THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie-Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche Inserm U1183 Institut de Médecine Régénératrice et de Biothérapies

Rôle thérapeutique des vésicules extracellulaires des cellules stromales mésenchymateuses dans l'arthrose : Impact de la sénescence

Présentée par Jérémy BOULESTREAU

Le 15 décembre 2021

Sous la direction de Danièle NOËL

Devant le jury composé de

Francis BERENBAUM, PU-PH, INSERM	Président du jury
Claire VINATIER, MCU, Université de Nantes	Rapporteur
Victorine DOUIN-ECHINARD, MCU, Université Paul Sabatier	Examinateur
Danièle NOËL, DR, INSERM	Directeur de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Rôle thérapeutique des vésicules extracellulaires des cellules stromales mésenchymateuses dans l'arthrose : Impact de la sénescence

L'âge est le facteur de risque le plus important dans l'incidence des maladies dégénératives et notamment l'arthrose, qui est caractérisée par l'accumulation de cellules sénescentes au niveau des articulations. A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif de l'arthrose. Parmi les approches thérapeutiques en cours d'évaluation, l'injection de cellules stromales mésenchymateuses du tissu adipeux (ASCs) a montré des résultats prometteurs dans des études pré-cliniques et cliniques. Elles exercent leurs propriétés régénératrices au travers de la sécrétion de médiateurs libérés dans le milieu extracellulaire ou contenus dans des vésicules extracellulaires (EV). Le premier objectif de mon travail de thèse a été d'étudier l'impact de la sénescence des ASCs utilisées pour produire des EV sur leur rôle thérapeutique dans l'arthrose. Le second objectif a été de déterminer si les ASCs et leurs EV ont un effet sénoprotecteur sur des chondrocytes arthrosiques.

Nous avons développé un modèle d'ASCs sénescentes et montré que les EV qu'elles produisent conservent en partie les capacités des EV saines à réguler le phénotype des chondrocytes humains arthrosiques in vitro. En revanche, les EV d'ASCs sénescentes perdent leur effet thérapeutique dans un modèle murin d'arthrose induite à la collagénase. En parallèle, nous avons testé l'effet sénoprotecteur des EV dérivées d'ASCs saines et sénescentes dans deux modèles de chondrocytes induits en sénescence par un stimulus inflammatoire (IL1β) ou par induction de dommages à l'ADN (étoposide). Dans ces deux modèles, les EV d'ASCs saines ou sénescentes freinent l'induction de la sénescence des chondrocytes suggérant que ce mécanisme d'action participe à leur effet bénéfique dans l'arthrose. Nous avons également montré que les ASCs soumises à un environnement sénescent perdent en partie leur effet sénoprotecteur, ce qui indique que les CSM-EV peuvent être une option pertinente pour de futures applications cliniques dans les maladies dégénératives.

En conclusion, nous avons montré que les EV isolées d'ASCs sénescentes perdent leurs propriétés thérapeutiques dans un modèle murin d'arthrose malgré la conservation de leur effet sénoprotecteur sur des chondrocytes arthrosiques in vitro.

Mots-clés : Vieillissement ; sénescence ; cellules stromales mésenchymateuses ; vésicules extracellulaires ; arthrose.

Therapeutic role of extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells in osteoarthritis: Impact of senescence

Age is the most important risk factor in the incidence of degenerative diseases, especially osteoarthritis (OA), which is characterized by the accumulation of senescent cells in joints. Currently, there is no cure for osteoarthritis. Among the therapeutic approaches that are being evaluated, the injection of adipose mesenchymal stromal cells (ASCs) has shown promising results in pre-clinical and clinical studies. They exert their regenerative properties through the secretion of mediators released into the extracellular medium or contained in extracellular vesicles (EV). The first objective of my PhD thesis was to evaluate the impact of the senescence of ASCs used to produce EVson their therapeutic effect in osteoarthritis.The second objective was to determine whether ASCs and their EV exert a senoprotective effect on osteoarthritic chondrocytes.

We developed a model of senescent ASCs and showed that their EVs maintain the ability of EV from healthy ASCs to regulate *in vitro* the phenotype of human OA chondrocytes. By contrast, EV from senescent ASCs lose their therapeutic effect in the mouse model of collagenase-induced osteoarthritis. In parallel, we tested the senoprotective effect of EVs derived from healthy ASCs in two models of chondrocytes induced in senescence using either an inflammatory (IL1β) or a DNA damage (etoposide) stimulus. In the two models, EV from healthy or senescent ASCs prevent the induction of senescence on chondrocytes suggesting that this mechanism plays a role in their beneficial effect in OA. We also shown that ASCs exposed to a senescent environment partly lose their senoprotective effect, indicating that MSC-EV may be a relevant option for future clinical applications in degenerative diseases.

In conclusion, we provided evidence that EV isolated from senescent ASCs lose their therapeutic properties in a murine model of osteoarthritis even though they exert a senoprotective effect on OA chondrocytes in vitro.

Key words: Aging; senescence; mesenchymal stromal cells; extracellular vesicles; osteoarthritis.

Table des matières

Remerciements 5

Liste des figures 8

Liste des abréviations 9

Avant-propos 12

1 Introduction bibliographique 14

1.1 Vieillissement et maladies liées à l'âge 14

1.2 La sénescence cellulaire 18

1.2.1 Caractéristiques générales de la sénescence 19

1.2.1.1 Arrêt du cycle cellulaire 19

1.2.1.2 Altérations lysosomales 20

1.2.1.3 Hypertrophie cellulaire 21

1.2.1.4 SAHF 21

1.2.1.5 Dommages à l'ADN 22

1.2.1.6 Altération de l'enveloppe nucléaire 22

1.2.1.7 SASP 23

1.2.1.8 Résistance à l'apoptose 24

1.2.1.9 Oxydation des macromolécules 24

1.2.2 Mécanismes inducteurs de la sénescence 26

1.2.2.1 Sénescence cellulaire et réponse aux dommages de l'ADN 26

1.2.2.2 Erosion des télomères 27

1.2.2.3 Sénescence induite par des oncogènes 28

1.2.2.4 Dysfonctionnements mitochondriaux et sénescence cellulaire 28

1.2.3 Sénescence et autophagie 30

1.2.4 Effets bénéfiques de la sénescence cellulaire 31

1.2.5 Impacts néfastes de la sénescence 32

1.3 L'arthrose 34

1.3.1 Epidémiologie 34
1.3.2 Etiologie 34
1.3.2.1 L'âge 34
1.3.2.2 Le genre 35
1.3.2.3 L'obésité 35
1.3.2.4 La génétique 36
1.3.3 Physiopathologie 37
1.3.3.1 Cartilage articulaire 37
1.3.3.2 L'os sous-chondral 43
1.3.3.3 La membrane synoviale 47
1.3.3.4 Dégénérescence du cartilage articulaire 49
1.3.3.5 Sénescence cellulaire et arthrose 50
1.3.3.6 Altération de l'autophagie 50
1.3.4 Evaluation clinique et diagnostique 51
1.3.5 Traitements 52
1.3.5.1 Soins palliatifs 52
1.3.5.2 Approches chirurgicales 54
1.3.5.3 Nouvelles approches thérapeutiques 54
1.4 Vésicules extracellulaires dérivées des CSM 56
1.4.1 Cellules stromales mésenchymateuses 56
1.4.1.1 Origine et source des CSM 59
1.4.1.2 Fonctions des CSM 60
1.4.2 Les EV de CSM 65
1.4.2.1 Les différents types de vésicules extracellulaires 65
1.4.2.2 Biogénèse des vésicules extracellulaires 66
1.4.2.3 Mécanismes d'interaction des vésicules extracellulaires 68
1.4.3 Isolement et caractérisation des vésicules extracellulaires 70
1.4.3.1 Séparation et concentration des EV 70

1.4.3.2 Caractérisation des vésicules extracellulaires 73
1.4.4 Fonctions des vésicules extracellulaires 77
1.4.5 Utilisation des EV en thérapies 78
Article 1 (Revue de la littérature) : Vésicules extracellulaires dérivées des cellules souches mésenchymateuses : opportunités et défis pour la translation clinique 80
1.4.5.1 EV dérivées des CSM et vieillissement 81
Article 2 (Revue de la littérature) : Vésicules extracellulaires dérivées de cellules souches mésenchymateuses dans le vieillissement 82
1.4.5.2 EV dérivées de CSM en thérapie contre la sénescence associée à l'arthrose 83
Article 3 (Revue de la littérature) : Vésicules extracellulaires de cellules stromales mésenchymateuses: perspectives thérapeutiques pour cibler la sénescence dans l'arthrose 84
Hypothèses de travail - Objectifs 85
2 Travaux personnels 86
1ère partie : Les vésicules extracellulaires des cellules stromales mésenchymateuses sénescentes ne peuvent prévenir l'arthrose. 86
Article 4 (article original) : Les vésicules extracellulaires des cellules stromales mésenchymateuses sénescentes ne peuvent pas prévenir l'arthrose 87
2ème partie : Effet sénoprotecteur des vésicules extracellulaires des cellules stromales mésenchymateuses dans l'arthrose. 88
Article 5 (article original) : Effet sénoprotecteur des vésicules extracellulaires dérivées de cellules stromales mésenchymateuses sur des chondrocytes arthrosiques. 89
3 Conclusions générales & perspectives 90
3.1 Impact de la sénescence des ASCs sur l'effet thérapeutique des EV 92
3.2 Effet sénoprotecteur des EV dans l'arthrose 94
4 Bibliographie 96
Curriculum vitae 129
Annexe 131
Article 6 (Revue de la littérature) : La sénescence : de son implication physiopathologique aux traitements futurs 131

Remerciements

Par ces quelques lignes, je souhaite remercier chaleureusement toutes celles et ceux qui ont participé, de près ou de loin à ces travaux et qui m'ont accompagné tout au long de ces trois années de thèse.

En premier lieu, je tiens à adresser mes remerciements à l'ensemble des membres du jury ayant accepté d'évaluer mon travail. Je remercie Claire Vinatier et Francis Berenbaum qui, en tant que rapporteurs, ont accepté de passer du temps à lire et évaluer ces travaux. Je remercie également Victorine Douin-Echinard pour avoir accepté d'évaluer mon travail en tant qu'examinateur.

Je remercie également très chaleureusement Gina Devau et Michel Vidal, membres de mon comité de suivi de thèse qui ont, à deux reprises, accordé de leur temps pour examiner l'avancée du projet afin d'apporter une aide et une expertise extérieures. Votre bienveillance et vos conseils lors de nos discussions m'ont été précieux pour prendre du recul sur mes recherches et avancer sereinement au fil des années.

Un immense et très sincère merci, à ma directrice de thèse Danièle Noël, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Tu m'as convaincu de quitter ma région nantaise natale pour effectuer ma thèse sous le beau soleil du sud de la France. Tu as cru en moi et tu m'as permis d'entreprendre cette aventure. Ton écoute, ta bienveillance, ta patience, ton expertise, font de toi une directrice de thèse, une encadrante, une cheffe de groupe exceptionnelle. Tu as su faire en sorte que ce projet grandisse. J'ai toujours pu compter sur ton soutien et tu as toujours été présente pour m'aiguiller et m'encourager. Tu as su me convaincre de sortir de ma zone de confort notamment pour présenter mes résultats dans plusieurs congrès internationaux. Même si je n'aime pas être au centre de l'attention, tu as su me donner confiance en moi et dans mes travaux pour les présenter aux autres membres de la communauté scientifique. Grâce à toi, j'ai acquis au cours de ces trois années plus de rigueurs et surtout plus d'assurance. Je dois reconnaître que la thèse fut une sacrée expérience, tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Merci infiniment pour tout ce que tu m'as apporté au cours de ces années de thèse. Même si aujourd'hui je souhaite découvrir d'autres horizons de la recherche, j'espère que nous aurons l'opportunité de collaborer à l'avenir.

Je tiens également à remercier Christian Jorgensen, directeur de l'IRMB, sans qui, nos projets ne pourraient se réaliser.

Je remercie également Jérôme Guicheux et Catherine Le Visage du laboratoire RMeS à Nantes, qui m'ont poussé à continuer dans la recherche après mon stage de master, et m'ont encouragé à rejoindre l'équipe de Danièle Noël. Merci à Audrey Smith, la meilleure doctorante/encadrante de stage que j'ai eu l'honneur de rencontrer et qui m'a donné l'envie de poursuivre en thèse sur les MSC.

Petit tour d'horizon des collègues. Tout d'abord je remercie celles et ceux qui se sont impliqués dans mon projet. Merci Marie de m'avoir pris sous ton aile au début de ma thèse. Merci à toi de m'avoir formé et de m'avoir tant aidé dans les manips, sur les figures, et sur ce fameux cytomètre en flux qui me rebute tant ! Merci également de te charger de réclamer nos bonbons auprès d'Eppendorf ! Merci également Claire B pour tes conseils avisés en biologie moléculaire, pour ton soutient, tes encouragements, pour ton point de vue toujours très mesuré et nos longues conversations parfois jusqu'à tard dans la journée ! Merci à Claire L, bientôt 4ème fois maman, pour ta bonne humeur, et nos rigolades en culture cellulaire. Pardonne-moi d'avoir dû subir mes gouts musicaux discutables, et de m'avoir entendu chanter Jul dans le P2. Un très très grand merci à toi Karine, toujours disponible et sans qui la partie in vivo de notre article ne serait pas ce qu'elle est. Merci à Rosanna, et les autres membres de la clinique de vous êtes investis pour l'obtention des prélèvements humains. Merci Farida, pour ta bienveillance, ta bonne humeur sans failles et tes éclats de rires communicatifs. Merci également pour tes encouragements avant les congrès. Merci Audrey B et Gautier (alias « le bogosse de l'IRMB ») pour avoir été de véritables sas de décompression. Merci à vous pour toutes nos rigolades et de prendre si bien soin des doctorants comme vous le faites ! Vous êtes les collègues que tout le monde rêverait d'avoir. Bien entendu, je n'oublie pas les nouveaux arrivés, Emeline et Yoan. J'aurais aimé passer plus de temps à vous connaître et pouvoir travailler ensemble.

Merci aux copains du bureau, notamment les « anciens » avec qui j'ai partagé 50 cm² de bureau quelques temps avant le grand déménagement. Je pense à Engi, Beryl et Joffrey.

Merci également Pauline, qui en plus d'être médecin a brillamment réalisé une thèse de sciences en plus de son travail de maman. Alexandre, le meilleur pédiatre de Montpellier ! Toujours de bonne humeur et disponible pour un cours express sur la coagulation, ou pour relater des anecdotes amusantes de la vie à l'hôpital. Merci également Sarah pour tes talents de cuisinière et nos discussions. Merci Noémie, la reine de la méca, à l'enthousiasme et à la motivation sans failles.

Je voudrais également remercier très très très chaleureusement les copains du labo, Marjorie, Jholy, Damien, Soledad, Lohann, Brice. Merci à vous, ces soirées légendaires, nos apéros « du scandale » et tous ces supers moments passés ensemble. Sans vous ça n'aurait pas été pareil et je vous en suis vraiment reconnaissant !

Enfin, un très grand merci à mes très chers camarades de thèse. Candice (alias Candichoux) tout juste docteure et Jérémy S (alias GG) avec qui j'ai formé ce trio. Cette thèse a été pour moi l'occasion de faire votre rencontre, et QUELLE RENCONTRE ! Cette thèse n'aurait pas été la même sans vous. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble, nos vacances inoubliables en camping dans « la

pampa » ou à dompter les vagues sur l'océan, nos soirées, nos apéros (oui encore des apéros…). Nous avons traversé cette aventure ensemble, les meilleurs moments comme les moins bons. La transition vers de nouveaux horizons professionnels sans vous à mes côtés sera difficile mais je sais que nous resterons liés d'amitié. Encore une fois, un très grand merci à vous, non sans émotions, d'être les meilleurs amis qu'on puisse avoir !

Plus généralement, merci à l'ensemble des membres de l'institut qui m'ont permis d'évoluer dans un environnement de travail stimulant et collaboratif. Merci beaucoup à Saïd, toujours de bonne humeur et positif. Merci également à Philippe avec qui j'ai pu échanger pendant les pauses café devant l'institut, et pour les dons de Pastis et Pineau faits maison ! Merci à Elodie et François. Merci aussi au personnel administratif.

Merci également à la fondation pour la recherche en rhumatologie (FOREUM) sans qui ce projet n'aurait pas été possible.

Merci également à mes très chers/ères ami(e)s nantais Léa, Nivine, Elise, Lucie, Alexis, Mélinda, David Danny, Caroline (alias Carolove), Pierre-Alexandre (alias P.A.), Paul, Leila, Mathilde, Martin. Merci à vous tous de m'avoir permis d'échapper à la vie de thésard, vous avez été une véritable bouffé d'oxygène. Féodor & Louise je pense également très fort à vous qui affronterez la fin de thèse en même temps que moi, force et honneur à vous ! Merci à toi Nabila (alias Docteur Djouadi), qui a également quitté Nantes pour le soleil de Montpellier et m'a rejoint peu après mon arrivée pour débuter une grande carrière de médecin.

Je conclurai en remerciant les personnes les plus chères à mon cœur. Mes parents et mes sœurs, Pauline et Estelle, sans qui rien n'aurait été possible. Vous m'avez soutenu et encouragé tout au long de mes études. J'ai également une pensée émue pour toi Christian, mon oncle, qui nous a quitté cette année. J'aurai tant aimé avoir pu te compter parmi nous jusqu'à la fin de cette aventure. Enfin, merci à tous les autres membres de ma famille pour tout votre soutient et vos encouragements.

Liste des figures

Figure 1 : Prévalence de la fragilité chez les hommes et les femmes par âge 15
Figure 2 : Les caractéristiques du vieillissement 16
Figure 3 : Interconnexions fonctionnelles entre les caractéristiques du vieillissement 16
Figure 4 : Représentation schématique de la chronologie et de la progression des phénotypes liés à l'âge chez l'homme adulte 18
Figure 5 : Les voies moléculaires impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire de la sénescence 20
Figure 6 - Inducteurs de sénescence et phénotypes associés 26
Figure 7 : Aperçu du dysfonctionnement mitochondrial qui se produit pendant la sénescence 29
Figure 8 : Processus et voies moléculaires associées à l'autophagie 30
Figure 9 : Structure du cartilage articulaire 38
Figure 10 : L'organisation structurelle du cartilage articulaire 39
Figure 11 : Schéma du microenvironnement osseux sous-chondral dans l'arthrose sous stimulation mécanique 44
Figure 12 : Transformation microstructurale osseuse sous-chondrale au cours de la progression de l'arthrose 45
Figure 13 : Implication de la synoviale dans la physiopathologie de l'arthrose 48
Figure 14 : Lignes directrices pour la prise en charge non chirurgicale de l'arthrose du genou selon la Société internationale de recherche sur l'arthrose (OARSI) 52
Figure 15 : Démonstration du potentiel souche des cellules dérivées de la moelle osseuse du tissu conjonctif, qui ont ensuite été nommées « cellules souches mésenchymateuses » 57
Figure 16 : Les mécanismes médiateurs du soutien trophique dépendant des CSM 61
Figure 17 : Représentation schématique des capacités immunomodulatrices des CSM 62
Figure 18 : Les principaux types d'EV 66
Figure 19 : Biogénèse des vésicules extracellulaires 67
Figure 20 : Interdépendance des voies de trafic intracellulaire dans la génération des vésicules extracellulaires 68
Figure 21 : Devenir des vésicules extracellulaires dans les cellules receveuses 69
Figure 22 : Diverses techniques utilisées pour la séparation et la concentration des EV 71
Figure 23 : Caractérisation des EV par différentes méthodes 74
Figure 24 : Composition globale des EV 76
Figure 25 : Fonction biologique des EV 78

Liste des abréviations

ACR	American College of Rheumatology
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Microscopie à force atomique
ARN	Acide ribonucléique
ASC(s)	Cellule(s) stromale(s) mésenchymateuse(s) isolée(s) du tissu adipeux
BCL2	B-cell lymphoma 2
BML	Lésions de la moelle osseuse
BMP-7	Protéine morphogénétique osseuse-7
CA	Corps apoptotique
CCF	Fragments de chromatine cytosolique
CFU-F	Colony-forming unit-fibroblast
cGAS	GMP-AMP synthase cyclique
CIOA	Arthrose induite à la collagénase
CKI	Inhibiteur de kinase dépendante de la cycline
CMH	Complexe majeur d'histocompatiblité
COLX	Collagène de type X
Cryo-TEM	Microscopie cryoélectronique
CS	Cellules souches
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CSM(s)	Cellule(s) souche(s) mésenchymateuse(s)
DDR	Réponse aux dommages à l'ADN
DSB	Cassure double brin
DSL	Diffusion dynamique de la lumière
EPO	Erythropoïétine
ESCRT	Complexe de tri endosomal nécessaires au transport
FOREUM	Fondation pour la recherche en rhumatologie
FSV	Fraction stromale vasculaire
GAG	Glycosaminoglycane
GSH-Px	Glutathion peroxydase
H3K9me3	Histone H3 triméthylée Lys9
HA	Acide hyaluronique
HDAC	Inhibiteurs de l'histone désacétylase
HGF	Facteur de croissance des hépatocytes
HMGA	Facteurs de protéine A de groupe à haute mobilité
HO-1	Hème oxygénase
HP1	Protéine d'hétérochromatine 1
IA	Intra-articulaire
IDO	Indoléamine 2,3-dioxygenase
IGF-1	Facteurs de croissance
IL	Interleukine
IL-1RA	Antagoniste des récepteurs de l'IL-1
ILV	Vésicules intraluminales

IMC	Indice de masse corporelle
iNOS	Oxyde nitrique synthase induite
iPSC	Cellules souches pluripotentes induites
IRM	Imagerie par résonnance magnétique
IRMB	Institut de Médecine Régénérative et de Biothérapies
ISCT	Société internationale de thérapie cellulaire
ISEV	Société internationale des vésicules extra-cellulaires
KO	Knock-down
MAPK	Protéines kinases activées par les mitogènes
MAPKAPK2	Protéine kinase activée par la MAP kinase 2
MCP	Protéine chimio attractante des monocytes
MEB	Microscopie électronique à balayage
MEC	Matrice extracellulaire
MET	Microscopie électronique à transmission
MMP	Métalloprotéinases
MO	Moelle osseuse
MoA	Méchanisme d'action
MP	Microparticules
MV	Microvésicules
MVE	Endosome multivésiculaire
NF-κB	Facteur nucléaire-κB
NTA	Analyse du suivi des nanoparticules
OA	Arthrose
OARSI	Société internationale de recherche sur l'arthrose
OIS	Sénescence induite par des oncogènes
OP-1	Protéine ostéogénique 1
PAI-1	Plasminogène activateur inhibiteur-1
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PEG	Polyethylene glycols
PGE2	Prostaglandine E2
PICS	Sénescence cellulaire induite par la perte de PTEN
PP2A	Protéine phosphatase 2A
pRb	Protéine du rétinoblastome
ROS	Dérivé réactif de l'oxygène
SA β-Gal	Activité β-galactosidase associée à la sénescence
SAHF	Foyer d'hétérochromatine associé à la sénescence
SASP	Phénotype sécrétoire associé à la sénescence
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
SLPI	Inhibiteur de la protéinase des leucocytes sécrétoires
SNARE	Récepteur des protéines d'attachement du facteur soluble sensible au N-ethylmaleimide
STING	Stimulateur adaptateur des gènes d'interféron
TA	Tissu adipeux
TERC	Composant ARN télomérique
TERT	Transcriptase inverse télomérique
TGFβ1	Facteur de croissance transformant β1

THBS	Thrombospondines
TIMP	Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale alpha
UC	Ultracentrifugation
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Avant-propos

L'âge est le facteur de risque le plus important dans l'incidence des maladies dégénératives. Il est associé à l'accumulation de cellules sénescentes qui contribuent au déclin fonctionnel des organes. Les cellules sénescentes sont caractérisées par arrêt permanent de la prolifération, des altérations morphologiques et métaboliques, et en particulier, un sécrétome modifié (ou SASP) qui altère le milieu environnant. Les molécules du SASP peuvent être véhiculées dans des vésicules extracellulaires (EV) qui jouent un rôle majeur dans les communications intercellulaires et la propagation des signaux délétères associés au vieillissement cellulaire. L'arthrose, caractérisée par une dégradation du cartilage articulaire, est une maladie du vieillissement qui possède une forte prévalence. Cette pathologie a un impact considérable sur la qualité de vie du patient, entraînant douleur et invalidité, et sur la société en raison du coût de sa prise en charge. Actuellement, il n'existe pas de traitement curatif pour soigner l'arthrose mais uniquement des traitements palliatifs visant à réduire les symptômes de la maladie. La prise en charge actuelle des patients arthrosiques repose essentiellement sur l'utilisation d'antalgiques et d'anti-inflammatoires, mais ces traitements ne sont pas capables de ralentir ou stopper l'altération des tissus articulaires. Les enjeux de la recherche sur l'arthrose sont donc de pouvoir proposer dans les années à venir un traitement curatif à ces patients.

L'Institut de Médecine Régénératrice et de Biothérapies (IRMB) est un institut dont les thématiques de recherche touchent majoritairement l'étude des cellules souches, leur biologie et leurs applications thérapeutiques. Au sein de cet institut, le groupe de recherche « Organoïdes, cellules souches mésenchymateuses (CSM) et vésicules extracellulaires pour la thérapie des maladies ostéoarticulaires » dirigé par Danièle Noël, s'intéresse depuis plusieurs années au potentiel thérapeutique des CSM et de leurs EV dans ces maladies, et notamment l'arthrose. Ainsi, Marie Maumus a tout d'abord démontré l'efficacité des CSM dérivées du tissu adipeux à améliorer in vitro, le phénotype des chondrocytes arthrosiques et in vivo, à protéger des dégradations induites dans un modèle murin pertinent d'arthrose. Maxime Ruiz a mis en évidence l'importance de la régulation de la voie du TGFβ1 dans l'homéostasie articulaire, et son rôle dans l'effet thérapeutique des CSM et leur potentiel régénératif. Stella Cosenza a mis au point les méthodes d'isolement et de caractérisation des vésicules extracellulaires (EV) produites par les CSM murines, et a montré que ces EV sont un traitement aussi efficace que les CSM dans des modèles pré-cliniques d'arthrose et d'arthrite.

Mon projet de thèse s'inscrit dans la continuité de ces travaux et a été financé par la Fondation pour la Recherche en Rhumatologie (FOREUM) à travers le consortium SEN-OA. Ce projet a pour objectif d'évaluer l'effet de la sénescence sur les propriétés fonctionnelles des EV isolées de CSM.

Le premier axe de travail a été dédié à l'évaluation de l'effet thérapeutique d'EV isolées à partir de CSM naïves ou induites en sénescence par traitement à l'étoposide, molécule qui induit des dommages à l'ADN. Nous avons par la suite comparé l'effet thérapeutique des EV dérivées des CSM naïves ou sénescentes *in vitro* sur des chondrocytes arthrosiques humains, puis, *in vivo* dans un modèle murin d'arthrose induite à la collagénase.

Un second axe de travail a été consacré à l'étude de l'effet sénomorphique des EV isolées à partir de CSM naïves ou induites en sénescence. Pour cela nous avons développé un modèle in vitro de chondrocytes humains induits en sénescence par dommages à l'ADN (traitement étoposide), ou par l'inflammation (traitement par addition d'IL-1β). Nous avons comparé l'effet protecteur de ces EV sur l'apparition de la sénescence induite.

Mon manuscrit de thèse s'articule en trois parties. La première partie introductive consistera en une revue de la littérature. La seconde partie présentera les résultats expérimentaux obtenus au cours de ma thèse sous la forme de deux articles originaux. Enfin, une troisième partie clôturera ce manuscrit par une discussion reprenant les principales avancées et les perspectives de ces travaux.

1 Introduction bibliographique

1.1 Vieillissement et maladies liées à l'âge

Les maladies dégénératives liées à l'âge sont en passe de devenir les premières pathologies en termes d'incidence et représentent d'ores et déjà, un problème majeur de santé publique. Ces pathologies représentent aujourd'hui un fardeau croissant pour notre système de santé avec une augmentation significative de l'incidence des comorbidités, notamment la neurodégénérescence mais également le diabète, les maladies cardiovasculaires, le cancer, l'ostéoporose et l'arthrose (OA) (Suzman et al., 2015). L'augmentation des maladies chroniques dégénératives chez les personnes âgées influence non seulement négativement leur qualité de vie, mais impacte financièrement nos systèmes de sécurité sociale. L'enjeu est donc de préserver le bien-être des personnes âgées mais aussi de réduire les coûts de santé publique associés. L'ensemble des processus qui conditionnent le déclin de l'autonomie et des fonctions organiques est aujourd'hui regroupé sous le terme de « fragilité ». La fragilité se caractérise par un déclin du fonctionnement de plusieurs systèmes physiologiques, accompagné d'une vulnérabilité accrue aux facteurs de stress. Elle est associée à une augmentation de la mortalité, des hospitalisations, des chutes et des admissions en soins de longue durée et une altération de la qualité de vie des patients. Le concept de fragilité évolue constamment dans la littérature, et il y a débat sur la façon de définir cette condition. Mis à part ce débat, trois facteurs importants sont restés cohérents au cours des dernières décennies dans la conceptualisation de la fragilité. Premièrement, la fragilité est multidimensionnelle, les facteurs physiques et psychosociaux jouant un rôle dans son développement. Deuxièmement, la fragilité est une conséquence du processus de vieillissement comme le montre sa prévalence qui augmente avec l'âge. Sa prévalence est aussi plus élevée chez les femmes (Figure 1). Troisièmement, la fragilité est dynamique, en effet, même si sa prévalence augmente avec l'âge, il faut prendre compte de la contribution des facteurs individuels et environnementaux qui peuvent l'influencer (Hoogendijk et al., 2019; Markle-Reid et Browne, 2003). Au-delà de 80 ans, les personnes souffrent fréquemment de fragilité, ce qui augmente le risque de chutes, de fractures, d'hospitalisation, de défaillance organique, d'invalidité et de décès (Partridge et al., 2018).

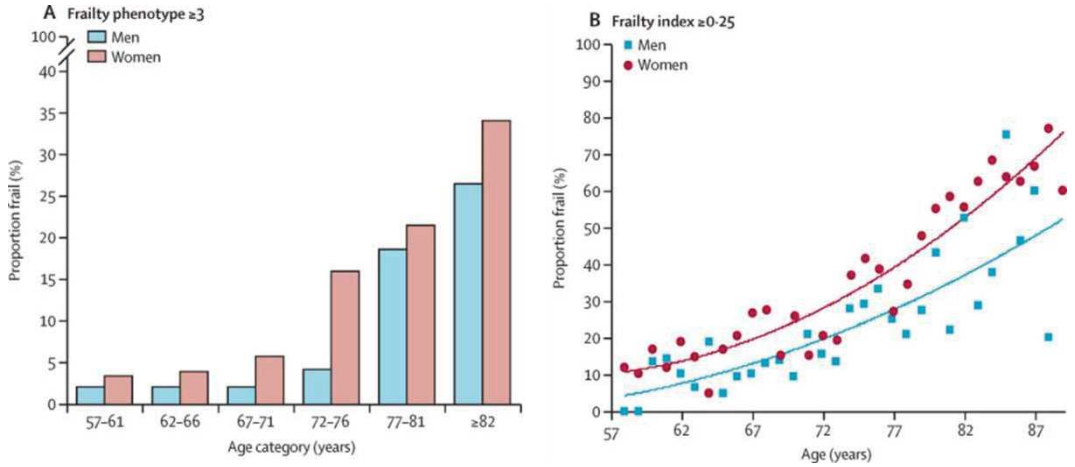


Figure 1 : Prévalence de la fragilité chez les hommes et les femmes par âge (adapté d'après Partridge et al., 2018).

Il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes qui conduisent au vieillissement et comment nous pouvons avoir un impact positif sur les troubles liés à l'âge pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Le vieillissement peut être caractérisé par neuf caractéristiques illustrées dans la Figure 2 : instabilité génomique, attrition des télomères, altération épigénétique, perte de protéostase, dysfonctionnement métabolique, dysfonctionnement mitochondrial, sénescence cellulaire, épuisement des cellules souches et altération des communications. Le vieillissement est une accumulation de dommages aux organites et aux macromolécules dans les cellules et les organes qui se fait de manière autonome. Les mécanismes cellulaires non autonomes jouent également un rôle dans la modulation des changements dégénératifs se produisant spontanément (López-Otín et al., 2013).

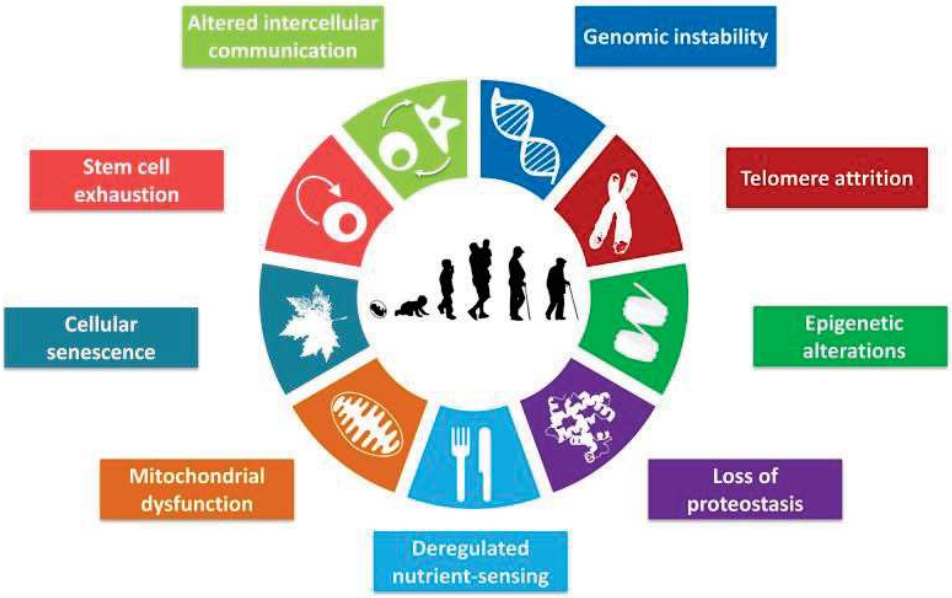


Figure 2 : Les caractéristiques du vieillissement (d'après López-Otín et al., 2013).

Ces caractéristiques du vieillissement peuvent être regroupées en trois catégories (Figure 3). La première regroupe les principales causes de dommages cellulaires. La deuxième inclue les réponses compensatoires ou antagonistes aux dommages. Ces réponses atténuent initialement les dommages, mais si elles sont chroniques ou exacerbées, elles deviennent elles-mêmes délétères. Et la troisième rassemble des caractéristiques intégratives qui sont le résultat final des deux premiers groupes et qui sont en fin de compte responsables du déclin fonctionnel associé au vieillissement.

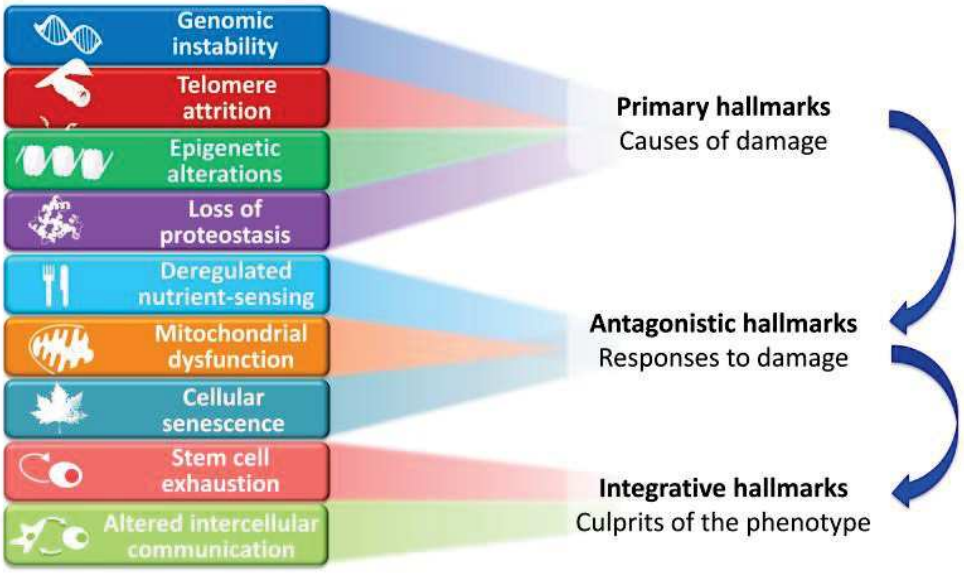


Figure 3 : Interconnexions fonctionnelles entre les caractéristiques du vieillissement (d'après López-Otín et al., 2013).

Ainsi, les mécanismes sous-jacents qui régissent le vieillissement résultent d'une interaction complexe entre régulation génique et accumulation de dommages. Ce concept a été proposé par Kirkwood dès 2005 (Kirkwood, 2005; López-Otín et al., 2013).

D'un point de vue subclinique, le processus de vieillissement se manifeste par divers types de détériorations physiologiques. Des altérations biologiques se produisent, notamment une perte de masse osseuse, de cartilage, de masse et de force musculaire et un gain de graisse abdominale (Figure 4). Des changements systémiques se produisent, par exemple dans le système endocrinien, entraînant une altération des niveaux d'hormones, et dans la circulation, entraînant des modifications de la pression artérielle et des lipides sanguins. Les réponses des tissus aux hormones peuvent également être affectées, comme dans la résistance à l'insuline. Des changements mécaniques et structurels se produisent, y compris la rigidité vasculaire, qui peuvent affecter les fonctions cardiaques et cérébrales. Finalement, ces changements subcliniques continus peuvent aboutir à une gamme de pathologies liées à l'âge. Les personnes ayant des niveaux sanguins élevés de marqueurs de risque de maladies, et celles présentant une multimorbidité, meurent jusqu'à 20 ans plus jeunes que celles ayant des niveaux inférieurs (Partridge et al., 2018).

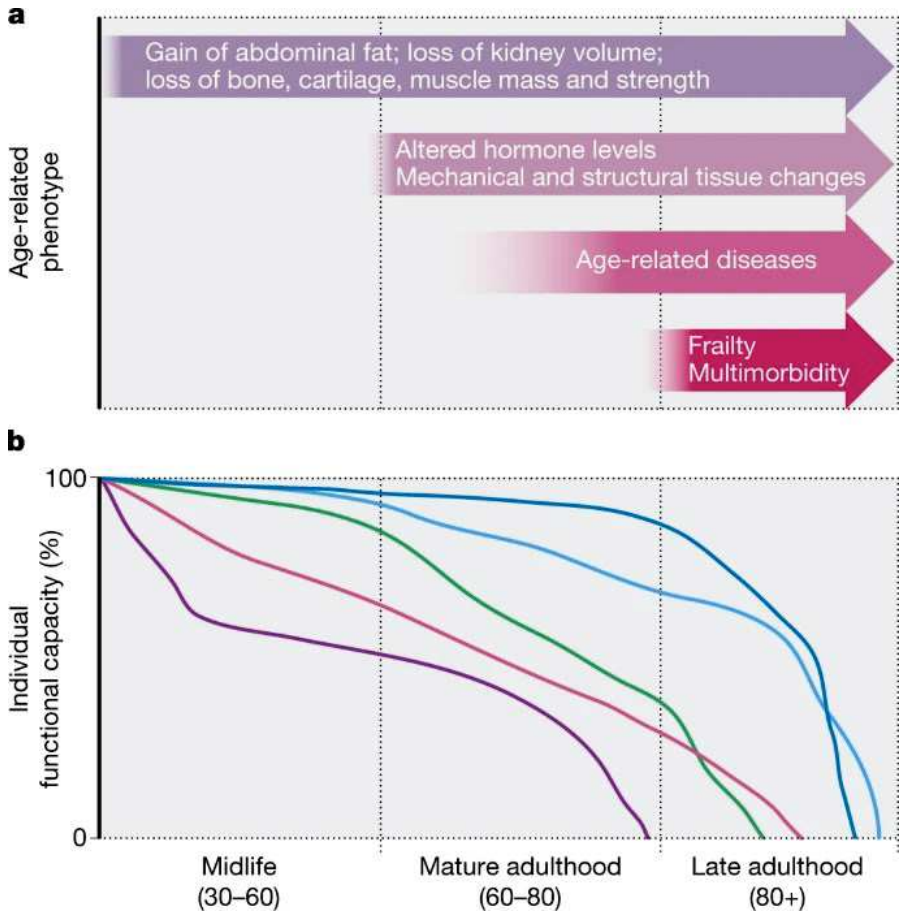


Figure 4 : Représentation schématique de la chronologie et de la progression des phénotypes liés à l'âge chez l'homme adulte (d'après Partridge et al., 2018).

L'une des caractéristiques principales du vieillissement est l'augmentation de la proportion de cellules sénescentes au cours de l'âge. Initialement, la sénescence était perçue comme un mécanisme permettant d'empêcher la propagation des cellules endommagées et de déclencher leur élimination par le système immunitaire. Cependant, ce mécanisme nécessite un système de remplacement cellulaire efficace qui implique l'élimination des cellules sénescentes et la mobilisation des progéniteurs pour rétablir le nombre de cellules. Chez les organismes âgés, ce système de renouvellement peut devenir inefficace.

1.2 La sénescence cellulaire

Initialement caractérisée par un arrêt permanent de la prolifération, la sénescence cellulaire se produit en réponse à des stress endogènes et exogènes, notamment le dysfonctionnement des télomères, l'activation d'oncogènes et des dommages persistants à l'ADN. La sénescence cellulaire peut également être un programme contrôlé, se produisant dans divers processus biologiques, y compris le développement embryonnaire. Elle est maintenant reconnue comme un mécanisme fondamental du vieillissement et l'élimination des cellules sénescentes est devenue une nouvelle cible thérapeutique

pour les maladies dégénératives liées à l'âge, notamment dans l'arthrose. De nouvelles stratégies thérapeutiques qui visent à éliminer les cellules sénescentes ou sénothérapies se sont développées ces dernières années. Le développement d'agents pharmacologiques sénolytiques et sénomorphiques ciblant les cellules sénescentes sont en cours d'investigation (pour revue voir (Di Micco et al., 2021). Les sénolytiques ciblent les cellules sénescentes afin de les éliminer, tandis que les sénomorphiques modulent les propriétés des cellules sénescentes sans les éliminer (Childs et al., 2017).

La sénescence cellulaire a été décrite pour la première fois en 1961 in vitro par Hayflick et Moorhead sur des fibroblastes humains (Hayflick et Moorhead, 1961). Cela a conduit à l'hypothèse que le vieillissement des tissus est causé par des cellules qui perdent progressivement leur capacité à proliférer, ce qui est essentiel pour remplacer les cellules endommagées qui s'accumulent naturellement avec le temps (Hayflick, 1965).

1.2.1 Caractéristiques générales de la sénescence

A ce jour, il n'existe pas de biomarqueurs uniques, universels ou spécifiques à un modèle pour identifier les cellules sénescentes in vitro ou in vivo. L'identification des cellules sénescentes repose sur une combinaison de plusieurs marqueurs qui, lorsqu'ils sont présents simultanément, peuvent faire la distinction entre les cellules sénescentes et leurs homologues quiescents ou différenciés. Dans l'ensemble, la recherche de biomarqueurs de sénescence universels est constamment remise en cause par la preuve que les phénotypes de sénescence sont très hétérogènes et peuvent différer selon le déclencheur initial et le type cellulaire à l'étude.

1.2.1.1 Arrêt du cycle cellulaire

Une caractéristique distinctive des cellules sénescentes est l'expression accrue de protéines inhibitrices du cycle cellulaire, collectivement connues sous le nom d'inhibiteurs de kinases dépendantes de la cycline (CKI). La CKI ayant le rôle le plus important dans l'accumulation de cellules sénescentes au cours du vieillissement est p16INK4A (Figure 5) car elle est cruciale pour maintenir l'arrêt de la prolifération (Alcorta et al., 1996; Serrano et al., 1993). En effet, les souris dépourvues de p16INK4a sont prédisposées à la formation spontanée de tumeurs (Serrano et al., 1996). p21 et p16INK4A sont deux CKI qui sont des composants des voies de suppression de tumeur régies par p53 et pRb (protéine du rétinoblastome), et s'accumulent fréquemment dans les cellules sénescentes. Les niveaux d'expression de p21 et p16INK4A étant associés au maintien de l'arrêt de la prolifération cellulaire, ces protéines sont utilisées pour identifier les cellules sénescentes dans les tissus et les cellules en culture. Cependant, tous les types de cellules sénescentes n'expriment pas p16INK4A car celle-ci peut également être exprimée par certaines cellules tumorales, en particulier celles qui ont perdu les fonctions pRb (Witkiewicz et al., 2011).

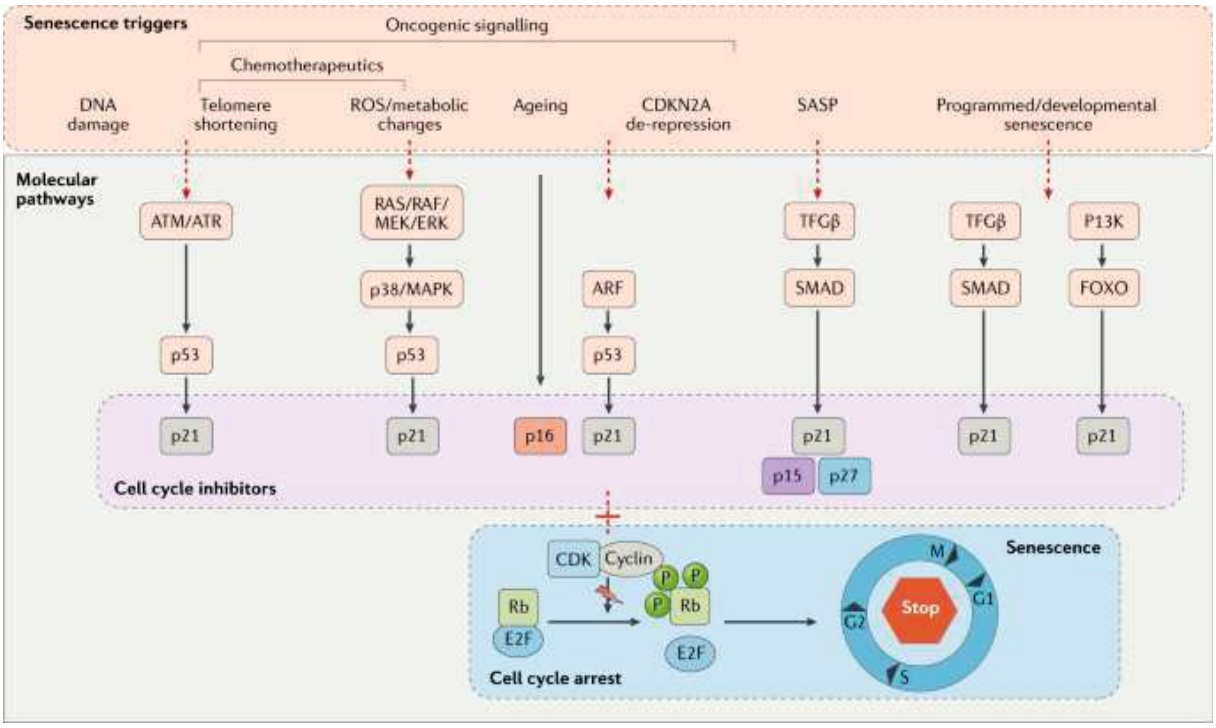


Figure 5 : Les voies moléculaires impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire de la sénescence (d'après Lozano-Torres et al., 2019).

Outre l'expression de ces CKI, l'absence de réplication de l'ADN peut être mis en évidence. Cet arrêt de la réplication d'ADN est généralement détecté par l'incorporation d'analogues nucléosidiques (par exemple, la 5-bromodésoxyuridine ou la [^{3}H]thymidine) ou par immunocoloration des marqueurs de prolifération, tels que PCNA et Ki-67. Cependant, ces marqueurs ne font pas la distinction entre les cellules sénescentes et les cellules post-mitotiques quiescentes ou différenciées.

1.2.1.2 Altérations lysosomales

Les lysosomes sont des organelles spécialisées dans le catabolisme cellulaire. Ils peuvent en effet dégrader de nombreux composés cellulaires (intracellulaires, membranaires, organelles) d'origine exogène (hétérophagie) et endogène (autophagie) et permettent donc l'élimination des déchets cellulaires. Les altérations lysosomales retrouvées dans les cellules sénescentes ont permis la mise au point de marqueurs classiquement utilisés pour la détection de ces cellules.

Le lysosome contient un ensemble d'enzymes impliquées dans la dégradation des déchets cellulaires. On retrouve parmi ces enzymes lysosomales la β-galactosidase qui fonctionne à pH 4,5 dans les cellules saines mais à un pH suboptimal de 6 dans les cellules sénescentes. L'activité de la β-galactosidase associée à la sénescence (SA-β-gal) a été l'un des premiers biomarqueurs décrits pour identifier les cellules sénescentes. Il a contribué à démontrer que les cellules présentant des caractéristiques de

sénescence s'accumulent dans les tissus en lien avec les pathologies associées au vieillissement (Dimri et al., 1995). L'activité SA β-gal semble être directement dépendante d'une augmentation de la masse lysosomale (Kurz et al., 2000) associée à une augmentation de la quantité d'enzyme présente dans les cellules (Lee et al., 2006). Ce marqueur est détectable par coloration histochimique dans la plupart des cellules sénescentes et n'est généralement pas trouvé dans les cellules pré-sénescentes, quiescentes ou immortalisées. Cependant, il a été montré que la SA β-gal peut également s'accumuler dans les cellules privées de sérum ou en sur-confluence in vitro (Cho et Hwang, 2012).

L'accumulation de lipofuscine est une autre caractéristique des cellules sénescentes. La lipofuscine est un agrégat de protéines oxydées qui s'accumule progressivement, principalement dans les cellules post-mitotiques âgées. Elle est considérée comme une caractéristique du vieillissement et est également impliquée dans la pathogenèse de certaines pathologies liées à l'âge (Jung et al., 2007). Une méthode récemment développée basée sur son analogue, le noir Soudan B lié à la biotine, apparaît comme un système de détection fiable pour tracer les cellules sénescentes dans une variété de types de cellules et de tissus (Evangelou et al., 2017).

1.2.1.3 Hypertrophie cellulaire

Une autre particularité des cellules sénescentes est la morphologie anormalement agrandie et plate avec une augmentation disproportionnée du rapport cytoplasme/noyau. Alors que ce cytoplasme volumineux a été initialement décrit comme une caractéristique accompagnant l'établissement de la sénescence cellulaire, une étude récente suggère que l'augmentation de la taille des cellules peut jouer un rôle causal dans l'arrêt de la croissance associé à la sénescence (Neurohr et al., 2019). De plus, in vivo, les cellules sénescentes SA β-gal-positives ont une taille cellulaire accrue par rapport aux cellules SA β-gal-négatives (Biran et al., 2017).

1.2.1.4 SAHF

La sénescence s'accompagne d'une réorganisation de l'ADN qui se retrouve compacté autour de protéines histones et forment ce qui est appelé un foyer d'hétérochromatine associé à la sénescence ou SAHF. L'hétérochromatine est une structure nucléaire dense enrichie en protéines, notamment l'histone H3 triméthylée sur la Lysine 9 (H3K9me3), la protéine d'hétérochromatine 1 (HP1), les facteurs de protéine A de groupe à haute mobilité (HMGA), le variant d'histone macroH2A et les co-chaperones d'histone HIRA et ASF1A (Chandra et al., 2012; Narita et al., 2003; Zhang et al., 2005). L'ADN et les protéines histones sont condensées, aboutissant à la diminution de la transcription des gènes contenus dans ces régions (Narita et al., 2003; Sadaie et al., 2013; Zhang et al., 2007).

Cependant, les SAHF ne sont pas des marqueurs universels de la sénescence ; ils sont observés fréquemment lors de l'activation des oncogènes et se forment lors de la réplication de l'ADN. Ces SAHF

peuvent être utilisés pour identifier les cellules sénescentes, mais ils semblent être spécifiques au programme de sénescence induit par les oncogènes activés et les facteurs de stress de la réplication de l'ADN (Di Micco et al., 2011).

Les changements dans la structure de la chromatine sont associés à des changements dans les protéines structurelles nucléaires, y compris la rupture de la lame nucléaire (Swanson et al., 2013). La perte de la lame nucléaire peut entraîner la libération de fragments de chromatine cytosolique (CCF) dans le cytoplasme des cellules sénescentes (Dou et al., 2015, 2017; Ivanov et al., 2013). Il est important de noter que les CCF dictent les fonctions paracrines associées à la sénescence via l'activation de la GMP-AMP synthase cyclique (cGAS) et la voie du stimulateur adaptateur des gènes d'interféron (STING). Il a été rapporté que de faibles doses d'inhibiteurs d'HDAC réduisent les CCF et suppriment le SASP (Vizioli et al., 2020).

1.2.1.5 Dommages à l'ADN

Les dommages à l'ADN sont également caractéristiques des cellules sénescentes. Les cassures double brin (DSB) dans l'ADN peuvent entraîner des instabilités génétiques et des mutations altérant l'intégrité du génome. Le stress de réplication, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) endogènes, les sources exogènes de dommages à l'ADN sont les principales causes des ruptures de l'ADN. Pour réparer ces lésions, la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) est initiée sur le site des dommages à l'ADN. Une réponse précoce connue aux DSB est la phosphorylation de l'extrémité C-terminale de la protéine histone centrale H2AX (appelée γH2AX lorsqu'elle est phosphorylée) au niveau de l'acide aminé hautement conservé Ser139. Le rôle de γH2AX est de recruter les protéines DDR associées et d'assurer la rétention de ces protéines au voisinage des sites DSB. La phosphorylation de H2AX est une étape importante du processus DDR et a été largement utilisée comme marqueur des dommages à l'ADN. Les signaux γH2AX apparaissent sous forme de foyers individuels visualisés par un marquage par immunofluorescence. Après réparation réussie des DSB, les molécules γH2AX sont déphosphorylées par la protéine phosphatase 2A (PP2A) et les foyers γH2AX ne sont plus détectables. Une coloration γH2AX persistante peut indiquer des DSB d'ADN qui sont soit en cours de réparation lente et continue, soit des DSB qui restent définitivement non réparés en raison de la sénescence cellulaire.

1.2.1.6 Altération de l'enveloppe nucléaire

Nous avons vu précédemment que des études confirment les changements structurels de la chromatine dans les cellules sénescentes. Il a également été montré la présence de fragments de chromatine cytoplasmique (CCF) dans environ 20% des cellules subissant une sénescence réplicative ou induite par des oncogènes in vitro. L'accumulation de tels fragments de chromatine dans le cytoplasme suggère donc que l'intégrité de l'enveloppe nucléaire est compromise dans les cellules

sénescentes (Ivanov et al., 2013). En effet, la lame nucléaire, un réseau protéique situé sous la membrane nucléaire interne, subit un remodelage important au cours de la sénescence cellulaire (Dreesen et al., 2013a; Freund et al., 2012; Shimi et al., 2011). La lamine B1, une protéine de filament intermédiaire exprimée dans toutes les cellules somatiques est régulée négativement dans les cellules subissant une sénescence induite in vitro (Dreesen et al., 2013a; Freund et al., 2012; Ivanov et al., 2013; Sadaie et al., 2013; Shah et al., 2013; Shimi et al., 2011; Stewart et Burke, 1987; Wang et al., 2017). Les niveaux de lamine B1 diminuent également au cours du vieillissement chronologique de la peau (Dreesen et al., 2013a, 2013b), dans les mélanocytes sénescents dans les naevus humains (Ivanov et al., 2013), dans l'épiderme cutané de souris exposées aux UV (Wang et al., 2017), dans le foie de souris irradiées (Freund et al., 2012) et les reins d'un modèle murin vieillissant prématurément (Baar et al., 2017).

1.2.1.7 SASP

Bien que les cellules sénescentes vivent dans un état d'arrêt de croissance permanent, elles ne sont pas dormantes dans les tissus. Au lieu de cela, les cellules sénescentes restent métaboliquement actives et développent des caractéristiques de signalisation distinctes, appelées SASP. Le SASP est caractérisé par la sécrétion accrue de molécules bioactives par les cellules sénescentes, notamment des chimiokines, des cytokines, des protéases et des facteurs de croissance. Ces molécules peuvent induire une gamme de réponses physiologiques dans le microenvironnement, y compris une réponse inflammatoire, un arrêt de la croissance ou la tumorigenèse (Basisty et al., 2020). C'est à partir de la fin des années 90, que des travaux ont mis évidence une modification du sécrétome avec la sénescence (Shelton et al., 1999). En 2008, les travaux de Coppé et Campisi ont permis d'identifier un plus large éventail de protéines du SASP via l'utilisation d'approches protéomiques sur des fibroblastes et des cellules endothéliales sénescentes, complété par une autre étude en 2010 (Coppé et al., 2008, 2010). Ces travaux ont permis de distinguer deux grands groupes de protéines : celles qui possèdent un rôle paracrine sur les cellules environnantes et celles qui possèdent une action sur le remodelage de la matrice extracellulaire. Il est aujourd'hui admis que le SASP est impliqué dans plusieurs pathologies liées au vieillissement et associé à la perte d'homéostasie des tissus âgés bien qu'il ait été initialement impliqué dans la clairance des cellules sénescentes (Chien et al., 2011; Coppé et al., 2008; Kuilman et Peeper, 2009; Nelson et al., 2012; Xue et al., 2007). Le SASP peut être également régulé par certains facteurs, notamment mTOR qui régule la traduction de la protéine kinase activée par la MAP kinase 2 (MAPKAPK2, également connue sous le nom de MK2) et l'IL-1α. Des travaux ont mis en évidence que l'inhibition de mTOR par la rapamycine réduit l'expression des facteurs du SASP (Coryell et al., 2021).

Pour accroître la complexité de ce phénotype, différents stimuli induisant la sénescence produisent des protéomes sécrétoires distincts qui peuvent entraîner des résultats biologiques différents selon les tissus touchés (Basisty et al., 2020).

Des composants du SASP, principalement les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8, peuvent être utilisées pour évaluer la sénescence générale des tissus ou des cultures cellulaires. Cependant, le SASP seul ne peut pas être utilisé comme biomarqueur de sénescence fiable car la sénescence déclenchée par la surexpression de p16INK4a sur des fibroblastes humains n'entraîne pas de SASP (Coppé et al., 2011).

Une grande partie de la recherche sur le SASP s'est concentrée sur son rôle dans la genèse et la progression de diverses maladies et, des approches de ciblage des facteurs du SASP pour une intervention thérapeutique (Tchkonia et al., 2013). Ces approches pourraient aider le développement de thérapies freinant le développement des maladies dégénératives.

1.2.1.8 Résistance à l'apoptose

Il a été rapporté que les cellules sénescentes sont résistantes aux stimuli pro-apoptotiques extrinsèques et intrinsèques (Sagiv et al., 2013; Sasaki et al., 2001; Wang, 1995). La famille de protéines BCL joue un rôle central dans la régulation de la mort cellulaire par divers mécanismes, y compris l'apoptose et l'autophagie (Cory et al., 2003; Wang, 1995; Yip et Reed, 2008). Cette famille comprend les protéines anti-apoptotiques BCL-2, BCL-W, BCL-XL, MCL-1 et A1, et est étudiée comme une cible pour une intervention pharmacologique dans le cancer (Azmi et al., 2011; Zeitlin et al., 2008). Il a été montré que la production accrue de BCL-W et BCL-XL est associée à la résistance des cellules sénescentes à l'apoptose, et que leur inhibition combinée conduit à la mort des cellules sénescentes. Ces auteurs ont également montré qu'un inhibiteur ciblant les protéines BCL-2, BCL-W et BCL-XL (ABT-737) provoque préférentiellement l'apoptose des cellules sénescentes, à la fois in vitro et in vivo, et élimine ces cellules des tissus, ouvrant une voie pour l'élimination ciblée des cellules sénescentes (Yosef et al., 2016).

1.2.1.9 Oxydation des macromolécules

L'augmentation des dommages au cours du processus de vieillissement cellulaire est considérée comme un facteur limitant la durée de vie des organismes. Outre l'ADN, les protéines sont également des cibles fréquentes de modifications non enzymatiques par des substances réactives, notamment des oxydants et des agents de glycation. Les modifications non enzymatiques des protéines peuvent altérer leur structure, entraînant souvent une diminution de leur fonctionnalité. Bien que les systèmes protéolytiques assurent l'élimination des protéines modifiées, l'activité de ces protéases décline au cours du processus de vieillissement. De plus, l'augmentation liée à l'âge des composés réactifs, en

raison de systèmes antioxydants altérés, conduit à l'accumulation de protéines endommagées et à la formation d'agrégats protéiques. Les protéines ainsi modifiées et les agrégats protéiques altèrent les fonctions cellulaires et les propriétés tissulaires (Nowotny et al., 2014). L'augmentation de ces protéines modifiées a été associée à un grand nombre de troubles liés à l'âge, notamment la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer et le cancer (Nyström, 2005).

L'apparition de protéines carbonylées spécifiques a été observée lors de la sénescence induite par le stress oxydatif de fibroblastes humains. Parmi ces protéines, certaines appartiennent au cytosquelette tandis que d'autres sont principalement impliquées dans le contrôle qualité et/ou la biosynthèse des protéines, ainsi que dans le métabolisme. Fait intéressant, la majorité de ces protéines carbonylées se sont avérées appartenir à des réseaux d'interactions fonctionnelles des voies de signalisation impliquées dans la réponse au stress oxydatif et la sénescence (Le Boulch et al., 2018).

