

UTILISATION DES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES DANS LE TRAITEMENT DES TENDINOPATHIES ET DES DESMOPATHIES CHEZ LE CHEVAL

USE OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN THE TREATMENT OF EQUINE TENDINOPATHIES AND DESMOPATHIES

Par Francis Desbrosse⁽¹⁾
(communication présentée le 21 février 2008)

RÉSUMÉ

L'activité sportive du cheval athlète soumet son appareil locomoteur aux forces cycliques de la locomotion, dont les effets s'accumulent avec l'entraînement. Les contraintes en tension et en cisaillement subies par les tendons et les ligaments peuvent atteindre les limites physiologiques et la tendinite apparaît alors comme un accident aigu survenant, souvent, sur un tendon fragilisé, ce qui justifie une thérapeutique régénérative. Les multiples traitements des tendinopathies sont évoqués. Les thérapeutiques régénératives prennent leur place durant la phase subaiguë de la tendinite, à savoir entre la troisième et la douzième semaine qui suivent l'accident. Les thérapeutiques régénératives ont débuté avec les facteurs de croissance IGF-1 et TGF- β . L'utilisation de la moelle osseuse autologue a ensuite été introduite en 1995. La moelle osseuse est récoltée dans le sternum, préférentiellement au niveau de la quatrième sternèbre, puis si nécessaire, au niveau de la troisième, et enfin plus rarement au niveau de la cinquième. L'intervention peut être pratiquée chez le cheval debout. Trois techniques sont actuellement utilisées pour réinjecter la moelle osseuse. La première technique consiste à injecter immédiate la moelle dans la lésion tendineuse. Dans la seconde technique, les cellules souches mésenchymateuses de la moelle sont cultivées jusqu'à l'obtention d'environ dix millions de cellules, ce qui demande trois semaines, puis elles sont injectées dans la lésion. La troisième technique consiste à enrichir la moelle prélevée en plaquettes sanguines et en cellules souches et à éliminer la phase contenant les hématies, par une centrifugation à 3500 tours pendant quinze minutes. L'extrait ainsi enrichi est injecté aussitôt. Dans les trois techniques, les injections dans la lésion sont réalisées sous contrôle échographique. Un programme d'exercice contrôlé est ensuite mis en place pendant plusieurs mois, durant lequel des examens échographiques sont réalisés. Le taux de bons résultats varie entre 50 et 80 % selon les auteurs. Ces résultats sont commentés en faisant apparaître de nombreux biais. La discussion porte sur les autres applications en pathologie équine, les autres sites de prélèvement, l'identification des cellules souches, leur fragilité et les effets secondaires du traitement. Nous ne savons pas quel est l'avenir de ces thérapeutiques et la mise en place d'études contrôlées et randomisées est à prévoir.

Mots-clefs: cellules souches mésenchymateuses, facteurs de croissance, cheval, tendons, ligaments.

(1) DVM, ECVS, 18 bis rue des Champs, 78470 Saint Lambert des Bois.

SUMMARY

The locomotor system of the equine athlete is subjected to cyclic tension and shearing forces, which build-up as training intensifies. When these forces exerted on the tendons and ligaments reach physiological limits, acute tendonitis may develop, often on a weakened tendon, requiring a regenerative treatment. The numerous treatments for tendinopathies are listed in the article. Regenerative therapeutics are indicated in the subacute phase of tendonitis, i.e. between the 3rd and 12th week following the injury. These treatments started with the injection of the growth factors IGF-1 and TGF- β . The injection of autologous bone marrow was first used in 1995. Bone marrow is collected from the sternum, preferably from the 4th sternebra, and if necessary from the 3rd sternebra, or more rarely from the 5th sternebra. The procedure can be carried out with the horse standing. Following its collection, the bone marrow is injected in the injured tendon. Three different techniques are used currently. In the first one, crude bone marrow is injected immediately into the lesion in the tendon under ultrasonographic guidance. In the second technique, the mesenchymal stem cells from the bone marrow sample are cultured until approximately 10 million cells are obtained (this takes 3 weeks), and are then injected in the lesion under ultrasonographic guidance. In the third technique, the bone marrow sample is centrifuged at 3500 rpm for 15 minutes, to obtain platelet and stem cell rich fractions without red blood cells. The enriched extract is injected immediately in the lesion. Discharge instructions include controlled exercise for a few months with regular ultrasonographic reassessments of the tendon. A positive outcome is reported in 50 % to 80 % of cases, depending on the authors. These results are commented, highlighting numerous biases. The discussion includes applications in other equine conditions, other sites for bone marrow collection, the identification and fragility of stem cells, and the side effects of the treatment. We do not know how these treatments will fare in the future, and randomized controlled trials will have to be carried out.

