Surg.* 2015;17:901–8.
  - Zeira O, Asiag N, Aralla M, Ghezzi E, Pettinari L, Martinelli L, *et al.* Adult autologous mesenchymal stem cells for the treatment of suspected non-infectious inflammatory diseases of the canine central nervous system: safety, feasibility and preliminary clinical findings. *J Neuroinflammation.* 2015;12:181.