Le protéasome est la machinerie protéolytique cellulaire majeure, dont la fonction est altérée au cours de la sénescence réplicative. Cependant, les causes exactes de son dysfonctionnement dans ces conditions sont inconnues. L'inhibition partielle du protéasome sur des cellules jeunes après traitement avec des inhibiteurs spécifiques a induit un phénotype semblable à la sénescence (Chondrogianni et al., 2003). L'inactivation du protéasome semble également être un contributeur probable à l'accumulation des protéines endommagées. Des analyses métaboliques et fonctionnelles ont révélé une altération du métabolisme du glucose dans les cellules sénescentes. Un changement métabolique conduisant à une mobilisation accrue de substrats non glucidiques tels que les acides aminés à chaîne ramifiée ou les acides gras à longue chaîne a été observé. Une augmentation des niveaux d'acyl-carnitines a indiqué un renouvellement accru des lipides de stockage et membranaires pour la production d'énergie. Pris ensemble, ces résultats suggèrent qu'il existe un lien entre les modifications oxydatives des protéines et le métabolisme cellulaire altéré associé au phénotype sénescent (Baraibar et al., 2016).

Les dommages oxydatifs peuvent également s'accumuler dans l'ADN et contribuer aux changements physiologiques associés au vieillissement. Des travaux ont montré que les taux de 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua), l'un des types les plus abondants de dommages oxydatifs à l'ADN, sont significativement plus élevés dans certains organes de rats âgés par rapport à ceux de rats jeunes (Hirano et al., 1996). Il existe également une accumulation progressive des dommages oxydatifs de l'ADN dans le cerveau humain avec l'âge qui pourraient contribuer à une augmentation de l'incidence des maladies neurodégénératives (Hamilton et al., 2001; Mecocci et al., 1993).

1.2.2 Mécanismes inducteurs de la sénescence

Comme illustré dans la Figure 6, il existe trois mécanismes principaux à l'origine de l'induction de la senescence :

- La réponse aux dommages à l'ADN (DDR),
- L'érosion des télomères,
- La sénescence induite par des oncogènes (OIS).

Ces processus partagent des mécanismes communs, qui font notamment intervenir la DDR à différents niveaux, et aboutissent à l'arrêt du cycle cellulaire et au phénotype sénescent.

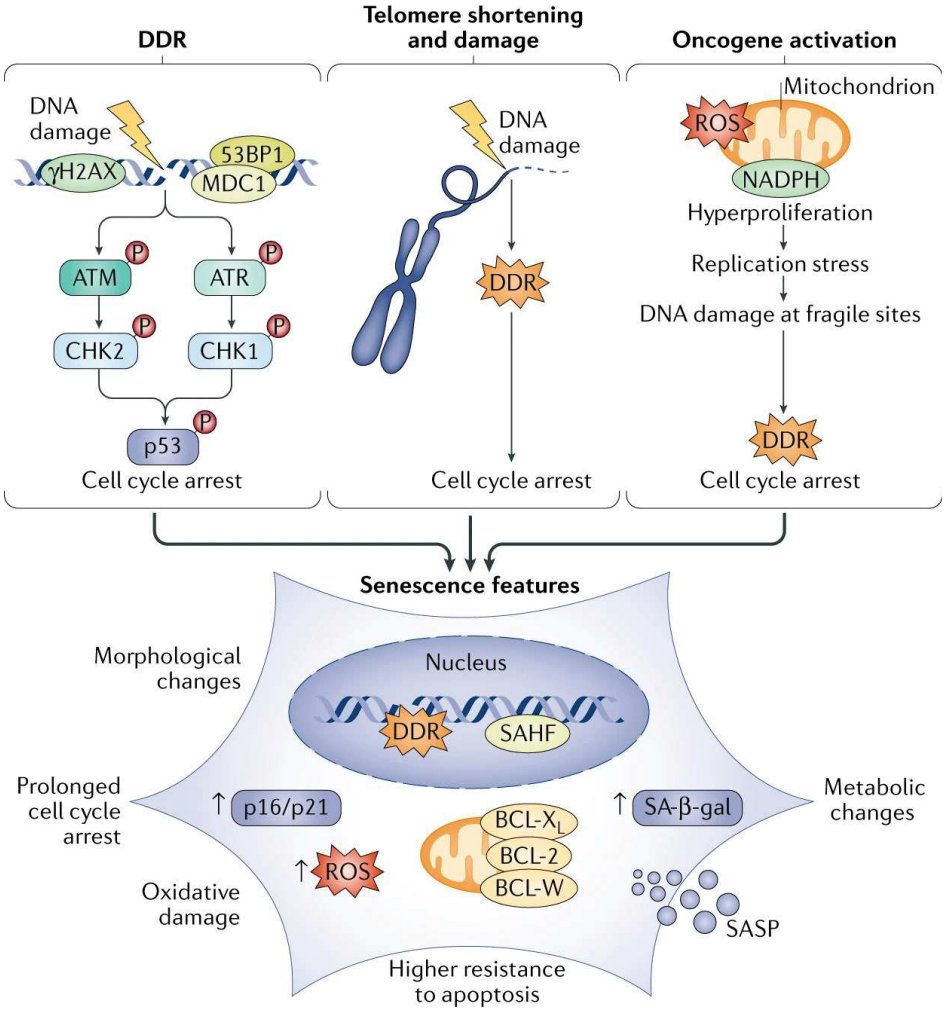


Figure 6 - Inducteurs de sénescence et phénotypes associés (d'après Di Micco et al., 2021).

1.2.2.1 Sénescence cellulaire et réponse aux dommages de l'ADN

Les dommages nucléaires à l'ADN sont souvent signalés comme une cause sous-jacente courante de la sénescence, principalement sous la forme de DSB qui activent la voie de DDR (Ovadya et al., 2018). La DDR exerce des fonctions de contrôle pour bloquer la progression du cycle cellulaire et empêcher la propagation d'informations génétiques corrompues aux cellules filles. Certains facteurs de la DDR

s'accumulent sur les sites de lésions de l'ADN et forment des foyers nucléaires cytologiquement détectables, jusqu'à ce que les dommages aient été réparés (Jackson et Bartek, 2009). Si les dommages à l'ADN persistent, cela provoque une signalisation DDR prolongée et un arrêt prolifératif prolongé sous la forme de sénescence cellulaire (Fumagalli et al., 2014). La démonstration récente que les foyers de DDR persistants observés dans des cellules sénescentes cultivées contiennent des DSB non réparés appuie l'idée que la sénescence cellulaire s'apparente à une activation prolongée du point de contrôle (Galbiati et al., 2017). L'inhibition des kinases de signalisation de la DDR (ATM, ATR, CHK1 et CHK2) permet aux cellules sénescentes de réintégrer le cycle cellulaire (Di Micco et al., 2006; Fagagna et al., 2003; Mallette et Ferbeyre, 2007). Au bas de la cascade de DDR, le suppresseur de tumeur p53, qui est une cible d'ATM et de son paralogue ATR, est activé et stimule l'expression de p21, un médiateur essentiel de l'arrêt du cycle cellulaire associé à la sénescence. L'inhibiteur de CDK4 et CDK6, p16INK4A, est un autre facteur clé dans plusieurs types de sénescence (Mallette et Ferbeyre, 2007). La molécule p21 est activée tôt à l'entrée de la sénescence et p16INK4a est activée plus tard, probablement pour maintenir le phénotype de sénescence (Dulić et al., 2000). En plus de l'activation de la cascade de DDR, le suppresseur de tumeur p19ARF stabilise p53, ce qui contribue à l'induction de la sénescence (Kamijo et al., 1997).

1.2.2.2 Erosion des télomères

Le raccourcissement des télomères est un autre des mécanismes d'induction de la sénescence cellulaire fréquemment décrit dans la littérature. A l'extrémité de chaque chromosome se trouve une portion d'ADN non-codante appelée télomère qui est à distinguer de l'ADN génomique. Les télomères sont composés de séquences d'ADN répétées [5'-TTAGGG-3'] et permettent de prévenir le raccourcissement de l'ADN génomique après chaque division (Blackburn, 1991; Lu et al., 2013). Comme l'appareil standard de réplication de l'ADN est incapable de dupliquer complètement les extrémités de l'ADN chromosomique, en l'absence de mécanismes de maintien des télomères tels que l'expression de la télomérase ou la recombinaison entre les télomères, les télomères raccourcissent à chaque cycle de réplication de l'ADN. Afin d'assurer la stabilité et l'intégrité du génome, le maintien des télomères implique une réplication fidèle du matériel génétique et une protection contre les signaux de dommages à l'ADN. Ces tâches sont effectuées par l'holoenzyme télomérase et une structure nucléoprotéique dans laquelle un ensemble de protéines associées aux télomères se lient à l'ADN télomérique pour former des complexes protéine/ADN spécifiques. Le complexe télomérase, qui comprend la transcriptase inverse télomérique (TERT), le composant ARN télomérique (TERC) et d'autres facteurs auxiliaires, est responsable de l'ajout de répétitions télomériques aux extrémités des chromosomes (Lu et al., 2013). En deçà d'une certaine longueur, à la suite de la perte de facteurs de coiffage ou de structures de protection, les télomères devenus extrêmement courts ressemblent à des

DSB et déclenchent ainsi une DDR très similaire à celle déclenchée par les DSB d'ADN (Fagagna et al., 2003; Herbig et al., 2004). La présence d'un ou de quelques télomères de signalisation DDR est suffisante pour déclencher la sénescence cellulaire réplicative (Hemann et al., 2001). Il est important de souligner que l'expression forcée de la télomérase empêche la sénescence cellulaire et favorise la prolifération cellulaire illimitée (Bodnar et al., 1998).

L'activation persistante de la DDR se produit également au niveau des télomères qui ne sont pas raccourcis de manière critique, dans les cellules ne se divisant pas lorsqu'elles sont exposées à des traitements génotoxiques exogènes et dans les cellules âgées ne se divisant pas, car la réparation est beaucoup moins efficace lorsque les DSB sont localisées dans les télomères (Bae et Baumann, 2007; Fumagalli et al., 2012; Hewitt et al., 2012). Lorsque les DSB télomériques persistent, la sénescence cellulaire est établie et maintenue (Rossiello et al., 2017).

1.2.2.3 Sénescence induite par des oncogènes

Enfin, l'OIS constitue un troisième mécanisme inducteur de la sénescence. L'OIS peut être induite par l'activation d'oncogènes tels que RAS, BRAF, AKT, E2F1 et la cycline E (Courtois-Cox et al., 2008). En effet, comme illustré dans la Figure 6, l'expression d'oncogènes déclenche une phase hyperproliférative initiale, associée à une réplication altérée de l'ADN, qui finit par engager les voies de la DDR et provoquer la sénescence (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006; Halazonetis et al., 2008). C'est en 1997 qu'a été décrite la sénescence cellulaire induite prématurément par une signalisation oncogénique excessive ou par la perte de gènes suppresseurs de tumeur. L'oncogène RAS peut entraîner un arrêt permanent de la phase G1 du cycle cellulaire lié à une accumulation de p53 et p16INK4A et associé à l'apparition d'un phénotype sénescent (Serrano et al., 1997).

La perte d'expression de gènes suppresseurs de tumeur, notamment PTEN et NF1, peut également induire la sénescence, après une phase d'hyperprolifération, puis d'engagement de la DDR in vivo (Courtois-Cox et al., 2008; Parisotto et al., 2018). Il convient de noter que, contrairement aux oncogènes RAS ou BRAF, l'activation de la voie PI3K-AKT favorise la sénescence dépendante de p53 souvent en l'absence d'hyperprolifération détectable et d'une forte accumulation de dommages à l'ADN, suggérant des mécanismes sous-jacents distincts (Astle et al., 2012; Chan et al., 2020).

1.2.2.4 Dysfonctionnements mitochondriaux et sénescence cellulaire

Les mitochondries sont des organites très dynamiques qui assurent de nombreuses fonctions indispensables, notamment en tant que principale source d'énergie de la cellule. Les mitochondries sont également impliquées dans divers processus cellulaires tels que le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose et la régulation du métabolisme (Nunnari et Suomalainen, 2012). Les liens entre dysfonctionnements mitochondriaux et la sénescence cellulaire sont fréquemment documentés dans

la littérature. Par exemple, l'augmentation du stress oxydatif dans les cellules sénescentes a été liée à l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles (Chapman et al., 2019). L'épuisement des sirtuines mitochondriales, un groupe de protéines qui régulent le vieillissement chez différentes espèces, ainsi que l'inhibition chimique sélective de la fonction mitochondriale, déclenchent la sénescence (Wiley et al., 2016). De plus, une étude publiée en 2016 a montré l'influence réciproque entre les dommages à l'ADN nucléaire et le dysfonctionnement mitochondrial (Correia-Melo et al., 2016).

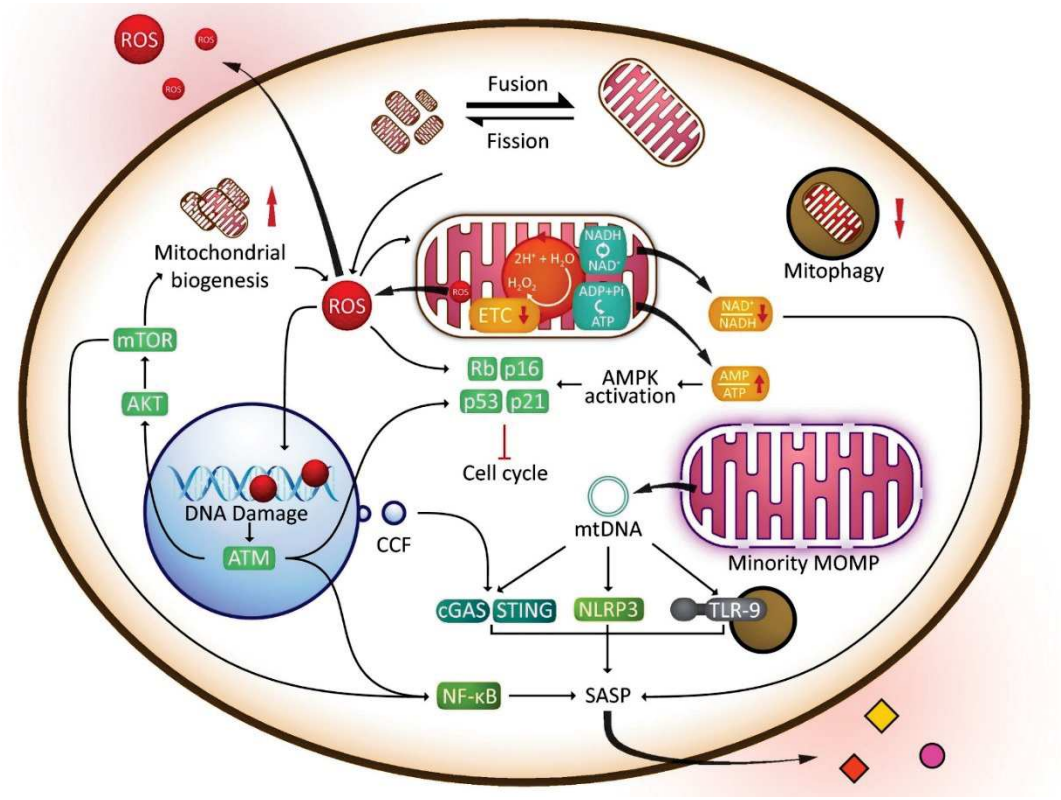


Figure 7 : Aperçu du dysfonctionnement mitochondrial qui se produit pendant la sénescence (d'après Chapman et al., 2019).

Comme illustré dans la Figure 7, les mitochondries des cellules sénescentes présentent une variété de changements en termes de structure, de dynamique et de fonction. On peut citer notamment une biogenèse mitochondriale exacerbée et une diminution de la mitophagie (dégradation sélective des mitochondries par autophagie). Métaboliquement, la chaîne de transport des électrons est perturbée, ce qui entraîne des altérations du rapport AMP/ATP ainsi qu'une augmentation de la production de ROS. Les ROS peuvent endommager les mitochondries et induire des dommages à l'ADN nucléaire qui agit dans une boucle de rétroaction positive pour imposer l'arrêt du cycle cellulaire. En outre, les ROS peuvent favoriser la biogenèse mitochondriale. De plus, les changements métaboliques conduisent à un déséquilibre du rapport NAD^+/NADH. Les mitochondries dans les cellules sénescentes peuvent également libérer des DAMP tels que l'ADNmt (une molécule immunostimulante) qui pourraient promouvoir le SASP (Chapman et al., 2019).

1.2.3 Sénescence et autophagie

L'autophagie est un processus cellulaire qui permet la dégradation par le lysosome de constituants cytoplasmiques tels que des protéines ou des organites (Figure 8). L'autophagie est initiée par la formation du phagophore qui s'étend progressivement autour du matériel cytoplasmique à dégrader. Cette étape d'élongation se termine par la formation de l'autophagosome. La maturation des autophagosomes nécessite leur fusion avec les lysosomes formant ainsi un autolysosome pour permettre la dégradation des constituants cytoplasmiques (Hansen et al., 2018). Les étapes allant de l'induction de l'autophagie par la naissance du phagophore, à la formation de l'autophagosome sont contrôlées principalement par cinq groupes de protéines :

- le complexe ULK1 impliqué dans l'initiation du processus,
- le complexe PI3K (phosphoinositide 3-kinase) permettant la nucléation du phagophore,
- le complexe de liaison aux PI3P (phosphatidylinositol 3-phosphate) pour la formation du phagophore constitué notamment d'Atg9,
- le système de conjugaison d'Atg12
- et le système de conjugaison LC3 contrôlant l'élongation du phagophore pour former l'autophagosome.

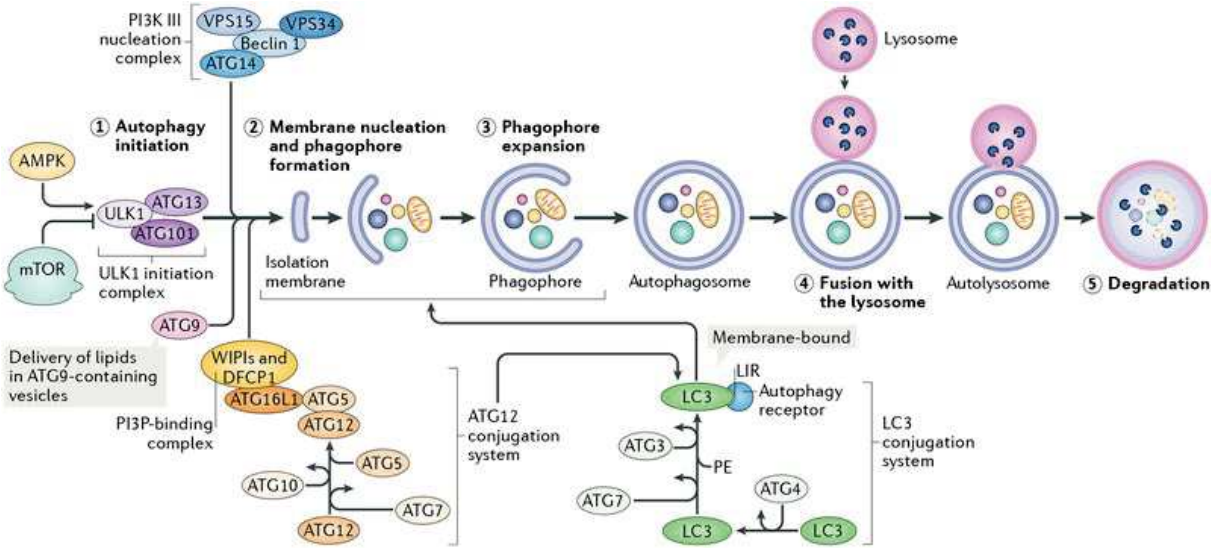


Figure 8 : Processus et voies moléculaires associées à l'autophagie (d'après Hansen et al., 2018).

L'autophagie pourrait être considérée comme un mécanisme supprimant la sénescence, en favorisant la dégradation des organites endommagés et d'autres composants cellulaires. Par exemple, une étude a montré que chez des cellules souches musculaires adultes, l'autophagie basale maintient l'état souche en réprimant la sénescence. De plus, au cours du vieillissement, l'activité autophagique diminue, parallèlement à la capacité de régénération des cellules souches, avec pour conséquence une

accumulation de cellules sénescentes chez la souris âgée (García-Prat et al., 2016). L'autophagie protègerait également contre la sénescence induite par le stress oxydatif. En effet, une étude a mis en évidence que l'augmentation de l'activité autophagique par l'inhibition de mTOR retarde la sénescence cellulaire et restaure les fonctions mitochondriales et lysosomales (Tai et al., 2017). Soutenant davantage un rôle de l'autophagie dans la prévention de la sénescence, un criblage à haut débit visant à identifier des composés qui atténuent la sénescence réplicative a été réalisé récemment. Ces travaux ont révélé que l'inhibiteur d'ATM : KU-60019, améliore le flux autophagique en restaurant une activité lysosomale fonctionnelle. Le traitement par l'inhibiteur d'ATM a également permis de récupérer les fonctions mitochondriales et d'atténuer les phénotypes de sénescence (Kang et al., 2017). Cependant, le rôle de l'autophagie dans la senescence fait encore débat. Des travaux évoquent notamment un rôle pro-sénescent de l'autophagie, en rapportant qu'une voie sélective de l'autophagie, via l'activation de mTOR, contribue à maintenir la synthèse protéique de nombreux facteurs SAPS (Narita et al., 2011; Young et al., 2009).

1.2.4 Effets bénéfiques de la sénescence cellulaire

La sénescence peut être considérée comme une réponse aux stress qui remplit des fonctions essentielles et bénéfiques (Burton et Krizhanovsky, 2014). Les rôles bénéfiques des cellules sénescentes sont évidents dans le développement embryonnaire. Une forme distincte de sénescence cellulaire se produit chez l'embryon et dans le placenta pour contrôler la croissance et la structuration (Chuprin et al., 2013; Gal et al., 2019; Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013). De même, chez les amphibiens, la sénescence cellulaire se produit à des étapes spécifiques au cours du développement (Davaapil et al., 2016). Par conséquent, la sénescence cellulaire au début de la vie est importante pour le développement normal et la morphogenèse, et plus tard dans la vie, elle devient importante pour la réparation des tissus et l'inhibition de la croissance tumorale. Au fil du temps, bien que le SASP favorise la réparation tissulaire et le recrutement des cellules immunitaires, sa persistance peut générer une inflammation chronique et contribuer aux maladies liées au vieillissement et, paradoxalement, au cancer (Di Micco et al., 2021).

La sénescence cellulaire contribuerait au maintien de la structure et de la fonction des tissus à la suite d'une blessure. Un certain nombre de molécules du SASP ont été associées à l'induction d'un programme de sénescence pour limiter la progression de la fibrose (Fitzner et al., 2012). La sénescence cellulaire est aussi impliquée dans la réparation des tissus dans d'autres systèmes plus primitifs. Chez le poisson zèbre, l'altération de la sénescence empêche la régénération des nageoires après une amputation (Da Silva-Álvarez et al., 2020), et chez les salamandres, les cellules sénescentes ont été associées à la régénération des membres (Yun et al., 2015). Ces observations suggèrent que la sénescence cellulaire est un programme qui a évolué pour limiter la réponse aux dommages tissulaires

dans l'organisme et faciliter la réparation et le remodelage des tissus pour restaurer rapidement la fonction tissulaire.

La fonction homéostasique des cellules sénescentes dépend de leur élimination par le système immunitaire, une fois leurs fonctions bénéfiques remplies (Krizhanovsky et al., 2008; Sagiv et Krizhanovsky, 2013). Les chimiokines du SASP sont capables d'attirer des sous-ensembles distincts de cellules immunitaires, notamment les cellules NK, les neutrophiles, les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages, les cellules B et les cellules T (Coppé et al., 2008; Freund et al., 2010; Sagiv et Krizhanovsky, 2013). Parmi ces types cellulaires, les cellules NK, les cellules T et les macrophages peuvent interagir physiquement avec les cellules sénescentes dans des conditions pathologiques et physiologiques (Di Micco et al., 2021). L'immunosurveillance de la sénescence est également essentielle pour limiter les états pathologiques fibrotiques et le vieillissement (Krizhanovsky et al., 2008; Ovadya et al., 2018; Sagiv et Krizhanovsky, 2013; Sagiv et al., 2016). Ainsi, le SASP est une composante du phénotype de sénescence qui semble avoir évolué pour signaler la présence de cellules sénescentes au système immunitaire et favoriser leur élimination, mais lorsque les cellules sénescentes persistent, leur SASP devient préjudiciable. La senescence peut donc avoir un impact négatif comme nous allons le voir dans la partie qui va suivre.

1.2.5 Impacts néfastes de la sénescence

Les cellules sénescentes peuvent contribuer au vieillissement de l'organisme par de multiples mécanismes. Avec l'âge, les individus ont tendance à développer un état pro-inflammatoire, caractérisé par des niveaux circulants élevés de facteurs inflammatoires (Franceschi et al., 2006). L'inflammation est un facteur de risque de diverses maladies chroniques associées à l'âge. De plus, une inflammation chronique et la présence de molécules inflammatoires dans le sang des personnes âgées sont associées à un état de fragilité. Un lien moléculaire entre la sénescence cellulaire, l'inflammation et la fragilité a été montré par l'identification de variations génomiques communes qui contribuent aux phénotypes chroniques associés au vieillissement (Jeck et al., 2012; Johnson et al., 2015; Melzer, 2008; Melzer et al., 2007). De plus, le raccourcissent des télomères, observé au cours du vieillissement, est en corrélation avec des dysfonctionnements métaboliques et cardiaques (Benetos et al., 2013; D'Mello et al., 2015). Il a été montré que l'augmentation des taux sanguins d'IL-6, de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1RA), du facteur de nécrose tumorale (TNF), tous des effecteurs clés du SASP, peuvent être des prédicteurs de maladies chroniques chez les personnes âgées (Fabbri et al., 2015). Cette sénescence cellulaire est donc à l'origine de la fragilité et des maladies associées à l'âge, caractérisées par des dysfonctionnements tissulaires et un raccourcissement de la durée de vie comme démontré par la transplantation d'un petit nombre de cellules sénescentes chez des souris jeunes (Xu et al., 2018).

Les cellules sénescentes pourraient également affecter la régénération tissulaire en limitant le potentiel de prolifération des cellules souches et progénitrices d'une manière cellulaire autonome (Sousa-Victor et al., 2015). De plus, il a été rapporté que les propriétés clonogéniques des cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont altérées lorsqu'elles sont exposées à des facteurs du SASP dérivés de cellules stromales sénescentes, indiquant que la sénescence peut également affecter la régénération de manière paracrine (Gnani et al., 2019). De manière intéressante, le temps d'exposition des tissus au SASP peut déterminer un effet pro- ou anti-sénescence. Ainsi, une exposition à court terme au SASP favorise l'expression de marqueurs de cellules souches in vivo (Chiche et al., 2017; Ritschka et al., 2017). Cependant, une exposition prolongée entraîne la sénescence au niveau tissulaire. Le SASP pourrait donc à court terme faciliter la cicatrisation des plaies et la réparation des lésions tissulaires en améliorant la fonction des cellules souches, tandis qu'à long terme, il pourrait contribuer à une perte de fonction des cellules exposées (Di Micco et al., 2021).

Nous venons donc de voir dans la première partie de cet exposé que la sénescence joue un rôle majeur dans les pathologies associées à l'âge. L'arthrose fait partie de ces maladies, et de nombreux travaux de recherche associent arthrose et sénescence.

1.3 L'arthrose

1.3.1 Epidémiologie

L'arthrose (OA) est un trouble musculosquelettique rhumatismal très répandu, qui touche plus de 7 % des personnes dans le monde (528 millions de personnes) (Leifer et al., 2021). Elle peut affecter toutes les articulations, mais affecte en priorité les genoux, les mains, les hanches et la colonne vertébrale. L'arthrose a un impact considérable sur la qualité de vie du patient, entraînant douleur et invalidité, et sur la société en raison du coût de sa prise en charge. Actuellement, il n'existe pas de traitement curatif pour soigner l'arthrose mais uniquement des traitements palliatifs visant à réduire les symptômes de la maladie (Kloppenburg et Berenbaum, 2020; Sharif et al., 2015).

1.3.2 Etiologie

L'étiologie de l'arthrose est multifactorielle. Elle résulte de l'accumulation de différents facteurs de risques donnant lieu à plusieurs sous-types dirigés par des mécanismes moléculaires différents. Les facteurs de risques peuvent être regroupés en deux catégories : les facteurs systémiques (le genre, l'âge, l'obésité et les syndromes métaboliques, la génétique) et les facteurs locaux (dysplasies, désalignements articulaires, traumatismes).

1.3.2.1 L'âge

L'âge est le principal facteur de risque systémique de l'arthrose. Plusieurs études ont montré que le vieillissement était associé à une augmentation de l'incidence et de la prévalence de l'arthrose du genou et de la hanche (Felson et al., 1987; van Saase et al., 1989). La destruction et la perte du cartilage articulaire dans l'arthrose sont provoquées par un déséquilibre entre la production et l'activité des médiateurs pro-inflammatoires et cataboliques, y compris une multitude de cytokines et de chimiokines, et la production de facteurs anabolisants, y compris les facteurs de croissance (IGF-1) et la protéine ostéogénique 1 (OP-1), également connue sous le nom de protéine morphogénétique osseuse-7 (BMP-7) (Loeser, 2013). Le déséquilibre de la signalisation catabolique et anabolique entraîne une surproduction d'enzymes dégradant la matrice, notamment les métalloprotéinases matricielles (MMP) et les aggrécanases. La MMP-13 est importante en raison de sa capacité à dégrader le collagène de type II, la principale protéine structurelle du cartilage qui fournit la résistance à la compression du tissu, tandis que les aggrécanases ont la capacité à dégrader l'aggrécane.

Le vieillissement entraîne une production accrue de MMP et d'aggrécanases en lien avec la sénescence des chondrocytes (Loeser, 2013). Les cytokines, chimiokines et MMP trouvées dans le cartilage et le liquide synovial arthrosiques suggèrent que les cellules de l'articulation possèdent un phénotype sénescent (Loeser, 2017). Les chondrocytes arthrosiques présentent également un stress oxydatif élevé qui favorise la sénescence cellulaire et altère la fonction mitochondriale (Loeser, 2011). Une

autre caractéristique de ces cellules est une réduction de la réponse de réparation, en partie due à une altération du récepteur TGF-β, entraînant un déséquilibre de synthèse des protéines matricielles en faveur des MMP (Blaney Davidson et al., 2009; van der Kraan et al., 2010).

1.3.2.2 Le genre

Le genre est un paramètre qui influence le développement de l'arthrose avec un risque plus important chez les femmes, particulièrement après la ménopause. Le ratio homme/femme du taux d'incidence d'arthrose du genou, de la hanche et de la main est de 0,55 ; 0,64 et 0,65, respectivement (Srikanth et al., 2005). L'atteinte radiographique est aussi plus sévère chez la femme. Une des explications est la présence de récepteurs aux œstrogènes dans les tissus articulaires. Ces hormones participent à divers processus protecteurs sur l'ensemble de ces tissus qui sont diminués à la ménopause (Martín-Millán et Castañeda, 2013). De manière intéressante, certains polymorphismes des récepteurs aux œstrogènes sont associés à un risque sévère de développement d'arthrose chez la femme (Ma et al., 2015; Riancho et al., 2010). Cependant, le rôle des œstrogènes et d'autres hormones en tant que facteurs étiologiques possibles ne fait pas consensus (de Klerk et al., 2009; Stevens-Lapsley et Kohrt, 2010).

Une étude publiée cette année a examiné la relation entre les discriminants liés au genre/sexe et l'arthrose sur les 10 dernières années et 42 études publiées. Différents résultats cliniques ont été analysés : différences morphométriques, suivis en cinématique, douleur, résultats fonctionnels après arthroplastie et besoins en soins de santé des patients. Les femmes semblent avoir recours à plus de soins de santé, ont une prévalence plus élevée d'arthrose, une douleur et une inflammation évaluées cliniquement, une diminution du volume du cartilage, des difficultés physiques et des paramètres et dimensions articulaires plus petits que les hommes. Cependant, aucune donnée sur les analyses d'expression différentielle des biomarqueurs, les voies moléculaires et les profils « omiques » n'a permis d'orienter la recherche préclinique et clinique vers des protocoles axés sur le sexe/genre. (Tschon et al., 2021).

1.3.2.3 L'obésité

L'obésité est un facteur de risque bien établi pour le développement et la progression de l'arthrose. Le risque relatif d'être en surpoids (indice de masse corporelle (IMC) : >25 kg/m^2) et de développer une arthrose de la main est de 1,9 (Yusuf et al., 2010). Bien que la relation entre l'arthrose et le risque d'obésité ait historiquement été considérée comme secondaire à une charge articulaire excessive (Felson et al., 2004), cela ne tient pas compte du risque d'arthrose dans les articulations non porteuses. Dans les articulations porteuses, comme le genou, il a été démontré que la graisse corporelle est un meilleur prédicteur de la perte de cartilage, indépendamment de la masse sans graisse (Ding et al.,

2013). De plus, chez les personnes avec la masse grasse la plus élevée, le risque d'arthroplastie du genou et de la hanche pour l'arthrose était de trois à quatre fois supérieur au reste de la population (Wang et al., 2009). De même, la « Nurses' Health Study » a démontré un risque cinq fois plus élevé de progression vers une arthroplastie de la hanche à un âge avancé lorsque les jeunes de 18 ans sont dans les catégories d'IMC les plus élevées par rapport aux plus faibles (≥35 kg/m^2 et ≤ 22 kg/m^2, respectivement) (Karlson et al., 2003).

L'association entre l'obésité et l'arthrose est reconnue depuis longtemps (Anandacoomarasamy et al., 2008; Felson, 1988). Les patients obèses développent une arthrose plus précoce et présentent des symptômes plus sévères, un risque plus élevé d'infections et plus de difficultés techniques pour une arthroplastie totale. En plus d'une charge biomécanique accrue sur l'articulation du genou, on pense que l'obésité contribue à une inflammation systémique de bas grade par la sécrétion de cytokines dérivées du tissu adipeux, appelées adipokines (Conde et al., 2011; Das, 2001; Fain, 2010). Plus précisément, les niveaux de cytokines pro-inflammatoires, y compris l'IL-1β, l'IL-6, l'IL-8 et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α) sont élevés dans des modèles d'obésité induite par un régime riche en graisses chez la souris et chez des patients obèses (Aygun et al., 2005; Brown et al., 2014; Bunout et al., 1996; Duncan et al., 2003; Louer et al., 2012; Neels et al., 2009; Pou et al., 2007; Stehouwer et al., 2002; Straczkowski et al., 2002; Visser, 2001; Wellen et Hotamisligil, 2005; Zhou et al., 2011). Ces facteurs inflammatoires peuvent déclencher la voie de signalisation du facteur nucléaire-κB (NF-κB) pour stimuler un processus catabolique au niveau articulaire et conduire à la dégradation de la matrice extracellulaire (ECM) via la régulation à la hausse des MMP (Fernandes et al., 2002; Kapoor et al., 2011; Martel-Pelletier, 1999).

1.3.2.4 La génétique

L'OA présente une composante génétique majeure. Au cours des dernières années, un nombre particulièrement important de loci de risque d'arthrose ont été signalés (Styrkarsdottir et al., 2017, 2018, 2019; Tachmazidou et al., 2019; Zengini et al., 2018). A ce jour, plus d'une centaine de loci de susceptibilité à l'arthrose ont été signalés chez les populations européennes ou d'origine européenne, le groupe ethnique qui a été le plus étudié (Rice et al., 2020; Tachmazidou et al., 2019). Parmi les allèles à risque, des variants de gènes codant pour la protéine de la matrice oligomère du cartilage (COMP), la protéine de type chondroadhérine (CHADL) et le collagène de type XI, qui sont des protéines structurelles de la MEC du cartilage, ont été identifiés (Styrkarsdottir et al., 2017, 2018). Cependant, la majorité des variants à risque ne sont pas censés modifier la séquence d'acides aminés d'une protéine, mais sont plutôt situés dans des régions non codantes du génome qui pourraient moduler l'expression de gènes cibles. Beaucoup de ces loci de risque sont proches ou en corrélation avec des médiateurs épigénétiques. Les caractéristiques et les médiateurs épigénétiques représentent donc un lien

mécanistique entre les facteurs de risques génétiques de l'arthrose et l'apparition ou la progression de la maladie.

Des études quantifiant l'ARN messager ont permis de faire le lien entre le risque génétique d'arthrose et l'expression des gènes cibles tels que ALDH1A2, MGP et PLEC (den Hollander et al., 2019; Rice et al., 2019; Shepherd et al., 2018, 2019; Styrkarsdottir et al., 2014). Des travaux ont mis en évidence des altérations dans la méthylation de nombreux gènes soupçonnés d'être impliqués dans l'arthrose, notamment des gènes codant pour des facteurs de transcription tels que SOX9, des gènes codant pour des protéines de la MEC et des protéases dégradant la matrice, notamment COL2A1, ACAN, MMP13 et d'autres gènes impliqués dans la signalisation des facteurs de croissance et des cytokines, tels que GDF5 et BMP7 (Miranda-Duarte, 2018). Au sein des chondrocytes, les mécanismes épigénétiques semblent donc jouer un rôle important dans la transition d'un phénotype sain à un phénotype pathogène, notamment hypertrophique (Singh et al., 2019).

1.3.3 Physiopathologie

L'arthrose se manifeste par une dégradation progressive du cartilage, un remodelage anormal de l'os sous-chondral accompagné d'une inflammation chronique de bas grade de la membrane synoviale. Ces altérations entraînent une perte fonctionnelle de l'articulation.

1.3.3.1 Cartilage articulaire

Le cartilage articulaire (CA) est la cible d'une importante dégradation et d'un remodelage au cours de l'arthrose. Le cartilage est un tissu conjonctif spécialisé présent chez l'ensemble des vertébrés. Il joue un rôle important dans le développement et le maintien de la fonction du système musculosquelettique, et participe à la formation, à la croissance et au maintien du squelette. Le cartilage articulaire est situé à l'extrémité des os longs et présente la particularité d'être ni innervé, ni vascularisé. L'apport des éléments nutritifs et l'élimination des résidus métaboliques sont assurés par le liquide synovial présent dans l'articulation. Les stimulations mécaniques lors d'activités physiques permet la circulation du liquide dans les différentes couches du cartilage. La fonction du CA est double, il permet de diminuer les forces de frictions induites au cours du mouvement et d'assurer l'amortissement et la répartition des charges appliquées aux os. Cependant en cas de lésions, le CA a une capacité limitée de cicatrisation et de réparation intrinsèques. Il est composé d'un unique type cellulaire différencié, le chondrocyte, responsable de la production et du remodelage de la MEC. La concentration en cellules de ce tissu étant relativement faible (inférieure à 5% du volume de CA), c'est la composition et l'organisation de la MEC qui assurent majoritairement les fonctions du tissu. Alors que cette MEC est principalement composée d'eau (70%), de collagènes (6%) et de protéoglycanes (11%) l'équilibre entre ces trois composants et les types de collagène peut varier d'un tissu

cartilagineux à un autre. Les protéoglycannes possèdent la caractéristique de retenir l'eau dans la MEC, ce qui est essentiel pour maintenir ses propriétés mécaniques (Sophia Fox et al., 2009, 2006; Woo et Buckwalter, 1988). Trois types de cartilages ayant des aspects, propriétés et fonctions différents ont été décrits : le cartilage élastique, le cartilage fibreux et le cartilage hyalin.

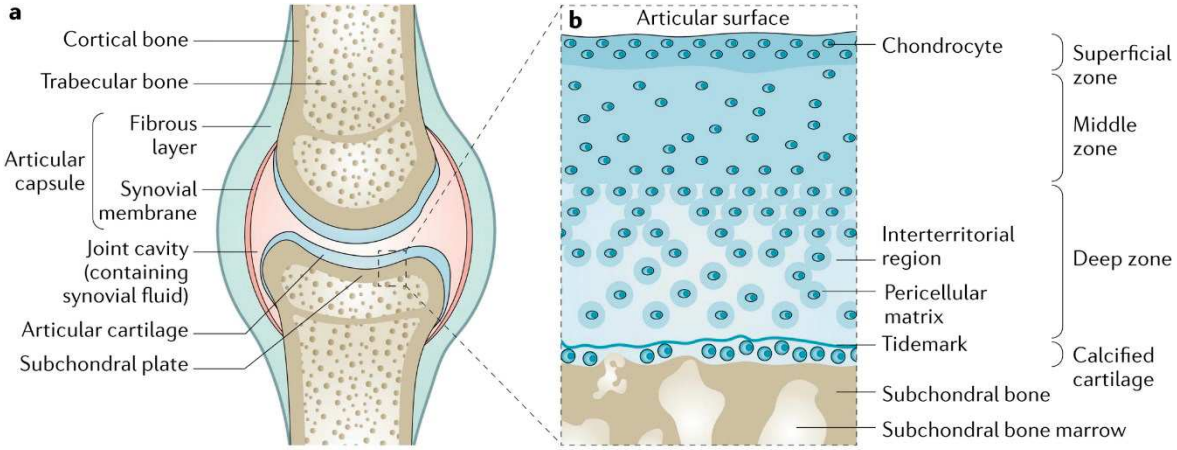


Figure 9 : Structure du cartilage articulaire (adapté d'après Martel-Pelletier et al., 2016).

Le cartilage est organisé en 4 couches distinctes (illustré par la Figure 9) (Sophia Fox et al., 2009) :

- La couche superficielle représente 10 à 20% de l'épaisseur totale du cartilage. Les chondrocytes, en grand nombre et de forme aplatie secrètent du collagène de type II et IX organisés en fibres compactes parallèles à la surface articulaire. Elle permet de protéger les couches profondes grâce à sa résistance accrue aux forces de cisaillement.
- La couche médiane représente 40 à 60% du volume total du cartilage. Les chondrocytes en petit nombre et de forme sphérique secrètent des collagènes de différents types et des protéoglycanes. Les fibres sont de petit calibre et d'orientation oblique, constituant ainsi la première ligne de défense aux forces de compression.
- La couche profonde représente environ 30% du volume du cartilage. Les chondrocytes sont organisés en colonnes parallèlement aux fibres épaisses de collagène qu'ils secrètent. L'orientation perpendiculaire des fibres par rapport à la surface articulaire permet une grande résistance aux forces de compression.
- La couche calcifiée représente 5 à 10% de l'épaisseur totale du cartilage. Les chondrocytes y sont quiescents et hypertrophiques. On y trouve du collagène de type X (COLX), peu de protéoglycanes et une concentration élevée en calcium.

La délimitation entre couches profondes et couches calcifiées constituent la « tide-mark ». Elle permet de réguler l'invasion du cartilage par les vaisseaux sanguins. L'os sous-chondral est directement sous le cartilage calcifié et laisse ensuite place à l'os trabéculaire (Gahunia et al., 2020).

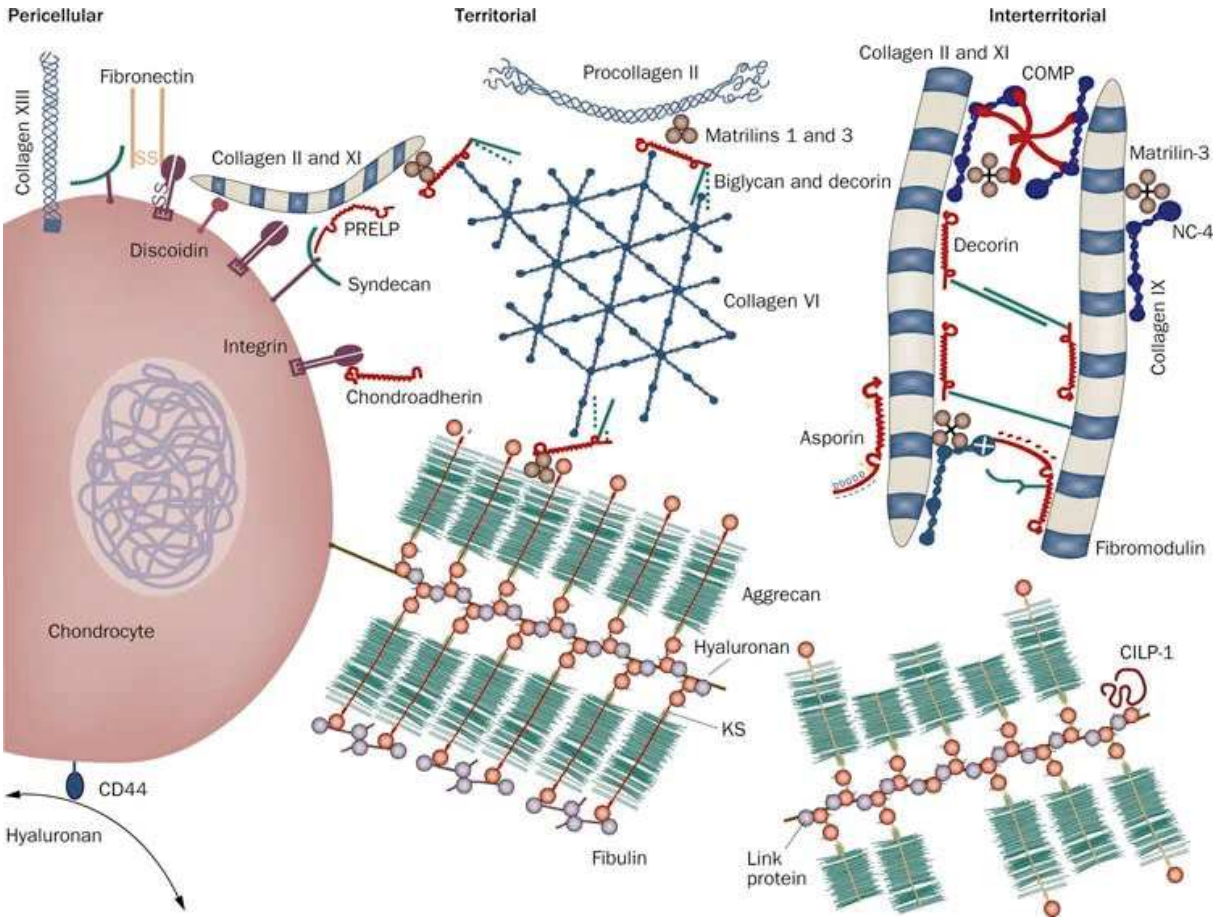


Figure 10 : L'organisation structurelle du cartilage articulaire (d'après Heinegård et Saxne, 2011).

En plus des variations zonales de structure et de composition, la matrice se compose de plusieurs régions distinctes basées sur la proximité des chondrocytes, la composition, le diamètre et l'organisation des fibrilles de collagène (illustré par la Figure 10). La MEC peut être divisée en régions péricellulaires, territoriales et interterritoriales.

- La matrice péri-cellulaire est une fine couche adjacente à la membrane cellulaire, elle entoure complètement le chondrocyte. Elle contient principalement des protéoglycanes, ainsi que des glycoprotéines et d'autres protéines non collagéniques. Cette région matricielle peut jouer un rôle fonctionnel pour initier la transduction du signal dans le cartilage avec support de charge (Eggli et al., 1985).
- La matrice territoriale entoure la matrice péri-cellulaire et est composée principalement de fines fibrilles de collagène formant un réseau en forme de panier autour des cellules (Guilak et

Mow, 2000; Muir, 1995; Sophia Fox et al., 2009). Cette région est plus épaisse que la matrice péri-cellulaire et est impliquée dans la protection des cellules cartilagineuses aux contraintes mécaniques. Elle contribue ainsi à la résilience de la structure du cartilage articulaire à supporter des charges importantes (Sophia Fox et al., 2009).

- La région interterritoriale est la plus grande des 3 régions matricielles. Elle contribue le plus aux propriétés biomécaniques du cartilage articulaire grâce aux protéoglycanes qui sont abondants dans cette zone (Mow et Guo, 2002). Cette région est caractérisée par des faisceaux de grosses fibrilles de collagène orientés aléatoirement, disposées parallèlement à la surface de la zone superficielle, obliquement dans la zone médiane et perpendiculairement à la surface articulaire dans la zone profonde.

Le chondrocyte est le seul type cellulaire résidant dans le cartilage articulaire. Les chondrocytes sont des cellules hautement spécialisées et métaboliquement actives qui jouent un rôle unique dans le développement, l'entretien et la réparation de la MEC. Les chondrocytes proviennent de cellules stromales mésenchymateuses et constituent environ 2% du volume total du cartilage articulaire (Alford et Cole, 2005). Ils varient en forme, en nombre et en taille, selon les régions anatomiques du cartilage articulaire. Les chondrocytes de la zone superficielle sont plus plats et plus petits et ont généralement une densité supérieure à celle des cellules plus profondes dans la matrice. Chaque chondrocyte établit un microenvironnement spécialisé et est responsable du renouvellement de la MEC dans son voisinage immédiat. Ce microenvironnement emprisonne essentiellement le chondrocyte dans sa propre matrice et empêche ainsi toute migration vers les zones adjacentes du cartilage. Les chondrocytes forment rarement des contacts de cellule à cellule pour la transduction directe du signal et la communication entre les cellules. Cependant, ils répondent à une variété de stimuli, notamment des facteurs de croissance, des charges mécaniques, des forces piézoélectriques et des pressions hydrostatiques. Malheureusement, les chondrocytes ont un potentiel de réplication limité, un facteur qui contribue à la capacité de guérison intrinsèque limitée du cartilage en réponse à une blessure. La survie des chondrocytes dépend d'un environnement chimique et mécanique optimal (Sophia Fox et al., 2009).

L'eau est le composant le plus abondant du cartilage articulaire, contribuant jusqu'à 80% de son poids. Environ 30% de cette eau est associée à l'espace intra-fibrillaire au sein du collagène, bien qu'un faible pourcentage soit contenu dans l'espace intracellulaire. Le reste est contenu dans l'espace poreux de la matrice (Maroudas et al., 1991; Torzilli, 1985). Des ions inorganiques tels que le sodium, le calcium, le chlorure et le potassium sont dissous dans l'eau des tissus (Lai et al., 1991; Linn et Sokoloff, 1965; Sophia Fox et al., 2009). La concentration relative en eau diminue d'environ 80 % dans la zone superficielle à 65 % dans la zone profonde. Le flux d'eau à travers le cartilage et à travers la surface

articulaire aide à transporter et à distribuer les nutriments aux chondrocytes, en plus de fournir une lubrification. Une grande partie de l'eau interfibrillaire semble exister sous forme de gel, et la plus grande partie peut être déplacée à travers la MEC en appliquant un gradient de pression à travers le tissu ou en comprimant la matrice solide (Mow et al., 1980, 1992). La résistance de frottement contre ce flux à travers la matrice est très élevée, ainsi la perméabilité du tissu est très faible.

Le collagène est la macromolécule structurelle la plus abondante dans la MEC et représente environ 60% du poids sec du cartilage. Le collagène de type II représente 90 à 95 % du collagène de la MEC et forme des fibrilles et des fibres entrelacées avec des agrégats de protéoglycanes. Les types de collagène I, IV, V, VI, IX et XI sont également présents mais ne contribuent qu'à une proportion mineure. Les collagènes mineurs aident à former et à stabiliser le réseau de fibrilles de collagène de type II (Gahunia et al., 2020). Le collagène II est fibrillaire, il est codé par le gène *COL2A1* en 2 principaux transcrits différents IIA et IIB issus d'un épissage alternatif au niveau de l'exon 2 (Ryan et Sandell, 1990). La forme IIA est exprimée au cours du développement de façon transitoire au niveau des structures cartilagineuses et non cartilagineuse. La forme IIB est spécifique au cartilage articulaire adulte (Sandell et al., 1991, 1994).

Il existe au moins 15 types de collagènes distincts composés de pas moins de 29 chaînes polypeptidiques. Tous les membres de la famille du collagène contiennent une région constituée de 3 chaînes polypeptidiques (chaînes α) enroulées en une triple hélice. La composition en acides aminés des chaînes polypeptidiques est principalement la glycine et la proline, l'hydroxyproline assurant la stabilité via des liaisons hydrogène le long de la molécule. La structure en triple hélices des chaînes polypeptidiques confère au cartilage articulaire d'importantes propriétés de cisaillement et de traction, qui aident à stabiliser la matrice.

Les protéoglycanes sont des monomères protéiques fortement glycosylés. Dans le cartilage articulaire, ils représentent le deuxième groupe de macromolécules de la MEC et correspondent à environ 10-15 % du poids humide. Les protéoglycanes sont constitués d'un noyau protéique avec une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes linéaires liées de manière covalente. Ces chaînes peuvent être composées de plus de 100 monosaccharides ; ils s'étendent à partir du noyau protéique, restant séparés les uns des autres en raison de la répulsion des charges. Le cartilage articulaire contient une variété de protéoglycanes essentiels au fonctionnement normal, notamment l'aggrécane, la décorine, le biglycane et la fibromoduline. Le plus important en taille et le plus abondant en poids est l'aggrécane, un protéoglycane qui possède plus de 100 chaînes de sulfate de chondroïtine et de sulfate de kératine. L'aggrécane est caractérisé par sa capacité à interagir avec l'acide hyaluronique (HA) pour former de grands agrégats de protéoglycanes via des protéines de liaison. L'aggrécane occupe l'espace

interfibrillaire de la MEC cartilagineuse et confère au cartilage ses propriétés osmotiques, essentielles à sa capacité à résister aux charges de compression.

Les protéoglycanes non agrégés sont caractérisés par leur capacité à interagir avec le collagène. Bien que la décorine, le biglycane et la fibromoduline soient beaucoup plus petits que l'aggrécane, ils peuvent être présents en quantités similaires. Ces molécules sont étroitement liées dans la structure des protéines, cependant ils diffèrent par la composition et la fonction des glycosaminoglycanes. La décorine et le biglycane possèdent respectivement 1 et 2 chaînes de sulfate de dermatane, tandis que la fibromoduline possède plusieurs chaînes de sulfate de kératine. La décorine et la fibromoduline interagissent avec les fibrilles de collagène de type II dans la matrice et jouent un rôle dans la fibrillogenèse et les interactions inter-fibrilles. Le biglycane se trouve principalement dans l'environnement immédiat des chondrocytes, où il peut interagir avec le collagène VI (Sophia Fox et al., 2009).

Certaines molécules telles que la fibronectine et les intégrines jouent un rôle dans l'organisation et le maintien de la structure macromoléculaire de la MEC. La fibronectine est une glycoprotéine capable d'interagir avec l'héparine et le sulfate de chondroïtine des protéoglycanes (Burton-Wurster et al., 1997). Elle joue le rôle de pont entre les intégrines cellulaires et les formes dénaturées du collagène (Tuckwell et al., 1994). Elle permet également de réguler le phénotype chondrocytaire en modulant la prolifération des chondrocytes, la synthèse, la dégradation et l'accumulation des protéoglycanes, par les fragments issus de sa dégradation (Nishioka et al., 2016; Pérez-García et al., 2016).

Les intégrines cellulaires bien qu'elles ne soient pas des protéines de la MEC jouent un rôle essentiel dans l'environnement articulaire, elles permettent l'interaction entre chondrocytes et MEC tout en transmettant de nombreuses informations relatives à la composition de l'environnement extracellulaire et des forces mécaniques subies. Elles agissent ainsi en récepteur bidirectionnel et régulent de nombreuses voies de signalisation intracellulaire (Gao et al., 2014b; Loeser, 2014).

Une autre famille importante qui entre dans la composition de la MEC cartilagineuse est celle des thrombospondines (THBS). Il s'agit aussi de glycoprotéines multimériques capables d'établir des ponts entre les cellules et la matrice (Chistiakov et al., 2017). En plus de leur rôle structural, elles participent à la régulation de différents processus notamment dans la fibrillogénèse du collagène (Bornstein et al., 2000; Halász et al., 2007; Hansen et al., 2011; Kyriakides et al., 1998). Elles permettent aussi d'interagir avec les collagènes, les protéoglycannes, les métalloprotéinases et les facteurs de croissance de la famille du TGF-β.

L'âge détermine la composition de la MEC ainsi que l'organisation des chondrocytes et leur réponse à des facteurs externes tels que les cytokines (Hardingham et Bayliss, 1990). Avec l'âge, il y a des

changements zonaux dans la distribution des chondrocytes ; cependant, le nombre total de chondrocytes reste essentiellement inchangé. Les chondrocytes commencent à se dissiper dans la région superficielle, tandis que les couches plus profondes ont un nombre accru de cellules.

Avec l'âge, il y a une diminution de l'hydratation de la matrice, avec une augmentation correspondante de la rigidité en compression. Cela peut avoir des implications pour l'os sous-chondral sous-jacent, qui peut voir des forces accrues lorsque le cartilage perd sa capacité à subir une déformation réversible. De tels changements peuvent être notés sur l'imagerie par résonance magnétique (IRM) comme la consolidation des travées et la sclérose sous-chondrale, qui est souvent observée en association avec un motif d'œdème de la moelle osseuse dans le cadre d'une dégénérescence du cartilage. La préservation de la MEC homéostatique est essentielle au maintien du cartilage articulaire.

La taille des agrégats de protéoglycanes dans la MEC diminue avec l'âge. Cela peut se produire à la suite d'une diminution des sites de liaisons disponibles de la chaîne HA ou à la suite de dommages protéolytiques aux protéines de liaison et à leurs chaînes de glycosaminoglycanes. L'agrégation peut également affecter la distribution de la taille des pores et la perméabilité du soluté. Il y a également un rapport accru de sulfate de kératine au sulfate de chondroïtine. La concentration d'hyaluronane augmente avec l'âge, mais cela résulte de l'accumulation progressive d'hyaluronane partiellement dégradé plutôt que d'une synthèse accrue (Martin et Buckwalter, 2001; Martin et al., 1997).

1.3.3.2 L'os sous-chondral

L'os sous-chondral est situé sous le cartilage articulaire, mais y reste connecté par interaction avec une couche de cartilage calcifié. L'os sous-chondral varie en architecture et en physiologie selon les régions, de la couche osseuse plus compacte adjacente au cartilage calcifié (plaque osseuse sous-chondrale), à l'os trabéculaire plus proche de la cavité médullaire. La plaque osseuse sous-chondrale est une fine couche d'os allant de 10 µm à 3 mm d'épaisseur, selon l'emplacement (Clark et Huber, 1990; Stewart et Kawcak, 2018).

L'os sous-chondral agit comme le support mécanique de l'articulation. Ce tissu contient des ostéoclastes, des ostéoblastes et des CSM, et est sillonné par de multiples vaisseaux et fibres nerveuses (Figure 11).

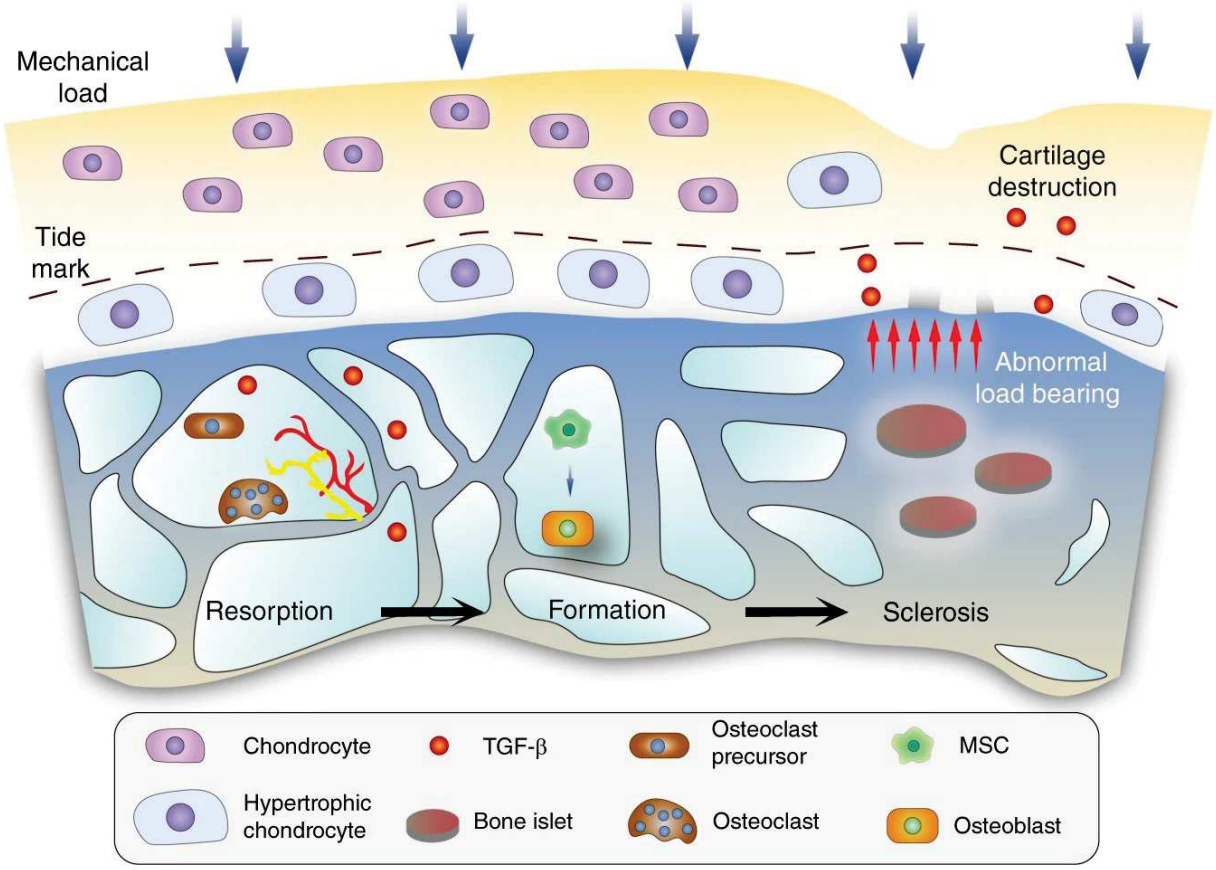


Figure 11 : Schéma du microenvironnement osseux sous-chondral dans l'arthrose sous stimulation mécanique (d'après Hu et al., 2021).

La jonction ostéochondrale a trois fonctions (Donell, 2019) :

- C'est la zone de transition entre le cartilage articulaire mou et l'os sous-chondral dur et a donc des propriétés mécaniques importantes,
- Les portions verticales des arcades de collagène de type II le traversent, ancrant le cartilage articulaire à l'os sous-chondral,
- Les cytokines la traversent au niveau moléculaire, créant une interface entre les chondrocytes et les cellules osseuses.