Key words: mesenchymal stem cells (MSCs), growth factors, horse, tendons, ligaments.

PLACE DES TECHNIQUES DE RÉGÉNÉRATION

L'activité sportive du cheval sollicite fortement son appareil locomoteur. Les tendons et les ligaments subissent des contraintes répétées, en tension et en cisaillement, et les limites physiologiques des résistances tendineuse et ligamentaire sont souvent atteintes. L'élévation de la température du fléchisseur superficiel, lors de l'effort, entraîne un vieillissement du collagène. Les tendinopathies apparaissent donc comme un phénomène aigu sur fond de chronicité (Perrin 2007). On comprend donc pourquoi nous préférons le terme de tendinopathies à celui de tendinite, et l'on entrevoit l'intérêt d'une médecine régénérative. Les tendinopathies sont fréquentes et, par leur gravité, elles sont une cause de réforme chez le cheval de sport (Kasashima *et al.* 2004; Singer *et al.* 2007). Les tendons fléchisseur superficiel et fléchisseur profond, leurs brides de renforcement, ainsi que le ligament suspenseur du boulet, sont concernés dans la majorité des cas. Mais les nouvelles techniques d'imagerie médicale ont permis de révéler l'implication de structures tendineuses et ligamentaires à tous les niveaux de l'appareil locomoteur du cheval et notamment, au niveau du pied. En effet, jusqu'à ce jour, la mise en évidence des tendinopathies et des

desmopathies était essentiellement clinique, basée sur l'inflammation, l'œdème, la chaleur, et la douleur. La technique de choix pour leur diagnostic et leur étude est maintenant l'échographie, à chaque fois qu'une fenêtre acoustique est présente. En l'absence de fenêtre acoustique, nous disposons, pour la partie distale du membre, de techniques d'imagerie plus complexes, maintenant réalisables chez le cheval debout, à savoir l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'angioscanner. Cette imagerie nous permet aussi de suivre le processus de réparation des ligaments et des tendons, et nous étant aperçus des limites de la réparation par cicatrisation, nous nous sommes naturellement tournés vers les techniques de régénération. Durant la phase aiguë, les anti-inflammatoires, l'hydrothérapie, la cryothérapie ont leur place. La phase chronique peut être une indication de l'approche chirurgicale, de peignage tendineux, soit à ciel ouvert ou de préférence, par voie transcutanée. Les techniques de desmotomies de la bride radiale ou de l'anneau du boulet, sous téno-scopie, sont aussi utilisées. Aussi les traitements régénératifs à l'aide de facteurs de croissance et de cellules souches trouvent-ils leur place durant la phase subaiguë, correspondant à la phase de l'angiogenèse (Desbrosse 2004; Rossignol *et al.* 2007). Cette période se situe environ six

semaines après « l'accident ». Avant trois semaines, l'inflammation, toujours présente, nuit au développement des cellules souches (Brehm 2006) ; après douze semaines, l'angiogenèse s'arrête et la fibroplasie s'installe (Brehm 2006). Il est intéressant de noter que le traitement traditionnel à base d'onguent vésicatoire était aussi appliqué à ce stade et ceci, peut être en raison de leur action supposée sur l'angiogenèse. L'utilisation des facteurs de croissance résulte des progrès des recherches en biologie moléculaire, adaptés par les chirurgiens à la pathologie ostéo-articulaire chez le cheval (McIlwraith & Trotter, 1996). L'insuline Growth factor (IGF-1), le transforming growth factor (TGF β) ont d'abord été utilisés pour la régénération cartilagineuse, puis en injection intra-tendineuse (Fortier 2002), mais cela n'a pas dépassé le stade expérimental. Les Australiens ont utilisé l'hormone de croissance, par voie générale, mais son utilisation a soulevé des controverses en Europe, cette hormone ayant une action systémique considérée comme dopante. En fait, l'utilisation de la moelle osseuse autologue contenant des facteurs de croissance, en quantité non négligeable, et des cellules souches mésenchymateuses en quantité moindre, a ouvert la voie des thérapeutiques régénératives et est depuis largement utilisée. La première indication en a été la desmopathie du suspenseur du boulet (Herthel 2001), puis la tendinopathie du fléchisseur superficiel du doigt (Smith *et al.* 2003 ; Brehm 2006) et maintenant tous types de desmopathies ou de tendinopathies, notamment au niveau du pied.

MÉTHODES

Technique de prélèvement

Le prélèvement de moelle osseuse se fait classiquement dans le sternum, chez le cheval vigile debout ou lors d'une anesthésie générale. On repère la quatrième sternèbre par échographie. Si la quantité de moelle recueillie est insuffisante, on prélève dans la troisième et en dernier recours, dans la cinquième sternèbre. Le choix de la sternèbre dépend de sa morphologie. La quatrième offre un bon compromis : elle présente une surface relativement plane, facilitant l'insertion du trocart de Jamshidi 11 G, sans risque de dérapage sur le côté, elle permet le recueil d'une quantité de moelle suffisante, et son épaisseur protège le myocarde. La troisième sternèbre offre l'avantage d'une épaisseur sécuritaire pour le myocarde, le volume de moelle osseuse disponible est important, mais d'une surface très anguleuse, elle favorise le dérapage du trocart. La cinquième, par sa surface plane, facilite la position du trocart, mais la quantité de moelle disponible est moindre et surtout, sa faible épaisseur augmente le risque de perforation du myocarde, situé juste derrière. Le contact avec l'os est établi à 4 cm de profondeur, puis le trocart est enfoncé

sur 2 cm par un mouvement de rotation. La moelle est aspirée par dépression dans une seringue de 50 ml, en réalisant une traction modérée et des à-coups sur le piston, jusqu'à l'obtention de 20 ml de moelle environ. Son prélèvement se caractérise par une couleur plus foncée que celle du sang et par une consistance grasseuse ; le contrôle au microscope *ex temporane* permet d'objectiver sa qualité par la densité des cellules souches à gros noyaux foncés et plurilobés et par la présence de gouttelettes grasseuses, ce qui distingue la moelle d'un prélèvement de sang.