L'os sous-chondral est un matériau biphasique, qui comprend un composant inorganique composé de cristaux d'hydroxyapatite pour la rigidité, et un composant organique composé principalement de collagènes de type I, de protéoglycanes, de glycosaminoglycanes et d'eau offrant élasticité et souplesse (Brama et al., 2009; Radin et Paul, 1971; Stewart et Kawcak, 2018). L'os sous-chondral est capable d'adapter physiquement sa morphologie en réponse aux contraintes exercées sur l'articulation (Stewart et Kawcak, 2018). La réponse adaptative est facilitée par les activités de formation et de résorption des ostéoblastes et des ostéoclastes, respectivement, et est observée macroscopiquement

dans l'os trabéculaire. La riche vascularisation et l'innervation de l'os sous-chondral facilitent une réponse locale complète et étendue aux altérations physiologiques et pathologiques au sein de l'os.

Initialement, l'OA a été considérée comme une usure du cartilage articulaire, mais des preuves plus récentes ont montré que la perturbation de l'os sous-chondral et l'inflammation synoviale participent et conduisent à la progression de la maladie (Weber et al., 2019). Il existe une corrélation directe entre la perte de cartilage articulaire et l'expansion de l'os sous-chondral. Des changements structurels, biochimiques et biomécaniques se produisent au niveau de la jonction ostéochondrale en association avec l'OA (Suri et Walsh, 2012).

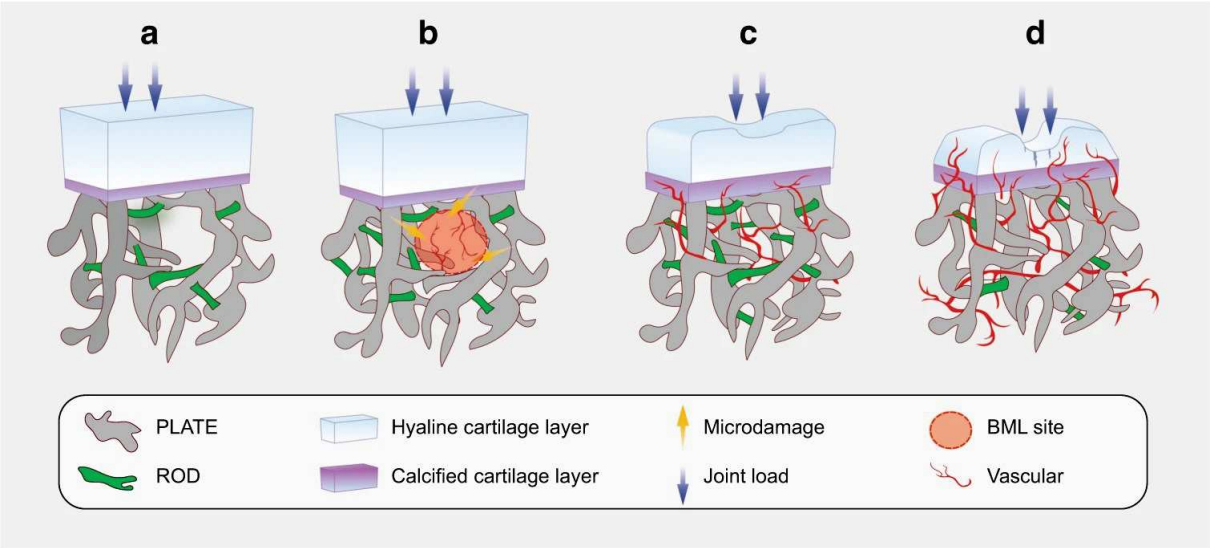


Figure 12 : Transformation microstructurale osseuse sous-chondrale au cours de la progression de l'arthrose (d'après Hu et al., 2021).

Comme le montre la Figure 12, les premiers signes d'OA dans l'os sous-chondral sont des lésions de la moelle osseuse (BML) (Hügle et Geurts, 2016). Ces BML résulteraient d'un remodelage de l'os sous-chondral dû à une surcharge mécanique. Si le chargement anormal persiste, alors les BML persistent, il y a une perte associée de cartilage articulaire et une OA symptomatique se développe (MacKay et al., 2017). Les signes de remodelage osseux ont été démontrés par une augmentation de la densité osseuse, un épaississement de la plaque sous-chondrale et une augmentation du nombre, du volume et de l'épaisseur trabéculaires (Loef et al., 2018).

Les principales cellules impliquées dans le remodelage osseux sous-chondral sont les ostéoblastes, les ostéoclastes et les macrophages. Chez les sujets souffrant d'OA, des micro fractures et une néovascularisation sont observées dans l'os sous-chondral et à la jonction ostéochondrale. Cela déclenche une réponse réparatrice avec la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et l'inflammation avec les résultats radiologiques typiques de formation d'ostéophytes, de kystes et de sclérose sous-chondrale (Weber et al., 2019).

L'effet de l'âge sur le tissu ostéochondral chez l'homme est mal compris. A mesure que la déminéralisation osseuse se produit, il y a une augmentation correspondante du contenu organique. Dans l'arthrose, la teneur en matières organiques n'augmente pas avec la déminéralisation, ce qui implique une augmentation du tissu ostéoïde. L'hypominéralisation est associée à une modification du rapport des chaînes alpha-1 à alpha-2 dans la composition du collagène de type I dans la zone sous-chondrale (Kerns et al., 2014). L'homéostasie entre les ostéoblastes et les ostéoclastes est perturbée et l'activité des ostéoclastes augmente. Dans l'os sain, les fractures guérissent spontanément en formant de l'os, mais dans l'OA, les microfractures guérissent avec du tissu vasculaire fibreux et de l'os sclérotique sous-minéralisé, ce qui implique un processus similaire à la guérison retardée des fractures (Hunter et al., 2009).

Dans l'OA, l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes augmente de 96 % et de 190 %, respectivement, mais comme la perte osseuse globale n'est pas observée dans l'ensemble, cela indique que la formation osseuse médiée par les ostéoblastes a un rôle distinct (Weber et al., 2019). Les ostéoblastes proviennent des CSM qui migrent de la moelle osseuse et se différencient en ostéoblastes et non, des ostéoblastes matures qui tapissent les fosses de résorption dans l'os sous-chondral endommagé (Park et al., 2012). Les CSM dérivées des BML ont une capacité de minéralisation plus faible et une prolifération plus lente, qui pourraient être provoquées par le processus inflammatoire (Campbell et al., 2016).

Les ostéoblastes de l'os sous-chondral peuvent induire un état pro-catabolique en stimulant les chondrocytes à augmenter l'expression de MMP-13 et à diminuer la production d'aggrécanes. En retour, les chondrocytes arthrosiques peuvent affecter la fonction des ostéoblastes en amenant ces derniers à augmenter l'expression de MMP-1 ; bien que ces données proviennent du stade terminal plutôt que de l'OA au stade précoce (Weber et al., 2019). Les ostéoblastes arthrosiques expriment également des niveaux élevés de cytokines inflammatoires telles que le facteur de croissance transformant β1 (TGFβ1) et la prostaglandine E2 (PGE2). La surexpression des cytokines inflammatoires contribue à la perturbation de l'os sous-chondral et il a été montré une interaction moléculaire à la jonction ostéochondrale. De plus, les ostéocytes de la moelle osseuse envoient des signaux apoptotiques en réponse aux microfractures ; ceux-ci augmentent l'ostéoclastogenèse et diminuent également la production de sclérostine (Henriksen et al., 2009; Jaiprakash et al., 2012). La sclérostine inhibe les ostéoblastes lorsque les ostéoclastes sous-chondraux s'activent et pénètrent dans la couche cartilagineuse non calcifiée. Cela peut être associé à une fissuration du cartilage articulaire jusqu'à la « tidemark ». Les forces mécaniques peuvent également affecter et aggraver la destruction.

Les tissus peuvent répondre en dupliquant la « tidemark » dans la couche non calcifiée avec un « deuxième front » d'ossification périvasculaire et d'épaississement sous-chondral. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins peut se produire avec une croissance interne dans le cartilage accompagnée de nerfs sensoriels. La formation d'ostéophytes, une tentative de diminuer la charge à travers l'articulation en augmentant sa surface, dépend de la néovascularisation. Les chondrocytes normaux sont résistants à l'invasion vasculaire en sécrétant des facteurs anti-angiogéniques, tels que les peptides régulateurs troponine I et thrombospondine-1 (Moses et al., 1999; Pfander, 2000) et les inhibiteurs d'enzymes dégradant la matrice, y compris les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP), l'inhibiteur de la protéinase des leucocytes sécrétoires (SLPI) et le plasminogène activateur inhibiteur-1 (PAI-1) (Fransès et al., 2010). Les fissures du cartilage articulaire peuvent être comblées avec du fibrocartilage comme tentative de réparation, avec invasion de fibroblastes via les nouveaux vaisseaux sanguins.

L'inflammation est une phase de cicatrisation des fractures osseuses, avec des cellules inflammatoires régulant le processus en sécrétant des cytokines inflammatoires et des médiateurs chimiotactiques (Osta et al., 2014), ainsi que des facteurs de croissance, pour recruter et stimuler à la fois les cellules immunitaires et les cellules progénitrices pour le remodelage du site de fracture. Les monocytes et les macrophages sont capables de libérer des cytokines telles que BMP-2, BMP-4 et TGF-β1, qui peuvent stimuler la différenciation et la prolifération des ostéoblastes (Donell, 2019; Loi et al., 2016).

1.3.3.3 La membrane synoviale

Le tissu synovial sépare la capsule articulaire de la cavité articulaire. Outre la nutrition et la lubrification du cartilage, la fonction principale du tissu synovial est d'empêcher l'adhérence de la capsule avec le cartilage. Dans les articulations, la membrane synoviale scelle la cavité synoviale. Elle est responsable du maintien du volume et de la composition du liquide synovial, principalement en produisant de la lubricine et de l'acide hyaluronique. Grâce au liquide synovial, la membrane synoviale contribue également à la nutrition des chondrocytes (et de l'os sous-chondral), car le cartilage articulaire n'a pas d'apport vasculaire ou lymphatique intrinsèque (Scanzello et Goldring, 2012). Par la production d'acide hyaluronique et d'activateur du plasminogène, la membrane synoviale préserve la mobilité articulaire (Busso et al., 1997).

La membrane synoviale est composée de deux couches :

- La couche externe, ou sub-intima, mesurant jusqu'à 5 mm d'épaisseur et constituée de plusieurs types de tissus conjonctifs : fibreux (type collagène dense), adipeux (que l'on trouve principalement dans les coussinets adipeux) ou aréolaire (type collagène lâche). Cette couche

est riche en collagène de type I et en apport sanguin microvasculaire, et possède des vaisseaux lymphatiques et des fibres nerveuses, mais est relativement acellulaire (Smith, 2011).

- La couche interne, ou intima, se trouve du côté de la cavité articulaire et se compose d'une couche de 1 à 4 cellules, de seulement 20 à 40 µm d'épaisseur. Elle possède deux types cellulaires qui sont identifiés par des méthodes immunohistochimiques et cytochimiques et appelés synoviocytes de type macrophage et de type fibroblaste. Les synoviocytes fibroblastiques constituent la population cellulaire dominante dans la membrane synoviale saine (Mathiessen et Conaghan, 2017; Smith, 2011).

Histologiquement, la membrane synoviale chez les patients arthrosiques est caractérisée par une hyperplasie, une fibrose et une vascularisation stromale (Prieto-Potin et al., 2015). Il y a un afflux abondant de leucocytes du compartiment vasculaire en réponse aux cytokines et aux molécules d'adhésion cellulaire, et plusieurs études ont montré que les macrophages et les lymphocytes T sont les cellules immunitaires les plus prédominantes dans la membrane synoviale OA (Klein-Wieringa et al., 2016; de Lange-Brokaar et al., 2012; Scanzello et Goldring, 2012).

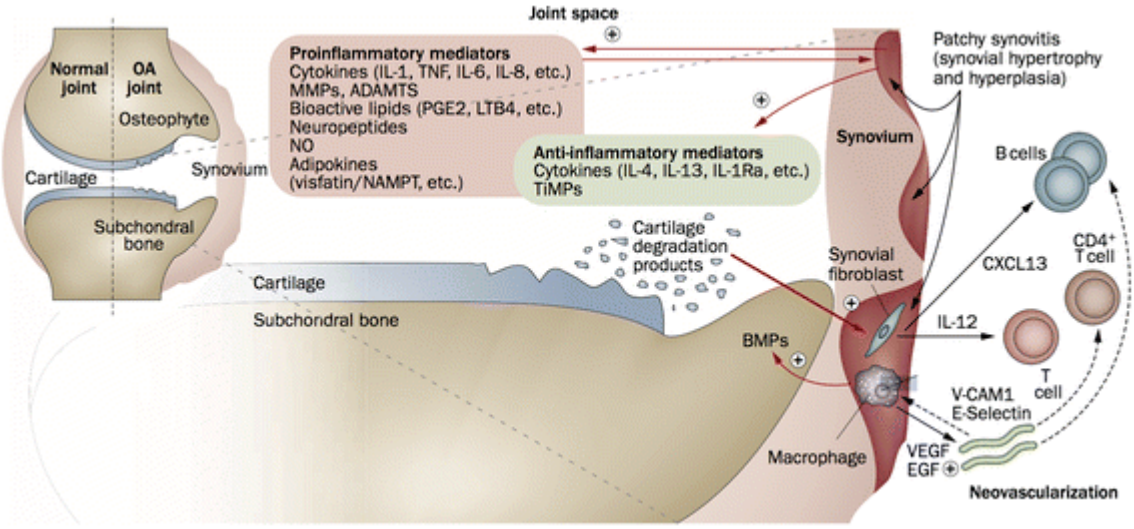


Figure 13 : Implication de la synoviale dans la physiopathologie de l'arthrose (d'après Sellam et Berenbaum, 2010).

La Figure 13 résume l'implication de la membrane synoviale dans la physiopathologie de l'OA. En effet, une grande partie de l'activation immunitaire innée et de la production de cytokines dans la cavité articulaire arthrosique est attribuée aux macrophages synoviaux, mais d'autres cellules, notamment les synoviocytes fibroblastiques et les chondrocytes, jouent également un rôle (Sokolove et Lepus, 2013). Les molécules du cartilage hyalin dégradé, libérées dans la cavité articulaire sont susceptibles d'initier une inflammation de la membrane synoviale. Les synoviocytes réagissent en produisant des médiateurs pro-inflammatoires, qui à leur tour attirent les cellules immunitaires, augmentent

l'angiogenèse et induisent un changement phénotypique des chondrocytes (Sokolove et Lepus, 2013). Un cercle vicieux s'ensuit ; les chondrocytes produisent des cytokines et des enzymes protéolytiques qui augmentent la dégradation du cartilage et maintiennent l'activation de la membrane synoviale (Berenbaum, 2013; Sellam et Berenbaum, 2010).

Les processus entraînant l'inflammation dans l'OA sont complexes. En outre, un traumatisme peut déclencher la libération de médiateurs inflammatoires localement, et il existe de plus en plus de preuves que le syndrome métabolique et l'obésité augmentent les médiateurs inflammatoires systémiques de bas grade qui peuvent agir en synergie avec d'autres mécanismes inflammatoires (Siebuhr et al., 2016).

1.3.3.4 Dégénérescence du cartilage articulaire

Comme nous l'avons vu précédemment, dans le cas de l'OA on observe une dérégulation de la balance entre anabolisme et catabolisme en faveur d'une activité catabolique importante. Les dommages au cartilage articulaire entraînent la perte des propriétés mécaniques de ce dernier (Kempson et al., 1973). Le gonflement et la déformation du cartilage associés à la dégradation des collagènes du cartilage sont l'une des caractéristiques de l'OA précoce (Bank et al., 2000). Les chondrocytes articulaires expriment des collagénases appartenant à la famille des métalloprotéinases matricielles (MMP-1, 8, 13 et 14) capables de cliver la région triple hélicoïdale du collagène de type II (Kafienah et al., 1998; Miller et al., 1976).

Les MMP dont plusieurs membres, notamment MMP13, sont surexprimés au cours de l'OA jouent un rôle prépondérant dans la dégradation du cartilage. Le « knock-down » (KO) sélectif de ce facteur dans le cartilage diminue la sévérité de la maladie dans un modèle murin (Wang et al., 2013). De plus, une méta-analyse de 10 études sur 485 patients arthrosiques et 295 personnes saines a permis de mettre en évidence des taux protéiques élevés de MMP1, 2 et 9 dans l'OA (Zeng et al., 2015). Les protéines de la famille ADAMTS, dont ADAMTS4 et ADAMTS5, participent également de manière active dans le processus de dégradation de la MEC en dégradant l'aggrécane (Bondeson et al., 2008).

Les chondrocytes peuvent adopter différents phénotypes in vivo et in vitro, définis par le type de collagène qu'ils produisent. Isolés de leur matrice, les chondrocytes présentent la particularité de se dédifférencier, produisant des collagènes fibroblastiques de type I et III. Avec l'apparition de l'OA, les chondrocytes subissent de multiples modifications en termes de prolifération, de viabilité, mais aussi de profil sécrétoire. L'acquisition d'un phénotype hypertrophique (produisant du collagène de type X et MMP-13) par les chondrocytes est bien documentée et contribue au développement de l'OA (Charlier et al., 2019).

1.3.3.5 Sénescence cellulaire et arthrose

Bien que les chondrocytes soient hypo-réplicatifs pendant l'homéostasie, ils conservent le potentiel de proliférer dans certains contextes. Par exemple, les chondrocytes prolifèrent sous forme de « grappes » au cours des premiers stades de la pathologie, ce qui est généralement considéré comme une tentative de réparation de la matrice endommagée (Lotz et al., 2010). Les chondrocytes initient également la division cellulaire lorsqu'ils sont ensemencés en culture. La relation entre la quiescence (c'est-à-dire l'arrêt réversible du cycle cellulaire) et la sénescence est complexe, avec des preuves que la stimulation mitogénique des cellules quiescentes endommagées peut en fait contribuer à l'induction de la sénescence lors de la réentrée dans le cycle cellulaire (Ogrodnik et al., 2019).

Comme d'autres organes, les tissus articulaires sont sujets à la sénescence, et le nombre de chondrocytes et de fibroblastes synoviaux sénescents est fortement corrélé avec l'âge (Del Rey et al., 2019; Diekman et al., 2018). Compte tenu du rôle important de la diaphonie os-cartilage, une sénescence accrue des ostéocytes au cours du vieillissement pourrait contribuer à l'OA et des lésions articulaires post-traumatiques peuvent accélérer la sénescence des chondrocytes et stimuler la dégradation du cartilage (Farr et al., 2016; Jeon et al., 2017). La sénescence induit des reconfigurations métaboliques dans les cellules qui, au fil du temps, peuvent contribuer à la pathogenèse. En effet, la transplantation de fibroblastes sénescents dans les articulations du genou de souris a induit une érosion du cartilage, la formation d'ostéophytes et une perte de mobilité, suggérant que les cellules sénescentes modifient le microenvironnement synovial et induisent une arthropathie semblable à l'OA (Xu et al., 2016). Les cellules articulaires sénescentes présentent des caractéristiques communes, telles que l'érosion des télomères, une expression accrue de p53 et des CKI p21 et p16INK4a, une génération accrue de ROS via un dysfonctionnement mitochondrial et une augmentation de l'hétérochromatine associée à la sénescence (Loeser, 2009). Enfin, les chondrocytes, les ostéocytes et les fibroblastes synoviaux peuvent sécréter un SASP (Del Rey et al., 2019; Diekman et al., 2018; Farr et al., 2016). Ce SASP inclut notamment des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-17, l'IL-1β et le TNF. Ces facteurs induisent des changements liés à l'OA, y compris l'inflammation, la croissance osseuse et la dégradation de la MEC (Basisty et al., 2020; Coppé et al., 2010).

1.3.3.6 Altération de l'autophagie

L'autophagie est essentielle pour préserver l'intégrité et la fonction du cartilage articulaire. Le cartilage humain normal exprime des niveaux élevés de régulateurs de l'autophagie, y compris ULK1, Beclin1 et LC3-II, suggérant que l'autophagie est un mécanisme constitutivement actif dans le cartilage. Dans le cartilage arthrosique humain et dans un modèle d'OA expérimentale chez la souris, l'autophagie est anormalement réduite et, conformément à ces résultats, mTOR, le principal signal inhibiteur de l'autophagie, est surexprimé (Caramés et al., 2010; Vinatier et al., 2018; Zhang et al., 2015). Une autre

étude évoque que l'autophagie peut agir comme une réponse adaptative pour tenter de protéger les cellules. Cependant, une fois l'OA sévère établie, la diminution de l'autophagie pourrait contribuer à la progression de la maladie (Sasaki et al., 2012).

Un rôle protecteur de l'autophagie peut être observé sur la mort cellulaire. L'activation de l'autophagie est souvent considérée comme un mécanisme de protection pour éviter la mort des chondrocytes et est associée à une diminution de l'apoptose (Caramés et al., 2010, 2012a, 2012b; Sasaki et al., 2012; Zhang et al., 2015). Il existe une interaction complexe entre l'autophagie et l'apoptose selon les différents stades de l'OA (Almonte-Becerril et al., 2010). Néanmoins, la relation entre l'autophagie et la mort cellulaire n'est pas entièrement comprise (Musumeci et al., 2015).

Il existe un consensus sur le rôle protecteur de l'autophagie dans des conditions de stress (Sasaki et al., 2012). Des travaux de 2015 ont montré que l'activation de l'autophagie protégeait contre le dysfonctionnement mitochondrial sur des chondrocytes. Inversement, l'inhibition de l'autophagie induisait des défauts de la fonction mitochondriale. Ces résultats indiquent que l'autophagie a un rôle important dans la protection des chondrocytes contre des facteurs de stress et, par conséquent, une déficience de l'autophagie peut être impliquée dans la pathogenèse de l'OA (López de Figueroa et al., 2015; Vinatier et al., 2018).

1.3.4 Evaluation clinique et diagnostique

Le diagnostic clinique d'OA repose sur un entretien et un examen physique du patient. Il ne peut être posé que si le patient présente des symptômes afin de prévenir ou atténuer ces derniers. En effet, la manifestation du symptôme principal qu'est la douleur, conduit les patients à consulter. La douleur est généralement décrite comme intense et profonde, accentuée par les mouvements. La difficulté d'utiliser les symptômes pour définir la présence d'OA est qu'ils n'apparaissent qu'une fois la maladie à un stade avancé et probablement irréversible. Pour intervenir en début de la maladie, les symptômes ont donc une valeur limitée dans le diagnostic de l'OA précoce.

L'OA est traditionnellement diagnostiquée avec une radiographie simple ; les caractéristiques comprennent le rétrécissement de la hauteur de l'espace articulaire, la formation d'ostéophytes et le développement de sclérose sous-chondrale et de kystes. Les systèmes de notation comprennent ceux proposés par Kellgren et Lawrence (Kellgren et Lawrence, 1957) et par la « Osteoarthritis Research Society International » (OARSI) (Altman et Gold, 2007). L'imagerie par résonnance magnétique (IRM) présente de nombreux avantages par rapport à la radiographie et permet l'évaluation des structures articulaires en trois dimensions et à haute résolution (Palmer et al., 2013). Par conséquent, cette technique est plus sensible dans la détection des changements structurels précoces (Guermazi et al.,

2012; Wirth et al., 2011). L'OARSI recommande désormais l'IRM pour l'évaluation de la morphologie du cartilage (Glyn-Jones et al., 2015).

1.3.5 Traitements

1.3.5.1 Soins palliatifs

A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif pour traiter l'OA. La prise en charge est complexe et doit tenir compte des particularités inhérentes à chaque patient, l'articulation concernée et le stade de la pathologie. La Figure 14 résume les différentes approches pour la prise en charge non chirurgicale de l'OA du genou. Les approches restent en majorité palliatives et visent à réduire le symptôme principal qu'est la douleur, tout en diminuant la gêne fonctionnelle afin d'améliorer la qualité de vie des patients.

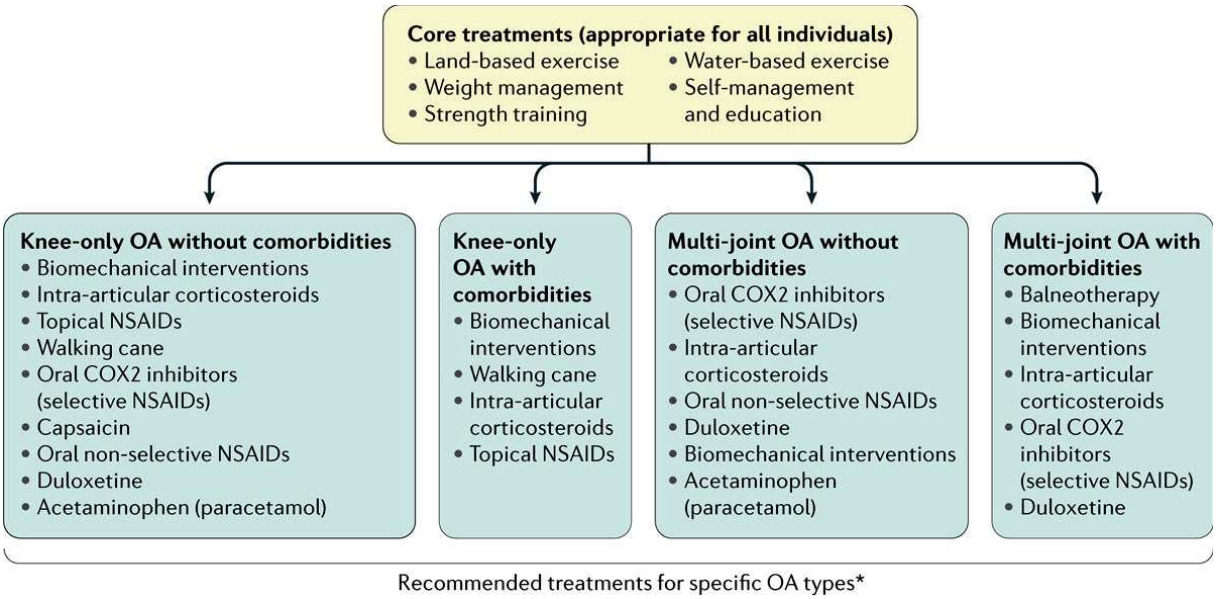


Figure 14 : Lignes directrices pour la prise en charge non chirurgicale de l'arthrose du genou selon la Société internationale de recherche sur l'arthrose (OARSI) (d'après Martel-Pelletier et al., 2016).

Les approches non pharmacologiques et pharmacologiques peuvent être combinées. La Ligue européenne contre les rhumatismes (EULAR) est à l'origine d'une initiative permettant d'évaluer l'efficacité des différentes prises en charge de l'OA ciblant telle ou telle articulation et émet des recommandations à ce sujet (Fernandes et al., 2013; Kloppenburg et al., 2019; Kroon et al., 2018; Pendleton, 2000; Sakellariou et al., 2017).

Concernant les approches non pharmacologiques, elles ont pour objectif d'améliorer la qualité de vie des patients tout en réduisant la consommation des soins. Ces approches reposent sur l'information et l'éducation des patients. La perte de poids modérée est l'exemple classique d'une approche non

pharmacologique qui peut porter ses fruits ; elle passe notamment par une modification du régime alimentaire. Le renforcement musculaire par l'exercice peut aussi être bénéfique. Sa stratégie permet d'atténuer les douleurs et d'améliorer la fonction motrice.

Des traitements pharmacologiques topiques, oraux et injectables sont disponibles pour les personnes souffrant d'OA. Les thérapies actuelles sont au mieux des analgésiques modérément efficaces et il convient de noter que les études rapportent que la plupart des personnes atteintes d'arthrose ont une douleur persistante malgré la prise de toutes les thérapies prescrites. Les traitements de première intention comprennent les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) topiques et le paracétamol oral (Zhang et al., 2010). Les AINS oraux et les inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2 (COX2) sont les agents pharmacologiques oraux les plus couramment utilisés pour le traitement de l'OA. Ils sont associés à des toxicités importantes (en particulier, des complications gastro-intestinales et cardiovasculaires), notamment avec l'augmentation de l'âge et des comorbidités. Les opioïdes sont utilisés de manière variable selon les pays et possèdent un profil de toxicité important (y compris les étourdissements, les nausées, la constipation et les chutes). Les preuves de l'utilisation de la duloxétine, un inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, dans l'OA du genou sont limitées ; les directives de OARSI et de l'« American College of Rheumatology » (ACR) recommandent son utilisation dans l'OA multi-articulaire et l'OA du genou, respectivement (Martel-Pelletier et al., 2016).

Les corticostéroïdes intra-articulaires peuvent être recommandés chez les patients chez lesquels la douleur empêche un exercice de renforcement musculaire approprié ou, plus rarement, chez lesquels les épanchements importants sont douloureux ou limitent les mouvements articulaires (Arden et al., 2008; Gaffney et al., 1995). Ils procurent des bénéfices analgésiques à court terme généralement pendant 3 à 4 semaines chez les personnes souffrant de douleurs arthrosiques modérées à sévères, probablement en raison de leur action anti-inflammatoire (Arden et al., 2008; Godwin et Dawes, 2004; Martel-Pelletier et al., 2016).

L'acide hyaluronique (également appelé hyaluronane) est un GAG de haut poids moléculaire et un composant naturel du liquide synovial et du cartilage. Il fournit les propriétés viscoélastiques au liquide synovial et pourrait fournir des propriétés lubrifiantes et d'absorption des chocs. Cependant, l'OARSI en 2014 ne recommande pas l'acide hyaluronique sur les bases d'une revue de la littérature (McAlindon et al., 2014). Cette conclusion est étayée par une méta-analyse du bénéfice thérapeutique de l'acide hyaluronique dans l'arthrose du genou, qui indique que le bénéfice est faible et cliniquement non pertinent (Rutjes et al., 2012).

1.3.5.2 Approches chirurgicales

Le lavage arthroscopique et le débridement (évacuation des débris hors de l'espace articulaire ou résection du cartilage et/ou du ménisque) ne sont pas recommandés pour le traitement de l'OA du genou sans antécédents clairs de véritable verrouillage mécanique, car les résultats cliniques ne sont pas améliorés (Belo et al., 2007). D'autres techniques chirurgicales telles que la greffe ostéochondrale en mosaïque ou « mosaïcoplastie ou l'implantation de chondrocytes autologues peuvent être envisagées. Néanmoins, il s'agit de techniques difficiles, non dépourvues de complications qui nécessitent un prélèvement de cartilage. La limite majeure de ces techniques est représentée par la taille de la lésion à traiter (Cognault et al., 2015). Si les interventions médicales ne parviennent pas à améliorer suffisamment les symptômes persistants de l'OA, une chirurgie de remplacement articulaire doit être envisagée. La chirurgie de remplacement articulaire est très efficace pour la hanche et de plus en plus pour l'articulation du genou (Lewis et al., 2015). En règle générale, la chirurgie de remplacement articulaire chez les patients plus jeunes (< 60 ans) peut être retardée car les prothèses articulaires ont une espérance de vie limitée et la chirurgie de révision offre des résultats moins favorables (Godwin et Dawes, 2004; Martel-Pelletier et al., 2016).

1.3.5.3 Nouvelles approches thérapeutiques

Actuellement de nouveaux axes thérapeutiques sont en cours d'évaluation, dont certains ont atteint le stade des essais cliniques. Ces nouvelles approches thérapeutiques ont notamment fait l'objet d'une revue l'année dernière (Delplace et al., 2021). Les approches ciblant de nouvelles cibles thérapeutiques impliquant certaines voies de signalisation, les cellules immunitaires ou les processus d'autophagie/sénescence sont en cours d'évaluation. L'évaluation de sénolytiques en clinique ont démontré toute leur potentialité chez l'homme. L'injection du cocktail Dasatinib/Quercétine (D+Q) à des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (Justice et al., 2019), et l'injection de Dasatinib chez des patients atteints de sclérodermie systémique ont montré une amélioration clinique (Martyanov et al., 2019). En 2019, l'effet sénolytique du cocktail D+Q chez des patients atteints de dégénérescence rénale au stade terminal a été démontré par une réduction significative du nombre de cellules sénescentes dans le tissu adipeux et dans la peau des patients, ainsi qu'une réduction des marqueurs du SASP dans le sang (Hickson et al., 2019). Parallèlement, la thérapie cellulaire à base de CSM est certainement l'axe le plus avancé, et de nombreux essais cliniques d'injections intra-articulaires de CSM ont été initiés (Delplace et al., 2021).

Les CSM représentent une perspective thérapeutique prometteuse pour traiter l'OA. Elles présentent un ensemble de propriétés biologiques : prolifération, différenciation, effets paracrines anti-fibrotique, anti-apoptotique, anti-inflammatoire notamment. Outre leur propriété de différenciation pour réparer les tissus musculosquelettiques, les CSM ont également la propriété d'interagir avec le

système immunitaire par la sécrétion de nombreuses molécules immunomodulatrices et anti-inflammatoires.

1.4 Vésicules extracellulaires dérivées des CSM

Nous allons dans un premier temps définir les CSM et détailler leurs origines, puis décrire leurs mécanismes d'action et leurs fonctions biologiques avant de présenter leur potentiel thérapeutique.

1.4.1 Cellules stromales mésenchymateuses

Alexander Friedenstein a été l'un des pionniers de la théorie selon laquelle la moelle osseuse est un réservoir de cellules souches des tissus mésenchymateux chez les organismes adultes. C'est au cours des années 1960 et 1970 qu'il a montré que la transplantation ectopique de moelle osseuse dans la capsule rénale entraîne non seulement la prolifération des cellules de la moelle osseuse, mais aussi la formation d'os (Friedenstein et al., 1968). Ceci indiquait l'existence d'une seconde population de cellules souches, en plus des cellules hématopoïétiques, donnant naissance à des précurseurs osseux. En raison de la capacité de ces cellules à former des ostéoblastes, Friedenstein leur a donné le nom de cellules souches ostéogéniques. Friedenstein a également été le premier à isoler des cellules adhérentes de type fibroblastique à partir de la moelle osseuse et à montrer leur capacité à proliférer rapidement in vitro sous forme de colonies clonogéniques (colony-forming unit-fibroblast [CFU-F]). Ces cellules dérivées de colonies CFU-F étaient caractérisées par la capacité de se différencier in vitro non seulement en ostéoblastes, mais également en chondrocytes et adipocytes (Figure 15) (Friedenstein et al., 1970, 1974). Le terme « cellules souches mésenchymateuses » a été proposé par Arnold Caplan en 1991 en raison de leur capacité à se différencier en plusieurs types de cellules qui forment le tissu conjonctif de nombreux organes (Caplan, 1991). Ce nom est devenu très populaire et est actuellement le plus couramment utilisé, même s'il reste soumis à controverse (Bianco et al., 2008). Aujourd'hui, il existe de nombreux substituts dans la littérature pour l'abréviation des CSM, y compris cellules stromales multipotentes, cellules stromales de la moelle, cellules souches mésodermiques, cellules stromales mésenchymateuses et bien d'autres. Caplan, dans ses derniers travaux, recommande de renommer ces cellules « Cellules de signalisation médicinale » en raison de l'accent mis sur le mécanisme de leurs effets thérapeutiques après la transplantation, qui serait basé principalement sur la sécrétion de facteurs facilitant les processus de régénération (Caplan, 2017).

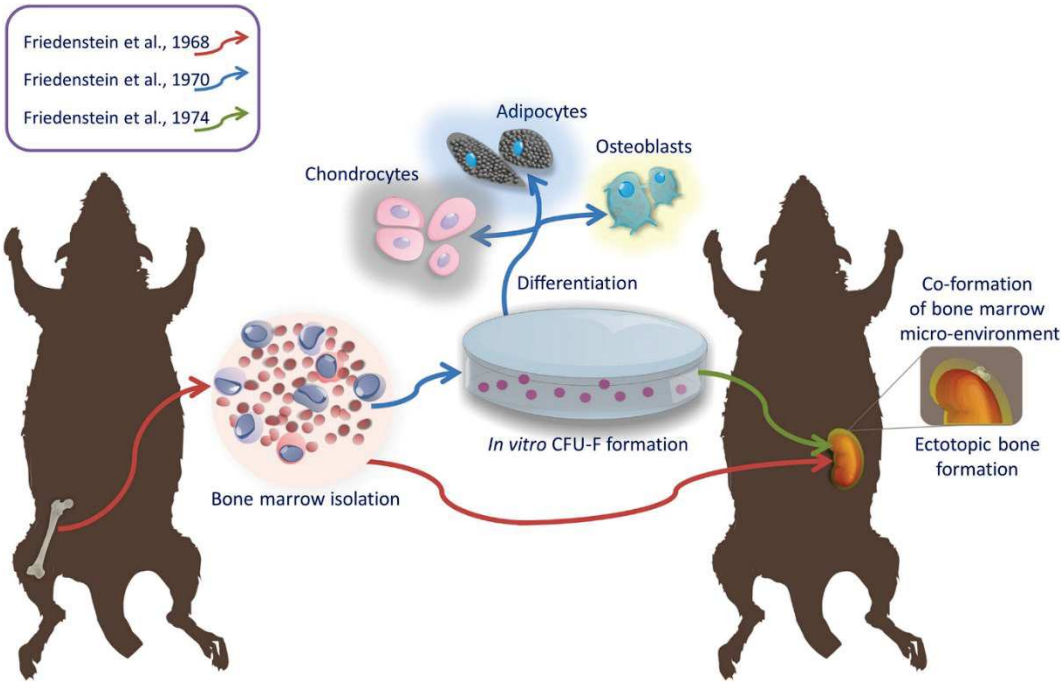


Figure 15 : Démonstration du potentiel souche des cellules dérivées de la moelle osseuse du tissu conjonctif, qui ont ensuite été nommées « cellules souches mésenchymateuses » (d'après Andrzejewska et al., 2019).

En raison de la controverse concernant la nomenclature, le degré de souche et les caractéristiques des cellules découvertes par Friedenstein, l'« International Society for Cellular Therapy » (ISCT) a publié en 2005 un avis précisant que le terme cellule souche mésenchymateuse n'est pas équivalent ou interchangeable avec cellule stromale mésenchymateuse qui est la nomenclature recommandée à présent (Horwitz et al., 2005). Le premier fait référence à une population de cellules souches avec une fonctionnalité démontrable de cellules progénitrices d'auto-renouvellement et de différenciation, tandis que le second fait référence à une population avec des propriétés sécrétrices, immunomodulatrices.

Une cellule souche possède une capacité d'auto-renouvellement illimité et de différenciation en d'autres types cellulaires matures sous certaines conditions. On distingue les cellules souches d'origine embryonnaire des cellules souches adultes. Les cellules souches peuvent également être catégorisées en fonction de leur capacité de différenciation.

Les cellules totipotentes sont les cellules les plus indifférenciées. Un ovocyte fécondé et les cellules des deux premières divisions sont des cellules totipotentes, car elles se différencient en tissus embryonnaires et extra-embryonnaires, formant ainsi l'embryon et le placenta (Rossant, 2001).

Les cellules souches pluripotentes sont capables de se différencier en cellules issues des 3 couches germinales - ectoderme, endoderme et mésoderme - à partir desquelles tous les tissus et organes se

développent (P. De Miguel et al., 2010). Les cellules souches pluripotentes ont d'abord été dérivées de la masse cellulaire interne du blastocyste (Evans et Kaufman, 1981). En 2006, Takahashi et Yamanaka ont généré des cellules pluripotentes en reprogrammant des cellules somatiques (Takahashi et Yamanaka, 2006). Ces cellules sont appelées cellules souches pluripotentes induites (iPSC) et partagent des caractéristiques similaires avec les cellules souches embryonnaires.

Les cellules souches multipotentes se trouvent dans la plupart des tissus et se différencient en cellules d'une seule couche germinale (Ratajczak et al., 2012). Les CSM sont les cellules multipotentes les plus reconnues. Elles peuvent être dérivées d'une variété de tissus, notamment la moelle osseuse, le tissu adipeux, les os, la gelée de Wharton, le sang du cordon ombilical et le sang périphérique (Institute of Medical Sciences, Foresterhill, Aberdeen AB25 2ZD, UK et al., 2010). Ces cellules peuvent se différencier en tissus dérivés du mésoderme tels que le tissu adipeux, les os, le cartilage et les muscles (Kolios et Moodley, 2013). Récemment, les CSM ont été différenciées en tissu neuronal dérivé de l'ectoderme. Il s'agit d'un exemple de transdifférenciation, c'est-à-dire lorsqu'une cellule d'une couche germinale (mésoderme) se différencie en une cellule d'une autre couche germinale (ici l'ectoderme) (Barzilay et al., 2009).

En 2006 l'ISCT a défini les critères minimaux caractérisant les CSM (Dominici et al., 2006; Viswanathan et al., 2019). Toute cellule isolée à partir d'un tissu ou d'un organe répondant aux 3 caractéristiques suivantes est considérée comme CSM :

- Adhérence au plastique en conditions de culture classiques
- Expression des antigènes de surface spécifique CD90, CD73, CD105 et absence des marqueurs CD14 (ou CD11b), CD34, CD45, CD79α (ou CD19) et HLA-DR
- Potentiel multipotent de différenciation, in vitro, en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes.

Concernant l'expression de marqueurs de surface, la liste décrite plus haut n'est pas exhaustive et de nouveaux marqueurs de surface pourraient conduire à des modifications de ces critères à l'avenir. Pour s'assurer que les populations hétérogènes de CSM ne soient pas confondues avec d'autres cellules, l'ISCT recommande de vérifier l'absence de l'expression d'antigènes hématopoïétiques : CD45 (un marqueur pan-leucocytaire), CD34 (marque les progéniteurs hématopoïétiques primitifs et les cellules endothéliales), CD14 et CD11b (exprimés de manière prédominante sur les monocytes et les macrophages), CD79α et CD19 (marqueurs de cellules B qui peuvent adhérer aux CSM en culture) et les molécules HLA-DR qui ne sont pas exprimées sur les CSM à moins d'être stimulées (Gronthos et al., 2003; Sacchetti et al., 2007; Simmons et Torok-Storb, 1991).

Les directives de l'ISCT recommandent l'utilisation du nom de cellules stromales mésenchymateuses multipotentes ; cependant, le nom « cellules souches mésenchymateuses » reste encore très utilisé.

Concernant la différenciation in vitro en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes, des conditions de différenciation de culture tissulaire in vitro standard sont utilisées (Dominici et al., 2006; Horwitz et al., 2005). La plupart des protocoles publiés pour ces voies de différenciations sont similaires, et des kits sont disponibles dans le commerce. Les CSM peuvent générer d'autres types de cellules selon un processus appelé mésengénèse, dans lequel les CSM donnent naissance à des myoblastes, des cellules stromales de la moelle osseuse, des fibroblastes, des cellules du tissu conjonctif ainsi que des ligaments et des tendons (Caplan et Dennis, 2006).

1.4.1.1 Origine et source des CSM

Alors que les cellules remplissant les critères des CSM peuvent être récoltées dans divers tissus à tous les stades de développement (fœtal, jeune, adulte et âgé) en utilisant leur propriété d'adhérence au plastique, il existe de profondes différences entre les populations de CSM obtenues (Liu et al., 2015; Muhammad et al., 2015). La moelle osseuse est historiquement la première source tissulaire à partir de laquelle les CSM ont été obtenues. Cependant, il est nécessaire de réaliser un prélèvement invasif et douloureux pour les patients. Le rendement obtenu est relativement faible et des étapes d'amplification sont nécessaires.

Les CSM ont par la suite été isolées à partir du tissu adipeux et appelées ASC (pour cellules stromales mésenchymateuses du tissu adipeux). Elles sont contenues dans la fraction stromale vasculaire (FSV) du tissu adipeux dont le prélèvement par liposuccion est moins invasif qu'un prélèvement de moelle osseuse. Leur rendement élevé (1000 à 10 000 fois supérieur à celui de la moelle osseuse) et leur facilité d'accès les rendent particulièrement intéressantes (Zuk et al., 2002).

Enfin, les CSM peuvent être obtenues à partir d'autres tissus et sécrétions de l'organisme, tels que le sang périphérique, la pulpe dentaire, le ligament jaune, le sang menstruel, l'endomètre, le lait maternel, ainsi que les tissus fœtaux : liquide amniotique, membranes, villosités choriales, placenta, cordon ombilical, gelée de Wharton et sang de cordon ombilical (Agha-Hosseini et al., 2010; Chen et al., 2011; Erices et al., 2000; Girdlestone et al., 2009; Kassis et al., 2006; Katz et al., 2005; Macias et al., 2010; Marongiu et al., 2010; Meng et al., 2007; Miao et al., 2006; Patki et al., 2010; Poloni et al., 2008; Roubelakis et al., 2007; Zeddou et al., 2010). Une étude réalisée chez la souris a également montré que les CSM pouvaient être présentes dans tous les tissus et les organes (da Silva Meirelles et al., 2006). Même si cette donnée est sujet à controverses, un sous-groupe de CSM a été localisé au niveau périvasculaire, ce qui pourrait expliquer que finalement tous les tissus et organes en contiennent (Crisan et al., 2008).

Les CSM d'origine fœtale par rapport aux CSM adultes se caractérisent par un taux de prolifération plus rapide ainsi qu'un plus grand nombre de doublements de population in vitro avant d'arriver en sénescence réplicative (Hass et al., 2011). Cependant, les CSM dérivées de moelle osseuse et du tissu adipeux sont capables de créer un plus grand nombre de colonies CFU-F, ce qui indique indirectement un degré plus élevé de leur caractère souche. La comparaison de l'expression génique typique des cellules pluripotentes montre que seules les cellules isolées de la moelle osseuse permettent d'observer l'expression du gène SOX2, dont l'activation est associée au processus d'auto-renouvellement des cellules souches ainsi qu'à la neurogenèse au cours du développement embryonnaire (Heo et al., 2016). Des divergences dans la capacité des CSM de diverses sources à se différencier ont été décrites. Le manque de différenciation des CSM dérivées du sang du cordon ombilical vers les adipocytes ainsi que la plus grande tendance des CSM de moelle osseuse et du tissu adipeux à se différencier vers les ostéoblastes ont été observés (Heo et al., 2016; Kern et al., 2006).

En plus de la diversité observée entre les CSM de différentes sources, il existe également des différences liées aux donneurs. Une étude a notamment rapporté que parmi des cellules isolées de moelle osseuse de donneurs d'âges et de sexes différents, les cellules de donneurs âgés sont caractérisées par un pourcentage accru de cellules apoptotiques, et un taux de prolifération plus lent, ainsi qu'une capacité plus faible à se différencier en ostéoblastes (Zhou et al., 2008).

1.4.1.2 Fonctions des CSM

En plus de leur capacité de multipotence, les CSM contribuent également à l'homéostasie tissulaire par leurs fonctions trophiques. De façon générale, ces fonctions sont médiées par l'intermédiaire de la sécrétion de différents facteurs solubles ou contenus dans des vésicules extracellulaires. L'ensemble de ces effets ont été démontrés in vitro et in vivo et sont détaillés dans la Figure 16.

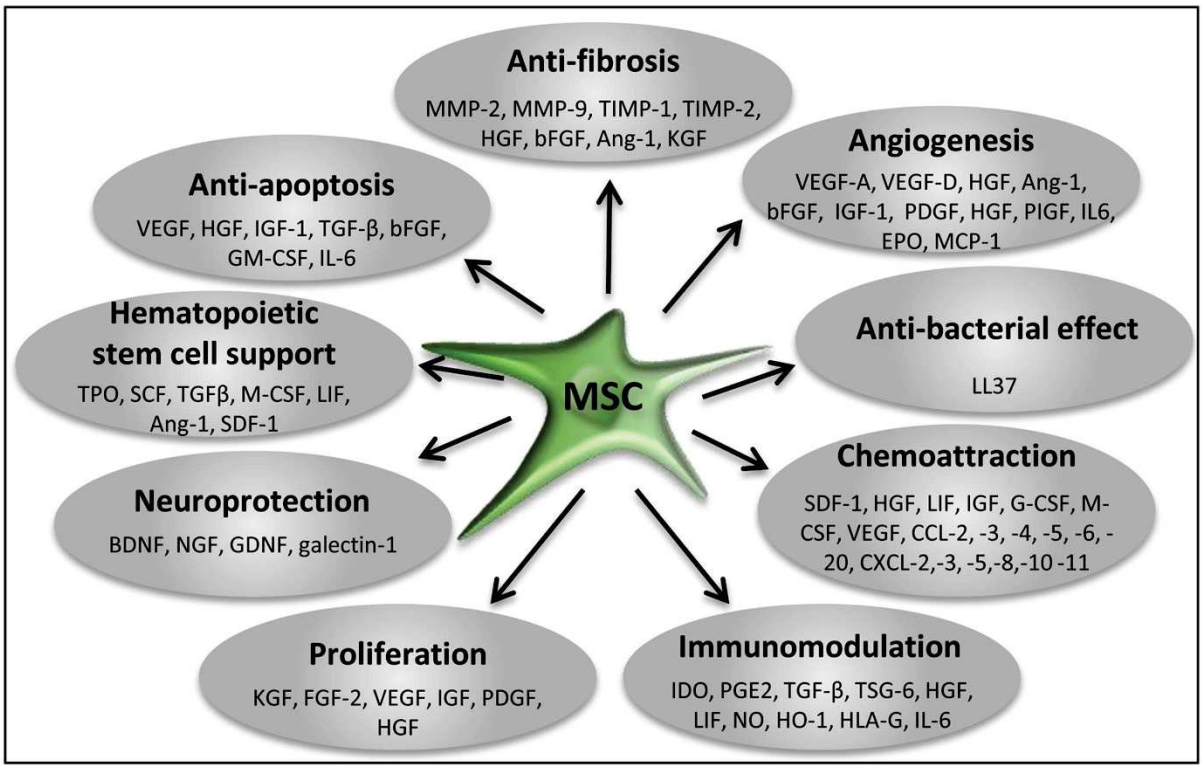


Figure 16 : Les mécanismes médiateurs du soutien trophique dépendant des CSM (d'après Maumus et al., 2013).

1.4.1.2.1 Rôle immunomodulateur

Une des principales fonctions des CSM est leur propriété immunomodulatrice. Les CSM cultivées in vitro ont la capacité d'interagir et de réguler la fonction de la majorité des cellules effectrices impliquées dans les processus de réponse immunitaire innée et acquise (Krampera et al., 2013). Ces propriétés immunomodulatrices sont illustrées en Figure 17. Elles exercent leurs effets immunomodulateurs en inhibant la prolifération et l'activation des cellules mononucléées du sang périphérique (Moll et al., 2011; Tu et al., 2010).

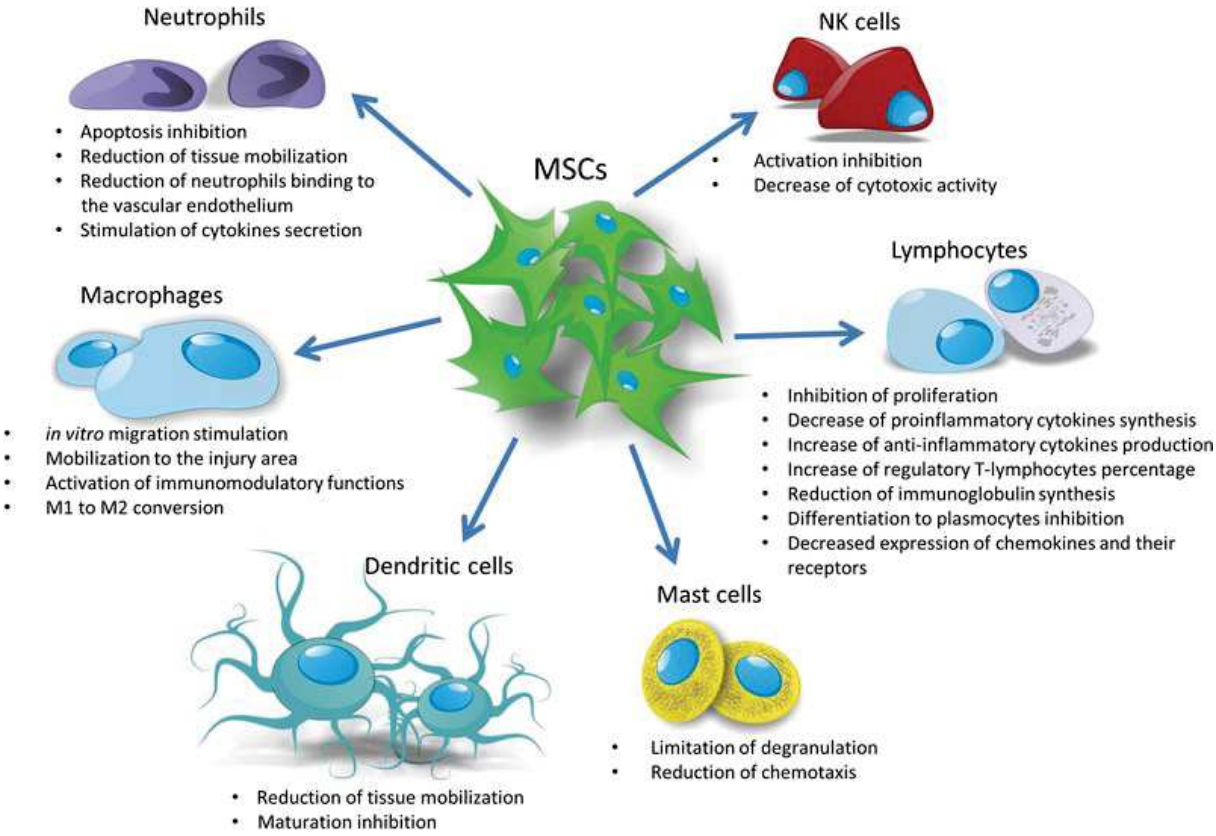


Figure 17 : Représentation schématique des capacités immunomodulatrices des CSM (d'après Andrzejewska et al., 2019).

Les CSM limitent la dégranulation des mastocytes, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par ces cellules ainsi que les facteurs chimiotactiques (Brown et al., 2011). Les CSM ont la capacité de bloquer la prolifération et contribuent également à la réduction de l'activité cytotoxique des cellules NK (Spaggiari et al., 2006, 2008). Elles inhibent la différenciation des cellules dendritiques immatures en cellules matures et limitent la mobilisation des cellules dendritiques vers les tissus (Su et al., 2011). Sous leur influence, les macrophages M1 (pro-inflammatoires) se polarisent en macrophages de type M2, avec un phénotype plutôt anti-inflammatoire, et l'IL-10 qu'ils sécrètent inhibe la prolifération des lymphocytes T (Chen et al., 2014; Gao et al., 2014a). Un effet immunomodulateur direct sur des lymphocytes T CD4+ et CD8+ et des lymphocytes B a été observé (Glennie et al., 2005). De plus, les CSM réduisent le niveau de cytokines pro-inflammatoires synthétisées par les lymphocytes T, telles que le TNF-α et l'IFN-γ (interféron γ) (Yañez et al., 2006), et augmentent la synthèse de cytokines anti-inflammatoires, par exemple IL-4 et IL10. Dans l'ensemble, les CSM régulent la différenciation des cellules lymphocytaires T et B, la polarisation des macrophages et induisent la génération de cellules Treg (Aggarwal et Pittenger, 2005; Corcione et al., 2006; Ghannam et al., 2010).

1.4.1.2.2 Rôle anti-apoptotique

Au sein de l'environnement cellulaire, de nombreux signaux peuvent être à l'origine du déclanchement du processus d'apoptose. Il a été rapporté que les CSM et/ou leur surnageant de culture limitent l'apoptose de fibroblastes de poumon (Kim et al., 2012), de cardiomyocytes (He et al., 2009), des cellules épithéliales du tube proximal du rein (Imberti et al., 2007), de cellules musculaires (Kwon et al., 2016) ou encore des cellules endothéliales (Rehman et al., 2004) in vitro et/ou in vivo. Elles limitent également les lésions d'ischémie-reperfusion de moelle épinière en diminuant les phénomènes apoptotiques (Yin et al., 2014). L'effet anti-apoptotique des CSM est notamment permis par des facteurs tels que : VEGF, HGF, IGF-1, TGF-b, bFGF, GM-CSF, IL6 (Cantinieaux et al., 2013; Eliopoulos et al., 2010; Eom et al., 2015; Maumus et al., 2013a).

1.4.1.2.3 Rôle anti-fibrotique

L'inflammation chronique est un facteur clé de la fibrose. Les CSM améliorent la fibrose en diminuant l'infiltration des monocytes/macrophages et des lymphocytes B tout en supprimant l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α et l'IL-1β dans la fibrose hépatique et la fibrose pulmonaire (Chen et al., 2019; Zuk et al., 2002). L'administration de CSM dans un modèle de fibrose hépatique chez le rat permet également de diminuer la fibrose (Duman et al., 2019). Enfin, il a été rapporté que les exosomes isolés à partir de CSM réduisent la fibrose pulmonaire dans un modèle de dysplasie bronchopulmonaire chez la souris (Willis et al., 2018).

Le TGF-β est considéré comme un régulateur important de la fibrose. Le TGF-β augmente la synthèse des protéines matricielles en modulant l'équilibre entre les MMP et l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases (Biernacka et al., 2011). Les CSM dérivées des amygdales atténuent la fibrose hépatique en réduisant l'expression du collagène I et du TGF-β de manière autophagie-dépendante, car l'inhibition de l'autophagie par la bafilomycine A1 abolit l'effet protecteur des CSM (Park et al., 2015).

Une autre voie de signalisation couramment liée à la fibrose est la signalisation Wnt. Les protéines Wnt sont augmentées dans les tissus fibreux chez l'humains. Plusieurs études ont démontré que les effets protecteurs des CSM dans les conditions fibrotiques sont médiés, au moins en partie, par la modulation de la signalisation TGF-β et Wnt (Cai et al., 2015; Li et al., 2012; Wang et al., 2014). Une autre étude a rapporté que les exosomes dérivés de CSM humaines atténuent également la fibrose hépatique en favorisant la régénération des hépatocytes via la modulation de la signalisation Wnt/β-caténine (Rong et al., 2019).

L'HGF est un médiateur essentiel des activités anti-fibrotiques des CSM dans plusieurs pathologies fibrotiques (Cahill et al., 2016; Lan et al., 2017; Li et al., 2012). Il diminue l'expression du TGFβ1 et

augmente la libération de MMP1 favorisant ainsi la dégradation du collagène (Taniyama et al., 2002). Il inhibe la synthèse des collagènes I et IV par les cellules hépatiques stellaires en induisant l'expression de miR-29a (Kwiecinski et al., 2011).

A ce jour, bien que de nombreux travaux aient démontré l'effet thérapeutique des CSM dans différents modèles de fibrose, tous les mécanismes moléculaires anti-fibrotiques ne sont pas encore élucidés (Rockel et al., 2020).

1.4.1.2.4 Autres rôles des CSM

Les CSM exercent une activité pro-angiogénique en agissant comme des cellules de type péricyte pour soutenir le nouveau système vasculaire et en sécrétant des facteurs, tels que le VEGF, le PDGF, le bFGF, l'IGF-1, HGF et PIGF. Les CSM sont en partie résistantes au stress oxydatif et sécrètent de puissantes molécules antioxydantes, à savoir l'hème oxygénase (HO)-1 et l'érythropoïétine (EPO). Ces facteurs peuvent moduler la production de molécules anti-oxydantes dans les tissus lésés, comme la superoxyde dismutase (SOD) ou la glutathion peroxydase (GSH-Px) (de Almeida et al., 2013; Ruiz et al., 2016).

1.4.1.2.5 Effets sénomorphiques

Des travaux récents ont confirmé l'effet protecteur des CSM sur la sénescence de chondrocytes arthrosiques, induite par des dommages à l'ADN (Malaise et al., 2019). Les CSM sont capables de réduire l'expression de molécules du SASP (TGF-β1, ADAMTS3, ADAMTS5) ainsi que l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire associés à la sénescence, à savoir p16INK4a, p15INK4b et p27KIP1 par les chondrocytes arthrosiques. En revanche, lorsqu'elles sont sénescentes, les CSM perdent leur capacité à réguler l'expression de p16INK4a, p15INK4b, p27KIP1 et des facteurs du SASP (TGF-β1 et ADAMTS3). Ainsi, l'effet sénosuppresseur des CSM semble impacté par leur entrée en sénescence. L'effet du sécrétome de CSM humaines sur les marqueurs de sénescence de chondrocytes arthrosiques a été évalué in vitro. Le milieu conditionné des CSM est capable de réguler à la baisse les marqueurs de sénescence, notamment l'activité SA-β-gal, l'accumulation de foyers γH2AX, la production de marqueurs du stress oxydant, l'activation des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK), l'expression de la cavéoline-1 et celle de p21 chez des chondrocytes soumis à un stress inflammatoire (Platas et al., 2016). Cet effet est médié par l'augmentation de l'expression de SIRT1 qui en retour diminue l'activité de p53. Des résultats similaires ont été décrits sur des ostéoblastes humains arthrosiques (Tofiño-Vian et al., 2017). De plus, la production de médiateurs inflammatoires tels que l'IL-6 et la PGE2 était fortement diminuée ce qui démontrait que le milieu conditionné des CSM exerce un effet protecteur sur des chondrocytes ou des ostéoblastes arthrosiques en contrant la sénescence prématurée induite par un stress inflammatoire. De plus, il a été rapporté que le sécrétome de CSM

fœtales humaines améliore la sénescence réplicative des CSM adultes, comme le montre une activité SA-β-gal significativement réduite, une prolifération cellulaire accrue et un potentiel de différenciation ostéogénique supérieur (Wang et al., 2016).

Les mécanismes sénosuppresseurs des CSM et de leur sécrétome ne sont pas encore élucidés mais les données de la littérature suggèrent que les EV libérées par les CSM seraient majoritairement responsables de leur effet protecteur (Boulestreau et al., 2020).

1.4.2 Les EV de CSM

1.4.2.1 Les différents types de vésicules extracellulaires

Les EV sont des vésicules nanométriques constituées d'une bicouche protéolipidique et présentes dans tous les fluides biologiques. Toutes les cellules sont capables de sécréter divers types d'EV (van Niel et al., 2018). La sécrétion des EV a été initialement décrite comme un moyen d'éliminer les déchets de la cellule (Johnstone et al., 1987). Aujourd'hui, nous savons que les EV sont bien plus que de simples transporteurs de déchets cellulaires. Leur intérêt porte désormais sur leur capacité à échanger des composants entre les cellules, allant des acides nucléiques aux lipides et aux protéines, et à agir comme vecteurs de signalisation dans les processus homéostasiques cellulaires normaux ou suite à des développements pathologiques (Colombo et al., 2014; Lo Cicero et al., 2015; Yáñez-Mó et al., 2015).

Historiquement, la première étude démontrant l'existence des EV a été publiée en 1946 à partir de prélèvements sanguins. Les EV étaient considérées alors comme de simples fragments de membranes ou de cellules (Chargaff et West, 1946). En 1967, ces fragments sont décrits pour la première fois à l'aide de la microscopie électronique (Wolf, 1967). En 1977, De Broe a décrit la libération de ces « fragments membranaires » comme une caractéristique omniprésente des cellules viables (De Broe et al., 1977). Jusqu'aux années 80, ces « fragments » étaient considérés comme de la « poussière » plaquettaire ou des débris cellulaires bourgeonnant directement de la membrane plasmique (Wolf, 1967). Ce sont finalement ces premières études qui ont décrit les premières « microparticules » ou « microvésicules ». En 1981, les travaux de Trams et al décrivent deux populations d'EV de taille distincte : l'une dont le diamètre est compris entre 500 et 1000 nm, et l'autre dont le diamètre avoisine les 40nm. Ces dernières semblent provenir d'un mécanisme plus complexe qu'un simple bourgeonnement de la membrane plasmique notamment du fait de leur composition lipidique (Trams et al., 1981). C'est la première fois que le terme « exosomes » apparaît dans la littérature. En 1983, est observée l'exocytose de vésicules provenant de la fusion de corps multivésiculaires d'origine endosomale avec la membrane plasmique chez des réticulocytes (Harding et al., 1983).

Même si le terme générique d'EV est actuellement utilisé pour désigner toutes ces vésicules extracellulaires, elles sont en fait très hétérogènes. Les EV sont classées en trois types (Figure 18) selon

leur mécanisme de libération et leur taille : les exosomes ; les microvésicules (MV) ou microparticules (MP) ou ectosomes et les corps apoptotiques (D'Souza-Schorey et Clancy, 2012).

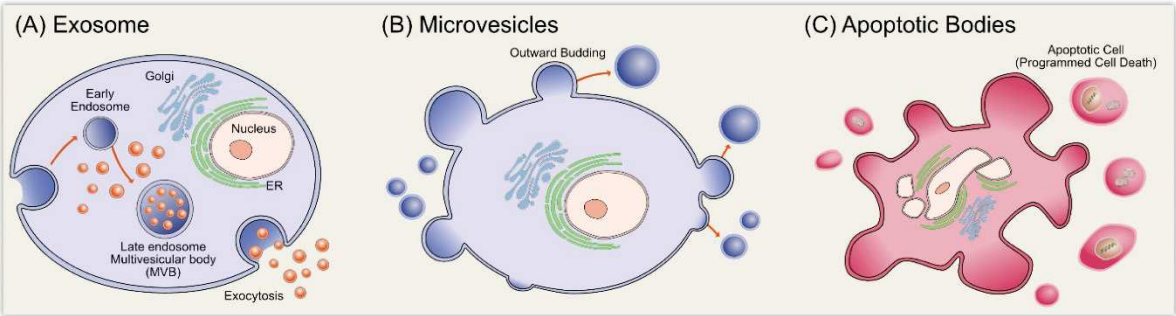


Figure 18 : Les principaux types d'EV (d'après Gurunathan et al., 2019).

Les exosomes sont des EV de petite taille : celle-ci peut varier entre 50 et 150nm. Pour un échantillon donné, la population d'exosomes présente une taille généralement homogène. La libération des exosomes par les cellules est constitutive. Ils sont issus du compartiment endosomal de la cellule.

Les microvésicules (MV), appelées dans certaines études « microparticules », sont des EV de taille moyenne, comprise entre 100nm et 500nm. Les MV naissent du bourgeonnement de la membrane plasmique, c'est pourquoi les marqueurs de surface de la cellule d'origine peuvent aider pour la caractérisation des MV. La formation puis la libération des MV dans le compartiment extracellulaire ne sont pas constitutives comme pour les exosomes, mais induites par un signal environnemental.

Les corps apoptotiques sont les EV possédant la taille la plus importante, supérieure à 500 nm. Les corps apoptotiques sont formés lors de la vacuolisation cellulaire et de la fragmentation lors de l'apoptose (D'Souza-Schorey et Clancy, 2012). Ils contiennent de fait des résidus cytoplasmiques ou nucléaires en proportion variable selon la partie de la cellule fragmentée. La suite de ce manuscrit ne portera que sur les exosomes et les MV.

1.4.2.2 Biogénèse des vésicules extracellulaires

Même si la génération de microvésicules et d'exosomes se produit à des sites distincts au sein de la cellule, des mécanismes intracellulaires et des processus de tri communs sont impliqués dans la biogenèse des deux entités.

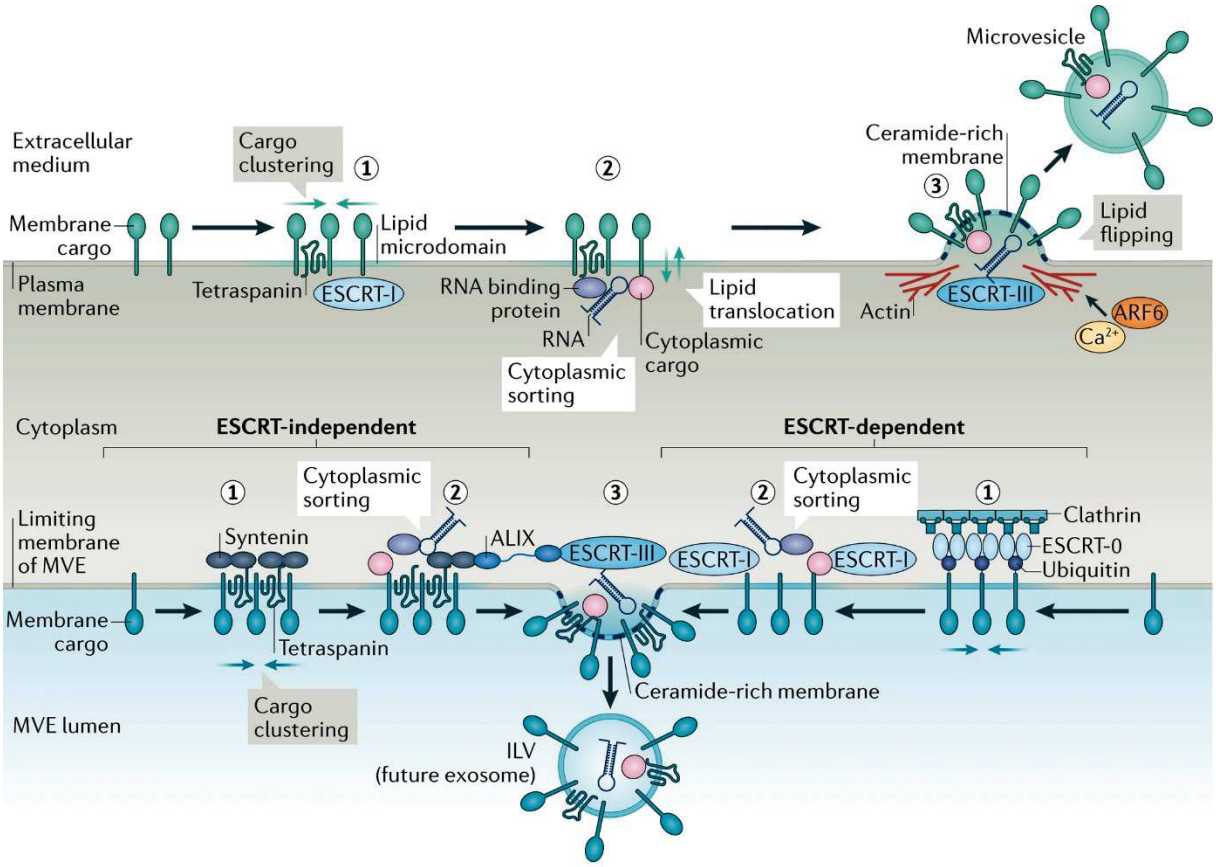


Figure 19 : Biogénèse des vésicules extracellulaires (d'après van Niel et al., 2018).

Les mécanismes de biogénèse des exosomes et des MV peuvent être découpés en 3 grandes étapes (illustré par la Figure 19). Premièrement, les lipides et les protéines associés à la membrane sont regroupés dans des microdomaines membranaires enrichis en tétraspanines (CD9, CD63, CD81, CD82), au niveau de la membrane plasmique pour les MV et de la membrane limitante de l'endosome multivésiculaire (MVE) pour les exosomes (Hemler, 2003). Deuxièmement, ces microdomaines participent au recrutement de composants solubles, tels que les protéines cytosoliques et des ARN, qui sont destinés à être inclus dans les EV. Troisièmement, la formation de ces microdomaines favorise le bourgeonnement de la membrane suivi d'un processus de fission, soit au niveau de la membrane plasmique vers le milieu extracellulaire, soit au niveau de la membrane limitante du MVE vers la lumière du MVE. Les mécanismes de biogenèse des exosomes sont assez bien compris et impliquent surtout des sous-unités du complexe de tri endosomal nécessaires au transport (ESCRT). Par exemple : ESCRT-III est nécessaire pour la scission des vésicules intraluminales (ILV) dans la lumière du MVE, mais le chargement, le regroupement et le bourgeonnement membranaire peuvent se produire par des mécanismes dépendants ou indépendants de l'ESCRT. Les mécanismes impliqués dans la biogenèse des microvésicules restent à élucider. Les mécanismes moléculaires qui agissent aux différentes étapes de la biogenèse des EV sont en partie communs aux exosomes et aux microvésicules (y compris les protéines ESCRT et la génération de céramide par la sphingomyélinase) (van Niel et al., 2018).

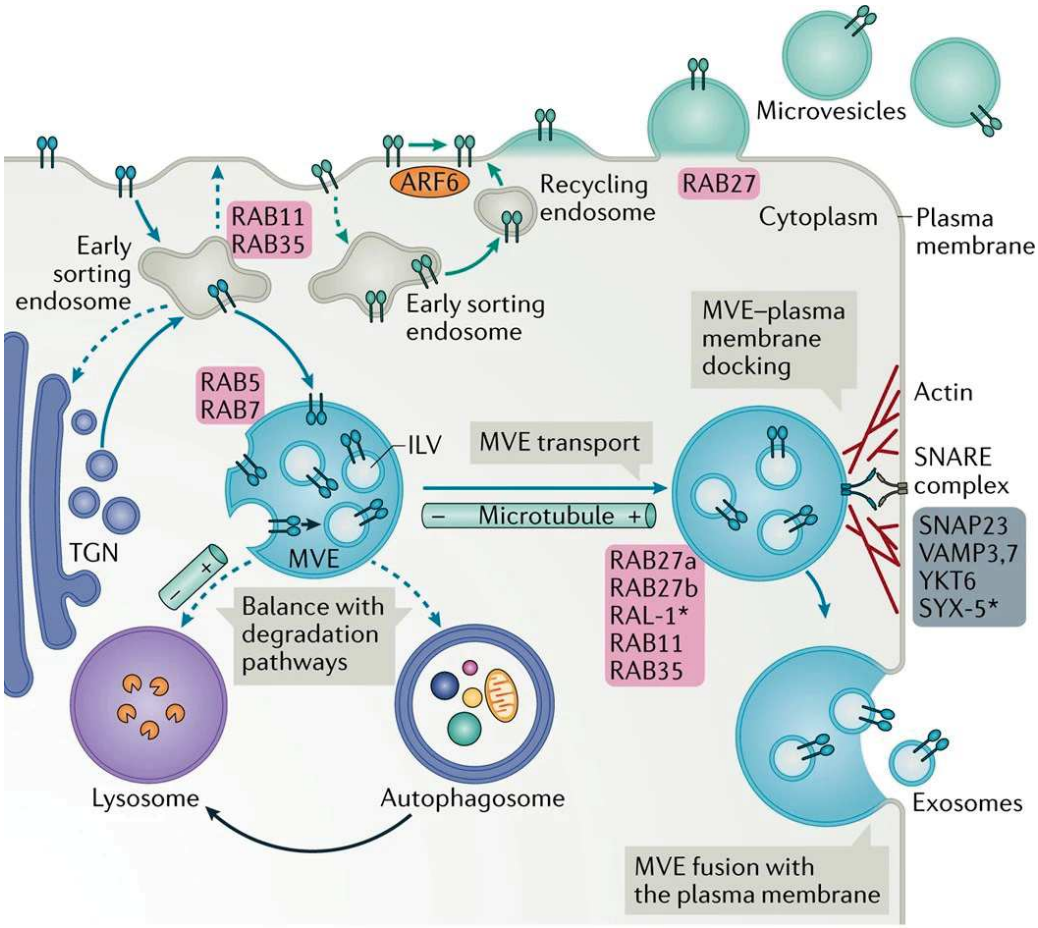


Figure 20 : Interdépendance des voies de trafic intracellulaire dans la génération des vésicules extracellulaires (d'après van Niel et al., 2018).

Dans le cas spécifique des MVB, lorsque les vésicules intra-luminales sont libérées dans l'espace luminal, il est nécessaire que cet endosome soit réadressé à la membrane et qu'il libère les vésicules dans l'espace extracellulaire (illustré par la Figure 20). Pour différencier les MVB destinés à fusionner avec le lysosome ou ceux réadressés à la membrane plasmique, la cellule doit pouvoir les distinguer. Il semblerait que la membrane des endosomes destinés à être recyclés soit riche en lipides et en tétraspanines, ce qui permettrait en partie de les distinguer de ceux destinés à être lysés. Ensuite, le déplacement du MVB recyclé jusqu'à la membrane fait principalement intervenir les protéines du cytosquelette, les kinésines et les protéines Rab (Ostrowski et al., 2010). Enfin, la fusion des MVB avec la membrane plasmique nécessite l'intervention des protéines SNARE (Récepteur des protéines d'attachement du facteur soluble sensible au N-ethylmaleimide) qui permettent l'union des deux bicouches lipidiques qui se sont rapprochées (Raposo et Stoorvogel, 2013).

1.4.2.3 Mécanismes d'interaction des vésicules extracellulaires

Une fois libérées dans l'espace extracellulaire, les EV peuvent atteindre les cellules réceptrices et délivrer leur contenu à la cellule hôte. Le mode d'interaction des EV avec la surface cellulaire et les

mécanismes qui interviennent dans le transfert du contenu des EV ne sont pas complètement élucidés. Ces processus sont complexes et dépendent de l'origine des EV et des cellules réceptrices (Mulcahy et al., 2014). Néanmoins, les mécanismes d'interactions des EV avec les cellules receveuses sont en partie décrits (Figure 21). Au niveau de la cellule receveuse (qui peut être la cellule productrice elle-même), les EV vont se fixer à la surface cellulaire.

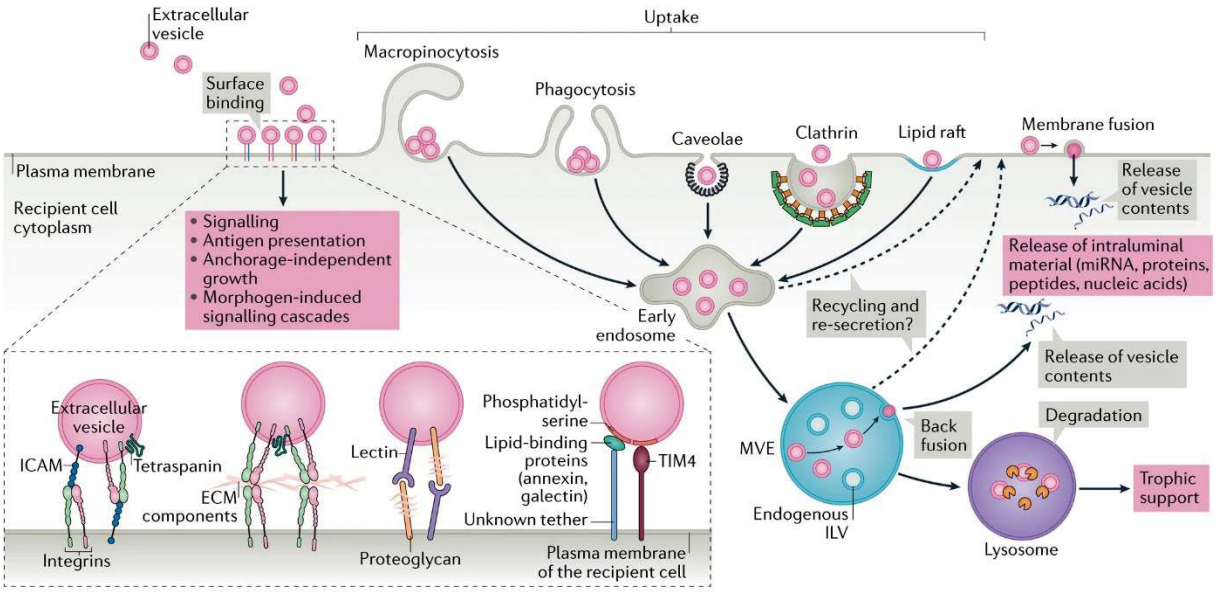


Figure 21 : Devenir des vésicules extracellulaires dans les cellules receveuses (d'après van Niel et al., 2018).

Selon le type cellulaire, elles peuvent rester liées à la surface (par exemple, aux intégrines) et peuvent communiquer avec leurs cibles au travers d'interactions dites « ligand-récepteur ». Elles peuvent ainsi activer une ou plusieurs voies de signalisation après transduction du signal (par exemple, la présentation de l'antigène). Il y a plusieurs voies d'internalisation des EV décrites (van Niel et al., 2018). D'une part, les EV peuvent fusionner avec la membrane plasmique de la cellule cible et libérer directement leur contenu dans le cytoplasme, à l'image de ce qui est décrit dans les fusions de particules virales avec leurs cibles (Jahn et Südhof, 1999). D'autre part, elles peuvent être internalisées par la cellule cible en suivant la voie classique d'endocytose. De ce fait, leur contenu pourra être soit dégradé, soit recyclé à la membrane, soit libéré dans le cytoplasme de la cellule cible. L'internalisation peut se faire selon la voie d'endocytose dépendante de la clathrine (Tian et al., 2014) ou selon les différentes voies d'endocytose indépendantes de la clathrine : macropinocytose, rafts lipidiques, phagocytose, cavéoles (Feng et al., 2010; Nakase et al., 2015; van Niel et al., 2018).

1.4.3 Isolement et caractérisation des vésicules extracellulaires

1.4.3.1 Séparation et concentration des EV

Diverses techniques de séparation et concentration des EV (illustré par la Figure 22) ont été adoptées telles que l'ultracentrifugation, l'ultrafiltration, la chromatographie d'exclusion de taille (SEC), la précipitation à base de polymère et la capture par affinité sur des billes magnétiques couplées à des anticorps pour ne citer que les plus utilisées (Chen et al., 2010; Koliha et al., 2016; Li et al., 2017; Livshits et al., 2015; Lobb et al., 2015; Momen-Heravi et al., 2013; Peterson et al., 2015). La méthode de référence la plus courante et la plus utilisée est l'ultracentrifugation différentielle à partir d'un milieu conditionné de culture cellulaire ou de différents fluides, notamment du plasma, du sérum, de la salive, du liquide amniotique, du lait maternel et de l'urine (Ashcroft et al., 2012; Balaj et al., 2011; Dalton, 1975; Gabel et al., 2020; Keller et al., 2011; Wiggins et al., 1987). Le choix dépend du sous-type d'EV collecté, mais également du fluide (et notamment de son volume) à partir duquel on souhaite les isoler.

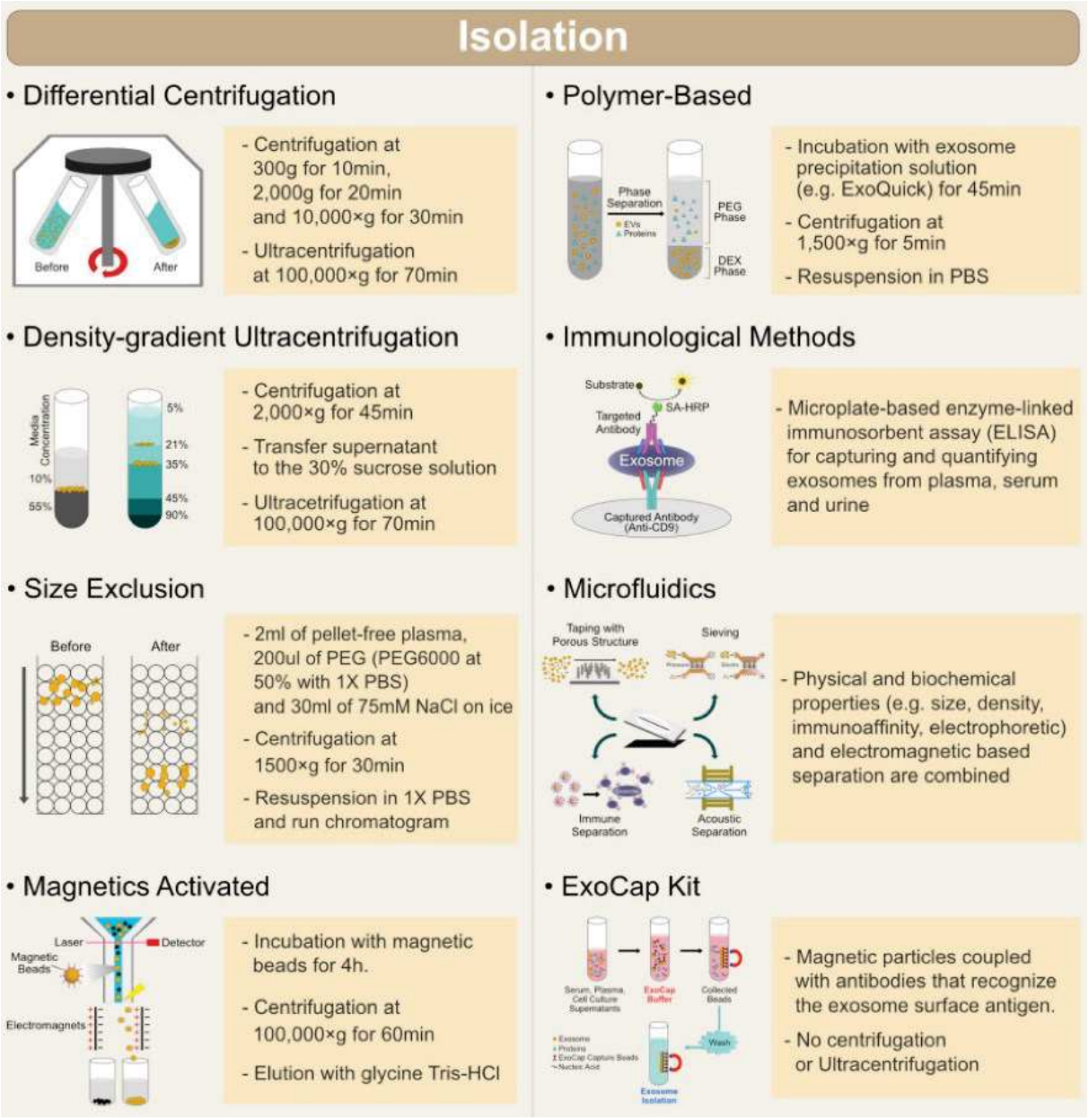


Figure 22 : Diverses techniques utilisées pour la séparation et la concentration des EV (Adapté d'après Gurunathan et al., 2019).

1.4.3.1.1 Méthode par ultracentrifugation

L'ultracentrifugation (UC) est actuellement la technique d'isolement la plus largement utilisée pour séparer et concentrer les EV. L'ultracentrifugation différentielle permet de séparer les sous-populations d'EV selon leur taille et/ou leur densité. L'ultracentrifugation est principalement divisée en deux étapes : tout d'abord, une série de centrifugation à basse (300g) et moyenne (2500g) vitesse pour éliminer les cellules mortes, les débris cellulaires et les corps apoptotiques, puis pour séparer les EV à une vitesse plus élevée avec une force centrifuge de 100 000 g au moins. Les EV sont ensuite lavées avec du PBS pour éliminer un maximum d'impuretés telles que les protéines contaminantes (Théry et al., 2006). Cependant, cette technique encombrante et chronophage nécessite l'achat d'un

équipement au coût élevé, et ne permet pas de séparer les EV des agrégats lipoprotéiques, même si l'étape de lavage au PBS en élimine une grande partie.

L'ultracentrifugation sur gradient de densité peut être utilisée pour améliorer la pureté des EV. Il en existe deux types principaux, l'une utilisant le saccharose et l'autre l'iodixanol. Un des avantages de l'utilisation du gradient de densité est qu'il permet de séparer les EV des agrégats lipoprotéiques. La population d'EV collectées sera composée principalement d'exosomes et non de MV de petite taille qui n'auraient pas la même densité (Raposo et Stoorvogel, 2013). De plus, l'utilisation de ce protocole a mis en évidence différents sous-types d'exosomes qui sédimenteraient différemment sur le gradient (Bobrie et al., 2012), limitant ainsi l'exhaustivité de cette méthode de collecte en exosomes. Enfin, la viscosité élevée de la solution de saccharose réduit la vitesse de sédimentation des exosomes, ce qui allonge la durée du processus (Zhang et al., 2020).

1.4.3.1.2 Méthodes basées sur la taille

Ces techniques font principalement référence à l'ultrafiltration et à la chromatographie d'exclusion stérique, qui séparent les EV des autres composants des échantillons biologiques, en fonction de leur différence de taille.

La SEC permet d'éliminer les protéines solubles qui passent au travers des pores et de retenir seulement les particules de plus gros diamètre hydrodynamique, dont les EV. Les cellules mortes et les débris auront été éliminés au préalable par des centrifugations à faible vitesse. Les rendements sont importants par cet outil (Lozano-Ramos et al., 2015). Les exosomes isolés ont une structure intacte et une taille uniforme, et leurs caractéristiques biologiques ne sont pas affectées, mais elles peuvent être dopées avec d'autres particules de taille similaire, entraînant une pureté réduite (Böing et al., 2014). Néanmoins, un temps de fonctionnement relativement long est toujours nécessaire, ce qui limite l'application dans le traitement de multiples échantillons biologiques (Yang et al., 2019).

Les méthodes d'ultrafiltration utilisent généralement des membranes d'ultrafiltration avec différents seuils de poids moléculaire pour séparer sélectivement les EV. Premièrement, l'ultrafiltration sur une membrane semi-perméable, permet de séparer les vésicules dont le diamètre est inférieur à celui du pore de la membrane utilisée des plus grosses. Deuxièmement, il existe des kits d'ultrafiltration sur colonne. Les colonnes sont composées de membranes capturant des EV d'un poids moléculaire donné. Cela permet de séparer d'un côté les petites EV et de l'autres les grosses EV (ainsi que les corps apoptotiques). Cependant ces types de colonnes ne sont pas adaptés aux fluides de grands volumes, tels que les surnageants de culture par exemple.

Enfin, il existe l'ultrafiltration séquentielle, qui consiste à filtrer le fluide en différentes étapes. Dans un premier temps, le fluide passe au travers d'une membrane semi-perméable pour éliminer les gros éléments (cellules, débris, corps apoptotiques). Puis la filtration tangentielle du liquide recueilli sur une membrane ne laisse passer que les protéines solubles. Enfin, les éléments retenus par la précédente membrane sont ultrafiltrés au travers de pores afin de conserver seulement les EV. Les effets sur l'intégrité et la fonctionnalité des EV, liés à ce type de technique de purification, ne sont pas encore connus (Vergauwen et al., 2017).

1.4.3.1.2.1 Méthode par précipitation

Cette technique de séparation et de purification des EV repose sur la précipitation des EV grâce à des polymères hydrophiles tels que le PEG (polyéthylène glycol). À la suite de la liaison des polymères et des molécules d'eau, les EV (hydrophobes) deviennent moins solubles et précipitent. Les EV sont ensuite récupérées par des centrifugations à basse vitesse. Le processus est relativement facile à mettre en œuvre sans nécessiter d'équipement spécialisé ou une longue durée de fonctionnement. Et une gamme de kits d'extraction à base de PEG très faciles à réaliser existent. Cependant cette méthode n'exclue pas les contaminations des EV par les molécules du polymère ni avec les protéines du milieu qui peuvent co-précipiter.

1.4.3.1.2.2 Méthode par immunoaffinité

Enfin, la chromatographie de capture par immunoaffinité est basée sur l'utilisation d'anticorps de capture, couplés à des billes magnétiques (ou à d'autres matrices), spécifiques des antigènes ou des protéines de surface des EV (Fitzgerald et al., 2017), telles que CD9, CD63 et CD81. Ces méthodes sont plus spécifiques des exosomes, mais elles peuvent aussi purifier des protéines solubles présentes dans le fluide. Cette méthode présente des avantages en raison de la haute affinité des interactions antigène-anticorps, qui permettent une importante sélectivité. Néanmoins, cette technique n'est pas appropriée pour séparer les EV d'un grand volume d'échantillon. Par ailleurs, certaines vésicules peuvent ne pas porter à leur membrane la protéine d'intérêt, ce qui limite l'exhaustivité de cette technique. Enfin, ce procédé d'enrichissement par affinité présente un coût élevé et un faible rendement.

1.4.3.2 Caractérisation des vésicules extracellulaires

Les EV peuvent être identifiées par leur morphologie, leur taille, la teneur en protéines et en lipides et les marqueurs de surface. Les méthodes les plus couramment utilisées pour caractériser les EV sont présentées dans la Figure 23.

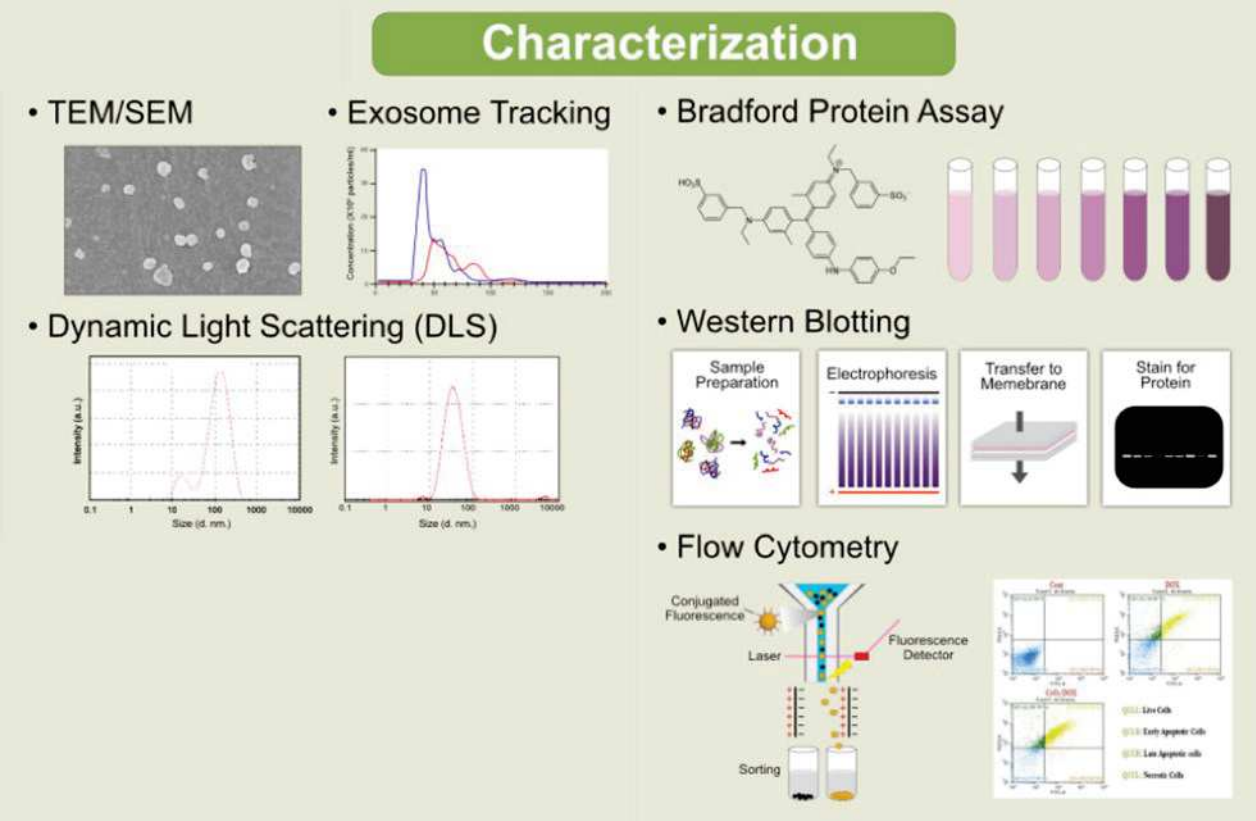


Figure 23 : Caractérisation des EV par différentes méthodes (adapté de Gurunathan et al., 2019).

1.4.3.2.1 Identification basée sur la morphologie

Des méthodes telles que la microscopie électronique à transmission (MET), la microscopie électronique à balayage (MEB), la microscopie cryo-électronique (Cryo-MET) et la microscopie à force atomique (AFM) sont couramment utilisées pour caractériser la microstructure des EV. La MEB permet d'observer la structure de surface, la MET permet d'analyser la structure interne et de fournir des informations sur la granulométrie. La résolution du MEB est inférieure à celle de la MET. La cryo-MET est une autre technique utilisée pour observer la morphologie de surface et la structure des EV. A la différence de la MEB ou de la MET qui nécessitent un grand volume d'échantillons pour la fixation et la coloration, la cryo-MET est capable d'analyser des formes congelées d'EV tout en évitant les effets des fixateurs chimiques et de la déshydratation (Yang et al., 2019; Zhang et al., 2020).

1.4.3.2.2 Identification basée sur la taille

L'analyse du suivi des nanoparticules (Nanoparticle Tracking analysis : NTA) et la diffusion dynamique de la lumière (Dynamic light scattering : DLS) sont deux techniques intéressantes pour mesurer la distribution des particules en suspension.

La DLS mesure la taille des EV. La limite inférieure de mesure est de 10 nm, ce qui convient à la détermination de systèmes monodispersés. Elle ne convient pas à la mesure d'échantillons d'EV

complexes avec une large gamme de tailles ; la concentration d'EV ne peut pas être détectée et il est difficile de distinguer les protéines contaminantes des EV. Cet outil est donc délaissé, depuis quelques années, au profit du NTA.

La NTA permet la détection de la taille et de la concentration des EV. La vitesse d'analyse est rapide et les EV peuvent être observées en temps réel. La résolution est supérieure à celle du cytomètre en flux et la limite inférieure de la mesure des particules peut atteindre 30 à 40 nm. Néanmoins, l'opération est compliquée et il est difficile de distinguer les protéines contaminantes des EV. Les niveaux de caméra et les seuils de détection affecteront également la quantification des exosomes (Yang et al., 2019; Zhang et al., 2020).

Les cytomètres en flux conventionnels peuvent mesurer des particules supérieures à 300 nm, mais ne sont pas capables de détecter des particules plus petites. Par conséquent, ces instruments ne permettent pas la détection directe des EV de petite taille (Suárez et al., 2017). Une nouvelle génération de cytomètres à l'échelle nanométrique (Nanoscale Flow Cytometer) ayant une meilleure sensibilité sont en cours de développement (Chandler et al., 2011). Les avantages de cette technique sont la détection d'EV de taille inférieure à 300 nm et la quantification des EV en fonction du niveau d'expression de l'antigène ciblé par l'anticorps de détection (Orozco et Lewis, 2010).

Toutes ces technologies permettent de quantifier un nombre de particules dans un échantillon, avec les limites mentionnées pour chacune d'entre elles. La mesure de la concentration en protéines des échantillons (Bradfort, microBCA) permet d'estimer également une quantité approximative d'EV présentes par leur contenu en protéines, ce qui n'équivaut pas à une quantité de particules présentes. En effet, la quantité de protéines peut être modulée par la quantité de particules présentes, par le contenu des vésicules mais également par les contaminants protéiques retenus lors des étapes de purification des EV.

1.4.3.2.3 Détermination du contenu des EV

La caractérisation moléculaire des EV est basée principalement sur l'identification des protéines témoignant de l'origine endosomale de certaines EV ou de l'origine membranaire des MV qui comportent les molécules de surface associées à la membrane plasmique des cellules parentales (Figure 24). Ainsi, pour les mettre en évidence, on peut utiliser des outils classiques de biologie cellulaire tels que le western blot ou les techniques immunoenzymatiques (ELISA). Certains marqueurs peuvent également être validés en cytométrie en flux à l'aide d'anticorps spécifiques. De plus, ces outils permettent aussi de s'assurer de l'absence de contamination dans l'échantillon, comme le requièrent les recommandations de l'ISEV de 2018 (Théry et al., 2018). Par exemple, pour des EV isolées à partir de surnageant de culture cellulaire, il est nécessaire de s'assurer de l'absence de

contamination par le sérum lorsqu'il est présent lors de l'étape de production du surnageant conditionné.

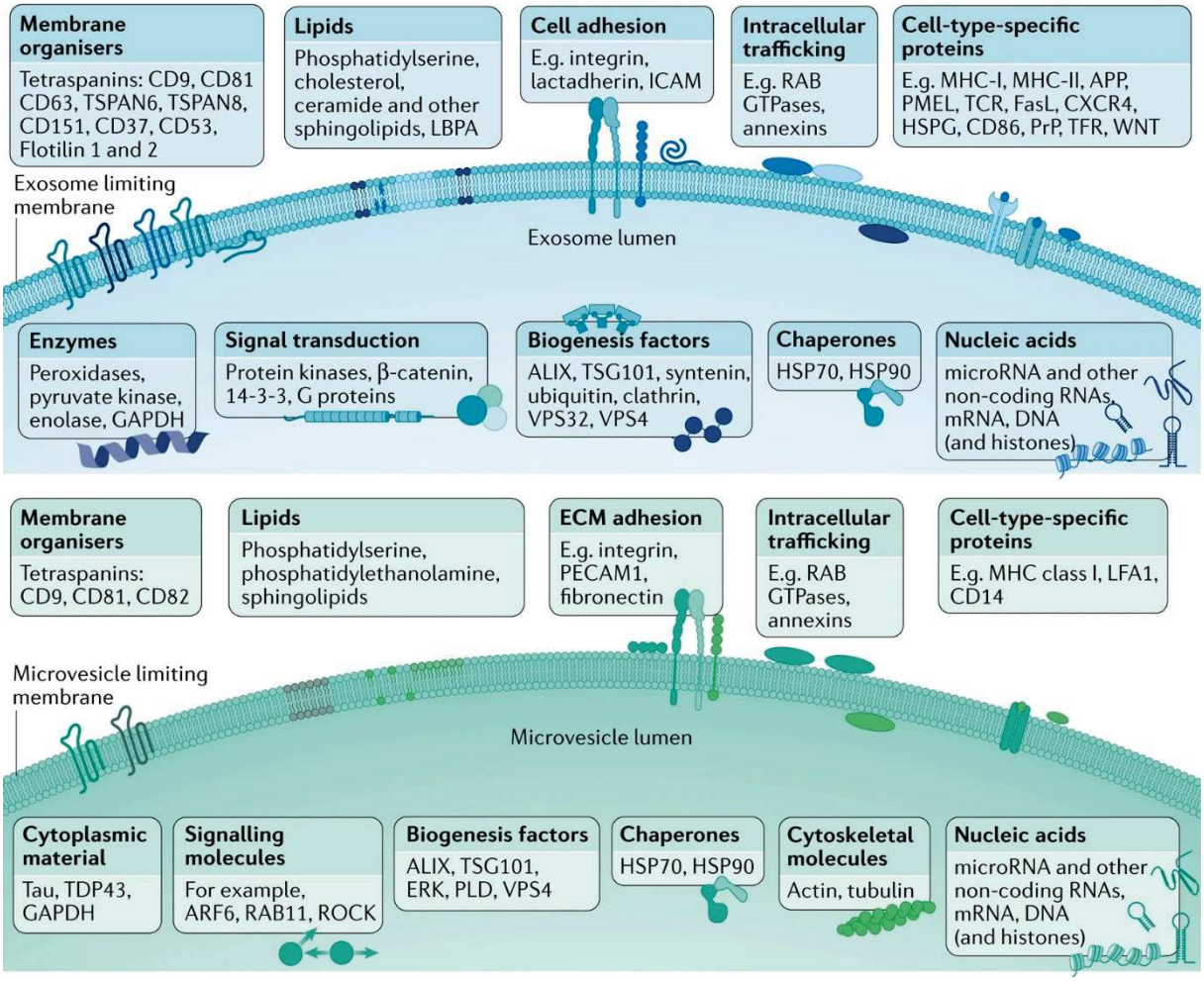


Figure 24 : Composition globale des EV (d'après van Niel et al., 2018).

Le développement de techniques d'analyse protéomique dans les années 1990 a rapidement permis l'identification à grande échelle des protéines contenues dans les EV. Les premières études protéomiques ont montré que les EV contiennent un sous-ensemble spécifique de protéines cellulaires, dont certaines dépendent du type de cellule qui les sécrète, tandis que d'autres se trouvent dans la plupart des EV, quel que soit le type de cellule. Ces dernières comprennent des protéines des endosomes, des membranes plasmiques et du cytosol, tandis que les protéines du noyau, des mitochondries, du réticulum endoplasmique et du complexe de Golgi sont pour la plupart absentes (illustré par la Figure 24). Ces observations mettent en évidence la spécificité de formation de ces vésicules et montrent qu'elles représentent un compartiment subcellulaire spécifique et non un réseau aléatoire de fragments cellulaires (Colombo et al., 2014). Des analyses protéomiques plus récentes montrent un grand chevauchement de l'expression des protéines entre MV et exosomes (Turiák et al., 2011).

1.4.4 Fonctions des vésicules extracellulaires

Les études récentes montrent que les EV jouent un rôle actif dans la communication intercellulaire dans la majorité des processus biologiques, tels que l'angiogenèse, la présentation d'antigènes, l'apoptose, la coagulation, l'homéostasie cellulaire, l'inflammation et la prolifération. Ces rôles sont attribués à leur capacité à transférer différents types de molécules effectrices, affectant ainsi les processus physiologiques et pathologiques de diverses maladies, notamment le cancer, les maladies neurodégénératives, les infections et les maladies auto-immunes (Gurunathan et al., 2019).

Les EV provenant de diverses sources cellulaires ont des fonctions physiologiques différentes et peuvent donc avoir différentes applications thérapeutiques. Elles ont été étudiées en tant que vaccins pour améliorer la réponse antitumorale ou contre des maladies infectieuses et allergiques (Markov et al., 2019). La détection d'EV en quantité accrue ou avec un contenu différent dans les fluides corporels de patients présentant différentes pathologies, a conduit à promouvoir les recherches sur l'utilisation des EV comme biomarqueurs potentiels (Lässer, 2015). Enfin, en raison de leur capacité à transporter un grand nombre de molécules actives, les EV peuvent être utilisées en tant que systèmes de délivrance de médicaments et peuvent être modifiées chimiquement ou biologiquement pour délivrer des agents thérapeutiques améliorés ou élargis. En effet, les EV présentent une grande stabilité dans la circulation sanguine, des capacités de ciblage spécifique et une capacité à traverser les barrières physiologiques (la barrière hémato-encéphalique, par exemple) (van den Hoogen et al., 2019). La Figure 25 résume en grande partie ces différentes fonctions.

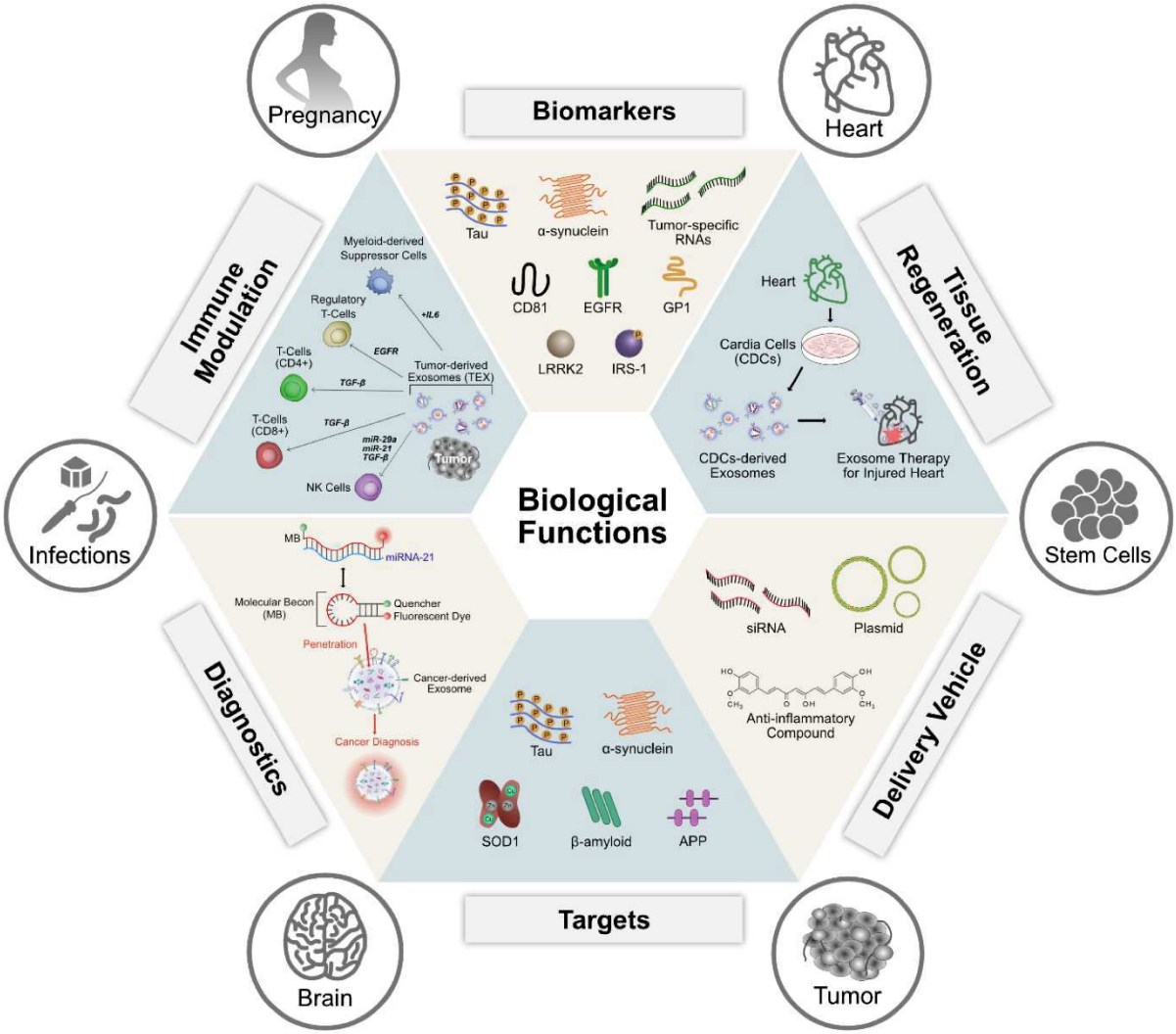


Figure 25 : Fonction biologique des EV (d'après Gurunathan et al., 2019).

1.4.5 Utilisation des EV en thérapies

Nous allons nous focaliser dans cette partie sur les EV isolées de CSM qui ont montré leur efficacité thérapeutique dans de nombreux modèles pré-cliniques et suscitent ainsi un grand intérêt en clinique. En effet, à ce jour, plus d'une vingtaine d'essais cliniques ont été recensés sur clinicaltrials.gov sur l'utilisation des EV dérivées de CSM. Bien que peu de résultats cliniques soient disponibles, les données précliniques et les premiers résultats cliniques sur les thérapies à base d'EV sont très encourageants. Cependant, il est important de souligner que ces essais cliniques sont pour la plupart des études de phase 1 sur la faisabilité et la sécurité de l'administration d'EV pour différentes applications cliniques.

Il est important de noter que pour les applications cliniques, des systèmes de production sûrs et efficaces, un contrôle qualité rigoureux et un stockage optimisé sont nécessaires. Plusieurs sources tissulaires de CSM peuvent être utilisées, telles que les CSM dérivées de la moelle osseuse, du tissu adipeux, de la membrane synoviale, ou du cordon ombilical. Ces CSM ont été testées dans divers tests

fonctionnels in vitro et dans un grand nombre de modèles non cliniques où les CSM-EV ont montré une efficacité thérapeutique (D'Arrigo et al., 2019). A l'avenir, des lignées de CSM immortalisées pourraient être utilisées pour assurer la reproductibilité des lots, pour éviter la variabilité inter-individuelle des donneurs et pour maintenir la bioactivité pendant l'expansion de la culture.

Le choix du système de culture (par exemple, la composition du milieu de culture et le support permettant l'adhésion des cellules) est un paramètre déterminant pour la production d'EV à usage clinique. Afin de répondre à ces objectifs, la culture 3D dans des bioréacteurs est l'approche la plus prometteuse. Les bioréacteurs à fibres creuses et à cuve agitée fournissent un rapport surface/volume élevé pour la croissance des CSM (Mendt et al., 2018; Mennan et al., 2019; Vymetalova et al., 2020). De plus, la production des EV dans les bioréacteurs est augmentée d'au moins 40 fois par rapport aux systèmes de culture 2D (Watson et al., 2016).

Pour les applications cliniques, le défi consiste à isoler les EV avec un rendement et une pureté élevée, tout en préservant leur structure et leur activité. L'ultrafiltration semble être la méthode de choix pour l'isolement à grande échelle, et est conforme aux bonnes pratiques de fabrication (BPF).

De plus, des contrôles qualité doivent être effectués sur la caractérisation et l'expansion des CSM, la production et l'isolement des EV et les critères de libération des lots (Rohde et al., 2019; Théry et al., 2018). Les tentatives de standardisation des méthodes d'isolement et de caractérisation des EV sont régulièrement discutées au sein de l'ISEV. Des tests de sécurité pour exclure les impuretés microbiennes doivent être effectués pour déterminer les niveaux d'endotoxines, la stérilité, l'absence de mycoplasmes et l'absence d'enrichissement viral dans le produit final.

Enfin, le stockage des EV afin de préserver leur activité biologique est critique. La possibilité de lyophiliser les EV pour un stockage à long terme à température ambiante semble être une des approches de conservation la plus prometteuse. La lyophilisation préserve les caractéristiques et la fonction des EV et peut donc représenter une stratégie de stockage rentable. Cela réduit également les coûts de transport (Charoenviriyakul et al., 2018).

Enfin, les aspects réglementaires pour la production et les applications cliniques des EV doivent être mis en œuvre. Les CSM sont définies comme des médicaments de thérapie innovante (MTI). Or, en 2015, un article de l'ISEV a discuté de la classification des produits à base d'EV et positionné les EV dans la classe des médicaments biologiques (Lener et al., 2015). Dans ce cadre, la réglementation existante exige l'identification, la quantification et la caractérisation de la ou des substances actives principales d'un médicament biologique pour indiquer le mécanisme d'action (MoA). La substance active détermine la classification pharmaceutique et le MoA, et définira le test d'activité à utiliser (Rohde et al., 2019). Cependant, dans le cadre des EV, le MoA ne se limite pas à une seule molécule,

comme cela a été montré pour les CSM, et il sera difficile de définir précisément la substance active. On peut également anticiper que le MoA, et les facteurs bioactifs associés, d'un même lot de CSM-EV peuvent également dépendre de l'application clinique visée et de la fonction thérapeutique associée. En ce sens, la réglementation doit nécessairement évoluer pour s'adapter à la spécificité des EV.

Nous avons discuté de ces différents points dans une revue de la littérature publiée récemment dans Frontiers in Bioengineering and Biotechnologies, intitulée « Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles : Opportunities and Challenges for Clinical Translation ».

Article 1 (Revue de la littérature) : Vésicules extracellulaires dérivées des cellules souches mésenchymateuses : opportunités et défis pour la translation clinique

Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Opportunities and Challenges for Clinical Translation

Marie Maumus, Pauline Rozier, **Jérémy Boulestreau**, Christian Jorgensen and Danièle Noël.

Publiée dans : Frontiers in Bioengineering and Biotechnology

frontiers in Bioengineering and Biotechnology

REVIEW
published: 10 September 2020
doi: 10.3389/fbioe.2020.00997

Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Opportunities and Challenges for Clinical Translation

*Marie Maumus[1,2], Pauline Rozier[1], Jérémy Boulestreau[1], Christian Jorgensen[1,3] and Danièle Noël[1,3]**

[1] IRMB, University of Montpellier, INSERM, CHU Montpellier, Montpellier, France, [2] Bauerfeind France, IRMB, Montpellier, France, [3] Clinical Immunology and Osteoarticular Diseases Therapeutic Unit, Department of Rheumatology, Lapeyronie University Hospital, Montpellier, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Ivan Martin,
University of Basel, Switzerland

Reviewed by:
Enrico Lucarelli,
Rizzoli Orthopedic Institute (IRCCS), Italy
Sowmya Viswanathan,
Krembil Research Institute, University Health Network, Canada

***Correspondence:**
Danièle Noël
daniele.noel@inserm.fr

Specialty section:
This article was submitted to Tissue Engineering and Regenerative Medicine, a section of the journal Frontiers in Bioengineering and Biotechnology

Received: 18 January 2020
Accepted: 30 July 2020
Published: 10 September 2020

Citation:
Maumus M, Rozier P, Boulestreau J, Jorgensen C and Noël D (2020) Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Opportunities and Challenges for Clinical Translation. Front. Bioeng. Biotechnol. 8:997. doi: 10.3389/fbioe.2020.00997

Extracellular vesicles (EVs), including exosomes and microvesicles, derived from mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) exert similar effects as their parental cells, and are of interest for various therapeutic applications. EVs can act through uptake by the target cells followed by release of their cargo inside the cytoplasm, or through interaction of membrane-bound ligands with receptors expressed on target cells to stimulate downstream intracellular pathways. EV-based therapeutics may be directly used as substitutes of intact cells or after modification for targeted drug delivery. However, for the development of EV-based therapeutics, several production, isolation, and characterization requirements have to be met and the quality of the final product has to be tested before its clinical implementation. In this review, we discuss the challenges associated with the development of EV-based therapeutics and the regulatory specifications for their successful clinical translation.

Keywords: mesenchymal stem cells, extracellular vesicles, regenerative medicine, therapy, clinical translation

INTRODUCTION

Extracellular vesicles (EVs), including exosomes and microvesicles, are nanoscale vesicles that are released by all cell types and act as signaling/communication agents between adjacent or distant cells. The transmission of information to a multitude of cells and locations confers them important roles in both physiological and pathological processes. EVs derived from mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) display similar functions as their parental cells and show therapeutic efficacy in many non-clinical models (Keshtkar et al., 2018). MSC-derived EVs (MSC-EVs) exert their functions through the transfer of their cargo (i.e., proteins, lipids, and nucleic acids such as mRNA, micro-RNAs, long non-coding RNAs, DNA, and metabolites) (Busatto et al., 2019; Qiu et al., 2019). They can be used as therapeutic tools either in naïve form, as substitutes of intact cells, or after modification for targeted drug delivery. However, for clinical applications, EV safe and effective production systems and rigorous quality control are needed before the release of clinical batches. The *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV) and the *European Network on Microvesicles and Exosomes in Health and Diseases* (ME-HaD) have highlighted a number of safety and regulatory requirements that must be considered for the clinical applications of EV-based

therapeutics (Lener et al., 2015). In the present review, we summarize the recent developments in EV production for pharmaceutical manufacturing, and discuss the regulatory issues associated with their clinical application.

DEFINITION AND CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR VESICLES

Extracellular vesicles are defined as particles that are delimited by a lipid bilayer, cannot replicate, and are released from the cell (Thery et al., 2018). At least three EV types can be characterized on the basis of their biogenesis pathway: (i) exosomes (small particles of endocytic origin with a diameter of 30–150 nm), (ii) microvesicles or microparticles (generated from the plasma membrane by direct budding; diameter of 150–500 nm), and (iii) apoptotic bodies (vesicles of 800–5000 nm in diameter, formed via membrane blebbing of apoptotic cells) (He et al., 2018). However, due to the overlapping sizes among EV subtypes and the frequent use of isolation techniques that rely on size-based separation, the ISEV recently recommended to define them as small vesicles (EVs $<$ 200 nm), and medium or large EVs (EVs $>$ 200 nm) (Thery et al., 2018). This definition is not comprehensive, particularly concerning EV biogenesis, but probably it represents the best option for classifying EVs that are mainly isolated according to their size. A more accurate definition will require the development of devices that allow EV isolation with high yields based on the presence of specific biomarkers and that are compatible with large-scale production.

Extracellular vesicles are secreted by all human and non-human cell types and can be divided into plant-derived EVs, bacterial/fungal/parasitic EVs, and animal product-derived EVs (Schuh et al., 2019). They are key components of the local environment through intercellular communication pathways, and also of the systemic environment through their release into the fluids of complex organisms. In animals and humans, they can be isolated from all body fluid types: blood, urine, breast milk, synovial liquid, amniotic fluid, cerebrospinal fluid, saliva,... (Schuh et al., 2019). EVs convey large numbers of molecules (e.g., proteins, mRNA, non-coding RNAs, and lipids) that mediate different functions, depending on the cells from which they originate. They transfer signals to recipient cells through different mechanisms: receptor-ligand interactions, direct membrane fusion, and endocytosis/phagocytosis (van Niel et al., 2018). They act in a paracrine and endocrine manner, and can be also taken up by their cells of origin. Therefore, EVs have important roles in both physiological and pathological processes.

POTENTIAL THERAPEUTIC USE OF MESENCHYMAL STEM CELL-DERIVED EXTRACELLULAR VESICLES

Extracellular vesicles from various cell sources have different physiological functions and therefore, may have different therapeutic applications. They were first investigated as vaccines to enhance the antitumor response using antigen-presenting cells, primarily dendritic cells loaded with tumor antigens, and then as vaccines for infectious and allergic diseases (for review, see Markov et al., 2019; Zurita et al., 2019). Subsequently, the detection of EVs with increased concentrations and differential cargoes in body fluids from patients with different pathological conditions led to much research on the potential use of EV proteins and RNA molecules as biomarkers of different diseases (Lasser, 2015). Finally, due to their capacity to carry large numbers of active molecules, EVs can be exploited as drug delivery systems, and can be chemically or biologically engineered to deliver enhanced or broaden therapeutic agents. Indeed, EVs act as "logistics shuttles" that show high stability in the bloodstream, specific targeting capacities (like their parent cells), and capacity to pass through physiological barriers (the blood brain barrier, for example). Indeed, MSC-derived EVs were shown to strongly inhibit lymphocyte proliferation and antibody production by targeting B-cells in heart failure (van den Hoogen et al., 2019). Chemical modification of EVs by addition of RGD peptides conjugated onto EV surfaces led the EVs to pass the blood brain barrier and target brain cells after ischemic stroke (Tian et al., 2018). EVs can also be loaded with drugs by cell transfection and genetic expression of a candidate gene, or by drug encapsulation after their isolation [(Mao et al., 2019; He et al., 2020; Ou et al., 2020); for review, see Crivelli et al. (2017)]. MSC-EVs were extensively characterized as drug delivery platform and shown to have greater internalization capabilities than commercial liposomes (Le Saux et al., 2020). The interest of using MSC-EVs loaded with doxorubicin by electroporation to target murine breast cancer cells or osteosarcoma cells has been demonstrated (Gomari et al., 2019; Wei et al., 2019). Interestingly, MSCs can entrap drug-loaded nanoparticles and release EVs that contain the nanoparticles enabling to combine MSC-based regenerative therapy to pharmaceutical nanomedicine (Perteghella et al., 2017).

The interest of using MSC-EVs for clinical applications is related to the variety of molecules with therapeutic functions they can carry and the fact that their cargo is naturally protected from degradation in the circulation (Tsui et al., 2002). EVs isolated from autologous MSCs are non-immunogenic. Although they should be poorly immunogenic in the case of allogenic injection thanks to the immunomodulatory molecules they convey, it is still unclear whether EVs contain major histocompatibility complex (MHC) molecules that might elicit alloimmune responses (Crivelli et al., 2017; Lohan et al., 2017). Numerous reports have highlighted the functional properties of MSCs and MSC-EVs using *in vitro* assays, and identified many factors involved in their functions (for review, see Doorn et al., 2012; Maumus et al., 2013; Clark et al., 2014; Glenn and Whartenby, 2014; Burrello et al., 2016; Abbasi-Malati et al., 2018). The possibility of using MSC-EVs to eliminate or reduce the clinical symptoms of several diseases has been widely assessed in animal models. A recent review of the literature discussed the applications of EVs from umbilical cord-derived MSCs (UC-MSCs) in various diseases (Yaghoubi et al., 2019). EVs isolated from different MSC sources have shown efficacy in non-clinical models of neurological diseases, particularly epilepsy (Xin et al., 2013; Long et al., 2017), post-traumatic brain

injury (Zhang et al., 2015), brain damage in pre-term neonates (Ophelders et al., 2016; Drommelschmidt et al., 2017; Sisa et al., 2019), and stroke (Doeppner et al., 2015). In animal models, MSC-EVs have been used to treat myocardial infarction (Lai et al., 2010; Bian et al., 2014) and for ischemic injury prevention in chronic renal failure (Gregorini et al., 2017). MSC-EVs are also efficient for the management of acute conditions, such as acute renal failure (Bruno et al., 2009) and respiratory failure (Zhu et al., 2014; Monsel et al., 2015; Monsel et al., 2016). MSC-EVs can reduce clinical symptoms in murine models of osteoarthritis and rheumatoid arthritis (Cosenza et al., 2017, 2018). Finally, MSC-EVs are effective in liver regeneration, as well as in experimental infectious conditions and ophthalmic diseases (Li et al., 2013; Tan et al., 2014; Tan et al., 2016; Bai et al., 2017; Chen et al., 2017; Chang et al., 2018). In conclusion, many studies have demonstrated the therapeutic efficacy of MSC-EVs in animal models and their potential is now evaluated in human clinical trials.