Utilisation du prélèvement

À partir de ce prélèvement, trois techniques sont actuellement pratiquées. Dans la première (Herthel, 2001), le transfert de moelle osseuse se fait aussitôt par injection échoguidée dans la lésion. La quantité de moelle transférée dépend du volume de la lésion, de quelques millilitres à dix millilitres au maximum. Le contrôle du bon positionnement du transfert est aussi réalisé à l'aide de l'échographe, la moelle osseuse étant échogène. Les suites sont simples et sur 47 interventions nous n'avons pas observé d'effet secondaire. Un pansement, mis en place pour huit jours, est ensuite remplacé par des bandages de repos. L'exercice est contrôlé et dosé en fonction de la localisation, du stade et de l'étendue de la lésion : le cheval est habituellement maintenu dans son box pendant huit jours, exercé au pas au cours des sept semaines suivantes, puis au trotting jusqu'au cinquième mois ; nous le remettons alors à l'entraînement sans exercice maximal jusqu'au septième mois et à l'entraînement normal avec exercice maximal jusqu'au neuvième mois. La remise en compétition a lieu entre le neuvième et le douzième mois. Un bilan locomoteur est effectué systématiquement à chaque étape du programme de l'exercice contrôlé et à la demande, en cas de signe d'appel. Il comprend un examen échographique à chaque fois qu'une fenêtre acoustique est disponible. À l'échographie, l'évolution favorable de la lésion se traduit par la disparition de l'œdème tendineux dans les premières semaines, l'installation d'une fibroplasie vers la huitième semaine et par la stabilisation des images échographiques à partir de la douzième semaine. La deuxième technique implique la culture cellulaire des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (Smith *et al.* 2003). Le prélèvement est effectué, dans les conditions déjà décrites, trois semaines après « l'accident ». En effet, la culture cellulaire demandant environ trois semaines, l'implantation ne pourra être envisagée qu'à partir de la sixième semaine, période optimale. Deux tubes de dix millilitres contenant de l'héparine et deux tubes de quatre millilitres contenant du sérum physiologique sont remplis de moelle osseuse. Placés dans un container réfrigérant à 6° Celsius, ils sont expédiés au Laboratoire⁽²⁾, le délai de transport n'excédant pas 48 heures. Le Laboratoire garantit un nombre de dix millions de cellules

(2) VetCell Bioscience Limited - The London Bioscience Innovation Centre 2 Royal College Street London NW1 OTU tel +44 (0) 20 7691 2062, www.vetcell.com. Ce laboratoire annonce 1000 cultures effectuées à ce jour réparties sur 250 praticiens. Les cellules-souches sont commercialisées 975 des dix millions de cellules, puis 120 pour dix millions supplémentaires.

dans un volume de deux millilitres et, en fonction de la taille de la lésion, deux à quatre millilitres sont nécessaires. Il convient de pratiquer l'implantation des cellules cultivées dans les 24 heures qui suivent leur retour. Les suites sont les mêmes que pour la transplantation immédiate. La troisième technique (Schnabel *et al.* 2007 ; Nixon 2008) consiste à utiliser les fractions de moelle osseuse enrichies en plaquettes sanguines et en cellules souches, obtenues après centrifugation. Le prélèvement est placé dans un tube séparateur contenant un anticoagulant ACD-A et fourni dans une trousse commerciale⁽³⁾. La centrifugation s'effectue à 3200 tours, pendant quinze minutes. Un assez gros volume de moelle osseuse, de 40 millilitres environ, est ainsi centrifugé, pour obtenir et utiliser un volume concentré de cellules, de quelques millilitres, qui est aussitôt injecté dans la lésion sous contrôle échographique.

RÉSULTATS

Entre novembre 2002 et mars 2007, nous avons traité 47 chevaux selon la première technique. Cet effectif se composait de 12 chevaux de sport et de 35 chevaux de course, dont 22 trotteurs et 13 affectés au galop. Nous n'avons enregistré une bonne récupération que dans 50 % des cas. Le temps moyen du suivi des individus après le traitement était de 18 mois.

DISCUSSION

Les cellules souches, utilisées dans le traitement des tendinopathies et des desmopathies, l'ont été aussi, de façon occasionnelle, pour la réparation de fractures (Kraus & Kirker-Head, 2006) et le traitement des plaies (Cartel *et al.* 2003). Un certain nombre de précautions s'impose : fragiles, il est conseillé de ne pas les implanter trop tôt après l'« accident ». Un délai de six semaines semble raisonnable. Après 12 semaines, la fibroplasie s'installe et leur implantation apparaît comme trop tardive pour obtenir un résultat significatif. Leur sensibilité à l'inflammation limite les associations que l'on serait tenté de faire avec des substances inflammatoires, telles que la muqueuse acellulaire de vessie de porc⁽⁴⁾.

Les résultats varient selon les auteurs qui décrivent une récupération dans 50 à 80 % des cas et peu d'effets secondaires sont signalés.