As it is generally accepted that MSCs from different tissue sources and from different donors display qualitatively different functional capacities, EVs isolated from different MSCs also should present differences in their cargo and related properties (Baglio et al., 2015). However, only few studies compared EVs from MSCs isolated from different sources. It has been recently reported that EVs from adipose tissue-derived MSCs (AD-MSCs) and from cardiac MSCs exhibit more potent angiogenic capacities than bone marrow-derived MSCs (BM-MSCs) (Chance et al., 2020; Kang et al., 2020). In addition, the capacity of EV production and secretory profile are higher in BM-MSCs than AD-MSCs, supporting a differential activity of EVs from different MSCs (Villatoro et al., 2019). Similarly, the expression of surface markers and function vary in MSCs from different species. Indeed, although MSC immunosuppressive capacity may cross the species barriers, different mechanisms of action are reported: through soluble factors for human MSCs and through cell–cell contacts for rodent MSCs (Uder et al., 2018). To our knowledge, no study has compared EVs from different species yet. Nevertheless, it is obvious that EVs from different species are different. This implies that the conclusions of pre-clinical studies that use human EVs in animal models have to be taken with cautions.

Another important notion for EV therapeutic applications is the definition of the minimal dose for effective clinical outcome in patients. Like parental MSCs, the effective dose of EVs is dependent on the biological activity, which can be defined on the basis of the number of particles or the quantity of bioactive proteins or RNAs. However, the protein or RNA content may quantitatively and qualitatively vary in function of MSC culture conditions or activation status and EV production method. In general, a dose-dependent effect of MSC-EVs has been observed using different functional assays (Cosenza et al., 2018; Bari et al., 2019a; Dal Collo et al., 2020). For instance, 50 μg of MSC-EVs are needed to induce the proliferation and differentiation of neural stem cells to oligodendrocytes (Otero-Ortega et al., 2020), while 10 μg of placenta-derived MSC-EVs are sufficient to increase the migration and tube formation of placental microvascular endothelial cells (Salomon et al., 2013). These differences in the dose needed for bioactivity can be related to the MSC source, the method used for EV isolation, or the mechanism of action (MoA) of EVs. The definition of the MoA for a specific therapeutic indication should allow designing a reproducible and reliable functional *in vitro* assay to determine the EV protein or RNA effective concentration, as proposed in Dal Collo et al. (2020). However, *in vitro* potency assays do not necessarily predict the therapeutic effect *in vivo*, and even less the patients' outcome in clinical trials.

The minimal effective dose of EVs could be determined using a relevant pre-clinical model (ideally a large animal model) for a specific therapeutic application. The therapeutic dose of EVs is usually in the range of 10–100 μg of proteins in mouse models (Riau et al., 2019). For example, a dose of 50 μg of EVs was sufficient to enhance protection and brain repair in a rat model of subcortical ischemic stroke, compared with 100 and 200 μg of EVs (Otero-Ortega et al., 2020). This dose was also the smallest effective dose identified in a functional *in vitro* assay. However, the most efficient dose is not always the highest dose, as shown for MSCs in a model of systemic sclerosis (Maria et al., 2016). Interestingly, it was reported that EVs isolated from non-pigmented ciliary epithelium display enhanced pro-MMP9 activities at high doses, but significantly reduce β-catenin expression and GSK-3 phosphorylation only at low doses (Tabak et al., 2018). This concentration-dependent effect of EVs might be related to different interaction modes with the target cells (e.g., direct binding to cell membrane receptors or internalization).

Moreover, investigating different administration routes may help to reduce the effective dose, if the accessibility of the target tissue is increased. Indeed, as the route of administration determines EV biodistribution, increasing the uptake of exogenous EVs by a targeted organ can enhance their efficacy (Di Rocco et al., 2016). Unlike intravenous injection, EV administration by the intraperitoneal or subcutaneous route results in higher accumulation in pancreas and gastrointestinal tract and in lower concentrations in liver and spleen (Wiklander et al., 2015). In addition, EV uptake is potentiated by the concomitant presence of extracellular proteins, for instance albumin (Schneider et al., 2017). Moreover, EV dose also can affect their biodistribution, as indicated by the inverse correlation between intravenous injection of increasing EV concentrations and their accumulation in liver (Wiklander et al., 2015).

In conclusion, the minimal effective doses of EVs can be determined by *in vivo* studies and these findings can be extrapolated for human use. EV dose and also the route, timing, and frequency of administration need to be carefully investigated for optimal and safe EV delivery in patients, as discussed elsewhere (Bari et al., 2019b).

CLINICAL APPLICATIONS OF MESENCHYMAL STEM CELL-DERIVED EXTRACELLULAR VESICLES

A total of nine clinical trials can be identified in the ClinicalTrials.gov database when using the keywords "exosomes"

and/or "extracellular vesicles" and focusing on MSC-EVs (**Table 1**). Six of them are still recruiting or are completed, two trials are not recruiting yet, and one has an unknown status.

The first phase I clinical trial was initiated in 2014 with the aim of evaluating the safety of EVs isolated from UC-MSCs in 20 patients with type 1 diabetes. Patients received a systemic injection of exosomes at day 0 and of microvesicles at day 7, and the effect on the total daily requirement of insulin was evaluated at 3 months. The status of the trial is unknown. In 2017, another phase I study enrolled patients with large and refractory macular holes (MH). This randomized and controlled study has included 44 patients who received 20 or 50 μg of UC-MSC-derived exosomes in the vitreous cavity close to the MH, after pars plana vitrectomy and internal limiting membrane peeling. This study is still recruiting. The treatment efficacy is evaluated by assessing MH closure by optical coherence tomography, at 24 weeks post-treatment. More recently, a safety and tolerability study was performed in pre-term neonates (born before gestational week 27) at high risk of bronchopulmonary dysplasia (BPD). This multi-center controlled double-bind trial included 3 to 14-day-old neonates (n = 18) who received 20, 60, or 200 pmol phospholipid of BM-MSC-EVs (UNEX-42)/kg body weight by intravenous injection. Safety was the primary endpoint, but BPD incidence and severity were also determined (secondary endpoints). A phase 1/2 multi-center randomized study to evaluate the effectiveness and safety of daily local injections of MSC-EVs (AGLE-103) in 30 patients with dystrophic epidermolysis bullosa was registered in November 2019. The primary endpoint is the safety and efficacy of wound closure at 8 months after treatment. The last phase 1/2 clinical study recorded in December 2019 will assess the alleviation of dry eye symptoms in 27 patients with chronic graft versus host disease (GVHD) after local treatment with UC-MSC-derived exosomes four times per day for 14 days. The treatment safety and efficacy will be evaluated at different time points by measuring the changes in the ocular surface disease index.

Two phase I clinical trials evaluate genetically engineered MSC-EVs. The first trial assessed EVs isolated from miR-124-overexpressing MSCs in five patients with acute ischemic stroke. Patients received 200 μg of total EV protein by stereotaxis, 1 month after the stroke. The incidence of adverse events was the primary outcome measure, but efficacy was also assessed using a Modified Rankin Scale after 12 weeks of treatment. The trial has recently been completed, but results are not available yet. The

TABLE 1 | Clinical trials evaluating MSC-EV therapies.

Disease	EV type	Administration route	Injected dose and time of injection	Cell source	Trial phase	Control group	Status	Number of patients	Ref/NTC
Type 1 diabetes	Exo and MV	IV	Eq of SN from 1.2-1.5 × 10^6 cells/kg body weight (day 0)	UC-MSCs	1	No	Unknown	20	NCT02138331
Macular holes	Exo	Local	20 μg or 50 μg Eq proteins (day 0)	UC-MSCs	1	Yes	Recruiting	44	NCT03437759
Bronchopulmonary dysplasia	Not indicated	IV	20, 60, or 200 pmol/kg (day 0)	BM-MSCs	1	Yes	Recruiting	18	NCT03857841
Dystrophic epidermolysis bullosa	Exo	Local	Not indicated (once a day for 60 days)	Not indicated	1/2	Yes	Not yet recruiting	30	NCT04173650
Dry eye (graft versus host disease)	Exo	Local	10 μg Eq proteins/drop, 4 times a day, 14 days	UC-MSCs	1	No	Recruiting	27	NCT04213248
Ischemic stroke	Exo	Local	200 μg Eq proteins (day 0)	miR-124 over expressing MSCs	1/2	No	Completed	5	NCT03384433
Pancreatic cancer	Exo	IV	Unspecified	MSCs loaded with KrasG12D siRNA	1	No	Not yet recruiting	28	NCT03608631
Graft versus host disease	Small size EVs	IV	4 units (1 unit = Eq of SN from 4 × 10^7 cells) (day 0)	BM-MSCs	NA	NA	Completed	1	Kordelas et al., 2014
Chronic kidney disease	Total EVs	IV (1st)/IA (2nd)	100 μg Eq proteins /kg (x2) (day 0)	UC-MSCs	2/3	Yes	Completed	40	Nassar et al., 2016

EVs, extracellular vesicles; Eq, equivalent dose; Exo, exosomes; IV, intravenous; IA, intra-arterial; MV, microvesicles; SN, supernatant; BM-MSC, bone marrow-derived mesenchymal stem cells; UC-MSC, umbilical cord-derived mesenchymal stem cells; NA, not applicable.

second clinical trial will evaluate MSC-derived exosomes loaded with small interfering RNAs against KRAS G12D (iExosomes) in patients with metastatic pancreatic cancer. Patients (n = 28) will receive the treatment by intravenous route at days 1, 4, and 10, and then every 14 days for up to three courses in the absence of adverse events or unfavorable disease outcome. The study aim is to identify the maximum tolerated dose and the dose-limiting toxicities of iExosomes, but has not recruited patients yet.

There are only two publications on the use of MSC-EVs in the clinic. The first article reported the case of one patient with therapy-refractory GvHD who received four units of BM-MSC-derived small EVs by intravenous injections (Kordelas et al., 2014). One unit of EVs was defined as the EV fraction recovered from the supernatant of 4×10^7 BM-MSCs conditioned for 48 h and isolated by filtration using 0.22 μm filter membranes, precipitation with polyethylene glycol, and a final ultracentrifugation at 100.000 g for 2 h. To reduce the potential side effects, the patient initially received one tenth of a unit, and then progressively increasing unit amounts every 2–3 days to a total of 4 units. No adverse event was observed and clinical symptoms were remarkably improved within 14 days after EV administration, suggesting the safety and potential efficacy of this EV-based treatment. The second article concerned a randomized placebo-controlled clinical trial that evaluated the safety and efficacy of UC-MSC-EVs in 40 patients with stage III and IV chronic kidney disease (Nassar et al., 2016). EVs were collected from UC-MSC conditioned supernatant using two ultracentrifugation steps at 100,000 g for 1 h. Patients received two injections of 100 μg EVs/kg body weight 1 week apart, the first one by the intravenous route and the second one through the intra-renal arteries. No adverse event was recorded. The overall renal function significantly improved during the 12-month follow-up period. Interestingly, TGFβ1 and IL10 levels significantly increased concomitantly with the clinical improvement, suggesting immune modulatory regulation. Although few clinical results are available, pre-clinical data and early clinical results on EV-based therapeutics are very encouraging. However, it is important to stress that these clinical trials are mostly phase 1 studies on the feasibility and safety of EV administration for different clinical applications. Only one phase 2/3 trial has been completed and showed the safety (primary endpoint) and efficacy (secondary endpoint) of UC-MSC-EVs in patients with chronic kidney disease, as indicated by the reduction of serum creatinine level by 50% and the twofold increase in eGFR (Nassar et al., 2016). Randomized, double-blinded phase 2 and 3 clinical trials are required to definitively demonstrate MSC-EV efficacy and therapeutic interest.

CHALLENGES FOR THE INDUSTRIAL PRODUCTION OF GMP-GRADE EXTRACELLULAR VESICLES

The main challenge linked to the industrialization of EV-based therapeutics for regenerative medicine is to define new manufacturing strategies under Good Manufacturing Practice (GMP) for EV scalable production and isolation. Standardized operating procedures (SOPs) using reproducible and standardized assays are mandatory to manufacture a defined and qualified EV product because each manufacturing procedure will generate a different product. To reach this goal, major questions have to be addressed early in the product development: (i) how to manufacture EVs; (ii) how to characterize and qualify the final product; and (iii) how to organize the product storage in order to maintain its stability.

Manufacturing

MSC Sources

Several tissue sources of MSCs can be used, such as BM, adipose tissue, synovial membrane, UC. These MSCs have been tested in various *in vitro* functional assays and in a large number of non-clinical disease models where MSC-EVs have shown therapeutic efficacy [for review see D'Arrigo et al. (2019)]. Nevertheless, no comparative study identified the most efficient MSC source for EV production, in terms of quantities or functional activities. Primarily two sources of MSCs (UC- and BM-MSCs) have been tested in clinical trials, but for different applications (**Table 1**). Therefore, the first question for EV manufacturing is the identification of the best MSC source(s) for a specific clinical application, and more data are necessary to answer this question. The best MSC source can be determined by identifying the most relevant MoA for the targeted therapeutic activity. For example, if an anti-inflammatory or pro-angiogenic function is envisioned, AD-MSCs or UC-MSCs might be preferred to BM-MSCs. It is nevertheless recommended to determine the best MSC source experimentally by comparing MSCs from different sources in a pre-clinical model relevant for the therapeutic application, by testing different batches of different MSC sources or by comparing pools of MSCs to avoid inter-donor variability. EV production is also influenced by the features of the producing cells. For instance, it has been shown that cell aging (replicative senescence and donor age-associated senescence) and cell–cell contacts (confluence and seeding density) affect EV production. Specifically, senescent MSCs secrete greater numbers of EVs than non-senescent MSCs (Huang et al., 2019; Fafian-Labora et al., 2020). Conversely, confluent MSCs produce lower amounts of EVs than proliferating MSCs (Patel et al., 2017). The impact of senescence on the production and functionality of MSC-EVs in different therapeutic applications has recently been reviewed (Boulestreau et al., 2020). EVs from aging MSCs did not exhibit the protective effect of EVs from young MSCs in an acute lung injury model (Huang et al., 2019). In consistency, intercellular transfer of EVs from young MSCs are more potent than EVs from aged MSCs to rejuvenate aged hematopoietic cells and restore their function through the uptake of autophagy-related mRNAs (Kulkarni et al., 2017). Production process will therefore have to include quality controls to evaluate the percentage of senescent cells and its impact on the functionality of EV batches.

Immortalized MSC lines could be used to ensure batch reproducibility, to avoid inter-individual donor variability, and

to maintain bioactivity during culture expansion. For instance, EVs released by embryonic stem cell-derived MSCs immortalized by transfection of a lentivirus carrying the c-Myc oncogene reduced the infarct size in a mouse model of myocardial injury (Chen et al., 2011). Of course, the immortalized MSC stability and absence of the transgene protein in the derived EVs must be demonstrated. Nevertheless, this strategy ensures an infinite supply of EVs with high inter-batch reproducibility.

EV Production

A second question is the choice of culture system (e.g., medium composition and cell-adhering support) for EV production. Indeed, several cell culture parameters influence EV production and cargo composition. For clinical purposes, the use of xeno- and EV-free culture media is recommended to remove any source of variability and animal-associated contaminations. It has been shown that xeno- and serum-free culture media support sustained MSC proliferation without loss of viability and promote the cell secretory functions (Lee et al., 2017; Mochizuki and Nakahara, 2018; Palama et al., 2020). Platelet lysates can be used at the place of fetal calf serum in GMP manufacturing conditions, although defined media are more appropriate (Pachler et al., 2017; Bari et al., 2018). To scale up EV production for industrialization, 3D-culture in bioreactors has been tested, such as multilayered cell culture flasks, hollow fiber bioreactors, stirred-tank bioreactors, and spheroidal aggregates of MSCs. Hollow fiber and stirred-tank bioreactors are the more promising approaches because they are closed and GMP-compatible scalable systems that provide a high surface-to-volume ratio for MSC growth (Mendt et al., 2018; Mennan et al., 2019; Vymetalova et al., 2020). EV production in bioreactors is increased at least by 40-fold compared with 2D culture systems (Watson et al., 2016). Furthermore, the duration of EV production and the frequency of medium collection have to be tested to determine the optimal parameters for cell proliferation, confluence and EV re-uptake by producing cells.

EV production can be stimulated using different biochemical or biophysical strategies. Among the biophysical strategies, hypoxia can be controlled and modulated. It has been reported that MSC culture and EV production in hypoxic conditions (1–5% O_2) increase the number of EVs released and their cargo composition (growth factors and miRNAs), thus enhancing their pro-angiogenic, immunomodulatory, cardioprotective and neuroprotective effects (Cui et al., 2018; Xue et al., 2018; Zhu et al., 2018). Another option is to take advantage of bioreactors to mechanically stimulate EV production by applying fluid shear stress or compression [for review, see Piffoux et al. (2019)]. Although, the underlying mechanisms are not known, one hypothesis is that in this condition, MSCs inhibit their own re-uptake of EVs. Recently, it has been reported that ultrasonication of ultracentrifuged MSC-EVs followed by regular centrifugation and filtration allows increasing the EV yield by 20-fold (Wang et al., 2019). Moreover, the authors demonstrated that these EVs are functional and promote wound healing in animal models. However, this technique might release a fraction of vesicles that normally remain tethered at the plasma membrane, or vesicles that have been recaptured by the producing cells, or even other components from secretory pathways (van Niel et al., 2018). Therefore, EVs isolated after ultrasonication need to be better characterized.

Different strategies have been considered to modulate EV content and biological activities, including biochemical stimuli and genetic modification of MSCs to overexpress specific proteins or miRNAs [for review, see Park et al. (2019)]. MSC activation with lipopolysaccharides before EV production does not change the number of released EVs, but influences their content. These EVs have been used to modify macrophage polarization, procoagulant properties, or the ability to support wound healing (Ti et al., 2015; Zeuner et al., 2016; Fiedler et al., 2018). The importance of miRNAs in MSC-EV therapeutic effects suggested that genetic engineering of MSCs to overexpress the miRNAs of interest might improve their efficacy. For example, miR-92a-3p overexpression in MSCs allowed producing EVs with higher protective effect against cartilage destruction in an osteoarthritis model (Mao et al., 2018).

In conclusion, all parameters that can influence EV number and content must be clearly identified to define the best balance between production conditions and EV functions. Improvement of EV functions can be obtained through genetic modification or pre-activation of MSCs. Because different manufacturing procedures and culture conditions can affect the characteristics and functionalities of EVs, the production process will have to be clearly defined for optimal use of EVs for specific clinical indications.

EV Isolation

There is no unique or standardized method to isolate EVs. This might explain the variability in EV characteristics and bioactivities among laboratories. For clinical applications, the challenge is to isolate EVs with high yield and purity, while preserving their structure and activity. In addition, the isolation method should be scalable, cost-effective, compatible with a high-throughput production process, and ideally, in a closed system. Differential ultracentrifugation-based techniques are the most common EV isolation methods in basic research, but they are not scalable, do not give pure EV preparations, may lead to EV aggregation, and are time-consuming. However, sequential centrifugation steps have been used for large-scale production of clinical-grade MSC-EVs (Mendt et al., 2018). Size-based fractionation methods that include tangential flow filtration and size exclusion chromatography are GMP-compliant and scalable systems for EV isolation [for reviews, see Agrahari et al. (2019); Paganini et al. (2019)]. Ultrafiltration also reduces the isolation times and costs compared with other techniques (Saxena et al., 2009; Bari et al., 2018, 2019b,c). In our opinion, currently, this is the method of choice for high-scale and GMP-compliant isolation of EVs. A comparative analysis of the secretome from BM- and AD-MSCs enriched by ultrafiltration or sequential ultracentrifugation indicated that ultrafiltration results in higher particle yield with higher protein content, in GMP-compliant conditions (Bari et al., 2019c). Finally, the choice of the isolation technique will have to be a compromise

between EV yield and cost. In addition, it is important to keep in mind that each variation in the production process generates a product modification that will require a new functional qualification.

Quality Controls

Quality controls concern MSC characterization and expansion, EV production and isolation, and the release criteria of EV batches [recently updated in Thery et al. (2018); Rohde et al. (2019)]. Attempts to standardize the methods of EV isolation and characterization are regularly discussed within ISEV. To measure the production yield, the number of isolated EV particles needs to be determined by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) or Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS). These methods allow measuring the number of particles in a solution. The production yield should be expressed as the particle number in cell equivalents because it takes into account the number of viable cells at harvest time and allows a better evaluation of the inter-batch reproducibility. Although there is no standard size for EV preparations, a size of $\leq$200 nm characterizes small EVs and could be defined as the standard to ensure better inter-batch reproducibility. EVs must also be profiled by flow cytometry or western blotting: expression of EV markers (CD9, CD63, TSG101, and CD81) and MSC markers (CD44, CD73, CD90, and CD105), and absence of signal for immune cell markers (CD14, CD34, and CD45). The presence of at least three different markers enriched in EVs should be a major criterion for batch release: CD9, CD63, CD81, Tsg101, Alix, and the ganglioside GM1, which has been described as an exosome marker (Tan et al., 2013). Finally, standard safety tests to exclude microbial impurities should be performed to determine the endotoxin levels, sterility, absence of mycoplasma, and absence of viral enrichment in the final product.

Additional information on protein and RNA concentration, which is not part of the released criteria, could be added to the quality control list. This information allows expressing the number of EVs as particles per μg of protein or RNA, and could be used to assess inter-batch reproducibility. In addition, specific microRNAs or proteins, known to be relevant for EV therapeutic effect, could be identified and quantified by quantitative PCR and ELISA assays to provide supportive data on EV functional properties. This will be relevant to define potency assays for EVs in relation to the dedicated clinical applications.

Storage and Stability

The preservation of EV biological activity during storage is both critical and challenging. Few studies have reported consistent data on EV storage and formulation. Siliconized vessels are recommended for EV storage to prevent their adherence to surfaces and their loss (Jeyaram and Jay, 2017). Phosphate buffered saline is habitually used for EV resuspension. Storage at −80°C is encouraged, although it can affect EV size, number and function (Lorincz et al., 2014; Cosenza et al., 2018). It has been reported that EV concentration (quantified by NTA) remains stable after 1 week of storage at +4, −20, and −80°C (Jeyaram and Jay, 2017). Nevertheless, storage at +4°C causes EV aggregation, and the amount of the associated proteins and miRNAs dramatically decreases at +4°C and −20°C. For clinical applications, EV products need to be suspended in sterile 0.9% NaCl and stored at −80°C. Moreover, they should be frozen and thawed rapidly to preserve their morphology and function. EV products should be formulated for single-use because it has been observed that their number decreases, and their morphology and content are altered after two cycles of freezing and thawing (Kusuma et al., 2018).

The possibility to freeze-dry the EV products for long-term storage at room temperature has been investigated. Freeze-drying preserves EV characteristics and function, and thus might represent a cost-effective storage strategy. It also reduce transport costs (Charoenviriyakul et al., 2018). The characteristics and functionality of peripheral blood mononuclear cell-derived secretomes remain stable for up to 6 months after lyophilization and high dose γ-irradiation when stored between −20 and +25°C (Laggner et al., 2020). However, such lyophilized secretomes contained albumin, cholesterol and triglycerides that might have preserved the sample bioactivity. Another study showed that the exosome number and size distribution and biological activity are not affected after storage at −80°C for 45 days or 6 months (Mendt et al., 2018). Disaccharide stabilizers could be added in the storage buffer to improve EV preservation. Trehalose is a natural, non-reducing disaccharide sugar used as a cryo-preservative for labile protein drugs, vaccines, and liposomes. Its safety and tolerance have been demonstrated in mice and humans after oral, gastric and parenteral administration (Sato et al., 1999; Richards et al., 2002). It has been reported that addition of trehalose to EV samples improves their stability when stored at −80°C and when lyophilized, by preventing EV aggregation and lysis (Bosch et al., 2016; Charoenviriyakul et al., 2018). Mannitol is another cryoprotectant that maintains the functionality of freeze-dried secretomes stored at −20°C for at least 2 months (Bari et al., 2019c). The addition of 5–10% dimethylsulfoxide (DMSO) also maintains EV integrity and function (Romanov et al., 2019). The possibility to develop an off-the-shelf lyophilized product is a huge strength compared with the parental cell product that must be frozen for preservation and must be transported fresh after revitalization and/or expansion, or frozen under stringent requirements. Finally, whatever the storage formulation and conditions, batch stability will have to be carefully examined and monitored during storage. Stability can easily be assessed by quantifying the particle number, the quantity of total RNA and proteins, and the MoA-associated bioactive factor at different times during storage.

REGULATORY ASPECTS FOR THE INDUSTRIAL AND CLINICAL USE OF EXTRACELLULAR VESICLES

The regulatory aspects for manufacturing and clinical applications of EVs as new therapeutics have to be implemented. In 2015, an ISEV position paper discussed the classification of EV-based products as biological medicine or biological drugs, and categorized EVs based on the anticipated active substance(s)

(Lener et al., 2015). It also provided a detailed discussion on the regulatory issues associated with EV-based therapeutics. According to the regulatory frameworks for manufacturing and clinical trials in Europe, United States and Australia, quality and safety control data must be provided, as underlined in the previous section. In addition, the existing guidelines require the identification, quantification and characterization of the main substance(s) of a biological drug to indicate the MoA. The active substance determines the pharmaceutical classification and the MoA, and will define the potency assay to be used (Rohde et al., 2019). However, we can expect that the MoA will not be limited to a single molecule, as it has been shown for MSCs, and it will be difficult to precisely define the active substance in EVs. We can also anticipate that the MoA, and associated bioactive factors, of a same MSC-EV batch may also depend on the targeted clinical application and the related therapeutic function. Interestingly, a review paper discussed the respective role of miRNAs and proteins as major factors in the MoA and in mediating EV therapeutic effect (Toh et al., 2018). A prerequisite for their potency is the presence of biologically relevant amounts of molecules. By analyzing the average quantity of miRNAs in MSC-EVs and the possible number of EVs taken up by a cell, the authors concluded that miRNAs are not likely to be in the right concentration or configuration to have a relevant biological activity. A similar analysis for proteins indicated that they were more likely to elicit a biologically relevant response, suggesting that proteins could be the main drivers of MSC-EV MoA. Nevertheless, it has been reported that several miRNAs are important actors, at least as mediators, of MSC-EV immunoregulatory effects (Martin-Rufino et al., 2019). More studies are needed to bring firm conclusions on the role of proteins and miRNAs in the MoA of MSC-EVs. Although not required in the early stages of clinical development, the definition of the active substance(s) that supports the MoA and the efficacy of EV-based treatments is a requirement to develop appropriate pharmaceutical control strategies. Indeed, in the early phases 1 and 2 of pharmaceutical development, the batch-to-batch consistency must be checked using biochemical, biophysical and functional assays (Rohde et al., 2019). Due to their complex nature, the specific MoA of EVs may be difficult to identify; however, in contrast to cells, it could be easier to set-up quality control tests for EV characterization and inter-batch homogeneity assays (Riazifar et al., 2017). The regulatory requirements will also be different for EV-based drugs derived from cells (genetically engineered or not) and for EVs used as drug-delivery systems [for review see Lener et al. (2015)]. Compliance with the regulatory frameworks is pivotal for the approval of EV-based therapies and their large-scale implementation.

CONCLUSION: CHALLENGES AND PERSPECTIVES

MSC-EVs exert comparable therapeutic functions as their parental cells, but have some advantages over MSCs because they lack nuclei and cannot abnormally proliferate or differentiate. Moreover, small-size EV preparations that are isolated using protocols including a filtration step through 0.22 μm membranes can be considered as sterile and do not require an additional sterilization step. However, there are still many challenges to be addressed concerning the scalable production, standardization, and characterization of EV products for the successful translation of EV-based therapeutics in the clinic (Agrahari et al., 2019). The heterogeneity of MSCs used for EV production (BM, adipose tissue, other tissues; non-manipulated or immortalized) and of the obtained EVs (production process; EV size; contents of EV fractions) makes difficult to select the EV drug with the highest therapeutic efficacy. Several companies have already developed EV- or secretome-based products for different clinical applications using diverse cell sources, and MSC-derived EVs represent around 40% of such products (Gimona et al., 2017). The best sources for reproducible, safe and cost-effective production must be identified using the relevant non-clinical models for each specific clinical applications. Large-scale processes to manufacture EV therapeutics in GMP conditions (mainly bioreactor technologies for EV production, and ultrafiltration technologies for EV purification) are being implemented using preferentially closed systems for higher safety to ensure robust production procedures. Several GMP-compliant processes for the production of MSC-EV or secretome products have been developed (Pachler et al., 2017; Bari et al., 2018; Mendt et al., 2018; Laggner et al., 2020). Importantly, although quality controls for cell production include cell viability and apoptosis rate measurements, they do not assess cell senescence. Yet, EV yield is higher when using senescent cells, and their cargo composition is altered (abnormal levels of some miRNAs) [for review, see Boulestreau et al. (2020)]. The proportion of senescent cells in the production batches and their effect on EV content should be taken into account in quality control procedures. Moreover, EV standardization (protein or RNA quantification, particle determination) should be improved. In addition, some undesirable miRNAs, such as miR-410 that promotes carcinoma cell growth and aging-associated miRNAs, should be quantified (Fafian-Labora et al., 2017; Dong et al., 2018). Analytical methods to accurately characterize EVs at the single-vesicle level are under development and are needed for reliable standardization. Lyophilization could be used for the long-term storage of EVs and to develop off-the-shelf products with high stability. This would represent a real advantage compared with MSCs because it would facilitate and reduce the costs of storage and transport (at room temperature). The formulation of EVs into a standardized biological drug has to be defined for each clinical application in terms of dosage, excipients (use and type of cryoprotectant, for example) and pharmaceutical forms (powder or liquid) (Bari et al., 2019b). The formulation may depend on the administration route. While liquid formulations can be used for systemic or parenteral injection of EVs, powder formulations might be preferred for oral or aerosolized administrations. The dosages for a specific application will determine the batch sizes for production (Rohde et al., 2019). The procedure for the characterization of the active substance(s), which can be localized in the inner and/or outer

part of EVs, and of the "excipient" non-biologically active moiety of the EVs will have to be established before the industrialization step. It is now crucial to address the challenges related to the production and the regulatory and clinical aspects of EV-based biological products in order to pave the way to their commercialization.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors contributed to the design and writing of the manuscript. MM, PR, JB, and CJ proofread and given comments as well as suggestions. DN supervised and finalized the manuscript.

FUNDING

We acknowledge funding support from the Inserm Institute, the University of Montpellier, the Agence Nationale de la Recherche for support of the national infrastructure: "ECELLFRANCE: Development of a national adult mesenchymal stem cell based therapy platform" (ANR-11-INSB-005). JB was supported by a grant from FOREUM Foundation for Research in Rheumatology.

REFERENCES

Abbasi-Malati, Z., Roushandeh, A. M., Kuwahara, Y., and Roudkenar, M. H. (2018). Mesenchymal stem cells on horizon: a new arsenal of therapeutic agents. *Stem Cell Rev.* 14, 484–499. doi: 10.1007/s12015-018-9817-x

Agrahari, V., Agrahari, V., Burnouf, P. A., Chew, C. H., and Burnouf, T. (2019). Extracellular microvesicles as new industrial therapeutic frontiers. *Trends Biotechnol.* 37, 707–729. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.11.012

Baglio, S. R., Rooijers, K., Koppers-Lalic, D., Verweij, F. J., Perez Lanzon, M., Zini, N., et al. (2015). Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. *Stem Cell Res. Ther.* 6:127. doi: 10.1186/s13287-015-0116-z

Bai, L., Shao, H., Wang, H., Zhang, Z., Su, C., Dong, L., et al. (2017). Effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes on experimental autoimmune uveitis. *Sci. Rep.* 7:4323. doi: 10.1038/s41598-017-04559-y

Bari, E., Ferrarotti, I., Di Silvestre, D., Grisoli, P., Barzon, V., Balderacchi, A., et al. (2019a). Adipose mesenchymal extracellular vesicles as alpha-1-antitrypsin physiological delivery systems for lung regeneration. *Cells* 8:965. doi: 10.3390/cells8090965

Bari, E., Ferrarotti, I., Torre, M. L., Corsico, A. G., and Perteghella, S. (2019b). Mesenchymal stem/stromal cell secretome for lung regeneration: the long way through "pharmaceuticalization" for the best formulation. *J. Control. Release* 309, 11–24. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.07.022

Bari, E., Perteghella, S., Catenacci, L., Sorlini, M., Croce, S., Mantelli, M., et al. (2019c). Freeze-dried and GMP-compliant pharmaceuticals containing exosomes for acellular mesenchymal stromal cell immunomodulant therapy. *Nanomedicine* 14, 753–765. doi: 10.2217/nnm-2018-0240

Bari, E., Perteghella, S., Di Silvestre, D., Sorlini, M., Catenacci, L., Sorrenti, M., et al. (2018). Pilot production of mesenchymal stem/stromal freeze-dried secretome for cell-free regenerative nanomedicine: a validated GMP-compliant process. *Cells* 7:190. doi: 10.3390/cells7110190

Bian, S., Zhang, L., Duan, L., Wang, X., Min, Y., and Yu, H. (2014). Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. *J. Mol. Med.* 92, 387–397. doi: 10.1007/s00109-013-1110-5

Bosch, S., de Beaurepaire, L., Allard, M., Mosser, M., Heichette, C., Chretien, D., et al. (2016). Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage. *Sci. Rep.* 6:36162. doi: 10.1038/srep36162

Boulestreau, J., Maumus, M., Rozier, P., Jorgensen, C., and Noel, D. (2020). Mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles in aging. *Front. Cell. Dev. Biol.* 8:107. doi: 10.3389/fcell.2020.00107

Bruno, S., Grange, C., Deregibus, M. C., Calogero, R. A., Saviozzi, S., Collino, F., et al. (2009). Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 1053–1067. doi: 10.1681/ASN.2008070798

Burrello, J., Monticone, S., Gai, C., Gomez, Y., Kholia, S., and Camussi, G. (2016). Stem cell-derived extracellular vesicles and immune-modulation. *Front. Cell. Dev. Biol.* 4:83.

Busatto, S., Zendrini, A., Radeghieri, A., Paolini, L., Romano, M., Presta, M., et al. (2019). The nanostructured secretome. *Biomater. Sci.* 8, 39–63. doi: 10.1039/c9bm01007f

Chance, T. C., Herzig, M. C., Christy, B. A., Delavan, C., Rathbone, C. R., Cap, A. P., et al. (2020). Human mesenchymal stromal cell source and culture conditions influence extracellular vesicle angiogenic and metabolic effects on human endothelial cells in vitro. *J. Trauma Acute Care Surg.* 89(2S Suppl. 2), S100–S108. doi: 10.1097/TA.0000000000002661

Chang, C. L., Sung, P. H., Chen, K. H., Shao, P. L., Yang, C. C., Cheng, B. C., et al. (2018). Adipose-derived mesenchymal stem cell-derived exosomes alleviate overwhelming systemic inflammatory reaction and organ damage and improve outcome in rat sepsis syndrome. *Am. J. Transl. Res.* 10, 1053–1070.

Charoenviriyakul, C., Takahashi, Y., Nishikawa, M., and Takakura, Y. (2018). Preservation of exosomes at room temperature using lyophilization. *Int. J. Pharm.* 553, 1–7. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.10.032

Chen, L., Xiang, B., Wang, X., and Xiang, C. (2017). Exosomes derived from human menstrual blood-derived stem cells alleviate fulminant hepatic failure. *Stem Cell. Res. Ther.* 8:9. doi: 10.1186/s13287-016-0453-6

Chen, T. S., Arslan, F., Yin, Y., Tan, S. S., Lai, R. C., Choo, A. B., et al. (2011). Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs. *J. Transl. Med.* 9:47. doi: 10.1186/1479-5876-9-47

Clark, E. A., Kalomoiris, S., Nolta, J. A., and Fierro, F. A. (2014). Concise review: MicroRNA function in multipotent mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 32, 1074–1082. doi: 10.1002/stem.1623

Cosenza, S., Ruiz, M., Toupet, K., Jorgensen, C., and Noel, D. (2017). Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis. *Sci. Rep.* 7:16214. doi: 10.1038/s41598-017-15376-8

Cosenza, S., Toupet, K., Maumus, M., Luz-Crawford, P., Blanc-Brude, O., Jorgensen, C., et al. (2018). Mesenchymal stem cells-derived exosomes are more immunosuppressive than microparticles in inflammatory arthritis. *Theranostics* 8, 1399–1410. doi: 10.7150/thno.21072

Crivelli, B., Chlapanidas, T., Perteghella, S., Lucarelli, E., Pascucci, L., Brini, A. T., et al. (2017). Mesenchymal stem/stromal cell extracellular vesicles: from active principle to next generation drug delivery system. *J. Control Release* 262, 104–117. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.07.023

Cui, G. H., Wu, J., Mou, F. F., Xie, W. H., Wang, F. B., Wang, Q. L., et al. (2018). Exosomes derived from hypoxia-preconditioned mesenchymal stromal cells ameliorate cognitive decline by rescuing synaptic dysfunction and regulating inflammatory responses in APP/PS1 mice. *FASEB J.* 32, 654–668. doi: 10.1096/fj.201700600R

Dal Collo, G., Adamo, A., Gatti, A., Tamellini, E., Bazzoni, R., Takam Kamga, P., et al. (2020). Functional dosing of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles for the prevention of acute graft-versus-host-disease. *Stem Cells* 38, 698–711. doi: 10.1002/stem.3160

D'Arrigo, D., Roffi, A., Cucchiarini, M., Moretti, M., Candrian, C., and Filardo, G. (2019). Secretome and extracellular vesicles as new biological therapies for knee osteoarthritis: a systematic review. *J. Clin. Med.* 8:1867. doi: 10.3390/jcm8111867

Di Rocco, G., Baldari, S., and Toietta, G. (2016). Towards therapeutic delivery of extracellular vesicles: strategies for in vivo tracking and biodistribution analysis. *Stem Cells Int.* 2016:5029619. doi: 10.1155/2016/5029619

Doeppner, T. R., Herz, J., Gorgens, A., Schlechter, J., Ludwig, A. K., Radtke, S., et al. (2015). Extracellular vesicles improve post-stroke neuroregeneration

and prevent postischemic immunosuppression. *Stem Cells Transl. Med.* 4, 1131–1143. doi: 10.5966/sctm.2015-0078

Dong, L., Pu, Y., Zhang, L., Qi, Q., Xu, L., Li, W., et al. (2018). Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote lung adenocarcinoma growth by transferring miR-410. *Cell Death Dis.* 9:218. doi: 10.1038/s41419-018-0323-5

Doorn, J., Moll, G., Le Blanc, K., van Blitterswijk, C., and de Boer, J. (2012). Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. *Tissue Eng. Part B Rev.* 18, 101–115. doi: 10.1089/ten.teb.2011.0488

Drommelschmidt, K., Serdar, M., Bendix, I., Herz, J., Bertling, F., Prager, S., et al. (2017). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles ameliorate inflammation-induced preterm brain injury. *Brain Behav. Immun.* 60, 220–232. doi: 10.1016/j.bbi.2016.11.011

Fafian-Labora, J., Lesende-Rodriguez, I., Fernandez-Pernas, P., Sangiao-Alvarellos, S., Monserrat, L., Arntz, O. J., et al. (2017). Effect of age on pro-inflammatory miRNAs contained in mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Sci. Rep.* 7:43923. doi: 10.1038/srep43923

Fafian-Labora, J., Morente-Lopez, M., Sanchez-Dopico, M. J., Arntz, O. J., van de Loo, F. A. J., De Toro, J., et al. (2020). Influence of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in vitro and their role in ageing. *Stem Cell Res. Ther.* 11:13. doi: 10.1186/s13287-019-1534-0

Fiedler, T., Rabe, M., Mundkowski, R. G., Oehmcke-Hecht, S., and Peters, K. (2018). Adipose-derived mesenchymal stem cells release microvesicles with procoagulant activity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 100, 49–53. doi: 10.1016/j.biocel.2018.05.008

Gimona, M., Pachler, K., Laner-Plamberger, S., Schallmoser, K., and Rohde, E. (2017). Manufacturing of human extracellular vesicle-based therapeutics for clinical use. *Int. J. Mol. Sci.* 18:1190. doi: 10.3390/ijms18061190

Glenn, J. D., and Whartenby, K. A. (2014). Mesenchymal stem cells: emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J. Stem Cells* 6, 526–539.

Gomari, H., Forouzandeh Moghadam, M., Soleimani, M., Ghavami, M., and Khodashenas, S. (2019). Targeted delivery of doxorubicin to HER2 positive tumor models. *Int. J. Nanomedicine* 14, 5679–5690. doi: 10.2147/IJN.S210731

Gregorini, M., Corradetti, V., Pattonieri, E. F., Rocca, C., Milanesi, S., Peloso, A., et al. (2017). Perfusion of isolated rat kidney with Mesenchymal Stromal Cells/Extracellular Vesicles prevents ischaemic injury. *J. Cell. Mol. Med.* 21, 3381–3393. doi: 10.1111/jcmm.13249

He, C., Zheng, S., Luo, Y., and Wang, B. (2018). Exosome theranostics: biology and translational medicine. *Theranostics* 8, 237–255. doi: 10.7150/thno.21945

He, L., Chen, Y., Ke, Z., Pang, M., Yang, B., Feng, F., et al. (2020). Exosomes derived from miRNA-210 overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells protect lipopolysaccharide induced chondrocytes injury via the NF-kappaB pathway. *Gene* 751:144764. doi: 10.1016/j.gene.2020.144764

Huang, R., Qin, C., Wang, J., Hu, Y., Zheng, G., Qiu, G., et al. (2019). Differential effects of extracellular vesicles from aging and young mesenchymal stem cells in acute lung injury. *Aging* 11, 7996–8014. doi: 10.18632/aging.102314

Jeyaram, A., and Jay, S. M. (2017). Preservation and storage stability of extracellular vesicles for therapeutic applications. *AAPS J.* 20:1. doi: 10.1208/s12248-017-0160-y

Kang, I. S., Suh, J., Lee, M. N., Lee, C., Jin, J., Lee, C., et al. (2020). Characterization of human cardiac mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles comparing with human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *BMB Rep.* 53, 118–123. doi: 10.5483/bmbrep.2020.53.2.235

Keshtkar, S., Azarpira, N., and Ghahremani, M. H. (2018). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell. Res. Ther.* 9:63. doi: 10.1186/s13287-018-0791-7

Kordelas, L., Rebmann, V., Ludwig, A. K., Radtke, S., Ruesing, J., Doeppner, T. R., et al. (2014). MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia* 28, 970–973. doi: 10.1038/leu.2014.41

Kulkarni, R., Bajaj, M., Ghode, S., Jalnapurkar, S., Limaye, L., and Kale, V. P. (2017). Intercellular transfer of microvesicles from young mesenchymal stromal cells rejuvenates aged murine hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 36, 420–433. doi: 10.1002/stem.2756

Kusuma, G. D., Barabadi, M., Tan, J. L., Morton, D. A. V., Frith, J. E., and Lim, R. (2018). To protect and to preserve: novel preservation strategies for extracellular vesicles. *Front. Pharmacol.* 9:1199. doi: 10.3389/fphar.2018.01199

Laggner, M., Gugerell, A., Bachmann, C., Hofbauer, H., Vorstandlechner, V., Seibold, M., et al. (2020). Reproducibility of GMP-compliant production of therapeutic stressed peripheral blood mononuclear cell-derived secretomes, a novel class of biological medicinal products. *Stem Cell. Res. Ther.* 11:9. doi: 10.1186/s13287-019-1524-2

Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M. M., Sze, N. S., Choo, A., Chen, T. S., et al. (2010). Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 4, 214–222. doi: 10.1016/j.scr.2009.12.003

Lasser, C. (2015). Exosomes in diagnostic and therapeutic applications: biomarker, vaccine and RNA interference delivery vehicle. *Expert Opin. Biol. Ther.* 15, 103–117. doi: 10.1517/14712598.2015.977250

Le Saux, S., Aarrass, H., Lai-Kee-Him, J., Bron, P., Armengaud, J., Miotello, G., et al. (2020). Post-production modifications of murine mesenchymal stem cell (mMSC) derived extracellular vesicles (EVs) and impact on their cellular interaction. *Biomaterials* 231:119675. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119675

Lee, M. S., Youn, C., Kim, J. H., Park, B. J., Ahn, J., Hong, S., et al. (2017). Enhanced cell growth of adipocyte-derived mesenchymal stem cells using chemically-defined serum-free media. *Int. J. Mol. Sci.* 18:1779. doi: 10.3390/ijms18081779

Lener, T., Gimona, M., Aigner, L., Borger, V., Buzas, E., Camussi, G., et al. (2015). Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. *J. Extracell. Vesicles* 4:30087. doi: 10.3402/jev.v4.30087

Li, T., Yan, Y., Wang, B., Qian, H., Zhang, X., Shen, L., et al. (2013). Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. *Stem Cells Dev.* 22, 845–854. doi: 10.1089/scd.2012.0395

Lohan, P., Treacy, O., Griffin, M. D., Ritter, T., and Ryan, A. E. (2017). Anti-donor immune responses elicited by allogeneic mesenchymal stem cells and their extracellular vesicles: are we still learning? *Front. Immunol.* 8:1626. doi: 10.3389/fimmu.2017.01626

Long, Q., Upadhya, D., Hattiangady, B., Kim, D. K., An, S. Y., Shuai, B., et al. (2017). Intranasal MSC-derived A1-exosomes ease inflammation, and prevent abnormal neurogenesis and memory dysfunction after status epilepticus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, E3536–E3545. doi: 10.1073/pnas.1703920114

Lorincz, A. M., Timar, C. I., Marosvari, K. A., Veres, D. S., Otrokocsi, L., Kittel, A., et al. (2014). Effect of storage on physical and functional properties of extracellular vesicles derived from neutrophilic granulocytes. *J. Extracell. Vesicles* 3:25465. doi: 10.3402/jev.v3.25465

Mao, G., Zhang, Z., Hu, S., Zhang, Z., Chang, Z., Huang, Z., et al. (2018). Exosomes derived from miR-92a-3p-overexpressing human mesenchymal stem cells enhance chondrogenesis and suppress cartilage degradation via targeting WNT5A. *Stem Cell Res. Ther.* 9:247. doi: 10.1186/s13287-018-1004-0

Mao, Q., Liang, X. L., Zhang, C. L., Pang, Y. H., and Lu, Y. X. (2019). LncRNA KLF3-AS1 in human mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorates pyroptosis of cardiomyocytes and myocardial infarction through miR-138-5p/Sirt1 axis. *Stem Cell Res. Ther.* 10:393. doi: 10.1186/s13287-019-1522-4

Maria, A. T., Toupet, K., Bony, C., Pirot, N., Vozenin, M. C., Petit, B., et al. (2016). Anti-fibrotic, anti-oxidant and immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in HOCl-induced systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* 68, 1013–1025. doi: 10.1002/art.39477

Markov, O., Oshchepkova, A., and Mironova, N. (2019). Immunotherapy based on dendritic cell-targeted/-derived extracellular vesicles-a novel strategy for enhancement of the anti-tumor immune response. *Front. Pharmacol.* 10:1152. doi: 10.3389/fphar.2019.01152

Martin-Rufino, J. D., Espinosa-Lara, N., Osugui, L., and Sanchez-Guijo, F. (2019). Targeting the immune system with mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles: what is the cargo's mechanism of action? *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7:308. doi: 10.3389/fbioe.2019.00308

Maumus, M., Jorgensen, C., and Noel, D. (2013). Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: role of secretome and exosomes. *Biochimie* 95, 2229–2234. doi: 10.1016/j.biochi.2013.04.017

Mendt, M., Kamerkar, S., Sugimoto, H., McAndrews, K. M., Wu, C. C., Gagea, M., et al. (2018). Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer. *JCI Insight* 3:e99263. doi: 10.1172/jci.insight.99263

Mennan, C., Garcia, J., Roberts, S., Hulme, C., and Wright, K. (2019). A comprehensive characterisation of large-scale expanded human bone marrow and umbilical cord mesenchymal stem cells. *Stem Cell. Res. Ther.* 10:99. doi: 10.1186/s13287-019-1202-4

Mochizuki, M., and Nakahara, T. (2018). Establishment of xenogeneic serum-free culture methods for handling human dental pulp stem cells using clinically

oriented in-vitro and in-vivo conditions. *Stem Cell Res. Ther.* 9:25. doi: 10.1186/s13287-017-0761-5

Monsel, A., Zhu, Y. G., Gennai, S., Hao, Q., Hu, S., Rouby, J. J., et al. (2015). Therapeutic effects of human mesenchymal stem cell-derived microvesicles in severe pneumonia in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 192, 324–336. doi: 10.1164/rccm.201410-1765OC

Monsel, A., Zhu, Y. G., Gudapati, V., Lim, H., and Lee, J. W. (2016). Mesenchymal stem cell derived secretome and extracellular vesicles for acute lung injury and other inflammatory lung diseases. *Expert Opin. Biol. Ther.* 16, 859–871. doi: 10.1517/14712598.2016.1170804

Nassar, W., El-Ansary, M., Sabry, D., Mostafa, M. A., Fayad, T., Kotb, E., et al. (2016). Umbilical cord mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles can safely ameliorate the progression of chronic kidney diseases. *Biomater. Res.* 20:21. doi: 10.1186/s40824-016-0068-0

Ophelders, D. R., Wolfs, T. G., Jellema, R. K., Zwanenburg, A., Andriessen, P., Delhaas, T., et al. (2016). Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles protect the fetal brain after hypoxia-ischemia. *Stem Cells Transl. Med.* 5, 754–763. doi: 10.5966/sctm.2015-0197

Otero-Ortega, L., Laso-Garcia, F., Frutos, M. C. G., Diekhorst, L., Martinez-Arroyo, A., Alonso-Lopez, E., et al. (2020). Low dose of extracellular vesicles identified that promote recovery after ischemic stroke. *Stem Cell Res. Ther.* 11:70. doi: 10.1186/s13287-020-01601-1

Ou, H., Teng, H., Qin, Y., Luo, X., Yang, P., Zhang, W., et al. (2020). Extracellular vesicles derived from microRNA-150-5p-overexpressing mesenchymal stem cells protect rat hearts against ischemia/reperfusion. *Aging* 12, 12669–12683. doi: 10.18632/aging.102792

Pachler, K., Lener, T., Streif, D., Dunai, Z. A., Desgeorges, A., Feichtner, M., et al. (2017). A Good Manufacturing Practice-grade standard protocol for exclusively human mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles. *Cytotherapy* 19, 458–472. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.01.001

Paganini, C., Capasso Palmiero, U., Pocsfalvi, G., Touzet, N., Bongiovanni, A., and Arosio, P. (2019). Scalable production and isolation of extracellular vesicles: available sources and lessons from current industrial bioprocesses. *Biotechnol. J.* 14:e1800528. doi: 10.1002/biot.201800528

Palama, M. E. F., Shaw, G. M., Carluccio, S., Reverberi, D., Sercia, L., Persano, L., et al. (2020). The secretome derived from mesenchymal stromal cells cultured in a xeno-free medium promotes human cartilage recovery in vitro. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8:90. doi: 10.3389/fbioe.2020.00090

Park, K. S., Bandeira, E., Shelke, G. V., Lasser, C., and Lotvall, J. (2019). Enhancement of therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Stem Cell Res. Ther.* 10:288. doi: 10.1186/s13287-019-1398-3

Patel, D. B., Gray, K. M., Santharam, Y., Lamichhane, T. N., Stroka, K. M., and Jay, S. M. (2017). Impact of cell culture parameters on production and vascularization bioactivity of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Bioeng. Transl. Med.* 2, 170–179. doi: 10.1002/btm2.10065

Perteghella, S., Crivelli, B., Catenacci, L., Sorrenti, M., Bruni, G., Necchi, V., et al. (2017). Stem cell-extracellular vesicles as drug delivery systems: new frontiers for silk/curcumin nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 520, 86–97. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.02.005

Piffoux, M., Nicolas-Boluda, A., Mulens-Arias, V., Richard, S., Rahmi, G., Gazeau, F., et al. (2019). Extracellular vesicles for personalized medicine: the input of physically triggered production, loading and theranostic properties. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 138, 247–258. doi: 10.1016/j.addr.2018.12.009

Qiu, G., Zheng, G., Ge, M., Wang, J., Huang, R., Shu, Q., et al. (2019). Functional proteins of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Stem. Cell Res. Ther.* 10:359. doi: 10.1186/s13287-019-1484-6

Riau, A. K., Ong, H. S., Yam, G. H. F., and Mehta, J. S. (2019). Sustained delivery system for stem cell-derived exosomes. *Front. Pharmacol.* 10:1368. doi: 10.3389/fphar.2019.01368

Riazifar, M., Pone, E. J., Lotvall, J., and Zhao, W. (2017). Stem cell extracellular vesicles: extended messages of regeneration. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 57, 125–154. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-061616-030146

Richards, A. B., Krakowka, S., Dexter, L. B., Schmid, H., Wolterbeek, A. P., Waalkens-Berendsen, D. H., et al. (2002). Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem. Toxicol.* 40, 871–898. doi: 10.1016/s0278-6915(02)00011-x

Rohde, E., Pachler, K., and Gimona, M. (2019). Manufacturing and characterization of extracellular vesicles from umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for clinical testing. *Cytotherapy* 21, 581–592. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.12.006

Romanov, Y. A., Volgina, N. E., Dugina, T. N., Kabaeva, N. V., and Sukhikh, G. T. (2019). Effect of storage conditions on the integrity of human umbilical cord mesenchymal stromal cell-derived microvesicles. *Bull. Exp. Biol. Med.* 167, 131–135. doi: 10.1007/s10517-019-04476-2

Salomon, C., Ryan, J., Sobrevia, L., Kobayashi, M., Ashman, K., Mitchell, M., et al. (2013). Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis. *PLoS One* 8:e68451. doi: 10.1371/journal.pone.0068451

Sato, S., Okamoto, K., Minami, R., Kohri, H., and Yamamoto, S. (1999). Trehalose can be used as a parenteral saccharide source in rabbits. *J. Nutr.* 129, 158–164. doi: 10.1093/jn/129.1.158

Saxena, A., Tripathi, B. P., Kumar, M., and Shahi, V. K. (2009). Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: an overview. *Adv. Colloid Interface Sci.* 145, 1–22. doi: 10.1016/j.cis.2008.07.004

Schneider, D. J., Speth, J. M., Penke, L. R., Wettlaufer, S. H., Swanson, J. A., and Peters-Golden, M. (2017). Mechanisms and modulation of microvesicle uptake in a model of alveolar cell communication. *J. Biol. Chem.* 292, 20897–20910. doi: 10.1074/jbc.M117.792416

Schuh, C., Cuenca, J., Alcayaga-Miranda, F., and Khoury, M. (2019). Exosomes on the border of species and kingdom intercommunication. *Transl. Res.* 210, 80–98. doi: 10.1016/j.trsl.2019.03.008

Sisa, C., Kholia, S., Naylor, J., Herrera Sanchez, M. B., Bruno, S., Deregibus, M. C., et al. (2019). Mesenchymal stromal cell derived extracellular vesicles reduce hypoxia-ischaemia induced perinatal brain injury. *Front. Physiol.* 10:282. doi: 10.3389/fphys.2019.00282

Tabak, S., Schreiber-Avissar, S., and Beit-Yannai, E. (2018). Extracellular vesicles have variable dose-dependent effects on cultured draining cells in the eye. *J. Cell. Mol. Med.* 22, 1992–2000. doi: 10.1111/jcmm.13505

Tan, C. Y., Lai, R. C., Wong, W., Dan, Y. Y., Lim, S. K., and Ho, H. K. (2014). Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models. *Stem Cell Res. Ther.* 5:76. doi: 10.1186/scrt465

Tan, L., Huang, Y., Pan, X., Quan, S., Xu, S., Li, D., et al. (2016). Administration of bone marrow stromal cells in sepsis attenuates sepsis-related coagulopathy. *Ann. Med.* 48, 235–245. doi: 10.3109/07853890.2016.1157725

Tan, S. S., Yin, Y., Lee, T., Lai, R. C., Yeo, R. W., Zhang, B., et al. (2013). Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane. *J. Extracell. Vesicles* 2:22614. doi: 10.3402/jev.v2i0.22614

Thery, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., et al. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the international society for extracellular vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* 7:1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750

Ti, D., Hao, H., Tong, C., Liu, J., Dong, L., Zheng, J., et al. (2015). LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b. *J. Transl. Med.* 13:308. doi: 10.1186/s12967-015-0642-6

Tian, T., Zhang, H. X., He, C. P., Fan, S., Zhu, Y. L., Qi, C., et al. (2018). Surface functionalized exosomes as targeted drug delivery vehicles for cerebral ischemia therapy. *Biomaterials* 150, 137–149. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.012

Toh, W. S., Lai, R. C., Zhang, B., and Lim, S. K. (2018). MSC exosome works through a protein-based mechanism of action. *Biochem. Soc. Trans.* 46, 843–853. doi: 10.1042/BST20180079

Tsui, N. B., Ng, E. K., and Lo, Y. M. (2002). Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin. Chem.* 48, 1647–1653. doi: 10.1093/clinchem/48.10.1647

Uder, C., Bruckner, S., Winkler, S., Tautenhahn, H. M., and Christ, B. (2018). Mammalian MSC from selected species: features and applications. *Cytometry A* 93, 32–49. doi: 10.1002/cyto.a.23239

van den Hoogen, P., de Jager, S. C. A., Mol, E. A., Schoneveld, A. S., Huibers, M. M. H., Vink, A., et al. (2019). Potential of mesenchymal- and cardiac progenitor cells for therapeutic targeting of B-cells and antibody responses in end-stage heart failure. *PLoS One* 14:e0227283. doi: 10.1371/journal.pone.0227283

van Niel, G., D'Angelo, G., and Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 19, 213–228. doi: 10.1038/nrm.2017.125

Villatoro, A. J., Alcoholado, C., Martin-Astorga, M. C., Fernandez, V., Cifuentes, M., and Becerra, J. (2019). Comparative analysis and characterization of soluble factors and exosomes from cultured adipose tissue and bone marrow mesenchymal stem cells in canine species. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 208, 6–15. doi: 10.1016/j.vetimm.2018.12.003

Vymetalova, L., Kucirkova, T., Knopfova, L., Pospisilova, V., Kasko, T., Lejdarova, H., et al. (2020). Large-scale automated hollow-fiber bioreactor expansion of umbilical cord-derived human mesenchymal stromal cells for neurological disorders. *Neurochem. Res.* 45, 204–214. doi: 10.1007/s11064-019-02925-y

Wang, L., Abhange, K. K., Wen, Y., Chen, Y., Xue, F., Wang, G., et al. (2019). Preparation of engineered extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells with ultrasonication for skin rejuvenation. *ACS Omega* 4, 22638–22645. doi: 10.1021/acsomega.9b03561

Watson, D. C., Bayik, D., Srivatsan, A., Bergamaschi, C., Valentin, A., Niu, G., et al. (2016). Efficient production and enhanced tumor delivery of engineered extracellular vesicles. *Biomaterials* 105, 195–205. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.07.003

Wei, H., Chen, J., Wang, S., Fu, F., Zhu, X., Wu, C., et al. (2019). A nanodrug consisting of doxorubicin and exosome derived from mesenchymal stem cells for osteosarcoma treatment in vitro. *Int. J. Nanomedicine* 14, 8603–8610. doi: 10.2147/IJN.S218988

Wiklander, O. P., Nordin, J. Z., O'Loughlin, A., Gustafsson, Y., Corso, G., Mager, I., et al. (2015). Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J. Extracell. Vesicles* 4:26316. doi: 10.3402/jev.v4.26316

Xin, H., Li, Y., Cui, Y., Yang, J. J., Zhang, Z. G., and Chopp, M. (2013). Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 1711–1715. doi: 10.1038/jcbfm.2013.152

Xue, C., Shen, Y., Li, X., Li, B., Zhao, S., Gu, J., et al. (2018). Exosomes derived from hypoxia-treated human adipose mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through the PKA signaling pathway. *Stem Cells Dev.* 27, 456–465. doi: 10.1089/scd.2017.0296

Yaghoubi, Y., Movassaghpour, A., Zamani, M., Talebi, M., Mehdizadeh, A., and Yousefi, M. (2019). Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived-exosomes in diseases treatment. *Life Sci.* 233:116733. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116733

Zeuner, M. T., Patel, K., Denecke, B., Giebel, B., and Widera, D. (2016). Paracrine effects of TLR4-polarised mesenchymal stromal cells are mediated by extracellular vesicles. *J. Transl. Med.* 14:34. doi: 10.1186/s12967-016-0794-z

Zhang, Y., Chopp, M., Meng, Y., Katakowski, M., Xin, H., Mahmood, A., et al. (2015). Effect of exosomes derived from multipluripotent mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury. *J. Neurosurg.* 122, 856–867. doi: 10.3171/2014.11.JNS14770

Zhu, L. P., Tian, T., Wang, J. Y., He, J. N., Chen, T., Pan, M., et al. (2018). Hypoxia-elicited mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitates cardiac repair through miR-125b-mediated prevention of cell death in myocardial infarction. *Theranostics* 8, 6163–6177. doi: 10.7150/thno.28021

Zhu, Y. G., Feng, X. M., Abbott, J., Fang, X. H., Hao, Q., Monsel, A., et al. (2014). Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of *Escherichia coli* endotoxin-induced acute lung injury in mice. *Stem Cells* 32, 116–125. doi: 10.1002/stem.1504

Zurita, M. E., Wilk, M. M., Carriquiriborde, F., Bartel, E., Moreno, G., Misiak, A., et al. (2019). A pertussis outer membrane vesicle-based vaccine induces lung-resident memory CD4 T cells and protection against *Bordetella pertussis*, including pertactin deficient strains. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 9:125. doi: 10.3389/fcimb.2019.00125

Conflict of Interest: MM is an employee of Bauerfeind France.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Maumus, Rozier, Boulestreau, Jorgensen and Noël. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Depuis la publication de cette revue, de nouveaux essais cliniques basés sur les CSM-EV ont été référencés sur clinicaltrial.gov. Une étude vise notamment à évaluer l'innocuité des exosomes à partir de CSM allogéniques délivrées par une injection unique intra-articulaire dans le genou de patients atteints d'arthrose symptomatique légère à modérée. L'étude prévoit d'inscrire 10 patients dans cet essai de phase 1 et le suivi durera 12 mois (NCT05060107). Les EV sont en cours d'évaluation pour le traitement du syndrome de défaillance respiratoire aiguë (SDRA) dans le contexte d'infection par le SARS-CoV-2 dans 10 essais cliniques. Trois de ces essais thérapeutiques évaluent l'utilisation des EV par voie intraveineuse. Un de ces essais de phase I (NCT04657458) a publié des résultats qui ont notamment démontré l'innocuité du traitement et sa capacité à restaurer l'oxygénation, à réguler à la baisse le choc cytokinique et à reconstituer l'immunité. Les deux autres études de phase II (NCT04798716) (NCT04493242) sont en cours et les résultats ne sont pas encore publiés. Enfin, les 7 autres évaluent la sécurité et l'apport d'un traitement par inhalation d'EV (NCT04313647) (NCT04276987) (NCT04491240) (NCT04602442) (NCT04544215) (NCT04602104).