L'écart observé peut avoir plusieurs causes. L'évaluation des résultats se base sur des critères différents selon les études, sur des critères cliniques ou sur des critères échographiques, bien que la présence d'une fibroplasie homogène à huit semaines soit considérée comme le témoin d'un bon résultat thérapeutique.

Presque toutes les études évaluent l'efficacité de la régénération, en quelque sorte de façon macroscopique, par les performances sportives, en prenant en compte le nombre de participations à des manifestations sportives, le nombre de performances et l'absence de récurrence après trois épreuves. Enfin, une enquête téléphonique pour connaître le degré de satisfaction du propriétaire ou de l'entraîneur est souvent réalisée. Les résultats reposent sur des études rétrospectives. Les biais sont nombreux et les écarts constatés dans les résultats montrent combien il est difficile de se faire une opinion sur l'efficacité de ce type de traitement. En effet, quel que soit le stade de la tendinopathie, la maréchalerie est déterminante. À partir de la connaissance des concepts biomécaniques, elle permet, par des effets de leviers, soit de soulager, en phase aiguë, les structures tendineuses et ligamentaires lésées, soit de les mettre en situation de précontrainte pour mieux les préparer aux forces maximales durant la phase de réhabilitation. Ces forces s'expriment en kilo Newton, chaque millimètre dans la géométrie du fer compte, ce qui explique que la maréchalerie évolue vers un art de plus en plus technique. La ferrure est donc un traitement connexe, systématique et efficace, des tendinopathies et desmopathies. Elle constitue avec la médecine sportive, les techniques d'entraînement et le choix des sols, un biais dans l'évaluation des résultats obtenus dans les traitements de régénération par les facteurs de croissance et les cellules souches. Il nous manque des études expérimentales contrôlées et des études de terrain randomisées. L'écart observé soulève le problème de leur fiabilité.

Par ailleurs, les cellules souches issues de cultures de cellules mésenchymateuses sont difficiles à caractériser. Le Laboratoire⁽²⁾ produit des cellules dont leur aptitude à la prolifération est appréciée par leur nombre et leur concentration dans la culture proposée. C'est d'ailleurs, sur cette base, qu'en est fixé le prix. Mais on ne connaît rien de leur aptitude à la différenciation et à la maturation, de leur capacité à s'adapter à leur future fonction. Pour ces deux raisons, de prix, et d'incertitude sur leur fonctionnalité, les praticiens français restent « timides » face à la technique de culture cellulaire, au profit de la transplantation directe et immédiate de la moelle.

Le cordon ombilical peut être aussi une source de cellules souches, considérées de meilleure qualité, mais dont la multiplication risque d'être moins contrôlable. Elles sont actuellement peu utilisées, bien que le laboratoire⁽²⁾ propose un stockage de ces cellules souches à partir du cordon ombilical, à la naissance, en vue d'un emploi ultérieur lors d'éventuelles lésions tendineuses. Le tissu adipeux est aussi une source de cellules souches mésenchymateuses. Les études sont moins avancées car le tissu adipeux est plus difficile à prélever chez le cheval que la moelle osseuse ; il est prélevé à la base de la queue. La

(3) CFT - cell factor technologies, Inc. Biomet, Inc. P.O. Box 587, 56 E. Bell Drive, Warsaw, Indiana 46581, USA.

(4) ACell Vet, Inc. 10555 Guilford Road, Suite 113, Jessup, MD 20794, phone : 800-826-2926. Email : info@cell.com Web : www.acell.com

culture cellulaire est rapide, elle demande 48 heures, à comparer avec les trois semaines pour les cellules de la moelle osseuse. Cependant les cellules obtenues seraient moins bien définies et moins pluripotentes. Cette technique est pratiquée aux USA⁽⁵⁾.