1.4.5.1 EV dérivées des CSM et vieillissement

Comme nous l'avons vu précédemment, le vieillissement est un processus complexe qui implique des mécanismes cellulaires autonomes et cellulaires non autonomes où la sénescence joue un rôle important. Des altérations liées à l'âge dans les CSM ont été associées à des fonctions dérégulées. La perte de cellules souches fonctionnelles nécessaires au maintien de l'homéostasie tissulaire contribue probablement directement au vieillissement. De nouvelles preuves suggèrent que les changements dans le nombre et la composition des EV libérées par les cellules sénescentes contribuent aux effets néfastes de la sénescence au cours du vieillissement. Par rapport aux facteurs solubles, les EV ont des propriétés biophysiques et biochimiques différentes car elles présentent une durée de vie plus longue que les facteurs solubles et sont plus résistantes à la dégradation par des protéases (O'Loghlen, 2018). De plus, l'augmentation de la production d'EV est une caractéristique générale des cellules âgées et induites en sénescence, comme le montrent plusieurs études dès 2008 (Beer et al., 2015; Lehmann et al., 2008; Takasugi et al., 2017). En conséquence, la production des EV par les CSM augmente avec l'âge du donneur et les cultures à passage tardif (Fafián-Labora et al., 2017, 2019; Lei et al., 2017). Une deuxième caractéristique des EV libérées par les cellules sénescentes est l'altération de leur contenu (pour une revue, voir (Urbanelli et al., 2016). Il est proposé que les EV soient impliquées dans la modulation de l'inflammation systémique chronique survenant au cours du vieillissement (inflamm-aging), qui est associée à la progression des maladies liées à l'âge, par le transport d'un certain nombre de microARN (miRNA). Un certain nombre de miRNA dont l'expression est modulée dans les CSM âgées par rapport aux jeunes ont été identifiés. Nous avons traité ce sujet dans une revue de la littérature

publiée récemment dans Frontiers in Cell and Developmental Biology, intitulée « Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles in Aging »

Article 2 (Revue de la littérature) : Vésicules extracellulaires dérivées de cellules souches mésenchymateuses dans le vieillissement

Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles in Aging

Jérémy Boulestreau, Marie Maumus, Pauline Rozier, Christian Jorgensen and Danièle Noël.

Publiée dans : Frontiers in Cell and Developmental Biology

frontiers in Cell and Developmental Biology

REVIEW
published: 21 February 2020
doi: 10.3389/fcell.2020.00107

Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles in Aging

Jérémy Boulestreau[1], Marie Maumus[1], Pauline Rozier[1], Christian Jorgensen[1,2†] and Danièle Noël[1,2†]*

[1] Institute of Regenerative Medicine and Biotherapies (IRMB), University of Montpellier, INSERM, Montpellier, France,
[2] Clinical Immunology and Osteoarticular Diseases Therapeutic Unit, Department of Rheumatology, CHU, Montpellier, France

Aging is associated with high prevalence of chronic degenerative diseases that take a large part of the increasing burden of morbidities in a growing demographic of elderly people. Aging is a complex process that involves cell autonomous and cell non-autonomous mechanisms where senescence plays an important role. Senescence is characterized by the loss of proliferative potential, resistance to cell death by apoptosis and expression of a senescence-associated secretory phenotype (SASP). SASP includes pro-inflammatory cytokines and chemokines, tissue-damaging proteases, growth factors; all contributing to tissue microenvironment alteration and loss of tissue homeostasis. Emerging evidence suggests that the changes in the number and composition of extracellular vesicles (EVs) released by senescent cells contribute to the adverse effects of senescence in aging. In addition, age-related alterations in mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) have been associated to dysregulated functions. The loss of functional stem cells necessary to maintain tissue homeostasis likely directly contributes to aging. In this review, we will focus on the characteristics and role of EVs isolated from senescent MSCs, the potential effect of MSC-derived EVs in aging and discuss their therapeutic potential to improve age-related diseases.

Keywords: mesenchymal stem cells, extracellular vesicles, regenerative medicine, aging, senescence, clinical translation

OPEN ACCESS

Edited by:
Bruna Corradetti, Houston Methodist Research Institute, United States

Reviewed by:
Fabiola Olivieri, Marche Polytechnic University, Italy
Francesco Prattichizzo, MultiMedica (IRCCS), Italy

***Correspondence:**
Danièle Noël
daniele.noel@inserm.fr

†These authors have contributed equally to this work

Specialty section:
This article was submitted to Molecular Medicine, a section of the journal Frontiers in Cell and Developmental Biology

Received: *30 August 2019*
Accepted: *10 February 2020*
Published: *21 February 2020*

Citation:
Boulestreau J, Maumus M, Rozier P, Jorgensen C and Noël D (2020) Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles in Aging. Front. Cell Dev. Biol. 8:107. doi: 10.3389/fcell.2020.00107

INTRODUCTION

Aging of the global population represents a growing burden on our healthcare system with a significant increase in the incidence of co-morbidities, including neurodegeneration, diabetes, cardiovascular diseases, cancer, osteoporosis, and osteoarthritis (OA), among others (Suzman et al., 2015). It is expected that in the coming years, people aged 65 years and over will outnumber children younger than 5 years. The rise of degenerative chronic diseases in the elderly not only influences negatively their quality of life but impacts financially our social security systems. There is therefore an urgent need to better understand the mechanisms driving aging and how we can positively impact on age-related disorders to develop novel therapeutic strategies.

AGING AND SENESCENCE

Aging is a complex process resulting from the accumulation of unpredictable molecular and cellular alterations in a time-dependent manner. Aging is characterized by nine hallmarks: genomic instability, telomere attrition, epigenetic alteration, loss of proteostasis, metabolic dysfunction, mitochondrial dysfunction, cellular senescence, stem cell exhaustion, and altered intercellular

communications (for review see Lopez-Otin et al., 2013; Lidzbarsky et al., 2018). Subsequently, aging is a cell-autonomous accumulation of damages to organelles and macromolecules in cells and organs. Cell non-autonomous mechanisms also play a role in modulating the degenerative changes occurring spontaneously. As examples, the pro-geronic C-C motif chemokine ligand 11 (CCL11) detected in serum from old mice can drive aging in young mice (Villeda et al., 2011). By contrast, the anti-geronic growth and differentiation factor (GDF11) identified in serum from young mice can induce rejuvenation after transfer in old mice using heterochronic parabiosis (Katsimpardi et al., 2014). However, the anti-aging role of GDF11 has been questioned since a potent inhibitory effect on skeletal muscle regeneration has been described thereafter (Brun and Rudnicki, 2015; Egerman et al., 2015). Although circulating factors may be important actors in the maintenance and propagation of aging, the identification of such factors is still missing. By contrast, the possibility that circulating EVs may instead mediate the beneficial function of a young milieu has been reported in a couple of studies and recently discussed (Prattichizzo et al., 2019).

Cellular senescence is characterized by permanent cell cycle arrest with resistance to cell death through necrosis, apoptosis or autophagy. It can be seen as a cell defense mechanism preventing unwanted proliferation of damaged cells to proceed toward oncogenic transformation. Senescence is likely not a single cell state and recent evidence highlights that distinct stimuli can induce different modes of senescence (for review, see Lunyak et al., 2017). DNA damage is a key inductive factor of senescence induced by physical (irradiation) or chemical [reactive oxygen species (ROS), mutagens] stress stimuli (*stress-induced senescence*). The imbalance between the production of ROS and anti-oxidants defined as oxidative stress contributes not only to DNA damage but also to protein damage and mitochondrial dysfunction leading to loss of homeostasis and senescence (Li et al., 2017). Other well characterized causes of senescence are telomere shortening (*replicative senescence*) and oncogene activation (*oncogene-induced senescence, OIS*), which also lead to DNA damage and persistent DNA damage response (DDR). Recently, the importance of senescence induced by transforming growth factor-β (TGF-β)/SMAD and phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Forkhead box O (FOXO) pathways has been highlighted as part of the normal developmental process (*developmental senescence*) (Munoz-Espin et al., 2013). Whatever the inductive signal, senescence is primarily controlled by the p53/p21CIP1 (p21) and p16INK4A/pRB signaling pathways (Larsson, 2011). Stimuli activating the DDR trigger the transcriptional activation of p53 inducing the cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) p21, which inhibits pRB phosphorylation and prevents E2F activity (**Figure 1**). Expression of p16INK4A also leads to pRB activation and E2F inactivation. Depending on the stimulus, either or both pathways may be activated. Furthermore, senescence may be transient or chronic. Transient senescence is involved in a beneficial process for normal development and regeneration while chronic senescence is associated with harmful process leading to disease and aging.

Senescent cells are characterized by enlarged nuclei and flattened morphology with presence of stress fibers, decreased adherence on plastic and vacuolization resulting from the dysregulated accumulation of macromolecules. They stain positive for acidic senescence-associated β-galactosidase (SA-βGal) activity, which is one of the most used senescence markers. More recently, senescence-associated lysosomal α-L-fucosidase (SA-α-Fuc) was proposed as a more sensitive and robust biomarker for cell senescence as compared to SA-βGal (Li et al., 2017). The presence of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF), which are stained by DAPI, and the expression of lysine 9-trimethylated histone H3 (H3K9Me3) are also hallmarks of DRR-associated senescence. The activity of the DDR can be highlighted by revealing the accumulation of γH2AX protein in the nucleus (Larsson, 2011). Markers of senescent cells include enhanced expression of cell cycle regulators (p16INK4a, p21, p27, p53, pRB) and of senescence-associated secretory phenotype (SASP) factors (**Figure 1**). The SASP comprises cytokines [interleukin-1β (IL-1β), IL-6], chemokines [monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), IL-8], growth factors [vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), hepatocyte growth factor (HGF), insulin growth factor-1 (IGF-1), TGFβ] and extracellular proteases [matrix metalloprotease-1 (MMP-1), -3, -13]. Of note, a large number of these factors are expressed at high basal levels in multipotent mesenchymal stromal or stem cells (MSCs).

MESENCHYMAL STEM CELLS AND EXTRACELLULAR VESICLES

Mesenchymal stem cells (MSCs) are isolated in large quantities from different tissue sources, especially bone marrow, adipose tissue or perinatal tissues and can be expanded *ex vivo*. They are defined by their capacity to adhere to plastic, a set of phenotypic markers ($CD73^+$, $CD90^+$, $CD105^+$, $CD11b^-$ or $CD14^-$, $CD19^-$ or $CD79a^-$, $CD34^-$, $CD45^-$, $HLA\text{-}DR^-$) and the ability to differentiate toward osteoblasts, adipocytes and chondrocytes (Dominici et al., 2006). In addition to their differentiation potential, MSCs are supportive cells exerting pleiotropic functions. They can exert namely anti-inflammatory, pro-proliferative, pro-angiogenic, anti-fibrotic, anti-apoptotic functions thanks to cell-cell interactions and secretion of a high number of soluble molecules. Among these, prostaglandin E2 (PGE2), TGFβ, IL-6, IL-1 receptor antagonist (IL-1RA), tumor necrosis factor (TNF)-inducible gene 6 protein (TSG6), nitric oxide (NO) produced by inducible NO synthase (iNOS) or kynurenine produced by indoleamine 2. 3-dioxygenase (IDO) are part of the anti-inflammatory secretome (Harrell et al., 2019). Other molecules such as HGF, FGF, VEGF are important components of the paracrine activity of MSCs. These molecules act upon release in the extracellular compartment but recent evidence indicates that they are primarily conveyed within extracellular vesicles (EVs) that play a key role in the cell-cell communication pathways.

Extracellular vesicles are divided into two main subtypes: exosomes and microvesicles (or microparticles)

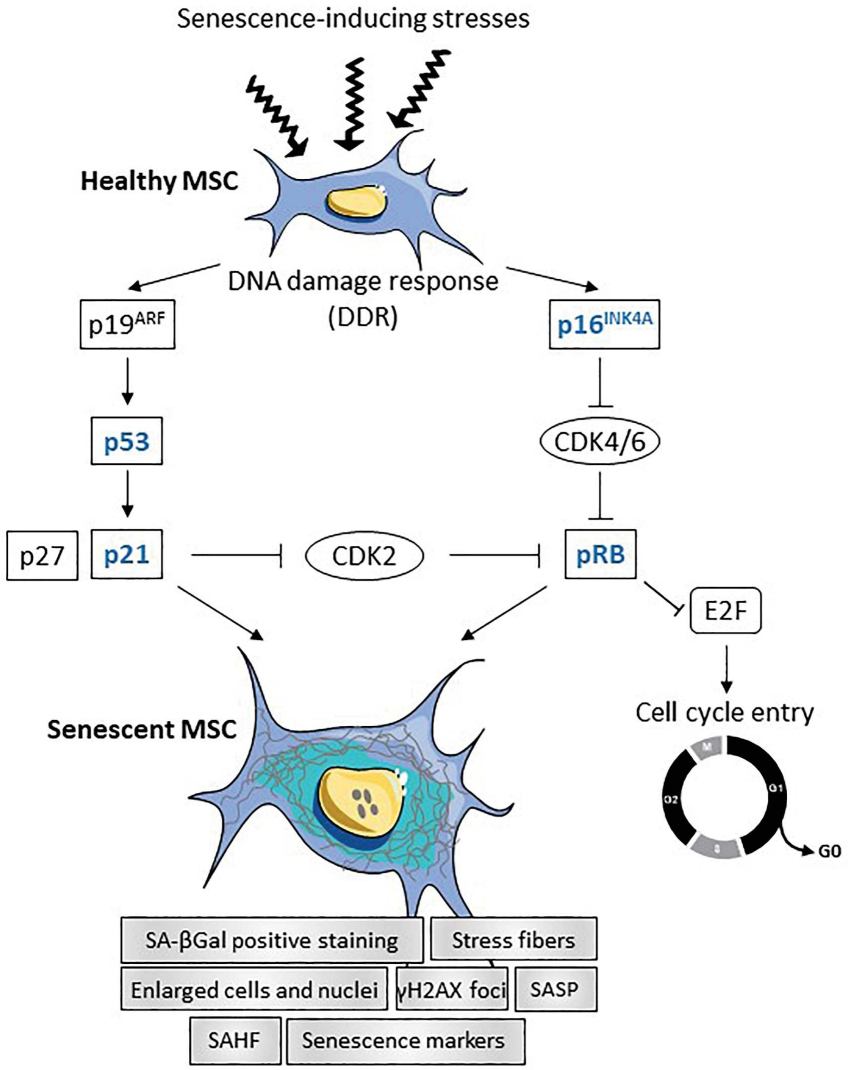


FIGURE 1 | Summary of transcriptional regulation of senescence in MSCs. In response to different stresses (oncogene, telomere attrition, oxydative stress, inflammation or mitochondrial dysfunction), DNA damage response (DDR) is induced in healthy MSCs leading to the activation of the two main signaling pathways $p19^{ARF}$ and $p16^{INK4A}$. Activation of $p19^{ARF}$ results in p53 and p21 activation, which inhibits CDK2 and induces senescence. Activation of the $p16^{INK4A}$-pRB pathway leads to cell cycle arrest and triggers senescence. Senescent MSCs are characterized by enlarged cells and nuclei, increased number of stress fibers, increased number of γH2AX foci and senescence-associated heterochromatin foci (SAHF), positive staining for SA-βGal and increased senescence markers and senescence-associated secretory phenotype (SASP).

(van Niel et al., 2018). Exosomes are small particles (less than 120 nm) originating from the endosomal compartment and produced in multivesicular bodies (MVB) that thereafter fuse with the plasma membrane to release their exosomal content. Microvesicles are vesicles around 100–500 nm that form by the budding of the plasma membrane under stress-inductive conditions. A third type of EVs called apoptotic bodies are characterized by a larger size (500–5000 nm) and a release upon fragmentation of apoptotic cells. However, they are not in the focus of the present review. The heterogeneity in EV size makes difficult to separate exosomes from microvesicles using current procedures for EV isolation, essentially based on physico-chemical properties. Because large exosomes and small microvesicles share similar density and size, the available purification methods can only separate small size and large size EVs (sEVs and lEVs, respectively), independently of their biogenesis (Thery et al., 2018). EVs contain proteins, lipids and nucleic acids, including mRNA, DNA and non-coding RNAs such as microRNAs and long non-coding RNAs (lncRNAs). They are enriched in some specific proteins (tetraspannins, members of the endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT), heat shock proteins) and lipids, especially cholesterol and sphingolipids. Nonetheless, the content of EVs mirrors the cell of origin and EVs also convey molecules that are specific for a particular cell type.

Extracellular vesicles are found in all biological fluids (blood, urine, breast milk, saliva, cerebrospinal fluid, synovial fluid,. . .) and are produced by all cell types. They are recognized as important components of the cell-to-cell communication pathways and exert a number of functions depending upon the parental cell and the environmental context. They are involved in tissue homeostasis maintenance and repair. They may also reflect the pathological state of the releasing cells, making them promising biomarkers of diverse pathologies (Svenningsen et al., 2019). EVs are therefore attractive as biomarkers for diagnosis or prognosis purposes and as therapeutic agents with documented activities related to the parental cell origin. EVs isolated from MSCs (MSC-EVs) are of particular interest for the scientific community because they reproduce the main functions of the parental cell, notably their immunosuppressive effect, and are safer since they do not possess nuclei and cannot replicate (Baldari et al., 2017). However, the function and the number of MSCs are altered with aging, which likely impact the content and effect of MSC-EVs (Li et al., 2017; Robbins, 2017). This dysfunction contributes to a large extend to the age-related degenerative changes in old individuals.

EFFECT OF AGING ON MSCs

Although data on the functionality of MSCs isolated from aged subjects with respect to young individuals are still debated in the literature, some consensual evidence appears. With the increase of donor age, MSCs from bone marrow are reported to show a decrease in proliferative and clonogenic/self-renewal capacities, characterized by the number of colony-forming unit-fibroblasts (CFU-F) but no phenotypic change is correlated with age (for review, see Charif et al., 2017). Nevertheless, a low expression level of CD146 is associated with late passages and shortening of telomeres in MSCs (for review, see Fafian-Labora et al., 2019). In addition, a decrease in the expression of CD106 and Stro-1 is observed in late passage MSCs while CD295 (leptin receptor) is increased (for review, see Li et al., 2017). Functionally, the differentiation capacity of MSCs, notably the osteogenic and chondrogenic differentiation potential, decreases with increasing donor age as well as their capacity to polarize macrophages toward the anti-inflammatory M2 phenotype (Yin et al., 2017). Adipogenic differentiation of MSCs is reported to increase with age. Interestingly, autophagy is increased in MSCs entering replicative aging (for review, see Fafian-Labora et al., 2019). Autophagy may play a dual role: in some models, autophagy induction is required for senescence while in other contexts, the decrease of autophagy induces senescence (Falser et al., 1987; Capasso et al., 2015). Nonetheless, the current paradigm underlines a key role for autophagy in reversing partially the senescence process occurring during aging (for review, see Fafian-Labora et al., 2019). Finally, levels in ROS and resulting oxidative stress are increased in aging MSCs (Marycz et al., 2016). Oxidative stress may result from low grade chronic inflammation occurring in aging and many degenerative diseases (Tofino-Vian et al., 2017). By contrast, treatment of MSCs with melatonin protects them from oxidative stress and related senescence highlighting the correlation between oxidative stress and senescence (Yun et al., 2018).

Replicative senescence can be induced in MSCs upon passages within population doublings (PD) 20–50 in culture. MSCs stop proliferating but maintain their metabolic state for a prolonged time. Although telomere shortening is not detected, accumulation of DNA damages and activation of the DDR together with loss of epigenetic control on chromatin deterioration have been described (for review, see Lunyak et al., 2017). MSCs have also been shown to enter OIS in response to oncogene exposition or loss of tumor suppressor genes (Braig et al., 2005). They can enter stress-induced senescence when exposed to oxidative stress, doxorubicin, bleomycin or very low doses of pesticides or irradiation (for review, see Lunyak et al., 2017). Finally, although not shown yet in MSCs, ectopic expression of the four reprogramming transcription factors OCT4, SOX2, KLF4 and C-MYC (OSKM) can cause senescence, which suggests that it could be indispensable for organism development (Mosteiro et al., 2016). Indeed, aging and senescence impact MSC characteristics in several ways and affect also the release of bioactive factors and EVs. A detailed analysis of the MSC secretome in different models of induced senescence revealed different protein profiles sustaining different expected functions (for review, see Lunyak et al., 2017).

Interestingly, a couple of studies indicate that age-related alterations in MSCs can be reversed. One interesting study reports a significant increase of cell division cycle 42 (Cdc42) activity in aged MSCs that can be decreased by the selective inhibitor ML141 (Chaker et al., 2018). Addition of ML141 on aged MSCs enhances cell growth, plastic adherence, viability and decreases the senescence markers, p16, p21, p53 while it restores the balance between pro- and anti-inflammatory cytokines. Other treatments, including resveratrol and non-coding RNA modulation, may also reverse the altered phenotype in senescent MSCs (Okada et al., 2016; Vono et al., 2018).

IMPACT OF CIRCULATING SENESCENT EVs ON MSC FUNCTION

The SASP in local tissue microenvironment and in body fluids impacts the characteristics and functions of resident stem cells and participates to altered tissue homeostasis occurring with aging. EVs are proposed to take a large part in senescence induction as demonstrated in a number of studies, notably on MSCs. A first study reported that the miRNA profiles of EVs isolated from the bone marrow interstitial fluid (BMIF-EVs) from young or aged mice were different with a significant increase of the miR-183 cluster in aged samples (Davis et al., 2017). *In vitro*, aged BMIF-EVs were highly endocytosed by young MSCs, which displayed reduced capacity to differentiate into osteoblasts. Transfection of young MSCs with miR-183-5p reduced proliferation and osteogenesis while it increased senescence. Likewise, circulating EVs from blood plasma of elderly donors were shown to reduce the osteogenic potential of young MSCs (Weilner et al., 2016). MiR-31 produced by endothelial cells was detected at elevated levels in the plasma

of osteoporotic and elderly patients and identified as one causal factor of osteogenesis inhibition by targeting Frizzled-3. Indeed, miR-31 may be involved in impaired bone formation in age-related diseases and may represent a valuable circulating biomarker for aging. Another study revealed that EVs from older women express high levels of C24:1 ceramide, a sphingolipid associated with the promotion of cell senescence and apoptosis, compared to younger individuals (Khayrullin et al., 2019). MSCs, which readily capture serum EVs, can be induced to senescence when EVs are loaded with C24:1 ceramide. In another report, muscle-derived circulating EVs isolated from the serum of old mice were shown to express higher levels of miR-34a, a miRNA associated with aging and inflammation, than in young mice (Fulzele et al., 2019). EVs recovered from miR-34a-overexpressing myoblasts reduced the survival of MSCs and increased senescence as detected by higher SA-βGal activity. Interestingly, EVs isolated from these myoblasts homed to bone *in vivo* and induced senescence of primary bone marrow-derived MSCs *ex vivo*. The authors concluded that aged skeletal muscle may be a potential source of circulating senescence-associated EVs impacting stem cell populations in tissues. Altogether, current data confirm that MSCs cultured *ex vivo* can be induced to senescence by circulating and tissue-derived aged EVs.

CHARACTERISTICS AND FUNCTION OF EVs FROM SENESCENT OR AGED MSCs

Increase of EV production is a general feature in aged and senescence-induced cells as shown by several studies as early as 2008 (Lehmann et al., 2008; Beer et al., 2015; Takasugi et al., 2017). Accordingly, the production of EVs by MSCs increases with donor age and late passage cultures (Fafian-Labora et al., 2017, 2019; Lei et al., 2017). The release of EVs from senescent cells is at least partially dependent on p53 and its downstream target gene tumor suppression-activated pathway 6 (TSAP6). P53 is a transcriptional regulator of endosome-associated genes, including Rab5B and Rab27B, that play important roles in endosome regulation and exosome biosynthesis (Fujii et al., 2006). There are two possible explanations for the enhanced secretion of EVs from senescent cells. EVs mediate the removal of undesirable, misfolded and toxic molecules, notably cytoplasmic DNA, allowing survival of cells (for review, see Takahashi et al., 2017). Fragmented DNA is known to activate the DDR and the export of fragmented DNA by EVs may contribute to prevent the aberrant activation of DDR pathways. Alternatively, senescent cells release EVs in the surrounding environment as a protective mechanism to communicate a distress signal, enabling neighboring cells to react more rapidly and more efficiently to stress. However, it must be underlined that EVs may also represent a non-canonical part of the SASP contributing to a pro-senescent signal via a bystander effect.

A second feature of EVs released by senescent cells is altered cargos (for review, see Urbanelli et al., 2016). EVs are proposed to be involved in the modulation of chronic, systemic inflammation occurring during aging (inflamm-aging), which is associated with the progression of age-related diseases, through the transport of a number of miRNAs. These miRNAs called inflammamiRs regulate the main age-related processes: DDR, oxidative stress, proteotoxic stress, senescence or mitochondrial dysfunction (for a review, see Prattichizzo et al., 2017). A panel of inflammamiRs commonly identified in distinct cell types includes miR-19b, miR-20a, miR-21, miR-126, miR-146a, and miR-155. In MSC-EVs, expression of several miRNAs is modulated with increasing age (for review, see Fafian-Labora et al., 2017). A decreased expression of a number of miRNAs was observed in MSC-EVs from old versus young rats (Wang et al., 2015). A significant decrease was confirmed for miR-294 and miR-872-3p. In another study, miR-146a and miR-335-5p were up- and down-regulated, respectively, in late passage MSC-EVs versus early passage MSC-EVs but the expression of both miRNAs increased with increasing age in MSC-EVs (Lei et al., 2017). However, the modulated expression of these miRNAs in MSC-EVs was not demonstrated to be related to senescence induction. Finally, miR-183-5p was shown to be preferentially expressed in EVs isolated in bone marrow-derived MSCs from aged mice and to induce senescence features in young MSCs (Davis et al., 2017). The modulation of miRNAs in aged versus young MSC-EVs or late versus early passage MSC-EVs is illustrated in **Figure 2**. Furthermore, a number of miRNAs whose expression is modulated in aged versus young MSCs have been identified (Okada et al., 2016; Ganguly et al., 2017; Kulkarni et al., 2017; Vono et al., 2018; **Figure 2**). Their presence and expression level in MSC-EVs remain to be determined. However, two of them, miR-17 and miR-335-5p, have been described as higher in young MSCs versus aged MSCs and in aged MSC-EVs versus young MSC-EVs, respectively, suggesting a possible modulation of their expression in MSC-EVs with respect to the parental cells. These miRNAs identified in MSCs as senescence- and/or aging-associated factors have also been described in other cell types, except for miR-27b, miR-199-5p, miR-294, and miR-872-3p, highlighting their importance in the regulation of aging.

The current notion is that EVs exert similar functions as the parental cells. Indeed, the modulation of secretomes and EV contents released by senescent and/or aged MSCs likely contributes to their altered functions (for review, see Lunyak et al., 2017). Contrary to EVs isolated from aged MSCs, EVs from young MSCs were shown to rejuvenate old hematopoietic stem cells and restore their functions thanks to the transfer of autophagy- and lineage commitment-related mRNAs (Kulkarni et al., 2017). The authors discussed the hypothesis that reduced expression of these mRNAs in old MSC-EVs could be one of the mechanisms involved in niche-mediated aging of hematopoietic stem cells. Similarly, bone marrow MSC-EVs isolated from aged mice were reported to impair the sensitivity to insulin of adipocytes, myocytes and hepatocytes *in vitro* and to induce insulin resistance *in vivo*, through miR-29b-5p upregulation (Su et al., 2019). Another study described the therapeutic role of young MSC-EVs in liposaccharide-induced acute lung injury while aged MSC-EVs failed to exert protective effect (Huang et al., 2019). This effect was mediated by the switch in macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype and an altered miRNA content.

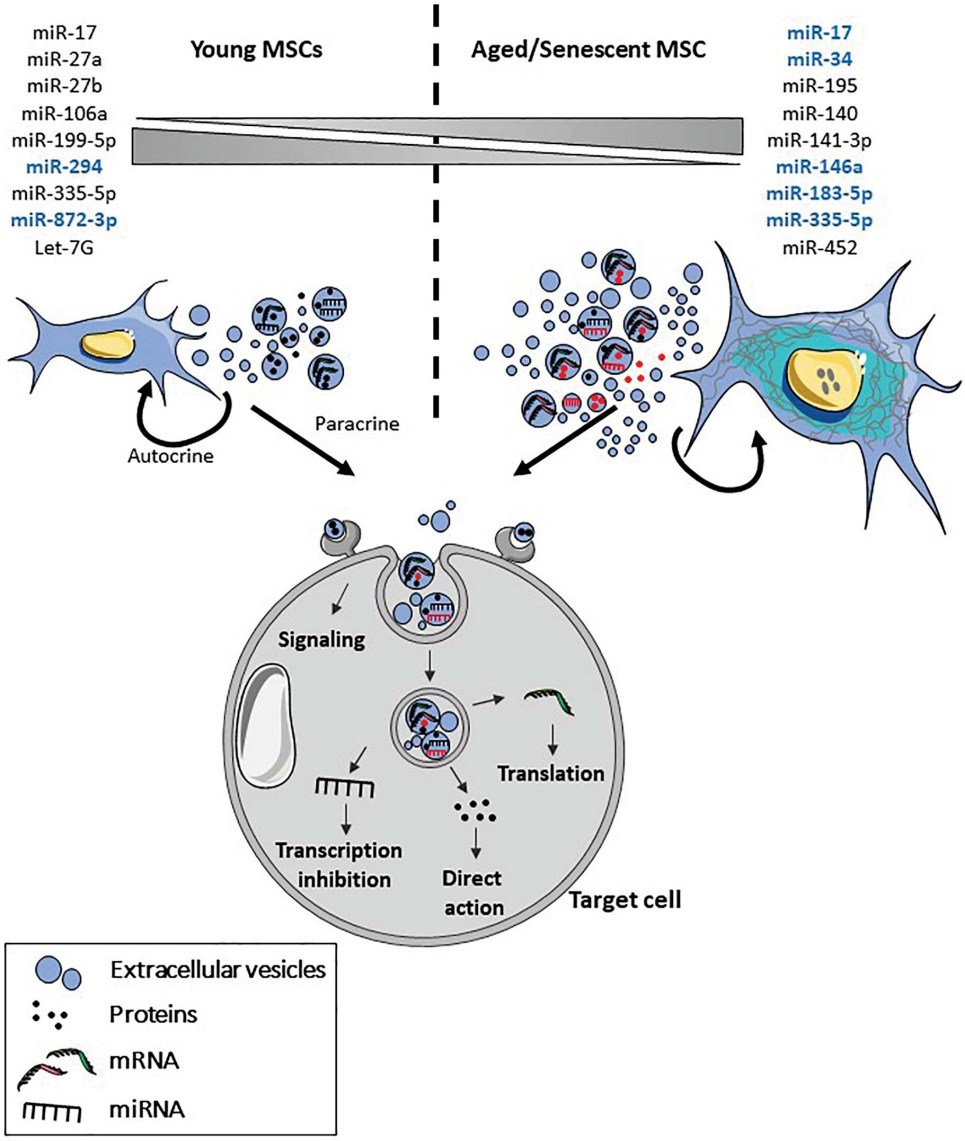


FIGURE 2 | Features of senescent MSC-EVs. With aging and senescence, production of EVs by MSCs is increased and their cargo is altered. Both the content in different types of molecules and their number may be altered in MSCs. More specifically, several miRNAs have been identified as being modulated in MSCs and in MSC-EVs (blue) with aging and/or senescence. Upon release, MSC-EVs will interact in an autocrine and paracrine manner with the parental and target cells contributing to senescence propagation. Senescent MSC-EVs can interact directly with cell surface receptors and induce intracellular signaling pathways or fuse with the plasma membrane or be internalized by endocytosis. After internalization, proteins, miRNA and mRNA are released in the cytosol where they are functionally active.

To our knowledge, no literature exists on the function of EVs isolated from senescence-induced MSCs. Interestingly, senescent fibroblasts isolated from oral submucous fibrosis biopsies were shown to participate in the improvement of fibrotic tissue through the secretion of MMPs (Pitiyage et al., 2011). Although we have to face to the lack of data on the contribution of EVs isolated from aged or senescent MSCs to the aging of the organism, the hypothesis that the secretome of senescent MSCs might influence and modulate stem cell niches and tissue homeostasis has been discussed elsewhere (for review, see Lunyak et al., 2017). Therefore, the possibility that senescent MSC-EVs may induce opposite effects depending on the tissue, the age or the context (inflammation, disease, . . .) has to be further investigated.

THERAPEUTIC EFFECT OF MSC-EVs ON SENESCENCE IN AGE-RELATED DISEASES

The regenerative properties of MSCs and MSC-EVs have been largely demonstrated and illustrated on a large

variety of age-related degenerative diseases (for review, see Phinney and Pittenger, 2017; Chang et al., 2018; Chen et al., 2019). As examples, MSC-derived EVs were reported to have a chondroprotective effect in OA (Cosenza et al., 2017; D'Arrigo et al., 2019) and to exhibit beneficial role in type 1 and type 2 diabetes (Fan et al., 2019; Mahdipour et al., 2019), in cardiovascular diseases (Bian et al., 2014; Suzuki et al., 2017) or stroke (Doeppner et al., 2015).

The modulating role of EVs on the aging process has been demonstrated *in vivo* in a couple of studies. One of these studies reported that hypothalamic neural stem/progenitor cells (NSS) secrete decreasing amounts of EVs in the cerebrospinal fluid during aging (Zhang et al., 2017). Interestingly, a central treatment with healthy NSS-EVs could control whole body's aging through the release of exosomal miRNAs. Another study showed that circulating levels of extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (eNAMPT) decline with age and that over-expression of eNAMPT in adipose tissue or infusion of eNAMPT-containing EVs can extend the lifespan of aged mice (Yoshida et al., 2019). This effect was mediated by the release of eNAMPT-containing EVs into target cells that led to enhanced NAD^+ synthesis, a known factor regulating the aging process. However, the effect of MSCs has been poorly investigated on age-associated senescence. One study reports that the secretome from human fetal MSCs ameliorates replicative senescence of adult MSCs as shown by significantly reduced SA-βGal expression and activity, enhanced cell proliferation and osteogenic differentiation potential in late passage (Wang et al., 2016). A similar approach demonstrated that the conditioned medium (CM) from MSCs regulated senescence features in IL1β-treated OA chondrocytes, namely SA-βGal activity, accumulation of γH2AX foci and reduction in the number of actin stress fibers (Platas et al., 2016). In addition, CM from MSCs decreased the oxidative stress, expression of p21 and enhanced the expression of sirtuin-1 (SIRT-1). These data were confirmed in another report showing that MSC-EVs from healthy donors downregulate SA-βGal activity and γH2AX foci in IL1β-treated osteoblasts isolated from OA patients (Tofino-Vian et al., 2017). MSC-EVs were also shown to reduce the production of the pro-inflammatory cytokines IL6 and PGE2 and the oxidative stress. Finally, EVs from young MSCs were reported to improve growth and to reduce senescent features of MSCs induced to genetic or replicative senescence (passages 10–14) (Liu et al., 2019).

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Aging impacts the function of MSCs and stimulates their senescence *in vivo*. With advancing donor age, senescent MSCs are characterized by a decline in the number of CFU-F, decreased capacity for differentiation, angiogenesis, wound healing properties and increased secretion of a SASP that contributes to senescence propagation. MSC-EVs have now been shown to be new components of the SASP and critical players in cellular senescence and aging. MSC-EVs are moving into the clinics for a number of therapeutic applications because this cell-free therapy offers more safety, better reproducibility and potentially higher scalability. Success of these therapies will depend on the physiological function of the parental cells and senescent MSCs may loss or have reduced therapeutic function and even worse, counteract the efficiency of the treatment. Aging therefore represents a limitation to the use of autologous MSCs, especially in older patients, for their use in tissue engineering and cell therapy applications. A better understanding of the senescence process will help controlling and modulating MSC-EVs cargos for boosting the beneficial effects of these innovative treatments.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

FUNDING

We acknowledge funding support from the Inserm Institute, the University of Montpellier, the Agence Nationale pour la Recherche for support of the national infrastructure: "ECELLFRANCE: Development of a national adult mesenchymal stem cell based therapy platform" (ANR-11-INSB-005). This study was also supported by a research grant called SEN-OA from FOREUM Foundation for Research in Rheumatology and the Arthritis R&D through the program "ROAD: Research on OsteoArthritis Diseases."

REFERENCES

Baldari, S., Di Rocco, G., Piccoli, M., Pozzobon, M., Muraca, M., and Toietta, G. (2017). Challenges and strategies for improving the regenerative effects of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Int. J. Mol. Sci.* 18:E2087. doi: 10.3390/ijms18102087

Beer, L., Zimmermann, M., Mitterbauer, A., Ellinger, A., Gruber, F., Narzt, M. S., et al. (2015). Analysis of the secretome of apoptotic peripheral blood mononuclear cells: impact of released proteins and exosomes for tissue regeneration. *Sci. Rep.* 5:16662. doi: 10.1038/srep16662

Bian, S., Zhang, L., Duan, L., Wang, X., Min, Y., and Yu, H. (2014). Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. *J. Mol. Med. (Berl.)* 92, 387–397. doi: 10.1007/s00109-013-1110-5

Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A. H., Schlegelberger, B., et al. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660–665. doi: 10.1038/nature03841

Brun, C. E., and Rudnicki, M. A. (2015). GDF11 and the mythical fountain of youth. *Cell Metab.* 22, 54–56. doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.009

Capasso, S., Alessio, N., Squillaro, T., Di Bernardo, G., Melone, M. A., Cipollaro, M., et al. (2015). Changes in autophagy, proteasome activity and metabolism to determine a specific signature for acute and chronic senescent mesenchymal stromal cells. *Oncotarget* 6, 39457–39468. doi: 10.18632/oncotarget.6277

Chaker, D., Mouawad, C., Azar, A., Quilliot, D., Achkar, I., Fajloun, Z., et al. (2018). Inhibition of the RhoGTPase Cdc42 by ML141 enhances hepatocyte

differentiation from human adipose-derived mesenchymal stem cells via the Wnt5a/PI3K/miR-122 pathway: impact of the age of the donor. *Stem Cell Res. Ther.* 9:167. doi: 10.1186/s13287-018-0910915

Chang, Y. H., Wu, K. C., Harn, H. J., Lin, S. Z., and Ding, D. C. (2018). Exosomes and stem cells in degenerative disease diagnosis and therapy. *Cell Transplant.* 27, 349–363. doi: 10.1177/0963689717723636

Charif, N., Li, Y. Y., Targa, L., Zhang, L., Ye, J. S., Li, Y. P., et al. (2017). Aging of bone marrow mesenchymal stromal/stem cells: implications on autologous regenerative medicine. *Biomed. Mater. Eng.* 28, S57-S63. doi: 10.3233/BME-171624

Chen, L., Qu, J., and Xiang, C. (2019). The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Res. Ther.* 10:1. doi: 10.1186/s13287-018-11051109

Cosenza, S., Ruiz, M., Toupet, K., Jorgensen, C., and Noel, D. (2017). Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis. *Sci. Rep.* 7:16214. doi: 10.1038/s41598-017-1537615378

D'Arrigo, D., Roffi, A., Cucchiarini, M., Moretti, M., Candrian, C., and Filardo, G. (2019). Secretome and extracellular vesicles as new biological therapies for knee osteoarthritis: a systematic review. *J. Clin. Med.* 8:E1867. doi: 10.3390/jcm8111867

Davis, C., Dukes, A., Drewry, M., Helwa, I., Johnson, M. H., Isales, C. M., et al. (2017). MicroRNA-183-5p increases with age in bone-derived extracellular vesicles, suppresses bone marrow stromal (stem) cell proliferation, and induces stem cell senescence. *Tissue Eng. Part A* 23, 1231–1240. doi: 10.1089/ten.TEA.2016.0525

Doeppner, T. R., Herz, J., Gorgens, A., Schlechter, J., Ludwig, A. K., Radtke, S., et al. (2015). Extracellular vesicles improve post-stroke neuroregeneration and prevent postischemic immunosuppression. *Stem Cells Transl. Med.* 4, 1131–1143. doi: 10.5966/sctm.20152078

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905

Egerman, M. A., Cadena, S. M., Gilbert, J. A., Meyer, A., Nelson, H. N., Swalley, S. E., et al. (2015). GDF11 increases with age and inhibits skeletal muscle regeneration. *Cell Metab.* 22, 164–174. doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.010

Fafian-Labora, J., Lesende-Rodriguez, I., Fernandez-Pernas, P., Sangiao-Alvarellos, S., Monserrat, L., Arntz, O. J., et al. (2017). Effect of age on pro-inflammatory miRNAs contained in mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Sci. Rep.* 7:43923. doi: 10.1038/srep43923

Fafian-Labora, J. A., Morente-Lopez, M., and Arufe, M. C. (2019). Effect of aging on behaviour of mesenchymal stem cells. *World J. Stem Cells* 11, 337–346. doi: 10.4252/wjsc.v11.i6.337

Falser, N., Bandtlow, I., Rziha, H. J., Haus, M., and Wolf, H. (1987). The role of acute and latent virus infections in the pathogenesis of inner ear disturbances. *Am. J. Otol.* 8, 136–147

Fan, B., Li, C., Szalad, A., Wang, L., Pan, W., Zhang, R., et al. (2019). Mesenchymal stromal cell-derived exosomes ameliorate peripheral neuropathy in a mouse model of diabetes. *Diabetologia* 63, 431–443. doi: 10.1007/s00125-019-050435040

Fujii, M., Kawai, Y., Endoh, M., Hossain, M. N., Nakabayashi, K., and Ayusawa, D. (2006). Expression of RAB27B is up-regulated in senescent human cells. *Mech. Ageing Dev.* 127, 639–642. doi: 10.1016/j.mad.2006.03.001

Fulzele, S., Mendhe, B., Khayrullin, A., Johnson, M., Kaiser, H., Liu, Y., et al. (2019). Muscle-derived miR-34a increases with age in circulating extracellular vesicles and induces senescence of bone marrow stem cells. *Aging (Albany NY)* 11, 1791–1803. doi: 10.18632/aging.101874

Ganguly, P., El-Jawhari, J. J., Giannoudis, P. V., Burska, A. N., Ponchel, F., and Jones, E. A. (2017). Age-related changes in bone marrow mesenchymal stromal cells: a potential impact on osteoporosis and osteoarthritis development. *Cell Transplant.* 26, 1520–1529. doi: 10.1177/0963689717721201

Harrell, C. R., Fellabaum, C., Jovicic, N., Djonov, V., Arsenijevic, N., and Volarevic, V. (2019). Molecular mechanisms responsible for therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretome. *Cells* 8:E467. doi: 10.3390/cells8050467

Huang, R., Qin, C., Wang, J., Hu, Y., Zheng, G., Qiu, G., et al. (2019). Differential effects of extracellular vesicles from aging and young mesenchymal stem cells in acute lung injury. *Aging (Albany NY)* 11, 7996–8014. doi: 10.18632/aging.102314

Katsimpardi, L., Litterman, N. K., Schein, P. A., Miller, C. M., Loffredo, F. S., Wojtkiewicz, G. R., et al. (2014). Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. *Science* 344, 630–634. doi: 10.1126/science.1251141

Khayrullin, A., Krishnan, P., Martinez-Nater, L., Mendhe, B., Fulzele, S., Liu, Y., et al. (2019). Very long-chain C24:1 ceramide is increased in serum extracellular vesicles with aging and can induce senescence in bone-derived mesenchymal stem cells. *Cells* 8:E37. doi: 10.3390/cells8010037

Kulkarni, R., Bajaj, M., Ghode, S., Jalnapurkar, S., Limaye, L., and Kale, V. P. (2017). Intercellular transfer of microvesicles from young mesenchymal stromal cells rejuvenates aged murine hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 36, 420–433. doi: 10.1002/stem.2756

Larsson, L. G. (2011). Oncogene- and tumor suppressor gene-mediated suppression of cellular senescence. *Semin. Cancer Biol.* 21, 367–376. doi: 10.1016/j.semcancer.2011.10.005

Lehmann, B. D., Paine, M. S., Brooks, A. M., McCubrey, J. A., Renegar, R. H., Wang, R., et al. (2008). Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 68, 7864–7871. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-076538

Lei, Q., Liu, T., Gao, F., Xie, H., Sun, L., Zhao, A., et al. (2017). Microvesicles as potential biomarkers for the identification of senescence in human mesenchymal stem cells. *Theranostics* 7, 2673–2689. doi: 10.7150/thno.18915

Li, Y., Wu, Q., Wang, Y., Li, L., Bu, H., and Bao, J. (2017). Senescence of mesenchymal stem cells (review). *Int. J. Mol. Med.* 39, 775–782.

Lidzbarsky, G., Gutman, D., Shekhidem, H. A., Sharvit, L., and Atzmon, G. (2018). Genomic instabilities, cellular senescence, and aging: *in vitro*, *in vivo* and aging-like human syndromes. *Front. Med. (Lausanne)* 5:104. doi: 10.3389/fmed.2018.00104

Liu, S., Mahairaki, V., Bai, H., Ding, Z., Li, J., Witwer, K. W., et al. (2019). Highly purified human extracellular vesicles produced by stem cells alleviate aging cellular phenotypes of senescent human cells. *Stem Cells* 37, 779–790. doi: 10.1002/stem.2996

Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194–1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039

Lunyak, V. V., Amaro-Ortiz, A., and Gaur, M. (2017). Mesenchymal stem cells secretory responses: senescence messaging secretome and immunomodulation perspective. *Front. Genet.* 8:220. doi: 10.3389/fgene.2017.00220

Mahdipour, E., Salmasi, Z., and Sabeti, N. (2019). Potential of stem cell-derived exosomes to regenerate beta islets through Pdx-1 dependent mechanism in a rat model of type 1 diabetes. *J. Cell. Physiol.* 234, 20310–20321. doi: 10.1002/jcp.28631

Marycz, K., Kornicka, K., Maredziak, M., Golonka, P., and Nicpon, J. (2016). Equine metabolic syndrome impairs adipose stem cells osteogenic differentiation by predominance of autophagy over selective mitophagy. *J. Cell. Mol. Med.* 20, 2384–2404. doi: 10.1111/jcmm.12932

Mosteiro, L., Pantoja, C., Alcazar, N., Marion, R. M., Chondronasiou, D., Rovira, M., et al. (2016). Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming *in vivo*. *Science* 354:aaf4445. doi: 10.1126/science.aaf4445

Munoz-Espin, D., Canamero, M., Maraver, A., Gomez-Lopez, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., et al. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* 155, 1104–1118. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.019

Okada, M., Kim, H. W., Matsu-ura, K., Wang, Y. G., Xu, M., and Ashraf, M. (2016). Abrogation of age-induced microRNA-195 rejuvenates the senescent mesenchymal stem cells by reactivating telomerase. *Stem Cells* 34, 148–159. doi: 10.1002/stem.2211

Phinney, D. G., and Pittenger, M. F. (2017). Concise review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy. *Stem Cells* 35, 851–858. doi: 10.1002/stem.2575

Pitiyage, G. N., Slijepcevic, P., Gabrani, A., Chianea, Y. G., Lim, K. P., Prime, S. S., et al. (2011). Senescent mesenchymal cells accumulate in human fibrosis by a telomere-independent mechanism and ameliorate fibrosis through matrix metalloproteinases. *J. Pathol.* 223, 604–617. doi: 10.1002/path.2839

Platas, J., Guillen, M. I., Perez Del, Caz, M. D., Gomar, F., Castejon, M. A., Mirabet, V., et al. (2016). Paracrine effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells in inflammatory stress-induced senescence features of osteoarthritic chondrocytes. *Aging (Albany NY)* 8, 1703–1717. doi: 10.18632/aging.101007

Prattichizzo, F., Giuliani, A., Sabbatinelli, J., Mensa, E., De Nigris, V., La Sala, L., et al. (2019). Extracellular vesicles circulating in young organisms promote healthy longevity. *J. Extracell. Vesicles* 8:1656044. doi: 10.1080/20013078.2019.1656044

Prattichizzo, F., Micolucci, L., Cricca, M., De Carolis, S., Mensa, E., Ceriello, A., et al. (2017). Exosome-based immunomodulation during aging: a nano-perspective on inflamm-aging. *Mech. Ageing Dev.* 168, 44–53. doi: 10.1016/j.mad.2017.02.008

Robbins, P. D. (2017). Extracellular vesicles and aging. *Stem Cell Investig.* 4:98. doi: 10.21037/sci.2017.12.03

Su, T., Xiao, Y., Xiao, Y., Guo, Q., Li, C., Huang, Y., et al. (2019). Bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomal MiR-29b-3p regulates aging-associated insulin resistance. *ACS Nano* 13, 2450–2462. doi: 10.1021/acsnano.8b09375

Suzman, R., Beard, J. R., Boerma, T., and Chatterji, S. (2015). Health in an ageing world–what do we know? *Lancet* 385, 484–486. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61597-X

Suzuki, E., Fujita, D., Takahashi, M., Oba, S., and Nishimatsu, H. (2017). Therapeutic effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes in cardiovascular disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 998, 179–185. doi: 10.1007/978-981-10-4397-0_12

Svenningsen, P., Sabaratnam, R., and Jensen, B. L. (2019). Urinary extracellular vesicles: origin, role as intercellular messengers and biomarkers; efficient sorting and potential treatment options. *Acta Physiol. (Oxf.)* 228:e13346. doi: 10.1111/apha.13346

Takahashi, A., Okada, R., Nagao, K., Kawamata, Y., Hanyu, A., Yoshimoto, S., et al. (2017). Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat. Commun.* 8:15287. doi: 10.1038/ncomms15287

Takasugi, M., Okada, R., Takahashi, A., Virya Chen, D., Watanabe, S., and Hara, E. (2017). Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2. *Nat. Commun.* 8:15729. doi: 10.1038/ncomms15728

Thery, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., et al. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International society for extracellular vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* 7:1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750

Tofino-Vian, M., Guillen, M. I., Perez Del, Caz, M. D., Castejon, M. A., and Alcaraz, M. J. (2017). Extracellular vesicles from adipose-derived mesenchymal stem cells downregulate senescence features in osteoarthritic osteoblasts. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017:7197598. doi: 10.1155/2017/7197598

Urbanelli, L., Buratta, S., Sagini, K., Tancini, B., and Emiliani, C. (2016). Extracellular vesicles as new players in cellular senescence. *Int. J. Mol. Sci.* 17:E1408. doi: 10.3390/ijms17091408

van Niel, G., D'Angelo, G., and Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 213–228. doi: 10.1038/nrm.2017.125

Villeda, S. A., Luo, J., Mosher, K. I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., et al. (2011). The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477, 90–94. doi: 10.1038/nature10357

Vono, R., Jover Garcia, E., Spinetti, G., and Madeddu, P. (2018). Oxidative stress in mesenchymal stem cell senescence: regulation by coding and noncoding RNAs. *Antioxid. Redox Signal.* 29, 864–879. doi: 10.1089/ars.2017.7294

Wang, B., Lee, W. Y., Huang, B., Zhang, J. F., Wu, T., Jiang, X., et al. (2016). Secretome of human fetal mesenchymal stem cell ameliorates replicative senescen. *Stem Cells Dev.* 25, 1755–1766. doi: 10.1089/scd.2016.0079

Wang, Y., Fu, B., Sun, X., Li, D., Huang, Q., Zhao, W., et al. (2015). Differentially expressed microRNAs in bone marrow mesenchymal stem cell-derived microvesicles in young and older rats and their effect on tumor growth factor-beta1-mediated epithelial-mesenchymal transition in HK2 cells. *Stem Cell Res. Ther.* 6:185. doi: 10.1186/s13287-015-0179-x

Weilner, S., Schraml, E., Wieser, M., Messner, P., Schneider, K., Wassermann, K., et al. (2016). Secreted microvesicular miR-31 inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Aging Cell* 15, 744–754. doi: 10.1111/acel.12484

Yin, Y., Wu, R. X., He, X. T., Xu, X. Y., Wang, J., and Chen, F. M. (2017). Influences of age-related changes in mesenchymal stem cells on macrophages during in-vitro culture. *Stem Cell Res. Ther.* 8:153. doi: 10.1186/s13287-017-0608600

Yoshida, M., Satoh, A., Lin, J. B., Mills, K. F., Sasaki, Y., Rensing, N., et al. (2019). Extracellular vesicle-contained eNAMPT delays aging and extends lifespan in mice. *Cell Metab.* 30, 329–342. doi: 10.1016/j.cmet.2019.05.015

Yun, S. P., Han, Y. S., Lee, J. H., Kim, S. M., and Lee, S. H. (2018). Melatonin rescues mesenchymal stem cells from senescence induced by the uremic toxin *p*-cresol via inhibiting mTOR-dependent autophagy. *Biomol Ther (Seoul)* 26, 389–398. doi: 10.4062/biomolther.2017.071

Zhang, Y., Kim, M. S., Jia, B., Yan, J., Zuniga-Hertz, J. P., Han, C., et al. (2017). Hypothalamic stem cells control ageing speed partly through exosomal miRNAs. *Nature* 548, 52–57. doi: 10.1038/nature23282

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Boulestreau, Maumus, Rozier, Jorgensen and Noël. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

1.4.5.2 EV dérivées de CSM en thérapie contre la sénescence associée à l'arthrose

Comme nous l'avons vu précédemment, l'arthrose est une maladie liée à l'âge corrélée à un nombre élevé de cellules sénescentes dans les tissus articulaires. Chez les patients arthrosiques, le nombre de cellules sénescentes dans le cartilage, la membrane synoviale, le coussinet adipeux infrapatellaire et l'os sous-chondral est corrélé avec l'âge. En effet, les cellules sénescentes telles que les chondrocytes, les fibroblastes synoviaux, les ostéoblastes et les progéniteurs de la moelle osseuse (MO) sont augmentés dans l'arthrose (Del Rey et al., 2019; Diekman et al., 2018; Farr et al., 2016). Leur accumulation est l'un des processus clés contribuant à la progression de la pathologie notamment par la sécrétion de facteurs du SASP (He et Sharpless, 2017).

Les CSM et leurs EV ont fait la preuve de leur efficacité dans des modèles pré-cliniques et sont actuellement évaluées en clinique. Il a notamment été montré que les CSM-EV possédaient un effet sénothérapeutique dans plusieurs études. Par exemple, le EV dérivées de CSM à passage précoce atténuent le phénotype de sénescence des CSM en sénescence réplicative (Liu et al., 2019). Parallèlement à la démonstration que les CSM-EV ont un impact direct sur le phénotype sénescent des cellules cibles, un certain nombre d'études ont montré des effets bénéfiques sur des pathologies liées au vieillissement (Ahmadi et Rezaie, 2021). Cependant, comme nous l'avons vu précédemment dans ce manuscrit, les fonctions des CSM et de leur EV sont affectées par le vieillissement. L'effet le plus impactant du vieillissement est la régulation à la hausse du SASP et la régulation à la baisse des propriétés anti-oxydantes et sénomorphiques. Cela suggère que dans une perspective de traitement allogénique, les CSM provenant de jeunes donneurs doivent être privilégiées afin de produire les EV ayant des fonctionnalités optimales.

Nous avons discuté de ce sujet dans une revue de la littérature publiée récemment dans Advanced Drug Delivery Reviews, intitulée « Extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells: Therapeutic perspectives for targeting senescence in osteoarthritis »

Article 3 (Revue de la littérature) : Vésicules extracellulaires de cellules stromales mésenchymateuses: perspectives thérapeutiques pour cibler la sénescence dans l'arthrose

Extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells: Therapeutic perspectives for targeting senescence in osteoarthritis

Jérémy Boulestreau, Marie Maumus, Pauline Rozier, Christian Jorgensen and Danièle Noël.

Publiée dans : Frontiers in Cell and Developmental Biology

Advanced Drug Delivery Reviews 175 (2021) 113836

Contents lists available at ScienceDirect

Advanced Drug Delivery Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/adr

Extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells: Therapeutic perspectives for targeting senescence in osteoarthritis

Jérémy Boulestreau [a], Marie Maumus [a,b], Christian Jorgensen [a,c], Danièle Noël [a,c,*]

[a] IRMB, University of Montpellier, INSERM, Montpellier, France
[b] Bauerfeind France, IRMB, Montpellier, France
[c] Clinical Immunology and Osteoarticular Disease Therapeutic Unit, Department of Rheumatology, CHU Montpellier, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 26 February 2021
Revised 19 May 2021
Accepted 12 June 2021
Available online 22 June 2021

Keywords:
Mesenchymal stromal cell
Extracellular vesicle
Senescence
Aging
Osteoarthritis
Regenerative medicine

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a common age-related disease that correlates with a high number of senescent cells in joint tissues. Senescence has been reported to be one of the main drivers of OA pathogenesis, in particular via the release of senescence-associated secretory phenotype (SASP) factors. SASP factors are secreted as single molecules and/or packaged within extracellular vesicles (EVs), thereby contributing to senescent phenotype dissemination. Targeting senescent cells using senolytics or senomorphics has therefore been tested and improvement of OA-associated features has been reported in murine models. Mesenchymal stromal cells (MSCs) and their derived EVs (MSC-EVs) are promising treatments for OA, exerting pleiotropic functions by producing a variety of factors. However, functions of MSCs and MSC-EVs are affected by aging. In this review, we discuss on the impact of the senescent environment on functions of aged MSC-EVs and on the anti-aging properties of MSC-EVs in the context of OA.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction . . . 2
2. Mesenchymal stromal cells and extracellular vesicles . . . 2
3. Common features of senescence and osteoarthritis . . . 2
   3.1. Cellular senescence features . . . 2
   3.2. Senescence and osteoarthritis associated features . . . 2
4. Impact of age on the functions of mesenchymal stromal cells-derived EVs . . . 4
5. Rejuvenation of aged MSCs and improvement of EV function . . . 4
6. Therapeutic effect of MSC-EVs in osteoarthritis . . . 5
   6.1. Chondroprotective effect of MSC-EVs on OA characteristics in joint tissues . . . 5
   6.2. Senotherapeutic effect of MSC-EVs on senescent features of joint tissues . . . 5
7. Discussion . . . 6
8. Conclusions . . . 6
   Declaration of Competing Interest . . . 7
   Acknowledgements . . . 7
   References . . . 7

* Corresponding author at: Inserm U1183, IRMB, Hôpital Saint-Eloi, 80 avenue Augustin Fliche, 34295 Montpellier cedex 5, France.

E-mail address: daniele.noel@inserm.fr (D. Noël).

https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113836
0169-409X/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Osteoarthritis (OA) is the most common joint disorder characterized by cartilage deterioration, calcification in the form of osteophytes and subchondral sclerosis and, low-grade synovitis. Several risk factors have been identified including genetics, obesity, repeated traumas, metabolic disorders, but the most prevalent one is age. This degenerative and debilitating disease affects over half of individuals aged 65 years and older, which yields around 30 million adults in the US population [1]. It is estimated that the number of people affected will double in the coming years to reach nearly 67 million by 2030 [2]. Senescence is one of the hallmarks of aging that has been implicated in the pathogenesis and progression of most of aging-associated diseases, including OA (for review, see [3]). However, the exact mechanism connecting senescence and OA pathology remains unclear. Senescent cells are cell cycle-arrested and release a secretome containing various bioactive molecules, called the senescence-associated secretory phenotype (SASP). These molecules can be released as single molecules or within extracellular vesicles (EVs) that contribute to the pathogenesis of OA and the degradation of joint tissues. Targeting senescent cells therefore represents a novel approach for treating OA [4].

Among the therapeutic strategies being investigated for the treatment of OA is the use of mesenchymal stromal/stem cells (MSCs). They have proved efficacy in non-clinical models of OA by decreasing inflammation and protecting cartilage and bone from degradation and, in the clinics by improving pain and functional parameters ([5,6], for *meta*-analysis and review [7]). More recently, MSC-derived EVs (MSC-EVs) have been reported to recapitulate most of the beneficial effects of parental MSCs. They improved the phenotype of OA chondrocytes *in vitro* [8] and exerted a therapeutic effect in murine models of OA [9,10] or in cartilage repair [11]. EV-based therapies may therefore represent novel alternatives to cells to combat aging via the secretion of regenerative factors and the depletion of senescent cells. Besides, EVs from aged or senescent MSCs may lose their regenerative potential and negatively influence the function of recipient cells through the release of SASP factors. In this review, we discuss the therapeutic role of MSC-EVs in OA and focus on senescence-associated features of OA.

2. Mesenchymal stromal cells and extracellular vesicles

EVs are mediators in the crosstalk between cells and contribute to the regulation of tissue homeostasis and pathological processes. These vesicles are produced by virtually all cell types and are detected in all body fluids. They are classified into three major subtypes depending on their size and biogenesis: exosomes (from 40 to 150 nm diameter) from endosomal origin, microvesicles (or microparticles, ectosomes; 100 nm to 1 μm) budding from the plasma membrane and apoptotic bodies (larger than 500 nm) evolving from cell disruption during apoptosis [12]. Nonetheless, currently used isolation methods achieve only enrichment in two main categories of heterogeneous populations of EVs: small size EVs (less than 150 nm) and medium size EVs (120 to 600 nm) from other soluble molecules contained in culture medium or fluids [13,14]. There is no consensus marker to identify EV subtypes but presence of a lipid bilayer as well as size and surface (CD9, CD63, CD81, flotillin) and cytosolic (HSP70, TSG101, ALIX,..) markers are widely used to characterize EVs. The composition of EVs coming from different cell compartments and distinct intracellular regulatory processes is variable and their cargo differs. Likewise, EV cargoes mostly reflect the source and state of parental cells and obviously, their function thereof. This is the reason why MSC-EVs are largely investigated as novel cell-free therapeutic weapons in a large variety of diseases [15].

Although MSC-EVs have proved therapeutic potential in different preclinical settings, their mechanism of action is still poorly understood. Different omics approaches have identified bioactive molecules (proteins, lipids, miRNAs) playing various roles in biological processes relevant for tissue repair, such as inflammation, angiogenesis, extracellular matrix remodelling, apoptosis, proliferation [15]. There are consensual data reporting that EVs isolated from different sources of MSCs have beneficial effects but few have compared the efficacy of different sources of MSC-EVs in parallel within a single study. Nevertheless, in OA, induced pluripotent stem (iPS) cells-derived MSC-EVs were shown to be more effective than synovium-derived MSC-EVs to alleviate OA histological score [10]. In this last paper, the mechanism underlying efficacy was not investigated but the effect of reprogramming on cell features, notably rejuvenation and inhibition of senescence might be one possible explanation.

3. Common features of senescence and osteoarthritis

3.1. Cellular senescence features

Senescence is defined as irreversible growth arrest and resistance to apoptosis in response to intrinsic signals (aging, replicative stress) and extrinsic signals, including DNA damage, oncogenic signalling and oxidative stress [16]. It is characterized as a complex process involving dysregulation of various cellular functions and molecular pathways. Hallmarks of senescence are cell-cycle arrest, expression of cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKI, namely p16INK4A, p21, p27, p53, pRB), hypertrophic morphological changes, production of acidic senescence-associated β-galactosidase (SA-β-Gal), accumulation of DNA damage and senescence-associated heterochromatin foci (SAHF), metabolic dysfunction and, production of SASP factors, including interleukin 1 (IL1), IL6, IL8, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), matrix metalloproteinases (MMP1, MMP3), vascular growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF), insulin growth factor 1 (IGF1), basic fibroblast growth factor (bFGF) (Fig. 1). Senescence has a primary beneficial role of tumour suppressor by up-regulating CDKIs in response to oncogenic signals but is also important for regulating tissue repair or embryogenesis [17]. Nevertheless, its contribution in aging-related diseases may be seen as a negative impact by boosting inflammation, matrix degradation and over-growth. Indeed, secretion of the SASP factors contributes to disease onset and progression in many, if not all, aging-related diseases, such as OA.

3.2. Senescence and osteoarthritis associated features

The close relationship between OA and senescence has been reviewed elsewhere [3]. In OA patients, the number of senescent cells in cartilage, synovial membrane, infrapatellar fat pad and subchondral bone correlates with age. Senescent p16INK4A$^+$ chondrocytes, synovial fibroblasts, osteoblasts and bone marrow (BM) progenitors are increased in OA [18–20]. Their accumulation is one of the key process contributing to disease progression by the secretion of SASP factors generating an inflammatory and degradative tissue environment similar to that is found in OA [21]. In the mouse model of collagenase-induced osteoarthritis, the transient accumulation of p16INK4A$^+$ senescent cells is observed in the synovial tissue, at day 24 after OA induction [22]. Senescence is also a characteristic of post-traumatic OA and age-related OA [23,24].

Joint cells in OA exhibit common hallmarks of senescence, including telomere attrition and increased expression of p53, the

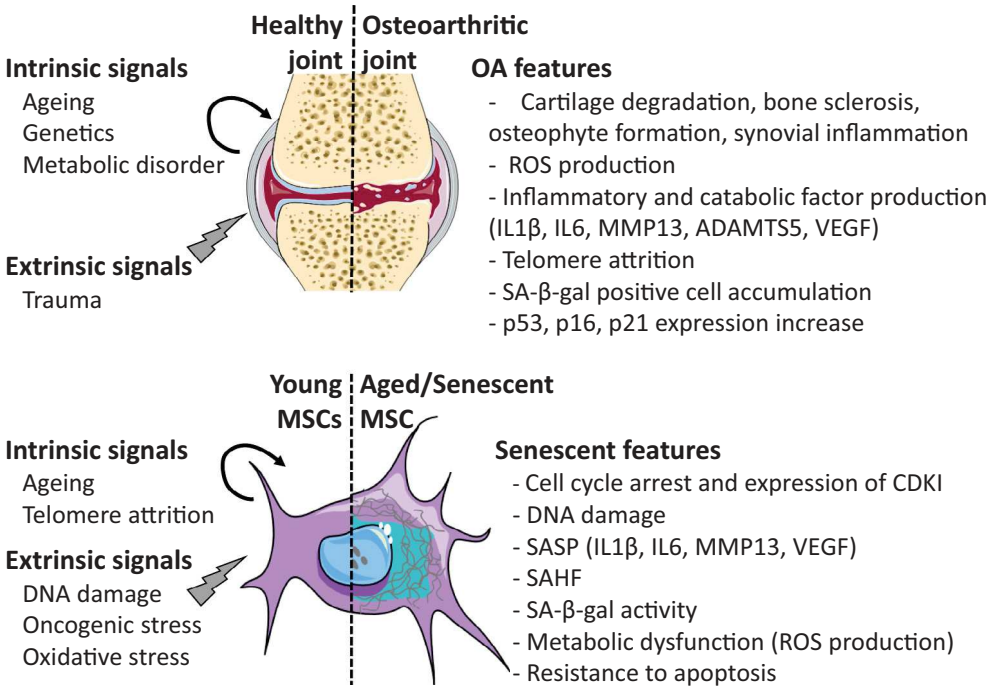


Fig. 1. Main features of osteoarthritis in joint tissues and of senescence in aged mesenchymal stromal cells.

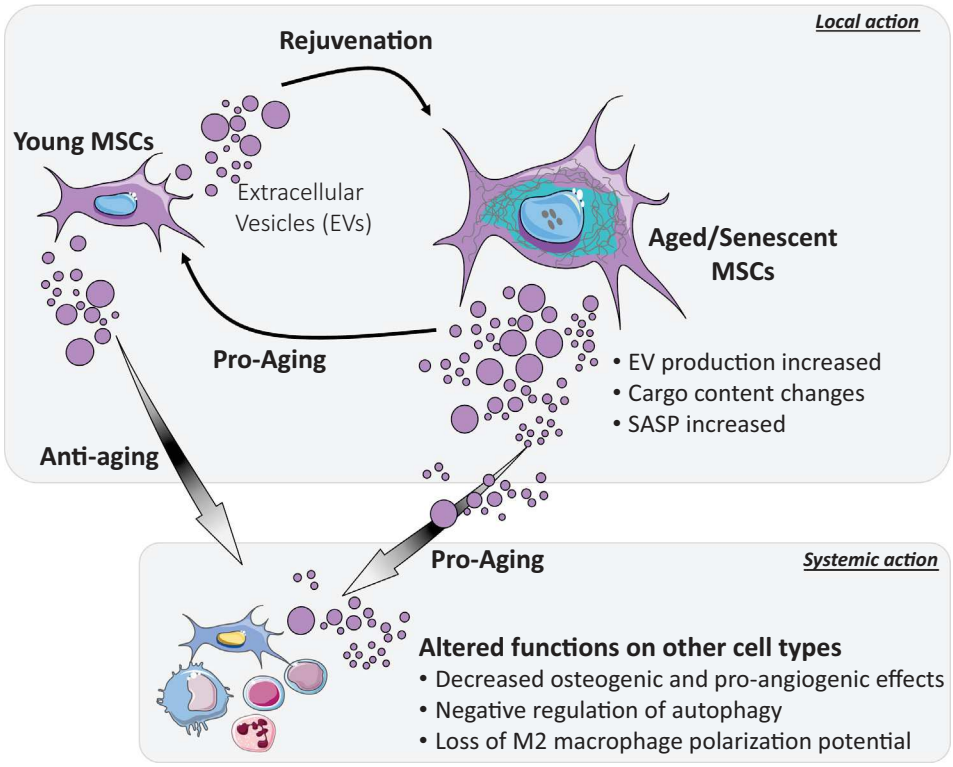


Fig. 2. Extracellular vesicles released by aged or young mesenchymal stromal cells (MSCs) possess pro-aging or anti-aging content that may impact the function of various cells in the local or systemic environment.

CDKIs p16INK4A and p21, enhanced generation of reactive oxygen species (ROS) and increased SAHF and SASP (for review, see [25]) (Fig. 1). The SASP comprises pro-inflammatory cytokines, such as IL1β, IL6, metalloproteinases, such as MMP13 and a desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-5 (ADAMTS-5) and growth factors, including VEGF, that contribute to inflammation, matrix degradation and osteophyte formation, all key features of OA. These circulating factors participate to the deregulation of tissue homeostasis in aged mice. Using the heterochronic parabiosis model, it was clearly demonstrated that young mice from the young/aged parabiosis group experienced higher proteoglycan loss and lower chondrocyte proliferation in

cartilage four months after surgery than the young/young group [26]. The RUNX2/SOX9 ratio was also increased by a 5-fold factor in the cartilage samples from young/aged group indicative of hypertrophy induction and initiation/progression of OA. By contrast, aged mice from the aged/young parabiosis group displayed higher chondrocyte proliferation, lower osteophyte formation and a normalized balance between anabolic and catabolic markers [27]. Interestingly, injection of recombinant growth differentiation factor-11 (GDF11) reproduced similar improvement on cartilage matrix synthesis in aged mice. Novel results showed that EVs isolated from plasma of young mice increase the longevity of aged mice by 10% [28]. This effect was attributed to their content in high amounts of extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (eNAMPT) and the central role of NAD^+-SIRT1 axis in the aging process. Data therefore suggest that EVs are central in the secretome of senescent cells and may contribute to premature senescence by lacking anti-aging factors and spreading pro-aging factors, thereby contributing to cartilage degeneration [29].

4. Impact of age on the functions of mesenchymal stromal cells-derived EVs

EV secretion by MSCs was shown to increase with their senescence status and age while the quantity of proteins decreased [30]. Aged MSCs display altered functions and support pro-aging signals that are found within released EVs (Fig. 2). Growth rate, cell migration as well as differentiation potential are impacted with age or in an aged environment and the miRNA profile in their EVs is altered [31]. Indeed, circulating EVs from aged human donors were found to negatively impact the osteogenic differentiation potential of primary adipose tissue-derived MSCs (ASCs) in a donor age-dependent manner [32]. This decreased osteogenic capacity of aged MSC-EVs was correlated with lower amount of galectin-3. Similarly, EVs isolated from the BM of aged mice were shown to inhibit the osteoblastogenic capacity of young MSCs. This inhibition was mediated by miR-183-5p, which reduced cell proliferation and differentiation while it increased senescence and oxidative stress [33]. More recently, EVs isolated from osteoblasts from patients with OA or osteoporosis exerted a negative effect on MSCs, as shown by increased apoptotic rate and decreased osteogenic potential [34]. Effect of aging on the immunosuppressive properties of MSCs has not been reported. However, some miRNAs associated with the immune profile of MSCs were shown to be decreased in EVs from aged MSCs and proposed to be related to the loss of their immunotherapeutic function [35]. Another study reported that aged MSC-EVs were not able to alleviate inflammation in LPS-induced lung injury model [36]. They did not reduce the recruitment of macrophages and were incapable of promoting M2 macrophage polarization. The pro-angiogenic activity and pro-wound healing effect of oxidative stress-induced senescent MSC-EVs are also decreased compared to healthy MSCs [37]. The down-regulation of miR-146a contributed to the impaired pro-angiogenic capacity of senescent MSC-EVs. Evidence is therefore accumulating to confirm the loss of function of MSCs and their EVs with aging.

Finally, SASP factors contained within EVs from aged individuals can induce premature senescence in MSCs. An increased number of muscle-derived miR-34a-5p-containing EVs was detected in the serum of aged mice and these EVs were described to negatively impact MSC viability and increase their senescence [38]. Accordingly, blood-derived EVs carrying C24:1ceramide were found in higher numbers in older women and shown to contribute to the induction of senescence in MSCs [39]. Finally, addition of aged MSC-EVs on young MSCs down-regulated the pluripotency markers Nanog, Oct4 and up-regulated the senescence markers Vinculin, LMNA and mTOR while young MSC-EVs had an opposite effect on aged MSCs [30]. Although not directly reported, it is likely that MSCs, in constant or repeated contact with aged EVs, produce senescent EVs with altered cargo and dysregulated functions. Besides altered functions, EVs from aged or senescent MSCs could induce senescence in neighbouring cells through the SASP. Still, data reporting the pro-senescent effect of MSC-EVs are sparse. An interesting study has nicely demonstrated that aged MSC-EVs transfer negative regulators of autophagy causing aging of hematopoietic stem cells (HSCs) [40]. Aged MSCs possess activated protein kinase B (AKT) signalling, which reduces the amount of several autophagy-related mRNAs transferred in their EVs while increasing the levels of miR-37 and miR-34a, two miRNAs targeting autophagy-related mRNAs. However, as indicated above, these examples are unique and further evidence is needed to firmly conclude that senescence-induced MSC-EVs transfer pro-aging or pro-senescent signals. No data is available on the role of senescent MSC-EVs on OA chondrocytes and synoviocytes, *in vitro* or in vivo, that could indicate that pro-senescent signals could not be counterbalanced by reparative or protective signals carried by such EVs, even though such functions are partially impaired in aged MSCs.

5. Rejuvenation of aged MSCs and improvement of EV function

Deterioration of the functionality of MSCs with aging has been largely demonstrated as discussed above. Restoring the properties of aged MSCs to that of young MSCs has therefore received much attention in the field of regenerative medicine. Together with decreased expression of anti-aging genes, including TERT, SIRT1, BCL2 and increased SA-β-Gal staining, the expression of miR-140, miR-146a/b, miR-195 is enhanced in aged MSCs [41]. Silencing miR-195 in aged MSCs was shown to restore the expression of anti-aging mediators, comprising TERT, SIRT1, FOXO1, phosphorylated AKT and to improve their therapeutic effect in a model of cardiac infarction. Another study has shown that rapamycin or p70S6K knock-down ameliorated chemical- or oxidative stress-induced senescence in MSCs [42]. Strategies that target oxidative stress in MSCs are promising for counteracting the detrimental effect of age and senescence in MSCs (for review see [43]). Novel data indicated that infant MSC-EVs can rejuvenate elderly MSCs by inhibiting the accumulation of ROS, reducing SA-β-Gal positive cell number, inducing proliferation and upregulating the expression of cytokines that promoted wound healing in diabetic mice [44]. A similar study recently reported the interest of umbilical cord (UC)-derived MSC-EVs to rejuvenate senescing BM-MSCs, thereby exhibiting alleviated aging phenotype as well as increased self-renewal capacity and telomere length [45]. This improvement was at least partly mediated by the transfer of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) into aging BM-MSCs. Rejuvenated MSCs exhibited increased bone formation potential after subcutaneous implantation on bone graft substitutes, higher wound repair capacity and ameliorated aging-related angiogenic dysfunction. Aged MSCs were also rescued using a treatment with LY294002, an inhibitor of AKT signalling, and their derived EVs transferred higher amounts of autophagy marker-related mRNAs, such as BECLIN-1, ATG7, LC3a, LC3b, SIRT1-3 and lower levels of miR-17 and miR-34a, resulting in increased therapeutic activity of MSCs and improved rejuvenating capacity on aged HSCs [40]. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) were reported to produce 16-fold more EVs than MSCs and were able to rescue both exhausted passaged MSCs as a premature model of replicative senescence and progerin-expressing MSCs as a genetically-induced senescence model [46]. Both iPSC-EVs and young MSC-EVs were efficient to improve the senescent state and function of aged MSCs. The mechanism of action of iPSC-EVs was through the delivery of peroxi-

doxin antioxidant enzymes that reduced intracellular ROS levels. Interestingly, embryonic stem cells (ESC)-EVs can ameliorate the senescent phenotype of MSCs both *in vitro* and in vivo and delay bone loss in aged mice [47]. These results indicate that EVs can rejuvenate tissue-resident stem cells and thereby prevent age-related disorders. It is noteworthy that the expansion conditions of MSCs can exert positive effects on senescence-associated changes since 3D culture was shown to reduce telomere attrition and SA-β-Gal expression and, improve mitochondrial function and differentiation potential of MSCs [48]. Therefore, a better understanding of culture conditions and factors that could reduce senescence-associated features would increase the safety and effectiveness of MSCs in large scale production process. In that respect, culture conditions or priming strategies to generate enhanced MSCs that could combine anti-senescence and improved reparative functions should be developed in the future for generating clinical grade EVs with superior capacities.

6. Therapeutic effect of MSC-EVs in osteoarthritis

6.1. Chondroprotective effect of MSC-EVs on OA characteristics in joint tissues

The beneficial action of MSC-EVs on OA chondrocyte phenotype was demonstrated *in vitro* by the up-regulation of the anabolic markers (type II collagen and aggrecan) together with the inhibition of catabolic (MMP-13, ADAMTS5), inflammatory (induced nitric oxide synthase (iNOS)) markers as well as apoptosis [9]. A similar study reported the decrease of inflammatory NFκB signalling, COX2 expression, collagenase activity and increased production of glycosaminoglycans (GAG), aggrecan, type II collagen, SOX9 expression in OA chondrocytes [49]. By contrast, lack of benefit on MMP activity and PGE2 secretion was shown using ASC-EVs [50]. Likewise, production of anabolic markers was reduced by synovial-derived MSC-EVs but this effect was reversed by over-expressing miR-140-5p in MSCs before EV isolation [51]. Nevertheless, two recent systematic reviews of literature reported a general tendency towards anti-inflammatory, anti-apoptotic, pro-migratory, pro-proliferative, anti-catabolic and pro-autophagic effect of MSC-EVs whatever the source [52,53]. Since, this pleiotropic effect of MSC-EVs on OA human chondrocytes was also shown using human MSC-EVs and reported to be mediated through the down-regulation of IL1β-mediated activation of ERK1/2, PI3K/AKT, p38, TAK1, and NF-κB signaling pathways [54]. Interestingly, another study identified lncRNA H19 contained in EVs as involved in the mechanism of action of MSC-EVs [55]. LncRNA H19 acts as an endogenous sponge of miR-29b-3p, which targets FOXO3, thereby promoting migration, ECM secretion and suppressing apoptosis and senescence in chondrocytes. In addition, the anti-inflammatory and anti-catabolic properties of MSC-EVs were recently confirmed on chondrocytes and further demonstrated on OA synoviocytes indicating that all joint tissues might benefit from MSC-EV therapy [56].

Several studies have reported the therapeutic effect of MSC-EVs in vivo using distinct models of OA [51,57,58]. Of interest, some studies evaluated different strategies to enhance MSC-EV-based treatment in OA. The importance of miR-31 in this process was recently demonstrated [59]. Human synovial MSC-EVs containing high amount of miR-31 were reported to alleviate cartilage damage and inflammation in knee joints in a model of OA induced by transection of the medial collateral ligament and the medial meniscus. Over-expression of miR-31 in MSC-EVs further improved cartilage preservation. Mechanistically, miR-31 targets KDM2A, which inhibits the transcription of E2F1, resulting in enrichment of E2F1 and increased chondrocyte proliferation and migration. Hypoxia pre-treatment of MSCs before EV isolation was also described to improve OA symptoms in the destabilization of medial meniscus (DMM) rat model, as visualized by reduced osteophyte formation and OA histological score as well as preservation of cartilage extracellular matrix proteins [60]. Hypoxia was shown to enhance the amount of miR-216a-3p in EVs resulting in its effective transfer in target chondrocytes and down-regulation of JAK2. JAK2/STAT3 signalling pathway inhibition promoted proliferation, migration and inhibited apoptosis of chondrocytes. Repeated injections of MSC-EVs are another mean to enhance or at least prolong treatment efficacy. Although not compared with a single injection, repeated injections of MSC-EVs over the disease course resulted in significant cartilage protection in two models of OA in rats (monosodium iodoacetate (MIA) and DMM) with high reduction in the number of $IL1\beta^+$ chondrocytes and $CD86^+$ synoviocytes [61]. These recent data highlight the possibility of generating MSC-EVs with enhanced therapeutic properties and pave the way for clinical translation.

6.2. Senotherapeutic effect of MSC-EVs on senescent features of joint tissues

A senotherapeutic effect of MSC-EVs has been demonstrated in some cases. EVs recovered from early passage MSCs were shown to alleviate the aging phenotype of senescent MSCs undergoing replicative senescence (>passage 10), as shown by reduction of SA-β-Gal staining, p21 and p53 expression, IL1α and IL6 secretion and, γ-H2AX production [46]. Human decidua-derived MSC-EVs not only promoted the proliferation, migration and differentiation of dermal fibroblasts but also improved their senescent state [62]. In another model, aged HSCs, which have been rejuvenated following a brief exposure to young MSC-EVs, were able to engraft at higher levels after bone marrow transplantation and this effect was attributed to the up-regulation of autophagy markers in EVs [40]. Consistently, aged MSCs treated with an inhibitor of AKT signalling produced EVs that were more efficient to rescue aged HSCs. In addition, the rejuvenating power of inhibitor-treated MSC-EVs was even higher than that of young EVs on HSC function in primary and secondary BM transplantation experiments. The modulation of miRNA levels in MSC-EVs was reported to improve aging-related features. Indeed, down-regulation of miR-29b-3p in MSC-EVs significantly ameliorated insulin resistance in aged mice via SIRT1 regulation [63].

Together with the demonstration that MSC-EVs directly impact on the senescent phenotype of target cells, a number of reports have shown beneficial effects on aging-related diseases and in OA (for review see [64]). However, only few data exist on a direct effect of MSC-EVs on OA-associated senescence. The first report on the effect of MSC secretome on the senescent phenotype of OA chondrocytes used the conditioned medium of MSCs [65]. The authors described a therapeutic benefit as indicated by decreased SA-β-Gal activity, γH2AX foci number, actin stress fiber formation as well as p21 and p16 mRNA expression. Our unpublished results using human ASC-EVs clearly indicated their role in preventing senescence features of OA chondrocytes, including SA-β-Gal activity, stress fiber formation and γH2AX foci, using two models of etoposide- and IL1β-induced senescence. MSC-EVs have also been found to reduce senescent features in OA osteoblasts (SA-β-Gal expression, γ-H2AX production) while reducing inflammatory (IL6 and PGE2) and oxidative stress (HNE) markers [66]. The data are nonetheless scarce and more studies are required to confirm the anti-senescence capacity of MSC-EVs and for further understanding the underlying mechanism of action. This would allow to increase the therapeutic properties of MSC-EVs as discussed below.

7. Discussion

Senescence is now seen as a hallmark of OA, and even more as a driver in OA pathogenesis, suggesting that treatments targeting senescence might be relevant. And indeed, intra-articular injections of senolytics and senomorphics can eliminate senescent cells in cartilage and synovium tissues and, improve OA features [67,68]. The interest of MSCs and their EVs as senomorphics has been pointed out in the present review. However, a number of crucial parameters, in particular MSC source, parental cell density, passage number, culture conditions, MSC priming or method of EV isolation may influence the yield and functions of MSC-EV preparations as discussed in a recent systematic review of the literature on MSC-EVs-based treatments in pre-clinical settings [69]. Besides the development of standards and consensus on processes for EV isolation that will help improving overall efficacy of EV therapeutics, the age or the senescence state of parental MSCs are rarely discussed. How this can impact on MSC-EV functions needs to be further investigated and this issue is particularly important for age-related degenerative diseases such as OA when autologous MSCs are used.

Aged BM-MSCs have impaired proliferation, senescence and chondrogenic response whereas ASCs or muscle-derived MSCs do not exhibit such effect [70]. A decline of BM-MSC number with aging has also been suggested but the most relevant change is the reduced capacity of aged cells to differentiate into osteoblasts with increased bias toward adipogenic differentiation (for review, see [71]). BM-MSC-EVs have been shown to positively regulate osteoblastic activity and bone formation *in vivo*, notably via the transfer of miRNAs [72]. A decline in such activity is therefore expected in aged MSC-EVs but the likely most impacting effect of aging is the up-regulation of the SASP and the down-regulation of anti-oxydative and anti-aging properties as previously described. This implies that in an allogenic perspective, MSCs originating from young donors should be favored to reduce the effect of aging on the functionality of EVs.

Likewise, among the different sources of MSCs that can be used for EV preparations, perinatal MSCs might be more functional, notably with respect to their anti-inflammatory functions. Indeed, Wharton's Jelly-derived MSCs exhibit enhanced expression of immunosuppressive factors, particularly leukocyte antigen G6 (HLA-G6), indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), prostaglandin E2 (PGE2) and, suppress mitogen-induced T lymphocyte responses to a greater extent than BM-MSCs or ASCs that were isolated from adult tissues [73,74]. In OA, a recent *meta*-analysis reports that BM-MSCs, ASCs and UC-MSCs are all effective in clinical trials, yet ASCs outperform BM-MSCs for relieving pain and UC-MSCs were more effective for improving function [75]. It has to be noticed that this analysis included only one study using UC-MSCs and it cannot be excluded that results were mostly related to inter-individual heterogeneity rather than to tissue source. Accordingly, great variations between selection criteria and expansion processes of MSCs between the clinical trials targeting OA have been highlighted elsewhere, which suggests that the optimal cell source is still speculative [76]. None reported a possible effect of senescence- or age-related features of used MSCs. Further studies are therefore required to definitely conclude that perinatal tissue-derived MSCs could be a more appropriate tissue source than adult MSCs for isolating EVs.

A possibility to circumvent inter-individual heterogeneity in MSC samples or processes, and therefore their derived EVs, would be to use immortalized clonal MSCs or iPS cells-derived MSCs. A potential issue with immortalized MSCs is safety. MSC-EVs are not capable of proliferation and therefore cannot form tumors but they might affect tumor growth. Contradictory results on pro- or anti-tumorigenic effects have been reported to date with naïve MSCs [77–80]. However, a MYC-transformed MSC line does not exhibit tumorigenic activity and its derived EVs do not inhibit or promote tumor growth in vivo [81,82]. Contrary to parental iPS cells, iPS-EVs or EVs from iPS-derived differentiated cells display the advantages of low immunogenicity, no risk of tumor formation and have been shown to have therapeutic potential in regenerative medicine (for review, see [83]). Interestingly, iPS-MSC-EVs can mitigate aging in a model of aging-related arterial stiffness and hypertension by promoting SIRT1, AMPKa and endogenous NOS (eNOS) expression [47]. Again, to our knowledge, a lack of data exists on the possible role of these immortalized MSCs- or iPS cells-derived EVs on senescence features in OA or other degenerative diseases. For safety reasons, the absence of transgene for immortalized MSC-EVs and of reprogramming factors in iPS-EVs must be validated before clinical applications. However, such approaches should guarantee the unlimited supply of EVs with high inter-batch reproducibility.

Finally, MSC priming before or during the production of EV-containing conditioned medium may be relevant for enhancing the anti-aging or reparative properties of MSCs and treating OA or other degenerative diseases. Hypoxia is a known promoter of MSC chondrogenesis but it can also increase the capacity of MSCs to promote the production of cartilage matrix by chondrocytes and decrease apoptosis [84]. Hypoxia priming of MSCs resulted in the production of EVs with higher capacities to promote M2 polarization of macrophages and this effect was attributed to higher levels of miR-21-5p that down-regulated PTEN [85]. Nevertheless, intravenous injection of these EVs promoted tumor growth by increasing cancer cell survival in a xenograft model. In a rat model of OA, EVs from MSCs cultured under hypoxia exerted a higher protective effect than MSCs cultured under normoxia, both on cartilage degradation and osteophyte formation [60]. In vitro, hypoxia-primed MSC-EVs enhanced the proliferation, migration and anabolism of chondrocytes while reducing their apoptosis and, this effect was associated to the up-regulation of miR-216a-5p. Priming of ASCs with γ-interferon (IFN-γ) was recently shown to modulate the miRNA cargo of derived EVs [86]. Interestingly, the most highly modulated miRNAs were associated to matrix or immune cell-related pathways as well as "skeletal and musculoskeletal disorders". In addition, TGFβ1-primed MSCs-derived EVs carrying higher amounts of miR-135b were also reported to attenuate cartilage damage in an in vivo model of OA through M2 polarization of macrophages [87]. Therefore, hypoxic priming, IFN-γ- or TGFβ1-priming of MSCs are effective and promising approaches to optimize EVs-mediated treatment of OA. Since priming was associated to the increase of specific miRNAs involved in cartilage-protective functions, production of EVs from genetically modified MSCs may be another option for OA treatment. Such strategy has been effective to increase chondrocyte proliferation and anabolism as well as alleviate cartilage damage in vivo using over-expression of miR-26a-5p, miR-31-5p, miR-92a-3p, miR-140-5p and miR-155-5p in MSCs [51,59,88–90]. Although most of these miRNAs may be correlated with senescence modulation, miR-140-5p was shown to play a protective role in OA by retarding chondrocyte senescence [91]. The impact of primed MSCs-derived EVs on senescence markers in target tissues is rarely reported and should be investigated in future studies.

8. Conclusions

Available data indicate that MSC-EVs are powerful tools in suppressing or at least delaying OA features both *in vitro* on chondrocytes, osteoblasts and synoviocytes, the major cell components in

the joint and, *in vivo*, in different murine and rat preclinical models of OA. Increasing evidence indicates that MSC-EVs can protect from cellular senescence induction; it is shown in particular for MSCs isolated from young individuals or from rejuvenated iPSCs. There is an overlap between senescence and OA markers that makes difficult to unravel whether MSC-EVs act through targeting factors involved in inflammation, catabolism, oxidative stress or senescence. Nevertheless, cellular senescence is seen as a primary driver of OA pathogenesis and senotherapeutic strategies have proved efficacy to reduce OA [68]. Future investigation is needed to design effective MSC-EV-based treatments for OA-associated senescence and envision clinical translation.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We acknowledge support from the Inserm Institute, the University of Montpellier and University Hospital of Montpellier. We also acknowledge the Agence Nationale pour la Recherche for support of the national infrastructure: "ECELLFRANCE: Development of a national adult mesenchymal stem cell based therapy platform" (ANR-11-INSB-005). Study was also supported by a research grant from FOREUM Foundation for Research in Rheumatology. Figures used SMART Servier Medical ART.

References

[1] M.G. Cisternas, L. Murphy, J.J. Sacks, D.H. Solomon, D.J. Pasta, C.G. Helmick, Alternative Methods for Defining Osteoarthritis and the Impact on Estimating Prevalence in a US Population-Based Survey, Arthritis Care Res. (Hoboken) 68 (2016) 574–580.
[2] J.M. Hootman, C.G. Helmick, Projections of US prevalence of arthritis and associated activity limitations, Arthritis Rheum. 54 (2006) 226–229.
[3] P.R. Coryell, B.O. Diekman, R.F. Loeser, Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis, Nat. Rev. Rheumatol. 17 (2021) 47–57.
[4] E. Dolgin, Send in the senolytics, Nat. Biotechnol. 38 (2020) 1371–1377.
[5] M. Ter Huurne, R. Schelbergen, R. Blattes, A. Blom, W. de Munter, L.C. Grevers, J. Jeanson, D. Noel, L. Casteilla, C. Jorgensen, W. van den Berg, P.L. van Lent, Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis, Arthritis Rheum. 64 (2012) 3604–3613.
[6] G. Desando, C. Cavallo, F. Sartoni, L. Martini, A. Parrilli, F. Veronesi, M. Fini, R. Giardino, A. Facchini, B. Grigolo, Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model, Arthritis Res Ther 15 (2013) R22.
[7] Y. Song, J. Zhang, H. Xu, Z. Lin, H. Chang, W. Liu, L. Kong, Mesenchymal stem cells in knee osteoarthritis treatment: A systematic review and meta-analysis, J. Orthop. Translat. 24 (2020) 121–130.
[8] M. Tofino-Vian, M.I. Guillen, M.D. Perez Del Caz, A. Silvestre, M.J. Alcaraz, Microvesicles from Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a New Protective Strategy in Osteoarthritic Chondrocytes, Cell. Physiol. Biochem. 47 (2018) 11–25.
[9] S. Cosenza, M. Ruiz, K. Toupet, C. Jorgensen, D. Noel, Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis, Sci. Rep. 7 (2017) 16214.
[10] Y. Zhu, Y. Wang, B. Zhao, X. Niu, B. Hu, Q. Li, J. Zhang, J. Ding, Y. Chen, Y. Wang, Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis, Stem Cell Res. Ther. 8 (2017) 64.
[11] S. Zhang, W.C. Chu, R.C. Lai, S.K. Lim, J.H. Hui, W.S. Toh, Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration, Osteoarthr. Cartil. 24 (2016) 2135–2140.
[12] G. van Niel, G. D'Angelo, G. Raposo, Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 19 (2018) 213–228.
[13] C. Thery, K.W. Witwer, E. Aikawa, M.J. Alcaraz, J.D. Anderson, R. Andriantsitohaina, A. Antoniou, T. Arab, F. Archer, G.K. Atkin-Smith, D.C. Ayre, J.M. Bach, D. Bachurski, H. Baharvand, L. Balaj, S. Baldacchino, N.N. Bauer, A.A. Baxter, M. Bebawy, C. Beckham, A. Bedina Zavec, A. Benmoussa, A.C. Berardi, P. Bergese, E. Bielska, C. Blenkiron, S. Bobis-Wozowicz, E. Boilard, W. Boireau, A. Bongiovanni, F.E. Borras, S. Bosch, C.M. Boulanger, X. Breakefield, A. M. Breglio, M.A. Brennan, D.R. Brigstock, A. Brisson, M.L. Broekman, J.F. Bromberg, P. Bryl-Gorecka, S. Buch, A.H. Buck, D. Burger, S. Busatto, D. Buschmann, B. Bussolati, E.I. Buzas, J.B. Byrd, G. Camussi, D.R. Carter, S. Caruso, L.W. Chamley, Y.T. Chang, C. Chen, S. Chen, L. Cheng, A.R. Chin, A. Clayton, S.P. Clerici, A. Cocks, E. Cocucci, R.J. Coffey, A. Cordeiro-da-Silva, Y. Couch, F.A. Coumans, B. Coyle, R. Crescitelli, M.F. Criado, C. D'Souza-Schorey, S. Das, A. Datta Chaudhuri, P. de Candia, E.F. De Santana, O. De Wever, H.A. Del Portillo, T. Demaret, S. Deville, A. Devitt, B. Dhondt, D. Di Vizio, L.C. Dieterich, V. Dolo, A. P. Dominguez Rubio, M. Dominici, M.R. Dourado, T.A. Driedonks, F.V. Duarte, H. M. Duncan, R.M. Eichenberger, K. Ekstrom, S. El Andaloussi, C. Elie-Caille, U. Erdbrugger, J.M. Falcon-Perez, F. Fatima, J.E. Fish, M. Flores-Bellver, A. Forsonits, A. Frelet-Barrand, F. Fricke, G. Fuhrmann, S. Gabrielsson, A. Gamez-Valero, C. Gardiner, K. Gartner, R. Gaudin, Y.S. Gho, B. Giebel, C. Gilbert, M. Gimona, I. Giusti, D.C. Goberdhan, A. Gorgens, S.M. Gorski, D.W. Greening, J.C. Gross, A. Gualerzi, G.N. Gupta, D. Gustafson, A. Handberg, R.A. Haraszti, P. Harrison, H. Hegyesi, A. Hendrix, A.F. Hill, F.H. Hochberg, K.F. Hoffmann, B. Holder, H. Holthofer, B. Hosseinkhani, G. Hu, Y. Huang, V. Huber, S. Hunt, A.G. Ibrahim, T. Ikezu, J.M. Inal, M. Isin, A. Ivanova, H.K. Jackson, S. Jacobsen, S.M. Jay, M. Jayachandran, G. Jenster, L. Jiang, S.M. Johnson, J.C. Jones, A. Jong, T. Jovanovic-Talisman, S. Jung, R. Kalluri, S.I. Kano, S. Kaur, Y. Kawamura, E.T. Keller, D. Khamari, E. Khomyakova, A. Khvorova, P. Kierulf, K.P. Kim, T. Kislinger, M. Klingeborn, D.J. Klinke 2nd, M. Kornek, M.M. Kosanovic, A. F. Kovacs, E.M. Kramer-Albers, S. Krasemann, M. Krause, I.V. Kurochkin, G.D. Kusuma, S. Kuypers, S. Laitinen, S.M. Langevin, L.R. Languino, J. Lannigan, C. Lasser, L.C. Laurent, G. Lavieu, E. Lazaro-Ibanez, S. Le Lay, M.S. Lee, Y.X.F. Lee, D. S. Lemos, M. Lenassi, A. Leszczynska, I.T. Li, K. Liao, S.F. Libregts, E. Ligeti, R. Lim, S.K. Lim, A. Line, K. Linnemannstons, A. Llorente, C.A. Lombard, M.J. Lorenowicz, A.M. Lorincz, J. Lotvall, J. Lovett, M.C. Lowry, X. Loyer, Q. Lu, B. Lukomska, T.R. Lunavat, S.L. Maas, H. Malhi, A. Marcilla, J. Mariani, J. Mariscal, E.S. Martens-Uzunova, L. Martin-Jaular, M.C. Martinez, V.R. Martins, M. Mathieu, S. Mathivanan, M. Maugeri, L.K. McGinnis, M.J. McVey, D.G. Meckes Jr., K.L. Meehan, I. Mertens, V.R. Minciacchi, A. Moller, M. Moller Jorgensen, A. Morales-Kastresana, J. Morhayim, F. Mullier, M. Muraca, L. Musante, V. Mussack, D.C. Muth, K.H. Myburgh, T. Najrana, M. Nawaz, I. Nazarenko, P. Nejsum, C. Neri, T. Neri, R. Nieuwland, L. Nimrichter, J.P. Nolan, E.N. Nolte-'t Hoen, N. Noren Hooten, L. O'Driscoll, T. O'Grady, A. O'Loghlen, T. Ochiya, M. Olivier, A. Ortiz, L.A. Ortiz, X. Osteikoetxea, O. Ostergaard, M. Ostrowski, J. Park, D.M. Pegtel, H. Peinado, F. Perut, M.W. Pfaffl, D.G. Phinney, B.C. Pieters, R.C. Pink, D.S. Pisetsky, E. Pogge von Strandmann, I. Polakovicova, I.K. Poon, B.H. Powell, I. Prada, L. Pulliam, P. Quesenberry, A. Radeghieri, R.L. Raffai, S. Raimondo, J. Rak, M.I. Ramirez, G. Raposo, M.S. Rayyan, N. Regev-Rudzki, F.L. Ricklefs, P.D. Robbins, D.D. Roberts, S.C. Rodrigues, E. Rohde, S. Rome, K.M. Rouschop, A. Rughetti, A.E. Russell, P. Saa, S. Sahoo, E. Salas-Huenuleo, C. Sanchez, J.A. Saugstad, M.J. Saul, R.M. Schiffelers, R. Schneider, T.H. Schoyen, A. Scott, E. Shahaj, S. Sharma, O. Shatnyeva, F. Shekari, G.V. Shelke, A.K. Shetty, K. Shiba, P.R. Siljander, A.M. Silva, A. Skowronek, O.L. Snyder 2nd, R.P. Soares, B. W. Sodar, C. Soekmadji, J. Sotillo, P.D. Stahl, W. Stoorvogel, S.L. Stott, E.F. Strasser, S. Swift, H. Tahara, M. Tewari, K. Timms, S. Tiwari, R. Tixeira, M. Tkach, W.S. Toh, R. Tomasini, A.C. Torrecilhas, J.P. Tosar, V. Toxavidis, L. Urbanelli, P. Vader, B.W. van Balkom, S.G. van der Grein, J. Van Deun, M.J. van Herwijnen, K. Van Keuren-Jensen, G. van Niel, M.E. van Royen, A.J. van Wijnen, M.H. Vasconcelos, I.J. Vechetti Jr., T.D. Veit, L.J. Vella, E. Velot, F.J. Verweij, B. Vestad, J.L. Vinas, T. Visnovitz, K.V. Vukman, J. Wahlgren, D.C. Watson, M.H. Wauben, A. Weaver, J.P. Webber, V. Weber, A.M. Wehman, D.J. Weiss, J.A. Welsh, S. Wendt, A.M. Wheelock, Z. Wiener, L. Witte, J. Wolfram, A. Xagorari, P. Xander, J. Xu, X. Yan, M. Yanez-Mo, H. Yin, Y. Yuana, V. Zappulli, J. Zarubova, V. Zekas, J. Y. Zhang, Z. Zhao, L. Zheng, A.R. Zheutlin, A.M. Zickler, P. Zimmermann, A.M. Zivkovic, D. Zocco, E.K. Zuba-Surma, Minimal information for studies of extracellular vesicles, (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines, J Extracell Vesicles 7 (2018) (2018) 1535750.
[14] T.A. Hartjes, S. Mytnyk, G.W. Jenster, V. van Steijn, M.E. van Royen, Extracellular Vesicle Quantification and Characterization: Common Methods and Emerging Approaches, Bioengineering (Basel) 6 (2019).
[15] S. Varderidou-Minasian, M.J. Lorenowicz, Mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular vesicles in tissue repair: challenges and opportunities, Theranostics 10 (2020) 5979–5997.
[16] C. Lopez-Otin, M.A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, G. Kroemer, The hallmarks of aging, Cell 153 (2013) 1194–1217.
[17] J. Campisi, Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective, Curr. Opin. Genet. Dev. 21 (2011) 107–112.
[18] M.J. Del Rey, A. Valin, A. Usategui, S. Ergueta, E. Martin, C. Municio, J.D. Canete, F.J. Blanco, G. Criado, J.L. Pablos, Senescent synovial fibroblasts accumulate prematurely in rheumatoid arthritis tissues and display an enhanced inflammatory phenotype, Immun. Ageing 16 (2019) 29.
[19] B.O. Diekman, G.A. Sessions, J.A. Collins, A.K. Knecht, S.L. Strum, N.K. Mitin, C.S. Carlson, R.F. Loeser, N.E. Sharpless, Expression of p16(INK)(4a) is a biomarker of chondrocyte aging but does not cause osteoarthritis, Aging Cell 17 (2018) e12771.
[20] J.N. Farr, D.G. Fraser, H. Wang, K. Jaehn, M.B. Ogrodnik, M.M. Weivoda, M.T. Drake, T. Tchkonia, N.K. LeBrasseur, J.L. Kirkland, L.F. Bonewald, R.J. Pignolo, D. G. Monroe, S. Khosla, Identification of Senescent Cells in the Bone Microenvironment, J. Bone Miner. Res. 31 (2016) 1920–1929.
[21] S. He, N.E. Sharpless, Senescence in Health and Disease, Cell 169 (2017) 1000–1011.
[22] O. Malaise, Y. Tachikart, M. Constantinides, M. Mumme, R. Ferreira-Lopez, S. Noack, C. Krettek, D. Noel, J. Wang, C. Jorgensen, J.M. Brondello, Mesenchymal

stem cell senescence alleviates their intrinsic and seno-suppressive paracrine properties contributing to osteoarthritis development, Aging (Albany NY) 11 (2019) 9128–9146.
[23] O.H. Jeon, N. David, J. Campisi, J.H. Elisseeff, Senescent cells and osteoarthritis: a painful connection, J. Clin. Invest. 128 (2018) 1229–1237.
[24] J.A. Martin, T. Brown, A. Heiner, J.A. Buckwalter, Post-traumatic osteoarthritis: the role of accelerated chondrocyte senescence, Biorheology 41 (2004) 479–491.
[25] R.F. Loeser, Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix, Osteoarthritis Cartilage 17 (2009) 971–979.
[26] L. Li, X. Wei, X. Geng, Z. Duan, X. Wang, P. Li, C. Wang, L. Wei, Impairment of chondrocyte proliferation after exposure of young murine cartilage to an aged systemic environment in a heterochronic parabiosis model, Swiss Med. Wkly 148 (2018) w14607.
[27] L. Li, X. Wei, D. Wang, Z. Lv, X. Geng, P. Li, J. Lu, K. Wang, X. Wang, J. Sun, X. Cao, L. Wei, Positive Effects of a Young Systemic Environment and High Growth Differentiation Factor 11 Levels on Chondrocyte Proliferation and Cartilage Matrix Synthesis in Old Mice, Arthritis Rheumatol. 72 (2020) 1123–1133.
[28] F. Prattichizzo, A. Giuliani, J. Sabbatinelli, E. Mensa, V. De Nigris, L. La Sala, P. de Candia, F. Olivieri, A. Ceriello, Extracellular vesicles circulating in young organisms promote healthy longevity, J. Extracell. Vesicles 8 (2019) 1656044.
[29] L. Terlecki-Zaniewicz, I. Lammermann, J. Latreille, M.R. Bobbili, V. Pils, M. Schosserer, R. Weinmullner, H. Dellago, S. Skalicky, D. Pum, J.C.H. Almaraz, M. Scheideler, F. Morizot, M. Hackl, F. Gruber, J. Grillari, Small extracellular vesicles and their miRNA cargo are anti-apoptotic members of the senescence-associated secretory phenotype, Aging (Albany NY) 10 (2018) 1103–1132.
[30] J. Fafian-Labora, M. Morente-Lopez, M.J. Sanchez-Dopico, O.J. Arntz, F.A.J. van de Loo, J. De Toro, M.C. Arufe, Influence of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in vitro and their role in ageing, Stem Cell Res. Ther. 11 (2020) 13.
[31] Y. Wang, B. Fu, X. Sun, D. Li, Q. Huang, W. Zhao, X. Chen, Differentially expressed microRNAs in bone marrow mesenchymal stem cell-derived microvesicles in young and older rats and their effect on tumor growth factor-beta1-mediated epithelial-mesenchymal transition in HK2 cells, Stem Cell Res. Ther. 6 (2015) 185.
[32] S. Weilner, E. Schraml, M. Wieser, P. Messner, K. Schneider, K. Wassermann, L. Micutkova, K. Fortschegger, A.B. Maier, R. Westendorp, H. Resch, S. Wolbank, H. Redl, P. Jansen-Durr, P. Pietschmann, R. Grillari-Voglauer, J. Grillari, Secreted microvesicular miR-31 inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, Aging Cell 15 (2016) 744–754.
[33] C. Davis, A. Dukes, M. Drewry, I. Helwa, M.H. Johnson, C.M. Isales, W.D. Hill, Y. Liu, X. Shi, S. Fulzele, M.W. Hamrick, MicroRNA-183-5p Increases with Age in Bone-Derived Extracellular Vesicles, Suppresses Bone Marrow Stromal (Stem) Cell Proliferation, and Induces Stem Cell Senescence, Tissue Eng. Part A 23 (2017) 1231–1240.
[34] T. Niedermair, C. Lukas, S. Li, S. Stockl, B. Craiovan, C. Brochhausen, M. Federlin, M. Herrmann, S. Grassel, Influence of Extracellular Vesicles Isolated From Osteoblasts of Patients With Cox-Arthrosis and/or Osteoporosis on Metabolism and Osteogenic Differentiation of BMSCs, Front. Bioeng. Biotechnol. 8 (2020) 615520.
[35] J. Fafian-Labora, I. Lesende-Rodriguez, P. Fernandez-Pernas, S. Sangiao-Alvarellos, L. Monserrat, O.J. Arntz, F.J. van de Loo, J. Mateos, M.C. Arufe, Effect of age on pro-inflammatory miRNAs contained in mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles, Sci. Rep. 7 (2017) 43923.
[36] R. Huang, C. Qin, J. Wang, Y. Hu, G. Zheng, G. Qiu, M. Ge, H. Tao, Q. Shu, J. Xu, Differential effects of extracellular vesicles from aging and young mesenchymal stem cells in acute lung injury, Aging (Albany NY) 11 (2019) 7996–8014.
[37] M. Xu, X. Su, X. Xiao, H. Yu, X. Li, A. Keating, S. Wang, R.C. Zhao, Hydrogen Peroxide-Induced Senescence Reduces the Wound Healing-Promoting Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Partially via miR-146a, Aging Dis. 12 (2021) 102–115.
[38] S. Fulzele, B. Mendhe, A. Khayrullin, M. Johnson, H. Kaiser, Y. Liu, C.M. Isales, M. W. Hamrick, Muscle-derived miR-34a increases with age in circulating extracellular vesicles and induces senescence of bone marrow stem cells, Aging (Albany NY) 11 (2019) 1791–1803.
[39] A. Khayrullin, P. Krishnan, L. Martinez-Nater, B. Mendhe, S. Fulzele, Y. Liu, J.A. Mattison, M.W. Hamrick, Very Long-Chain C24:1 Ceramide Is Increased in Serum Extracellular Vesicles with Aging and Can Induce Senescence in Bone-Derived Mesenchymal Stem Cells, Cells 8 (2019).
[40] R. Kulkarni, M. Bajaj, S. Ghode, S. Jalnapurkar, L. Limaye, V.P. Kale, Intercellular Transfer of Microvesicles from Young Mesenchymal Stromal Cells Rejuvenates Aged Murine Hematopoietic Stem Cells, Stem Cells (2017).
[41] M. Okada, H.W. Kim, K. Matsu-ura, Y.G. Wang, M. Xu, M. Ashraf, Abrogation of Age-Induced MicroRNA-195 Rejuvenates the Senescent Mesenchymal Stem Cells by Reactivating Telomerase, Stem Cells 34 (2016) 148–159.
[42] H. Liu, B. Huang, S. Xue, K.P. U, L.L. Tsang, X. Zhang, G. Li, X. Jiang, Functional crosstalk between mTORC1/p70S6K pathway and heterochromatin organization in stress-induced senescence of MSCs, Stem Cell Res. Ther. 11 (2020) 279.
[43] R. Vono, E. Jover Garcia, G. Spinetti, P. Madeddu, Oxidative Stress in Mesenchymal Stem Cell Senescence: Regulation by Coding and Noncoding RNAs, Antioxid. Redox Signal. 29 (2018) 864–879.
[44] V.C. Khanh, T. Yamashita, K. Ohneda, C. Tokunaga, H. Kato, M. Osaka, Y. Hiramatsu, O. Ohneda, Rejuvenation of mesenchymal stem cells by extracellular vesicles inhibits the elevation of reactive oxygen species, Sci. Rep. 10 (2020) 17315.
[45] Q. Lei, F. Gao, T. Liu, W. Ren, L. Chen, Y. Cao, W. Chen, S. Guo, Q. Zhang, W. Chen, H. Wang, Z. Chen, Q. Li, Y. Hu, A.Y. Guo, Extracellular vesicles deposit PCNA to rejuvenate aged bone marrow-derived mesenchymal stem cells and slow age-related degeneration, Sci. Transl. Med. 13 (2021).
[46] S. Liu, V. Mahairaki, H. Bai, Z. Ding, J. Li, K.W. Witwer, L. Cheng, Highly Purified Human Extracellular Vesicles Produced by Stem Cells Alleviate Aging Cellular Phenotypes of Senescent Human Cells, Stem Cells 37 (2019) 779–790.
[47] R. Feng, M. Ullah, K. Chen, Q. Ali, Y. Lin, Z. Sun, Stem cell-derived extracellular vesicles mitigate ageing-associated arterial stiffness and hypertension, J Extracell Vesicles 9 (2020) 1783869.
[48] Q. Yin, N. Xu, D. Xu, M. Dong, X. Shi, Y. Wang, Z. Hao, S. Zhu, D. Zhao, H. Jin, W. Liu, Comparison of senescence-related changes between three- and two-dimensional cultured adipose-derived mesenchymal stem cells, Stem Cell Res. Ther. 11 (2020) 226.
[49] L.A. Vonk, S.F.J. van Dooremalen, N. Liv, J. Klumperman, P.J. Coffer, D.B.F. Saris, M.J. Lorenowicz, Mesenchymal Stromal/stem Cell-derived Extracellular Vesicles Promote Human Cartilage Regeneration In Vitro, Theranostics 8 (2018) 906–920.
[50] C. Giannasi, S. Niada, C. Magagnotti, E. Ragni, A. Andolfo, A.T. Brini, Comparison of two ASC-derived therapeutics in an in vitro OA model: secretome versus extracellular vesicles, Stem Cell Res. Ther. 11 (2020) 521.
[51] S.C. Tao, T. Yuan, Y.L. Zhang, W.J. Yin, S.C. Guo, C.Q. Zhang, Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model, Theranostics 7 (2017) 180–195.
[52] D. D'Arrigo, A. Roffi, M. Cucchiarini, M. Moretti, C. Candrian, G. Filardo, Secretome and Extracellular Vesicles as New Biological Therapies for Knee Osteoarthritis: A Systematic Review, J. Clin. Med. 8 (2019).
[53] A. De Luna, A. Otahal, S. Nehrer, Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles - Silver Linings for Cartilage Regeneration?, Front. Cell Dev. Biol. 8 (2020) 593386.
[54] S. Li, S. Stockl, C. Lukas, J. Gotz, M. Herrmann, M. Federlin, S. Grassel, hBMSC-Derived Extracellular Vesicles Attenuate IL-1beta-Induced Catabolic Effects on OA-Chondrocytes by Regulating Pro-inflammatory Signaling Pathways, Front. Bioeng. Biotechnol. 8 (2020) 603598.
[55] L. Yan, G. Liu, X. Wu, The umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomal lncRNA H19 improves osteochondral activity through miR-29b-3p/FoxO3 axis, Clin. Transl. Med. 11 (2021) e255.
[56] C. Cavallo, G. Merli, R.M. Borzi, N. Zini, S. D'Adamo, M. Guescini, B. Grigolo, A. Di Martino, S. Santi, G. Filardo, Small Extracellular Vesicles from adipose derived stromal cells significantly attenuate in vitro the NF-kappaB dependent inflammatory/catabolic environment of osteoarthritis, Sci. Rep. 11 (2021) 1053.
[57] S. Cosenza, K. Toupet, M. Maumus, P. Luz-Crawford, O. Blanc-Brude, C. Jorgensen, D. Noel, Mesenchymal stem cells-derived exosomes are more immunosuppressive than microparticles in inflammatory arthritis, Theranostics 8 (2018) 1399–1410.
[58] J. Zhang, Y. Rong, C. Luo, W. Cui, Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes prevent osteoarthritis by regulating synovial macrophage polarization, Aging (Albany NY) 12 (2020) 25138–25152.
[59] K. Wang, F. Li, Y. Yuan, L. Shan, Y. Cui, J. Qu, F. Lian, Synovial Mesenchymal Stem Cell-Derived EV-Packaged miR-31 Downregulates Histone Demethylase KDM2A to Prevent Knee Osteoarthritis, Mol. Ther. Nucleic Acids 22 (2020) 1078–1091.
[60] Y. Rong, J. Zhang, D. Jiang, C. Ji, W. Liu, J. Wang, X. Ge, P. Tang, S. Yu, W. Cui, W. Cai, Hypoxic pretreatment of small extracellular vesicles mediates cartilage repair in osteoarthritis by delivering miR-216a-5p, Acta Biomater. 122 (2021) 325–342.
[61] C.H. Woo, H.K. Kim, G.Y. Jung, Y.J. Jung, K.S. Lee, Y.E. Yun, J. Han, J. Lee, W.S. Kim, J.S. Choi, S. Yang, J.H. Park, D.G. Jo, Y.W. Cho, Small extracellular vesicles from human adipose-derived stem cells attenuate cartilage degeneration, J. Extracell. Vesicles 9 (2020) 1735249.
[62] X. Bian, B. Li, J. Yang, K. Ma, M. Sun, C. Zhang, X. Fu, Regenerative and protective effects of dMSC-sEVs on high-glucose-induced senescent fibroblasts by suppressing RAGE pathway and activating Smad pathway, Stem Cell Res. Ther. 11 (2020) 166.
[63] T. Su, Y. Xiao, Y. Xiao, Q. Guo, C. Li, Y. Huang, Q. Deng, J. Wen, F. Zhou, X.H. Luo, Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomal MiR-29b-3p Regulates Aging-Associated Insulin Resistance, ACS Nano 13 (2019) 2450–2462.
[64] M. Ahmadi, J. Rezaie, Ageing and mesenchymal stem cells derived exosomes: Molecular insight and challenges, Cell Biochem. Funct. 39 (2021) 60–66.
[65] J. Platas, M.I. Guillen, M.D. Perez Del Caz, F. Gomar, M.A. Castejon, V. Mirabet, M.J. Alcaraz, Paracrine effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells in inflammatory stress-induced senescence features of osteoarthritic chondrocytes, Aging (Albany NY) 8 (2016) 1703–1717.
[66] M. Tofino-Vian, M.I. Guillen, M.D. Perez Del Caz, M.A. Castejon, M.J. Alcaraz, Extracellular Vesicles from Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Downregulate Senescence Features in Osteoarthritic Osteoblasts, Oxid Med Cell Longev 2017 (2017) 7197598.
[67] O.H. Jeon, D.R. Wilson, C.C. Clement, S. Rathod, C. Cherry, B. Powell, Z. Lee, A.M. Khalil, J.J. Green, J. Campisi, L. Santambrogio, K.W. Witwer, J.H. Elisseeff, Senescence cell-associated extracellular vesicles serve as osteoarthritis disease and therapeutic markers, JCI Insight 4 (2019).

[68] U. Nogueira-Recalde, I. Lorenzo-Gomez, F.J. Blanco, M.I. Loza, D. Grassi, V. Shirinsky, I. Shirinsky, M. Lotz, P.D. Robbins, E. Dominguez, B. Carames, Fibrates as drugs with senolytic and autophagic activity for osteoarthritis therapy, EBioMedicine 45 (2019) 588–605.
[69] F. Shekari, A. Nazari, S. Assar Kashani, E. Hajizadeh-Saffar, R. Lim, H. Baharvand, Pre-clinical investigation of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles: a systematic review, Cytotherapy 23 (2021) 277–284.
[70] O.S. Beane, V.C. Fonseca, L.L. Cooper, G. Koren, E.M. Darling, Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells, PLoS ONE 9 (2014) e115963.
[71] P. Ganguly, J.J. El-Jawhari, P.V. Giannoudis, A.N. Burska, F. Ponchel, E.A. Jones, Age-related Changes in Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells: A Potential Impact on Osteoporosis and Osteoarthritis Development, Cell Transp. 26 (2017) 1520–1529.
[72] Y. Qin, L. Wang, Z. Gao, G. Chen, C. Zhang, Bone marrow stromal/stem cell-derived extracellular vesicles regulate osteoblast activity and differentiation in vitro and promote bone regeneration in vivo, Sci. Rep. 6 (2016) 21961.
[73] S.J. Prasanna, D. Gopalakrishnan, S.R. Shankar, A.B. Vasandan, Pro-inflammatory cytokines, IFNgamma and TNFalpha, influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially, PLoS ONE 5 (2010) e9016.
[74] M.L. Weiss, C. Anderson, S. Medicetty, K.B. Seshareddy, R.J. Weiss, I. VanderWerff, D. Troyer, K.R. McIntosh, Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells, Stem Cells 26 (2008) 2865–2874.
[75] Z.J. Wei, Q.Q. Wang, Z.G. Cui, H. Inadera, X. Jiang, C.A. Wu, Which is the most effective one in knee osteoarthritis treatment from mesenchymal stem cells obtained from different sources?-A systematic review with conventional and network meta-analyses of randomized controlled trials, Ann. Transl. Med. 9 (2021) 452.
[76] M. Shariatzadeh, J. Song, S.L. Wilson, The efficacy of different sources of mesenchymal stem cells for the treatment of knee osteoarthritis, Cell Tissue Res. 378 (2019) 399–410.
[77] S. Bruno, F. Collino, M.C. Deregibus, C. Grange, C. Tetta, G. Camussi, Microvesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells inhibit tumor growth, Stem Cells Dev. 22 (2013) 758–771.
[78] S. Wu, G.Q. Ju, T. Du, Y.J. Zhu, G.H. Liu, Microvesicles derived from human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells attenuate bladder tumor cell growth in vitro and in vivo, PLoS ONE 8 (2013) e61366.
[79] A.M. Roccaro, A. Sacco, P. Maiso, A.K. Azab, Y.T. Tai, M. Reagan, F. Azab, L.M. Flores, F. Campigotto, E. Weller, K.C. Anderson, D.T. Scadden, I.M. Ghobrial, BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression, J. Clin. Invest. 123 (2013) 1542–1555.
[80] C.O. Rodini, P.B. Goncalves da Silva, A.F. Assoni, V.M. Carvalho, O.K. Okamoto, Mesenchymal stem cells enhance tumorigenic properties of human glioblastoma through independent cell-cell communication mechanisms, Oncotarget 9 (2018) 24766–24777.
[81] T.S. Chen, F. Arslan, Y. Yin, S.S. Tan, R.C. Lai, A.B. Choo, J. Padmanabhan, C.N. Lee, D.P. de Kleijn, S.K. Lim, Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs, J. Transl. Med. 9 (2011) 47.
[82] T.T. Tan, R.C. Lai, J. Padmanabhan, W.K. Sim, A.B.H. Choo, S.K. Lim, Assessment of Tumorigenic Potential in Mesenchymal-Stem/Stromal-Cell-Derived Small Extracellular Vesicles (MSC-sEV), Pharmaceuticals (Basel) 14 (2021).
[83] A.Y.L. Wang, Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Exosomes as a New Therapeutic Strategy for Various Diseases, Int. J. Mol. Sci. 22 (2021).
[84] Z. Zhi, C. Zhang, J. Kang, Y. Wang, J. Liu, F. Wu, G. Xu, The therapeutic effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on osteoarthritis is improved by the activation of the KDM6A/SOX9 signaling pathway caused by exposure to hypoxia, J. Cell. Physiol. 235 (2020) 7173–7182.
[85] W. Ren, J. Hou, C. Yang, H. Wang, S. Wu, Y. Wu, X. Zhao, C. Lu, Extracellular vesicles secreted by hypoxia pre-challenged mesenchymal stem cells promote non-small cell lung cancer cell growth and mobility as well as macrophage M2 polarization via miR-21-5p delivery, J. Exp. Clin. Cancer Res. 38 (2019) 62.
[86] E. Ragni, C. Perucca Orfei, P. De Luca, C. Mondadori, M. Vigano, A. Colombini, L. de Girolamo, Inflammatory priming enhances mesenchymal stromal cell secretome potential as a clinical product for regenerative medicine approaches through secreted factors and EV-miRNAs: the example of joint disease, Stem Cell Res. Ther. 11 (2020) 165.
[87] R. Wang, B. Xu, TGF-beta1-modified MSC-derived exosomal miR-135b attenuates cartilage injury via promoting M2 synovial macrophage polarization by targeting MAPK6, Cell Tissue Res. 384 (2021) 113–127.
[88] Z. Wang, K. Yan, G. Ge, D. Zhang, J. Bai, X. Guo, J. Zhou, T. Xu, M. Xu, X. Long, Y. Hao, D. Geng, Exosomes derived from miR-155-5p-overexpressing synovial mesenchymal stem cells prevent osteoarthritis via enhancing proliferation and migration, attenuating apoptosis, and modulating extracellular matrix secretion in chondrocytes, Cell Biol. Toxicol. 37 (2021) 85–96.
[89] Z. Jin, J. Ren, S. Qi, Human bone mesenchymal stem cells-derived exosomes overexpressing microRNA-26a-5p alleviate osteoarthritis via down-regulation of PTGS2, Int. Immunopharmacol. 78 (2020) 105946.
[90] G. Mao, Z. Zhang, S. Hu, Z. Zhang, Z. Chang, Z. Huang, W. Liao, Y. Kang, Exosomes derived from miR-92a-3p-overexpressing human mesenchymal stem cells enhance chondrogenesis and suppress cartilage degradation via targeting WNT5A, Stem Cell Res. Ther. 9 (2018) 247.
[91] H.B. Si, T.M. Yang, L. Li, M. Tian, L. Zhou, D.P. Li, Q. Huang, P.D. Kang, J. Yang, Z. K. Zhou, J.Q. Cheng, B. Shen, miR-140 Attenuates the Progression of Early-Stage Osteoarthritis by Retarding Chondrocyte Senescence, Mol. Ther. Nucleic Acids 19 (2020) 15–30.