CONCLUSION

Le traitement des tendinopathies et des desmopathies évolue dans le sens de l'utilisation de procédés de régénération et ceci, aux dépens des procédés aboutissant à un tissu cicatriciel. Le rôle de l'imagerie médicale a été déterminant dans le choix et la mise en place de ces procédés. L'association de cellules souches mésenchymateuses originaires de la moelle osseuse et de facteurs de croissance, issus de cette même moelle osseuse,

est actuellement un procédé largement utilisé dans le traitement des tendinopathies chez le cheval, et les domaines d'application restent ouverts. Il nous semble difficile de nous prononcer sur le devenir de ces thérapeutiques, ont-elles un avenir ou sommes-nous en présence d'un phénomène de mode ? (Kahn 2006). Pour le moment, nous manquons de recul pour répondre à cette question.

BIBLIOGRAPHIE

- Brehm, W. 2006. Stammzellen, Stammzelltherapie – Begriffsklärung, Zusammenhänge und mögliche klinische Anwendungen. *Pferdeheilkunde* 22: 259 – 267.
- Brehm, W. 2006. Les cellules souches dans le traitement des tendinites, In: *Présentations et travaux pratiques*, École Nationale Vétérinaire de Lyon, 7 Juillet 2006.
- Carter, C.A., Jolly, D.G., Worden, C.E., Hendren, D.G., Kane, C.J. 2003. Platelet rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Path.* 74(3):244 – 255.
- Desbrosse, F. 2004. Thérapeutiques lors de tendinite: du passé à l'avenir. In *Proceedings of the 4th conference AVEF*, Roissy, 21 février 2004, pp.26 – 32.
- Fortier, L.A. 2002. Tendon and ligament engineering-experiences with IGF-I. In *Proceedings of the 1st World Orthopaedic Veterinary Congress*, September 5th-8th 2002, Munich. Editors A.Vezzoni, J.Houlton, M.Schramme, B.Beale, p. 80.
- Herthel, D.J. 2001. Enhanced suspensory ligament Healing in 100 horses by StemCells and other bone marrow components. In *Proceedings of the 47th annual convention AAEP*, Nov 24th-28th 2001, San Diego Ca. AAEP. pp. 319 – 321.
- Kahn, A.2006. Cellules souches et médecine régénératrice. *Sciences Etudes* n° 4044 (avril 2006): 474 – 486.
- Kasashima, Y., Takahashi, T., Smith, R.K., Goodshil, A.E., Kuwano, A., Ueno, T., Hirano, S. 2004. Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in Japanese Thoroughbred flat racehorses in 1999. *Equine Vet J.* 36 (4): 346 – 350.
- Krause, K.H. & Kirker-Head, C. 2006. Mesenchymal Stem Cells and Bone Regeneration. *Veterinary surgery* 35: 232 – 242.
- McIlwraith, C.W. & Trotter, G.W. 1996. *Joint disease in the horse*. Saunders W.E. Company, 490 pages.
- Nixon, A.J. 2008. Regenerative Biologics for Tendinitis. In *Proceedings of the 1st International Congress of Equine Podiatry*, April 24th-26th 2008, Valencia. www.congresopodologiaequina.es.
- Perrin, R. 2007. Editorial: Diagnostic et traitement des tendinites. *Pratique Vétérinaire Equine* 39 (155): 3.
- Rossignol, F. & Virevialle. 2007. Traitement des tendinites: état des lieux et applications. *Pratique Vétérinaire Equine* 39 (155): 39 – 47.
- Singer, E.R., Barnes, J., Saxby, E., Murray, J.K. 2008. Injuries in the event horse: Training versus competition. *Vet J.* 175(1):76 – 86.
- Smith, R.K., Korda, M., Blunn, G.W., Goodship, A.E. (2003). Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet J.* 35 (1) 99 – 102.
- Schnabel, L.V., Mohammed, H.O., Miller, B.J., McDermott, W.G., Jacobson, M.S., Santangelo, K.S., Fortier, L.A. 2007. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res.* 25: 230 – 240

(5) **Vet-Stem** 12120 Tech Center Drive, Suite D. Poway, CA 92064, tel 858.748.2004 – Web www.vet-stem.com. Ce laboratoire annonce 2000 cultures à ce jour, utilisées par 400 praticiens.