Hypothèses de travail - Objectifs

L'hypothèse principale de mon travail de thèse est que les EV isolées à partir de CSM sénescentes, peuvent perdre en partie leur capacité thérapeutique dans le traitement de l'arthrose. Pour y répondre, mon projet s'est organisé autour de deux objectifs.

Mon premier objectif était de comparer l'effet thérapeutique d'EV isolées à partir d'ASCs saines ou induites en sénescence. Pour cela nous avons développé un modèle d'ASCs induites en sénescence à l'aide d'un agent induisant des dommages à l'ADN (étoposide). Nous avons par la suite comparé l'effet thérapeutique des EV dérivées d'ASCs saines ou sénescentes *in vitro* sur des chondrocytes arthrosiques humains, puis, *in vivo* dans un modèle murin d'arthrose induite à la collagénase.

Le second objectif était d'étudier l'effet sénoprotecteur des EV isolées à partir d'ASCs saines. Pour cela nous avons développé un modèle de chondrocytes humains induits en sénescence par des dommages à l'ADN, en utilisant de nouveau l'étoposide, mais également par l'inflammation en utilisant l'IL-1β. Nous avons par la suite évalué l'effet des EV saines et sénescentes sur la prévention de la sénescence induite sur des chondrocytes humains primaires.

2 Travaux personnels

1ère partie : Les vésicules extracellulaires des cellules stromales mésenchymateuses sénescentes ne peuvent prévenir l'arthrose.

L'âge est le facteur de risque le plus important dans les maladies dégénératives, notamment l'arthrose, qui est associée à l'accumulation de cellules sénescentes dans les articulations. Parmi les stratégies thérapeutiques pour le traitement de l'arthrose, les cellules stromales mésenchymateuses et leurs EV sont en cours d'évaluation. Des études in vitro et in vivo ont démontré les effets bénéfiques des CSM dans l'OA. En clinique, des études ont montré que le traitement par l'utilisation de CSM améliore la douleur et les paramètres fonctionnels (Desando et al., 2013; ter Huurne et al., 2012; Maumus et al., 2013b; Song et al., 2020). Plus récemment, il a été rapporté que les CSM-EV reproduisaient la plupart des propriétés thérapeutiques des CSM parentales (Cosenza et al., 2017; Tofiño-Vian et al., 2018; Zhang et al., 2016; Zhu et al., 2017). Cependant dans une perspective de traitement utilisant des CSM autologues ou leurs EV en clinique, il est à craindre que les EV provenant de CSM isolées de donneurs âgés peuvent perdre leur potentiel de régénération. A ce jour, aucune étude n'a comparé l'effet thérapeutique des CSM saines et sénescentes in vitro et in vivo dans l'arthrose.

Dans cette première partie de mes travaux de thèse, nous avons évalué l'impact de la sénescence sur les propriétés thérapeutiques des EV dérivées d'ASCs dans un modèle in vitro de chondrocytes humains arthrosiques et in vivo, dans un modèle murin d'arthrose induite à la collagénase.

La première étape a été de générer un modèle d'ASCs sénescentes. Pour cela, notre choix s'est porté sur l'étoposide, un composé qui inhibe l'entrée en mitose (prophase) des cellules, vraisemblablement par inhibition de la topo-isomérase II chargée de ressouder les brins d'ADN après leur cassure. Ce composé va induire des cassures double brin de l'ADN qui vont déclencher une DDR persistante et initier l'entrée en sénescence. Nous avons traité des ASCs humaines primaires avec 25 µM d'étoposide pendant 24 heures et évalué l'apparition des marqueurs de sénescence, 7 et 12 jours après traitement. Nous avons montré que le traitement des ASCs avec ce composé induit plusieurs marqueurs de sénescence : activité SA-β-Gal augmentée, arrêt de la prolifération cellulaire, présence de foyers de dommages à l'ADN, changement de morphologie cellulaire et production d'un SAPS dès 7 jours post-traitement.

Nous avons comparé l'effet chondroprotecteur des ASCs saines et sénescentes. Pour cela, nous avons utilisé des chondrocytes isolés de prélèvements de cartilage de patients arthrosiques. Afin d'exacerber le phénotype arthrosique des chondrocytes en culture, nous les avons traités à l'IL-1β pendant 48 heures avant d'ajouter des ASCs saines ou sénescentes en co-culture dans un Transwell pendant 7

jours. Nous avons montré que les ASCs sénescentes ont le même effet bénéfique sur le phénotype des chondrocytes arthrosiques que les ASCs saines sauf sur les marqueurs d'inflammation qui sont significativement augmentés. De manière intéressante et contrairement aux ASCs, les surnageants conditionnés des ASCs saines et sénescentes augmentent l'expression de l'aggrécane et du collagène de type I et III et sont moins efficaces à diminuer les marqueurs cataboliques.

Nous avons ensuite évalué l'effet des EV produites par les ASCs et montré que les EV d'ASC sénescentes ont le même effet que les EV d'ASCs saines sur l'augmentation de l'expression de l'aggrécane et la diminution de l'expression de MMP3. En revanche et contrairement aux EV d'ASCs saines, les EV sénescentes ne diminuent pas l'expression de MMP13, IL6 et IL8.

Enfin, nous avons comparé l'effet thérapeutique des EV dans un modèle murin d'arthrose induite par la collagénase. Les analyses histomorphométriques des articulations réalisées par µCT et microscopie laser confocale ont montré que seules les EV saines protègent les souris des lésions articulaires, notamment au niveau des calcifications au niveau méniscal et ligamentaire et au niveau du cartilage articulaire.

Ces travaux démontrent que les EV isolées d'ASCs sénescentes conservent en partie leurs capacités chondroprotectrices in vitro mais ne sont pas capables de prévenir des altérations engendrées par l'arthrose induite chez la souris.

Article 4 (article original) : Les vésicules extracellulaires des cellules stromales mésenchymateuses sénescentes ne peuvent pas prévenir l'arthrose

Extracellular vesicles from senescent mesenchymal stromal cells cannot prevent osteoarthritis

Jérémy Boulestreau, Marie Maumus, Karine Toupet, Christian Jorgensen and Danièle Noël.

En préparation

Extracellular vesicles from senescent mesenchymal stromal cells cannot prevent osteoarthritis.

Boulestreau Jérémy[1], Maumus Marie[1,2], Karine Toupet[1], Jorgensen Christian[1,3] and Noël Danièle[1,3,*]

[1]IRMB, University of Montpellier, INSERM, Montpellier, France; [2]Bauerfeind France, IRMB, Montpellier, France; [3]Clinical Immunology and Osteoarticular Disease Therapeutic Unit, Department of Rheumatology, CHU Montpellier, France.

* Corresponding author: Danièle Noël, PhD

Inserm U1183, IRMB, Hôpital Saint-Eloi,

80 avenue Augustin Fliche, 34295 Montpellier cedex 5, France

Tel: +33 4 67 33 04 73 – Fax: +33 4 67 33 01 13 -- E-mail: daniele.noel@inserm.fr

Abstract

Age is the most important risk factor in degenerative diseases such as osteoarthritis (OA), which is associated with the accumulation of senescent cells in the joints. Here, we aimed at assessing the impact of senescence on the therapeutic properties of extracellular vesicles (EVs) from human fat mesenchymal stromal cells (ASCs) in OA. We generated a model of DNA damage-induced senescence in ASCs using etoposide and characterized EVs isolated from their conditioned medium (CM). Senescent ASCs (S-ASCs) produced 3-fold more EVs (S-EVs) with a slightly bigger size and that contain 2-fold less total RNA. Coculture experiments of ASCs or EVs with OA chondrocytes showed that S-ASCs were as efficient as healthy ASCs (H-ASCs) to improve the phenotype of OA chondrocytes, except for inflammatory markers. Of note, S-EVs and H-EVs were more efficient than ASCs to upregulate the anabolic markers of chondrocytes. Both EVs could down-regulate MMP3 expression but S-EVs were less efficient to down-regulate MMP13 and inflammatory genes. Using the collagenase-induced OA model, we found that contrary to H-EVs, S-EVs could not protect mice from cartilage damage and joint calcifications while sub-chondral bone degradation was inhibited. In conclusion, S-EVs and H-EVs exerted quite similar chondroprotective function in vitro but S-EVs cannot protect mice from developing OA.

Keywords: Mesenchymal stromal cell, Extracellular vesicle, Senescence, Aging, Osteoarthritis, Regenerative medicine

Introduction

Osteoarthritis (OA) is the most prevalent rheumatic disease, characterized by cartilage degradation, sub-chondral bone sclerosis, osteophyte formation, synovial inflammation and calcification of ligaments. The main risks factors are obesity, genetics, joint injuries following traumas but the most prevalent one is age. This degenerative and debilitating disease affects over half of individuals aged 65 years and older, which yields around 30 million adults in the US population [1]. It is estimated that the number of people affected will double in the coming years to reach nearly 67 million by 2030 and OA has become a major socio-economic problem in industrialized societies [2]. Senescence is one of the hallmarks of aging that has been implicated in the pathogenesis and progression of most of aging-associated diseases, including OA [3]. However, the exact mechanism connecting senescence and OA pathology remains unclear. Senescent cells are cell cycle-arrested and release a secretome containing various bioactive molecules, called the senescence-associated secretory phenotype (SASP). These molecules can be released as single molecules or within extracellular vesicles (EVs) that contribute to the pathogenesis of OA and the degradation of joint tissues. Targeting senescent cells therefore represents a novel approach for treating OA [4].

Among the therapeutic strategies being investigated for the treatment of OA is the use of mesenchymal stromal cells (MSCs). A large number of studies have shown that in vitro, MSCs can improve the altered phenotype of OA chondrocytes and in vivo, have tissue supportive functions by decreasing inflammation and protecting cartilage and bone from degradation, through the production of trophic factors [5-8]. In clinics, a meta-analysis of available data indicated that MSC-based treatment improves pain and functional parameters [9]. More recently, extracellular vesicles (EVs) isolated from MSCs were reported to reproduce most of the therapeutic effects of parental MSCs. They improved the OA phenotype of chondrocytes in vitro and exerted a therapeutic effect in murine models of OA or in cartilage repair [10-13]. However, in the perspective of autologous therapies for OA and other degenerative diseases, MSCs will be isolated from aged patients and the question will raise on their senescence status and function preservation. Indeed, it has been reported that the pool of stem cells

decreases with age [14]. It has also been shown that EVs from aged or senescent MSCs may lose their regenerative potential and negatively influence the function of recipient cells through the release of SASP factors (for review, see [15]). However, to date, no study has evaluated the therapeutic effect of EVs from senescent MSCs in OA. The objective of the present study was to investigate the functional role of EVs isolated from senescent adipose tissue derived MSCs (ASCs) in vitro, on OA human chondrocytes and in vivo, in a preclinical model of OA.

Materials and methods

Cells and culture media

The study was approved for specimen recovery by the French Ministry of Research and Innovation and the Personal data Protection ethics Committee (CPP) of Languedoc-Roussillon (approval DC-2010-1185). ASCs were obtained from 7 healthy donors (aged 48 ± 5 years), from surgical residues obtained after aesthetic liposuction. Isolation and characterization of ASCs have been performed as reported previously and expanded in α-MEM medium containing 10% fetal calf serum (FCS), 100 µg/mL penicillin/streptomycin (PS), 2 mM glutamine (Glu), and 1 ng/mL basic fibroblast growth factor (CellGenix, Freiburg, Germany) (proliferative medium) [16]. ASCs were used at passage 2. The conditioned medium (CM) was recovered after 3 days.

Chondrocytes were isolated from the femoral condyles of patients with OA undergoing total knee replacement surgery (mean age: 74 ± 2 years). Briefly, cartilage slices were incubated in 2.5 mg/mL pronase (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier) at 37°C for 1 h followed by 2 mg/mL collagenase type II (Sigma-Aldrich), at 37°C overnight. Cell suspensions were then filtrated through cell strainer with 70 µm pores and cultured in DMEM/PS/Glu/10% FCS (proliferative medium) at the density of 25,000 cells/cm² till the end of passage 0.

For coculture assays, chondrocytes (500,000 cells/well) were then plated on the bottom of 6-well plates and treated with or without IL1β (10 ng/mL) for 48 hours. ASCs were added in cell culture inserts (100,000 cells; PET membranes, 0.4 µm porosity, Corning, Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix) on top of chondrocytes or different doses of EVs (100, 500 and 2500 ng), or 3 mL CM. Cultures were maintained in 3 mL of minimal medium (DMEM supplemented with PS, 0.35 mmol/L proline, 0.17 mmol/L ascorbic acid and 1 mmol/L sodium pyruvate) for 7 days.

Model of etoposide-induced senescence

ASCs were seeded in proliferative medium in 6-wells or 24-wells plates at the density of 2000 cells/cm² for control cells and 6000 cells/cm² for etoposide (ETO) treatment. ETO (25 µM) was added for 24 hours and ASCs were then rinsed three times with PBS before fresh medium addition for 7 or 12 days.

Cell proliferation assay

ASCs were trypsinized and the number of lived cells was counted using Trypan Blue exclusion dye. Proliferation was assessed using the Cell Proliferation ELISA, BrdU assay as described by manufacturer (Roche SAS, Boulogne-Billancourt).

Senescence-associated β-galactosidase

ASCs were fixed with 2.5% glutaraldehyde at room temperature (RT) for 5 min. After 3 washes with PBS, cells were incubated with a solution of 5 mM Potassium ferrocyanide, 5 mM Potassium ferricyanide, 200 mM citric acid/sodium phosphate buffer pH 6, 150 mM sodium Chloride, 2 mM magnesium chloride, 1 mg/mL of X-gal (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) at 37°C for 6 h. Cells were then examined and photographed under a microscope (EVOS M5000, Invitrogen). SA-β-Gal$^+$ ASCs were quantified with the Image J software using the cell counter complement. Additionally, SA-β-Gal assay was performed using the 96-Well Cellular Senescence Activity Assay following

manufacturer's instructions (Cell Biolabs, Saint-Cyr-l'Ecole). Fluorescence was measured using a Varioskan Flash microplate reader (ThermoFisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden).

Immunofluorescence assays

ASCs were fixed with 4% formaldehyde at RT for 15 min and permeabilized with 0.3% Triton X-100 in PBS for 1 h. For γH2AX staining, 5% normal goat serum was added during the permeabilization step. After 3 washes with PBS, ASCs were incubated with Phospho-histone γH2AX (Ser139) antibody (Cell Signalling Technology, Ozyme, St-Cyr-l'Ecole) at 4°C overnight. Cells were washed 3 times and incubated with Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (H+L) (ThermoFisher Scientific) at RT for 2 h and DAPI for 10 min. Finally, cells were photographed under a microscope (EVOS M5000, Invitrogen) and γH2AX foci and nucleus area were quantified using the Image J software and the counter complement. For F-actin staining, ASCs were incubated with 50 µg/mL fluorescent phalloidin conjugated with Tetramethyl-rhodamine B isothiocyanate (TRITC) in PBS at RT for 40 min. Cells were then stained with DAPI 10 min and washed 3 times in PBS before being photographed. Using the Image J software, cell surface and the corrected total cell fluorescence (CTCF) were quantified. CTCF = Integrated Density – (Area of selected cell x Mean fluorescence of background readings).

RNA Extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted using 350 µL RLT buffer from the RNeasy Mini Kit according to the supplier's recommendations (Qiagen, Les Ulis). Reverse transcription of 500 ng RNA was obtained by M-MLV reverse transcriptase (ThermoFisher Scientific). Real-time PCR was done on 10 ng cDNA using SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics, Meylan) and specific primers (Table 1). Values were normalized to the Ribosomal Protein S9 (RPS9) housekeeping gene and expressed as relative expression or fold change using the respective formulae $2^{-\Delta CT}$ or $2^{-\Delta\Delta CT}$.

ELISA assays

Supernatants from cells were recovered and stored at -20°C till use. Quantification of MMP-3, IL-6, IL8 and VEGF was performed using specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (Bio-Techne, R&D Systems, Rennes).

Production and Isolation of EVs

Production of conditioned medium (CM) and isolation of EVs were performed as described [17]. Briefly, total EVs were pelleted by differential ultracentrifugation at 100,000× g, at 4°C for 2 h. EVs were characterized as recommended by the International Society of Extracellular Vesicles (ISEV) [18]. EV size and concentration were determined by Nanoparticles Tracking Analysis; structure using cryo-TEM, RNA content using the RNeasy Micro Kit (Qiagen, Les Ulis) and protein content using the Micro BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) and by flow cytometry and western blot, as described [17]. Surface marker expression was analyzed using fluorophore-conjugated antibodies for murine CD11b, CD29, CD44, CD45, CD63, CD81, CD90 and HLA-ABC (BD Biosciences) by flow cytometry. EVs were used freshly prepared.

Collagenase-induced arthritis model and joint imaging

The collagenase-induced OA (CIOA) murine model was performed as previously described [19] and in accordance with guidelines and regulations of the Ethical Committee for animal experimentation of the Languedoc-Roussillon (Approval APAFIS#5349-2016050918198875)). Briefly, 5 µL of 1U type VII collagenase or saline (control (CT) group) were administered intra-articularly (IA) in the knee joint of 10 weeks old C57BL/6 mice at day 0 and 2. Groups of 15 mice received IA injections of either ASCs (2.5×10^5 cells/5 µL saline), EVs (250 ng/5 µL) or 5 µL saline at day 7. Mice were euthanatized at day 42 and paws recovered for fixation in 4% formaldehyde and further analysis.

For bone analysis, hind paws were scanned in a Micro-Computed Tomography (µCT) scanner (SkyScan 1176, Bruker, Kontich, Belgium) and 3D image stacks were reconstructed using the NRecon software

(Bruker). Quantification of subchondral bone of tibia and calcification of meniscus and ligaments was done using the CTAn software (Bruker). Reconstructed 3D images of joints were obtained using Avizo software (Avizo Lite 9.3.0, FEI, France). For cartilage analysis, tibia plateaus were scanned with a confocal laser scanning microscope (CLSM; TCS SP8, Leica Microsystems, Nanterre, France). Stacks of images were analyzed to quantitate several cartilage morphometric parameters using the Avizo software (FEI Visualization Sciences Group, Lyon).

Histological analysis

Hind paws were decalcified using 5% formic acid at RT for 2 weeks and then embedded in paraffin. Frontal sections of tibias were cut (3 slices of 7 µm each 100 µm; first section at 50 µm below the cartilage surface) and stained with safranin O and fast green. Cartilage degradation was quantified using the modified Pritzker OARSI score.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad 9 Prism Software. Data distribution was assessed using the Shapiro–Wilk normality test. A one-sample t test was done when the values displayed a normal distribution to compare one group to the control normalized to 1 or 100, either wise a Wilcoxon signed-rank test was used. If controls were not normalized, the statistical analyses between two groups were compared using the Student's t-test or the Mann–Whitney test when values were unpaired, parametric or non-parametric, respectively. Paired t test or Wilcoxon matched-pairs signed rank test were used to compare two paired groups, parametric or non-parametric, respectively. Data are presented as mean ± SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Results

Characterization of etoposide-induced senescent ASCs

We used etoposide (ETO) to generate a model of DNA damage-induced senescence (Fig. 1A). A 24 h treatment with 25 µmol/L ETO was sufficient to induce a proliferation arrest of ASCs as shown by the lower cumulative cell number, proliferation rate and BrdU incorporation percentage at day 12 (Fig. 1B-D). This was associated with a significant increase of the cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) p21cdkn1a, while the expression of other CDKI (p14ARF, p15INK4b, p16INK4a, p27KIP1 and p57KIP2) was not changed in ETO-treated ASCs (Fig. 1E). Secretion of several proteins of the SASP (MMP3, IL6 and IL8) was increased in ETO-treated ASCs (Fig. 1F). We also showed an increase in SA-β-Gal staining, which was reflected by the high percentage of SA-β-Gal$^+$ ASCs and the increase of SA-β-Gal activity (Fig. 1G-H). The number of stress fibers stained with phalloidin and quantified by CTCF was increased as well as the cell surface of ETO-treated ASCs compared to untreated ASCs (Figure 1G-I). Finally, ETO-induced DNA damage foci were visualized by γH2AX staining and the increase of the number of γH2AX positive nuclei and of the nucleus surface (Fig. 1G-J). All these senescence-related features were observed at day 12 but also, as soon as day 7 (Fig. S1). These data demonstrated that using ETO, we generated a DNA damage-induced senescence model in ASCs.

Senescent ASCs maintain their ability to reverse the OA phenotype of chondrocytes

First, we evaluated the capacity of senescent ASCs (S-ASCs) to restore the homeostasis of human OA chondrocytes. We previously showed that incubation of OA chondrocytes with IL-1β down-regulates the expression of anabolic genes, including type II collagen variant B (COL2A1ΔB), aggrecan (ACAN), type I collagen (COL1A1) and, up-regulates catabolic genes, such as matrix metalloproteinase 3 (MMP3), MMP13, and inflammatory markers (interleukin 6 (IL6), IL8) [20]. In this model, the addition of either healthy ASCs (H-ASCs) or S-ASCs did not impact the expression of anabolic markers but decreased type III collagen (COL3A1), MMP3 and MMP13 (Fig. 2). Of note, IL6 and IL8 were both up-regulated by S-ASCs and not significantly by H-ASCs. Interestingly when evaluating the conditioned

supernatants (CM) of parental ASCs, they did not reproduce the effect of ASCs in coculture with chondrocytes. Indeed, the CM of H-ASCs and S-ASCs were able to normalize the expression of ACAN and COL3A1 but were less efficient to reduce the expression of MMP3 and MMP13 or COL3A1. The expression of IL8 was increased with the CM of S-EVs but not with H-EVs. These data provide evidence that a crosstalk between ASCs and chondrocytes regulates the function of ASCs upon activation in the cocultures and suggest that the CM of non-activated ASCs contains a different composition of soluble mediators.

Senescent ASCs produce higher amounts of EVs

To determine whether EVs can account for the differential effect of the CM on OA chondrocytes, we isolated the EV fraction from the CM of H-ASCs and S-ASCs. EVs from the two ASC types displayed a different size distribution with EVs from senescent ASCs (S-EVs) being slightly bigger than EVs from healthy ASCs (H-EVs) as shown also by their median and modal sizes (Fig. 3A). The number of particles and the quantity of EV equivalent proteins produced by S-ASCs were significantly higher than those produced by H-ASCs (Fig. 3B). The cargo of H-EVs and S-EVs was similar in terms of total protein amounts per particle, but S-EVs possessed 2.3-fold less total RNA content than H-EVs (Fig. 3C). A number of membrane markers were expressed at similar levels on S-EVs and H-EVs, including CD29, CD44, CD63, CD81, CD90 while hematopoietic markers (CD11b, CD45) and HLA-ABC were not detected (Fig. 3D). Finally, H-EVs and S-EVs were characterized by the presence of a bilayer membrane as visualized by cryo-TEM (Fig. 3E). All these data confirmed the isolation of EVs from the CM of ASCs and showed that H-EVs and S-EVs exhibit slightly different characteristics.

EVs from senescent ASCs exhibit similar overall chondroprotective functions as healthy EVs

We then compared the dose-effect of H-EVs and S-EVs on the phenotype of IL-1β-treated OA chondrocytes. Addition of both S-EVs and H-EVs up-regulated the expression of the anabolic marker ACAN and down-regulated MMP3 in a dose-independent manner. H-EVs were able to significantly

decrease the expression of MMP13, IL6, IL8 while S-EVs had no effect and even tended to increase the expression of IL8. These data support the notion that S-EVs maintained the beneficial effect observed with H-EVs on OA chondrocytes but were less efficient to reduce catabolic and inflammatory genes and less efficient than their parental ASCs.

H-EVs protect cartilage and bone from degradation in the collagenase-induced OA murine model

We next aimed at comparing the therapeutic effect of S-EVs and H-EVs in vivo using the CIOA murine model. At histological level, the OA score, which increases with the increase of articular cartilage alterations, was lower in the group of mice receiving H-EVs compared to the CIOA group and similar to that of the healthy control (Fig. 5A). The OA score was high in the group of mice receiving S-EVs. Cartilage degradations were confirmed by CLSM analysis as shown by representative pictures of tibial plateaus from each group of mice (Fig. 5B). The volume of cartilage was higher in H-EVs treated mice compared to CIOA mice while surface degradation, as assessed by the surface/volume parameter, tended to be lower (Fig. 5C). Importantly, all the volume, thickness and surface degradation parameters were significantly worsened in S-EVs treated mice compared to H-EVs treated mice. The cartilage thickness of mice treated with S-EVs was even significantly worst compared to the CIOA group of mice.

Looking at bone alterations, we observed calcifications in the menisci and the lateral and median ligaments in the CIOA group (Fig. 6A). These calcifications were improved in the group of H-EVs treated mice as quantified by the bone volume and surface parameters (Fig. 6B). By contrast, these parameters were not improved in S-EVs treated mice and were similar to those in the CIOA group. Regarding the sub-chondral bone parameters, the bone volume and thickness were significantly decreased in the CIOA group while the surface degradations were increased (Fig. 6C-D). These parameters were all significantly improved in the group of mice treated with H-EVs. Improvement of these parameters was also noticed in the group treated with S-EVs but to a lesser extent. Altogether, the accurate analysis of histomorphometric parameters of articular cartilage, sub-chondral bone and joint compartment

including menisci and ligaments demonstrated a lack of efficacy of S-EVs to protect cartilage and bone from alterations in a relevant murine OA model.

Discussion

In the present study, we showed that S-EVs can improve the anabolic and catabolic functions of OA chondrocytes but are defective in regulating their inflammatory status. As a result and contrary to H-EVs, S-EVs cannot prevent the alterations in articular cartilage, sub-chondral bone and other joint compartments that are generated in an experimental model of OA.

Using ETO, we have generated a model of DNA damage-induced senescence in human ASCs that exhibits all the main features of senescence as soon as day 7 after induction. We previously found similar features using bone marrow-derived human MSCs (BM-MSCs) confirming the interest of this chemical inducer of senescence [21]. Here, we showed that S-ASCs produce 3-fold more EVs than H-ASCs. Moreover, S-EVs contained similar amounts of total proteins but 2-fold less total RNA. This is in accordance with a previous study using ASCs from young and aged healthy donors reporting slightly higher production of EVs by aging ASCs and similar total protein content in EVs [22]. Another study using BM-MSCs reported that EVs are secreted in higher amounts by cells from old rats than from young rats but contain 3-fold less total proteins [23]. The discrepancies cannot be attributed to the process of EV isolation that was similar in these studies but likely to the tissue and species origin of MSCs used. However apart from ASCs or BM-MSCs, the current understanding is that the amount of EVs produced by senescent cells is increased and their content is different from that of young cells ([24,25] and for review, see [26]).

One important finding of our study is that EVs (or the CM) do not recapitulate all the functionalities of parental ASCs. While it is commonly accepted that EVs share the main functions of parental MSCs, it is also reported that stress-associated changes in culture conditions (hypoxia, serum depletion, 3D culture,…) or MSC priming impact the cargo of EVs, in particular their protein or miRNA content (for

review, see [27]). In our study, ASCs were likely activated by chondrocytes in the coculture to adapt their secretome and modulate the OA phenotype of chondrocytes. ASCs were highly effective to down-regulate the catabolic and inflammatory activities, which are highly dysregulated in OA chondrocytes. However, EVs (or the CM) produced by non-activated ASCs exhibit slightly different activities. Indeed, we observed that the EVs could re-induce the expression of AGG and decrease the expression of inflammatory mediators but were less efficient than ASCs to down-regulate the catabolic activities of chondrocytes. Thus, in a deeply catabolic and inflammatory environment, ASCs were activated to focus on the secretion of anti-catabolic and anti-inflammatory mediators. This highlights the possible limitations or advantages of EVs. In the one hand, contrary to ASCs that can be primed by the environment to adapt their therapeutic response, EVs cannot. On the other hand, for manufacturing purposes and reproducibility between batches, EVs and their cargo are more stable whenever the conditions for production, isolation and storage are defined [28]. Our data also suggest that priming of parental cells by culture conditions or addition of chemicals or biomolecules should be envisioned for improving EV functions whenever a functional assay is available. Such assay for evaluating the effect of ASCs or EVs on chondrocyte homeostasis is therefore of interest to evaluate the next generation of "enhanced" EVs as demonstrated recently using EVs isolated from rat BM-MSCs [29].

The other important finding is that senescent EVs partly lose their chondroprotective functions. In OA, the therapeutic potential of EVs isolated from healthy or young MSCs has been described in several studies [10,30,31]. However, to our knowledge, this is the first study evaluating the effect of EVs isolated from senescent ASCs in OA. We found a similar capacity of S-EVs and H-EVs to regulate anabolic and catabolic markers of OA chondrocytes in vitro. However, S-EVs tended to increase the expression of inflammatory genes in chondrocytes and lost the ability to prevent cartilage and bone degradations in the joints of OA mice. Based on these results, our hypothesis is that S-EVs partly lose the anti-inflammatory function of parental ASCs and are not able to regulate the inflammatory response in the joints of OA mice. Altered functions of EVs from aged MSCs have already been reported. Indeed, their immunomodulatory functions or their differentiation and proliferation

potential are lower ([22] and for review, see [32]). The pro-angiogenic activity and pro-wound healing effect of oxidative stress-induced senescent MSC-EVs are also decreased compared to EVs from healthy MSCs [33]. In another model of LPS-induced lung injury, aged MSC-EVs were not able of promoting M2 macrophage polarization and to alleviate inflammation [22]. Accordingly, some miRNAs associated with the immune profile of MSCs were shown to be decreased in EVs from aged MSCs and proposed to be related to the loss of their immunotherapeutic function [34]. Moreover, the overall miRNA content is altered in aged BM-MSCs-derived EVs compared to that of younger cells [34,35].

In conclusion, we provided evidence that S-EVs partly lose their chondroprotective effect both in vitro on OA chondrocytes and in vivo in a murine model of OA. Further studies are required to unravel the mechanisms of action of H-EVs that are lost in S-EVs. Furthermore, the CM of healthy ASCs has previously been shown to counter the premature senescence of OA chondrocytes induced by inflammatory stress [36]. This senomorphic function of H-EVs may participate to their chondroprotective effect and has not been investigated so far in OA.

Author statement

Jérémy Boulestreau: Experimental work, data Formal analysis, manuscript writing; Marie Maumus: Experimental work, data Formal analysis; Christian Jorgensen: Conception and design; Danièle Noel: Conception and design, data Formal analysis, manuscript writing.

Declaration of competing of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We acknowledge support from the Inserm Institute, the University of Montpellier and University Hospital of Montpellier. We also acknowledge the Agence Nationale pour la Recherche for support of

the national infrastructure: "ECELLFRANCE: Development of a national adult mesenchymal stem cell based therapy platform" (ANR-11-INSB-005). Study was also supported by a research grant from FOREUM Foundation for Research in Rheumatology.

References

1. Cisternas, M.G.; Murphy, L.; Sacks, J.J.; Solomon, D.H.; Pasta, D.J.; Helmick, C.G. Alternative Methods for Defining Osteoarthritis and the Impact on Estimating Prevalence in a US Population-Based Survey. *Arthritis Care Res (Hoboken)* **2016**, *68*, 574-580, doi:10.1002/acr.22721.
2. Hootman, J.M.; Helmick, C.G. Projections of US prevalence of arthritis and associated activity limitations. *Arthritis Rheum* **2006**, *54*, 226-229, doi:10.1002/art.21562.
3. Coryell, P.R.; Diekman, B.O.; Loeser, R.F. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **2021**, *17*, 47-57, doi:10.1038/s41584-020-00533-7.
4. Dolgin, E. Send in the senolytics. *Nat Biotechnol* **2020**, *38*, 1371-1377, doi:10.1038/s41587-020-00750-1.
5. Desando, G.; Cavallo, C.; Sartoni, F.; Martini, L.; Parrilli, A.; Veronesi, F.; Fini, M.; Giardino, R.; Facchini, A.; Grigolo, B. Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. *Arthritis Res Ther* **2013**, *15*, R22.
6. Manferdini, C.; Maumus, M.; Gabusi, E.; Piacentini, A.; Filardo, G.; Peyrafitte, J.A.; Jorgensen, C.; Bourin, P.; Fleury-Cappellesso, S.; Facchini, A.; et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells exert antiinflammatory effects on chondrocytes and synoviocytes from osteoarthritis patients through prostaglandin e2. *Arthritis Rheum* **2013**, *65*, 1271-1281.
7. Maumus, M.; Manferdini, C.; Toupet, K.; Peyrafitte, J.A.; Ferreira, R.; Facchini, A.; Gabusi, E.; Bourin, P.; Jorgensen, C.; Lisignoli, G.; et al. Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis. *Stem Cell Res* **2013**, *11*, 834-844.

8. Ter Huurne, M.; Schelbergen, R.; Blattes, R.; Blom, A.; de Munter, W.; Grevers, L.C.; Jeanson, J.; Noel, D.; Casteilla, L.; Jorgensen, C.; et al. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **2012**, *64*, 3604-3613.
9. Song, Y.; Zhang, J.; Xu, H.; Lin, Z.; Chang, H.; Liu, W.; Kong, L. Mesenchymal stem cells in knee osteoarthritis treatment: A systematic review and meta-analysis. *J Orthop Translat* **2020**, *24*, 121-130, doi:10.1016/j.jot.2020.03.015.
10. Cosenza, S.; Ruiz, M.; Toupet, K.; Jorgensen, C.; Noel, D. Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis. *Sci Rep* **2017**, *7*, 16214, doi:10.1038/s41598-017-15376-8.
11. Tofino-Vian, M.; Guillen, M.I.; Perez Del Caz, M.D.; Silvestre, A.; Alcaraz, M.J. Microvesicles from Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a New Protective Strategy in Osteoarthritic Chondrocytes. *Cell Physiol Biochem* **2018**, *47*, 11-25, doi:10.1159/000489739.
12. Zhang, S.; Chu, W.C.; Lai, R.C.; Lim, S.K.; Hui, J.H.; Toh, W.S. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration. *Osteoarthritis Cartilage* **2016**, *24*, 2135-2140.
13. Zhu, Y.; Wang, Y.; Zhao, B.; Niu, X.; Hu, B.; Li, Q.; Zhang, J.; Ding, J.; Chen, Y.; Wang, Y. Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther* **2017**, *8*, 64.
14. Oh, J.; Lee, Y.D.; Wagers, A.J. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nat Med* **2014**, *20*, 870-880, doi:10.1038/nm.3651.
15. Boulestreau, J.; Maumus, M.; Rozier, P.; Jorgensen, C.; Noel, D. Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles in Aging. *Front Cell Dev Biol* **2020**, *8*, 107, doi:10.3389/fcell.2020.00107.

16. Bony, C.; Cren, M.; Domergue, S.; Toupet, K.; Jorgensen, C.; Noel, D. Adipose Mesenchymal Stem Cells Isolated after Manual or Water-jet-Assisted Liposuction Display Similar Properties. *Front Immunol* **2016**, *6*, 655.
17. Rozier, P.; Maumus, M.; Maria, A.T.J.; Toupet, K.; Lai-Kee-Him, J.; Jorgensen, C.; Guilpain, P.; Noel, D. Mesenchymal stromal cells-derived extracellular vesicles alleviate systemic sclerosis via miR-29a-3p. *J Autoimmun* **2021**, *121*, 102660, doi:10.1016/j.jaut.2021.102660.
18. Thery, C.; Witwer, K.W.; Aikawa, E.; Alcaraz, M.J.; Anderson, J.D.; Andriantsitohaina, R.; Antoniou, A.; Arab, T.; Archer, F.; Atkin-Smith, G.K.; et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* **2018**, *7*, 1535750, doi:10.1080/20013078.2018.1535750.
19. Maumus, M.; Roussignol, G.; Toupet, K.; Penarier, G.; Bentz, I.; Teixeira, S.; Oustric, D.; Jung, M.; Lepage, O.; Steinberg, R.; et al. Utility of a Mouse Model of Osteoarthritis to Demonstrate Cartilage Protection by IFNgamma-Primed Equine Mesenchymal Stem Cells. *Front Immunol* **2016**, *7*, 392.
20. Ruiz, M.; Maumus, M.; Fonteneau, G.; Pers, Y.M.; Ferreira, R.; Dagneaux, L.; Delfour, C.; Houard, X.; Berenbaum, F.; Rannou, F.; et al. TGFbetai is involved in the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and is dysregulated in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **2019**, *27*, 493-503, doi:10.1016/j.joca.2018.11.005.
21. Malaise, O.; Tachikart, Y.; Constantinides, M.; Mumme, M.; Ferreira-Lopez, R.; Noack, S.; Krettek, C.; Noel, D.; Wang, J.; Jorgensen, C.; et al. Mesenchymal stem cell senescence alleviates their intrinsic and seno-suppressive paracrine properties contributing to osteoarthritis development. *Aging (Albany NY)* **2019**, *11*, 9128-9146, doi:10.18632/aging.102379.
22. Huang, R.; Qin, C.; Wang, J.; Hu, Y.; Zheng, G.; Qiu, G.; Ge, M.; Tao, H.; Shu, Q.; Xu, J. Differential effects of extracellular vesicles from aging and young mesenchymal stem cells in acute lung injury. *Aging (Albany NY)* **2019**, *11*, 7996-8014, doi:10.18632/aging.102314.

23. Fafian-Labora, J.A.; Morente-Lopez, M.; Arufe, M.C. Effect of aging on behaviour of mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* **2019**, *11*, 337-346, doi:10.4252/wjsc.v11.i6.337.
24. Guix, F.X.; Capitan, A.M.; Casadome-Perales, A.; Palomares-Perez, I.; Lopez Del Castillo, I.; Miguel, V.; Goedeke, L.; Martin, M.G.; Lamas, S.; Peinado, H.; et al. Increased exosome secretion in neurons aging in vitro by NPC1-mediated endosomal cholesterol buildup. *Life Sci Alliance* **2021**, *4*, doi:10.26508/lsa.202101055.
25. Riquelme, J.A.; Takov, K.; Santiago-Fernandez, C.; Rossello, X.; Lavandero, S.; Yellon, D.M.; Davidson, S.M. Increased production of functional small extracellular vesicles in senescent endothelial cells. *J Cell Mol Med* **2020**, *24*, 4871-4876, doi:10.1111/jcmm.15047.
26. Kadota, T.; Fujita, Y.; Yoshioka, Y.; Araya, J.; Kuwano, K.; Ochiya, T. Emerging role of extracellular vesicles as a senescence-associated secretory phenotype: Insights into the pathophysiology of lung diseases. *Mol Aspects Med* **2018**, *60*, 92-103, doi:10.1016/j.mam.2017.11.005.
27. Wiest, E.F.; Zubair, A.C. Challenges of manufacturing mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles in regenerative medicine. *Cytotherapy* **2020**, *22*, 606-612, doi:10.1016/j.jcyt.2020.04.040.
28. Maumus, M.; Rozier, P.; Boulestreau, J.; Jorgensen, C.; Noel, D. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Opportunities and Challenges for Clinical Translation. *Front Bioeng Biotechnol* **2020**, *8*, 997, doi:10.3389/fbioe.2020.00997.
29. Rong, Y.; Zhang, J.; Jiang, D.; Ji, C.; Liu, W.; Wang, J.; Ge, X.; Tang, P.; Yu, S.; Cui, W.; et al. Hypoxic pretreatment of small extracellular vesicles mediates cartilage repair in osteoarthritis by delivering miR-216a-5p. *Acta Biomater* **2021**, *122*, 325-342, doi:10.1016/j.actbio.2020.12.034.
30. Woo, C.H.; Kim, H.K.; Jung, G.Y.; Jung, Y.J.; Lee, K.S.; Yun, Y.E.; Han, J.; Lee, J.; Kim, W.S.; Choi, J.S.; et al. Small extracellular vesicles from human adipose-derived stem cells attenuate cartilage degeneration. *J Extracell Vesicles* **2020**, *9*, 1735249, doi:10.1080/20013078.2020.1735249.

31. Zhang, J.; Rong, Y.; Luo, C.; Cui, W. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes prevent osteoarthritis by regulating synovial macrophage polarization. *Aging (Albany NY)* **2020**, *12*, 25138-25152, doi:10.18632/aging.104110.
32. Ganguly, P.; El-Jawhari, J.J.; Giannoudis, P.V.; Burska, A.N.; Ponchel, F.; Jones, E.A. Age-related Changes in Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells: A Potential Impact on Osteoporosis and Osteoarthritis Development. *Cell Transplant* **2017**, *26*, 1520-1529, doi:10.1177/0963689717721201.
33. Xu, M.; Su, X.; Xiao, X.; Yu, H.; Li, X.; Keating, A.; Wang, S.; Zhao, R.C. Hydrogen Peroxide-Induced Senescence Reduces the Wound Healing-Promoting Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Partially via miR-146a. *Aging Dis* **2021**, *12*, 102-115, doi:10.14336/AD.2020.0624.
34. Fafian-Labora, J.; Lesende-Rodriguez, I.; Fernandez-Pernas, P.; Sangiao-Alvarellos, S.; Monserrat, L.; Arntz, O.J.; van de Loo, F.J.; Mateos, J.; Arufe, M.C. Effect of age on pro-inflammatory miRNAs contained in mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Sci Rep* **2017**, *7*, 43923, doi:10.1038/srep43923.
35. Davis, C.; Dukes, A.; Drewry, M.; Helwa, I.; Johnson, M.H.; Isales, C.M.; Hill, W.D.; Liu, Y.; Shi, X.; Fulzele, S.; et al. MicroRNA-183-5p Increases with Age in Bone-Derived Extracellular Vesicles, Suppresses Bone Marrow Stromal (Stem) Cell Proliferation, and Induces Stem Cell Senescence. *Tissue Eng Part A* **2017**, *23*, 1231-1240, doi:10.1089/ten.TEA.2016.0525.
36. Platas, J.; Guillen, M.I.; Perez Del Caz, M.D.; Gomar, F.; Castejon, M.A.; Mirabet, V.; Alcaraz, M.J. Paracrine effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells in inflammatory stress-induced senescence features of osteoarthritic chondrocytes. *Aging (Albany NY)* **2016**, *8*, 1703-1717.

Table 1: List of primers for PCR

Gene	Sequence forward	Sequence reverse
ACAN	TCGAGGACAGCGAGGCC	TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA
COL2A1ΔB	CAGACGCTGGTGCTGCT	TCCTGGTTGCCGGACAT
COL1A1	CCTGGATGCCATCAAAGTCT	CGCCATACTCGAACTGGAAT
COL3A1	CGCCCTCCTAATGGTCAAGG	AGGGCCTGAAGGACCAGCTT
MMP3	TTGCGCCAAAAGTGCCTGTCT	GTACCCACGGAACCTGTCCCTC
MMP13	TAAGGAGCATGGCGACTTCT	GTCTGGCGTTTTTGGATGTT
IL6	AGACAGCCACTCACCTCTTCAG	TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG
IL8	GAGAGTGATTGAGAGTGGACCAC	CACAACCCTCTGCACCCAGTTT
p14ARF	CCCTCGTGCTGATGCTACTG	ACCTGGTCTTCTAGG AAGCGG
p15INK4b	GACCGGGAATAACCTTCCAT	CACCAGGTCCAGTCAAGGAT
p16INK4a	GAAGGTCCCTCAGACATCCCC	CCCTGTAGGACCTTCGGTGAC
p21cdkn1a	AGGTGGACCTGGAGACTCTCAG	TCCTCTTGGAGAAGATCAGCCG
p27KIP1	ATAAGGAAGCGACCTGCAACCG	TTCTTGGGCGTCTGCTCCACAG
p57KIP2	GCGGCGATCAAGAAGCTGT	GCTTGGCGAAGAAATCGGAGA
RPS9	GATTACATCCTGGGCCTGAA	ATGAAGGACGGGATGTTCAC

Figure legends

Fig. 1: Etoposide-induced senescence in human ASCs. (A) Schematic protocol for etoposide-induced senescence in ASCs. (B) Cumulative number of ASCs in non-treated (NT) and etoposide (ETO)-treated ASCs (n=3). (C) Proliferation rate of NT and ETO ASCs at day 12 (n=3). (D) Percentage of BrdU incorporation in NT and ETO ASCs at day 12 (n=3). (E) Relative expression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in NT or ETO ASCs at day 12 (n=2-3). (F) Amounts of proteins secreted by NT and ETO ASCs quantified by ELISA (n=6). (G) Representative pictures of SA-β-Galactosidase (SA-β-Gal in blue, bars: 100 µm) staining, phalloidin/DAPI (actin stress fibers in red and nuclei in blue; bars: 100 µm) and γH2AX/DAPI (γH2AX foci in red and nuclei in blue; bars: 50µm) staining in NT and ETO ASCs. (H) Percentage of SA-β-Gal positive ASCs (upper panel) and SA-β-Gal activity quantified by fluorometry (lower panel) (n=4). (I) Quantification of Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF; upper panel) and cell surface (lower panel) stained with fluorescent Phalloidin (n=9-14). (J) Percentage of ASCs with γH2AX positive foci in the nucleus (upper panel) and quantification of the nucleus surface stained with DAPI. Data are shown as mean ± SEM (n=4-12). *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Fig. 2: Senescent ASCs up-regulate inflammatory markers in human OA chondrocytes. Primary human chondrocytes ($5x10^5$ cells) were pretreated with 10 ng/mL IL1β (IL1) or not (NT) for 48 h before addition of ASCs (10^5 cells) or their conditioned medium (CM) for 7 days. Expression of chondrocyte markers as expressed as fold change (n = 6-7). *p < 0.05 as compared to IL1β-treated OA chondrocytes or the group indicated by the bar.

Fig. 3: C**haracterization of extracellular vesicles isolated from human ASCs.** (A) Size distribution of EVs isolated from healthy ASCs (H) or ETO-induced senescent ASCs (S) by Nano Tracking Analysis. Median and modal sizes of EVs are shown in the middle and right panel, respectively (n=3). (B) EV numbers produced by 10^6 ASCs per day (left panel) (n=3) or EV equivalent in µg of proteins produced by 10^6

ASCs (right panel) (n=20-23). (C) Quantity of total proteins (left panel) and total RNA (right panel) produced per particle (n=3). (D) Expression profile of membrane markers on the surface of H-EVs (black line), S-EVs (Blue line) or isotypic control (grey histogram) by FACS. (E) Representative pictures of H-EVs and S-EVs by cryo-transmission electron microscopy (scale bar: 100 nm). *p < 0.05, ****p<0.0001

Fig. 4: Senescent EVs fail to decrease inflammatory mediators in OA chondrocytes. Primary human chondrocytes were pretreated with 10 ng/mL IL1β (IL1) or not (NT) for 48 h. Different amounts (Low: 100 ng; Mid: 500 ng; High: 2.5 µg) of EVs from healthy or senescent ASCs (H-EV or S-EV) were added for 7 days. Expression of chondrocyte markers as expressed as fold change (n = 6-7). *p < 0.05, compared to IL1β-treated OA chondrocytes.

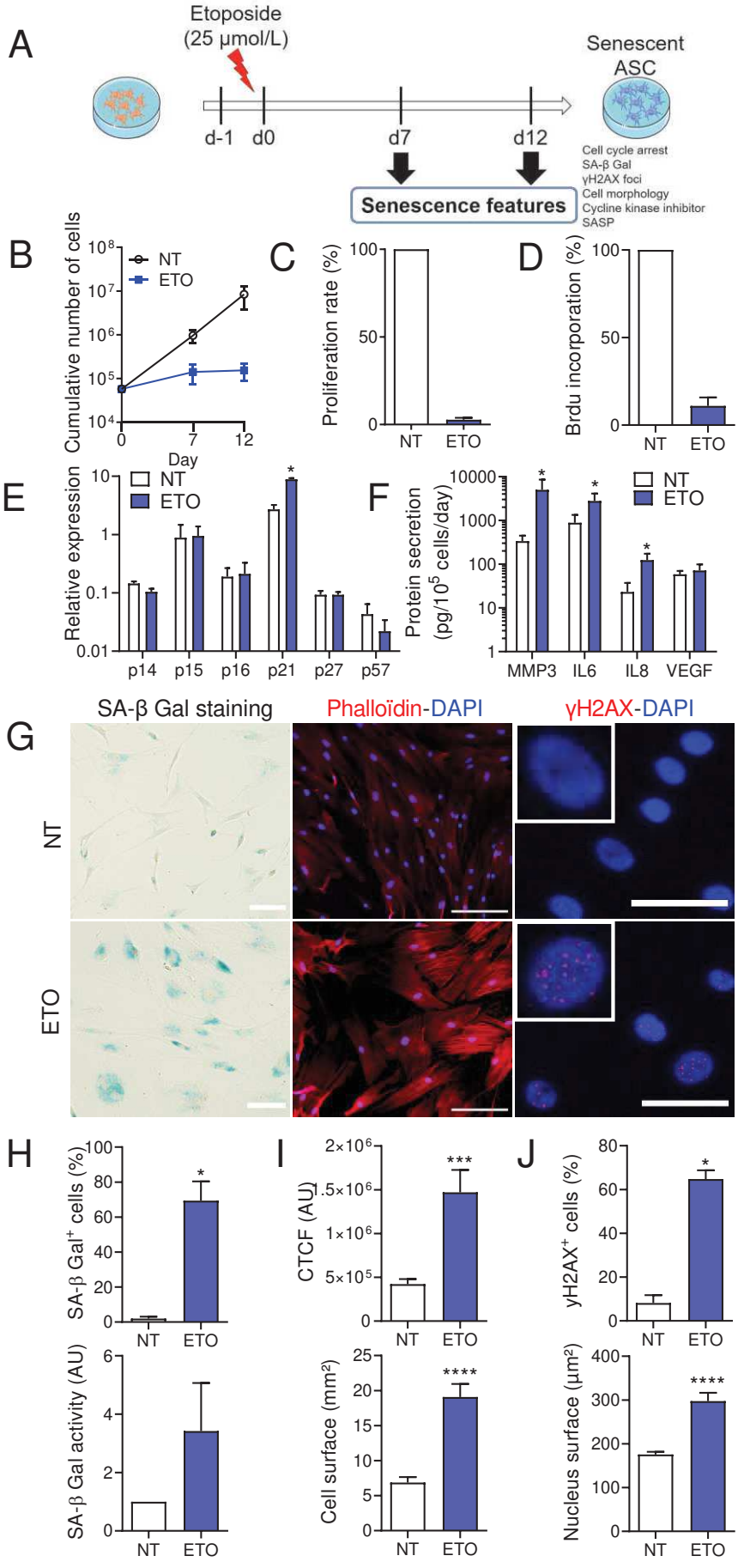
Fig. 5: Senescent EVs fail to inhibit cartilage degradation in the collagenase-induced OA model. (A) Representative histological sections of tibias from control mice (CT), collagenase-treated mice (CIOA) and CIOA mice that received 250 ng EVs from healthy or senescent ASCs (H-EV or S-EV). Safranin O-Fast green staining. (B) Average OA score from histological sections of the different groups of mice. (C) Representative 3D reconstructed images of articular cartilage after confocal laser scanning microscopy analysis. (D) Histomorphometric parameters (volume, thickness, surface/volume) of 3D images of articular cartilage as shown in (C). Data are shown as mean ± SEM (n =8-30) with *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Fig. 6: Senescent EVs partly fail to inhibit bone erosion in the collagenase-induced OA model. (A) Representative 3D reconstructed images of knee joints from control mice (CT), collagenase-treated mice (CIOA) and CIOA mice that received 250 ng EVs from healthy or senescent ASCs (H-EV or S-EV) after µCT analysis. (B) Histomorphometric parameters of calcifications (bone volume and surface) in knee joints of mice shown in (A). (C) Representative 3D reconstructed images of sub-chondral bone surface in tibias of the different groups of mice after µCT analysis. (D) Histomorphometric parameters

(volume, thickness, surface/volume) of sub-chondral bone in mice shown in (C). (Data are shown as mean ± SEM (n =4-15) *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Fig. S1: Characterization of etoposide-induced senescence in human ASCs after 7 days. (A) Proliferation rate of non-treated (NT) and etoposide (ETO)-treated ASCs (n=3). (B) Percentage of BrdU incorporation in NT and ETO ASCs (n=3). (C) Relative expression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in NT or ETO ASCs (n=6). (D) Representative pictures of SA-β-Galactosidase staining (SA-β-Gal in blue, bars: 100 µm) in NT and ETO ASCs and percentage of SA-β-Gal positive ASCs (right panel) (n=3). (E) Representative pictures of phalloidin/DAPI staining (actin stress fibers in red and nuclei in blue; bars: 100 µm) in NT and ETO ASCs. Quantification of Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF; left panel) and cell surface (right panel) stained with fluorescent Phalloidin (n=9-12). (F) Representative pictures of γH2AX/DAPI staining (γH2AX foci in red and nuclei in blue; bars: 50µm) in NT and ETO ASCs. Percentage of ASCs with γH2AX positive nuclei (left panel) and quantification of the nucleus surface stained with DAPI (right panel) (n=3-15). (G) Amounts of proteins secreted by NT and ETO ASCs quantified by ELISA (n=6). Data are shown as mean ± SEM. *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Figure 1


A
Etoposide
(25 µmol/L)
d-1
d0
d7
d12
Senescent
ASC
Cell cycle arrest
SA-β Gal
γH2AX foci
Cell morphology
Cycline kinase inhibitor
SASP
Senescence features
B
Cumulative number of cells
NT
ETO
Day
C
Proliferation rate (%)
D
Brdu incorporation (%)
E
Relative expression
p14
p15
p16
p21
p27
p57
F
Protein secretion
(pg/10^5 cells/day)
MMP3
IL6
IL8
VEGF
G
SA-β Gal staining
Phalloïdin-DAPI
γH2AX-DAPI
NT
ETO
H
SA-β Gal+ cells (%)
SA-β Gal activity (AU)
I
CTCF (AU)
Cell surface (mm²)
J
γH2AX+ cells (%)
Nucleus surface (µm²)

Supplemental Figure 1

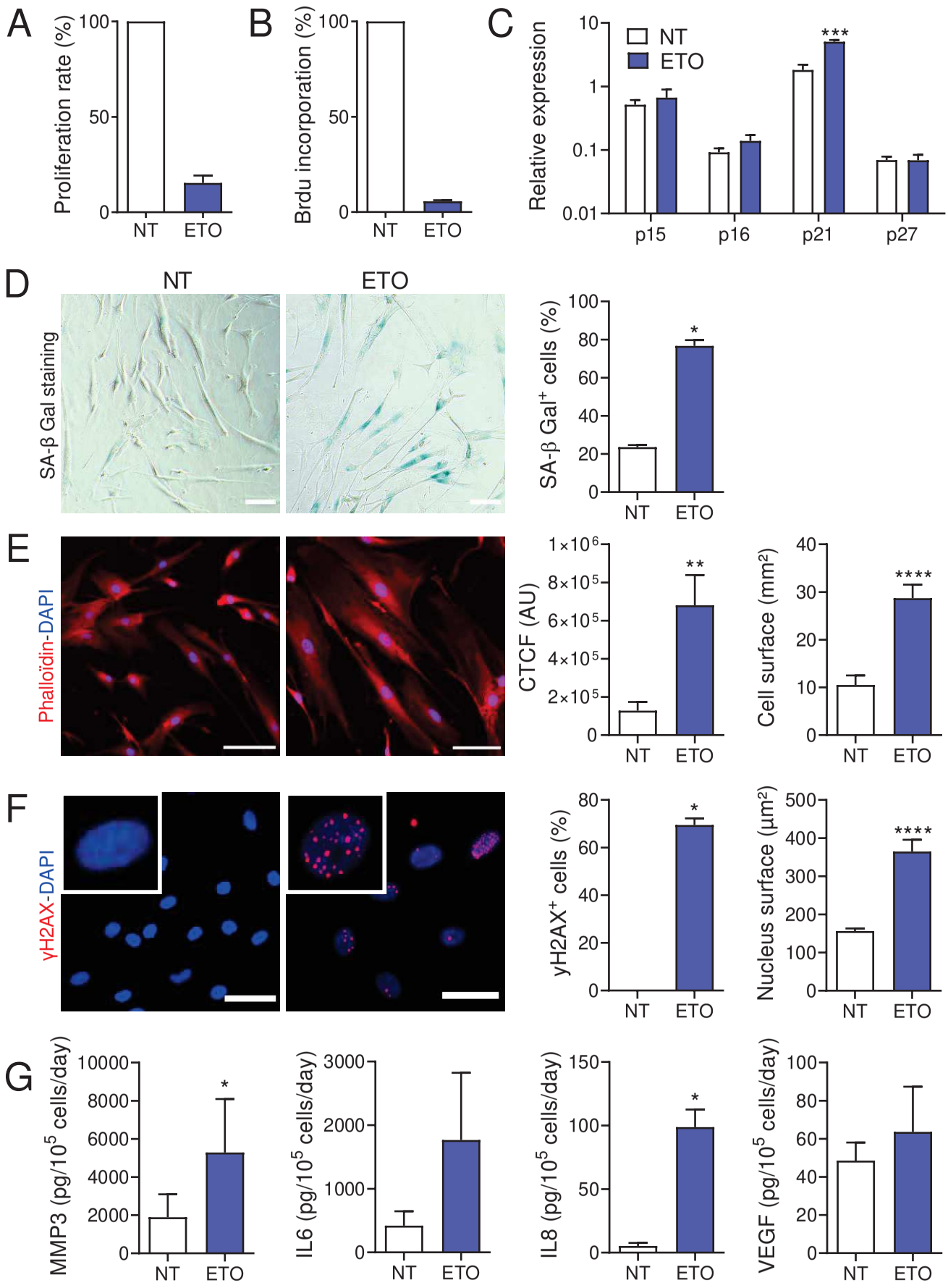


Figure 2

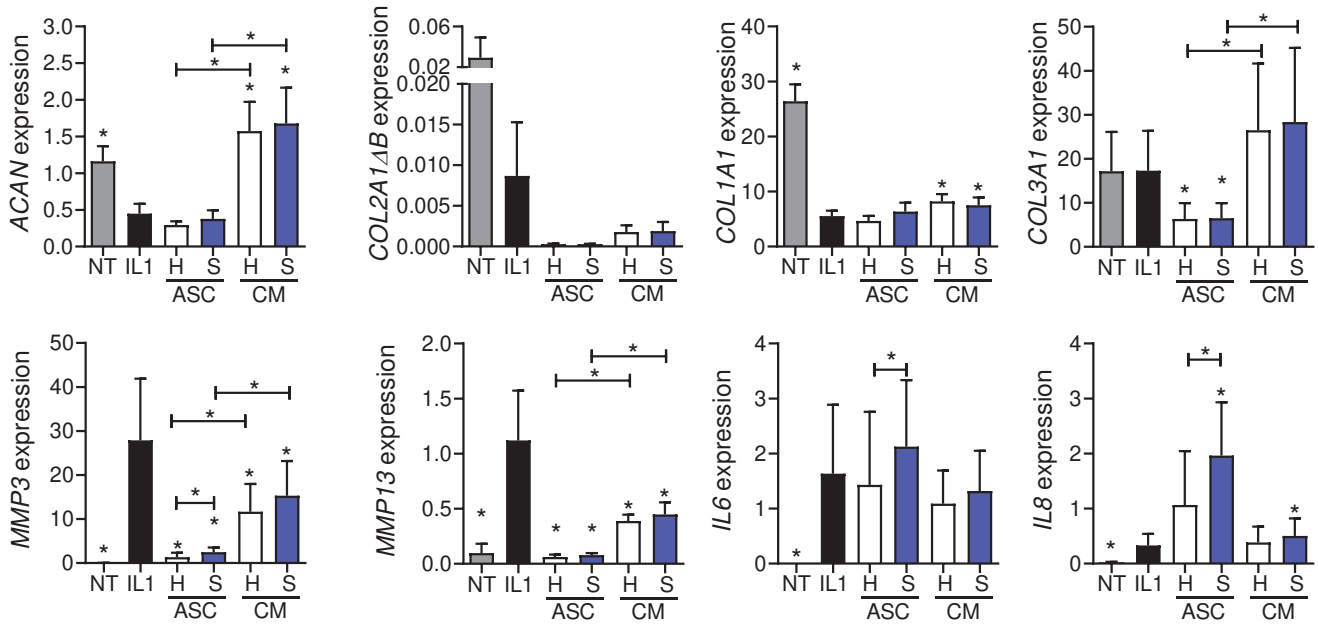

ACAN expression
COL2A1ΔB expression
COL1A1 expression
COL3A1 expression
MMP3 expression
MMP13 expression
IL6 expression
IL8 expression
NT IL1 H S H S
ASC CM

Figure 3

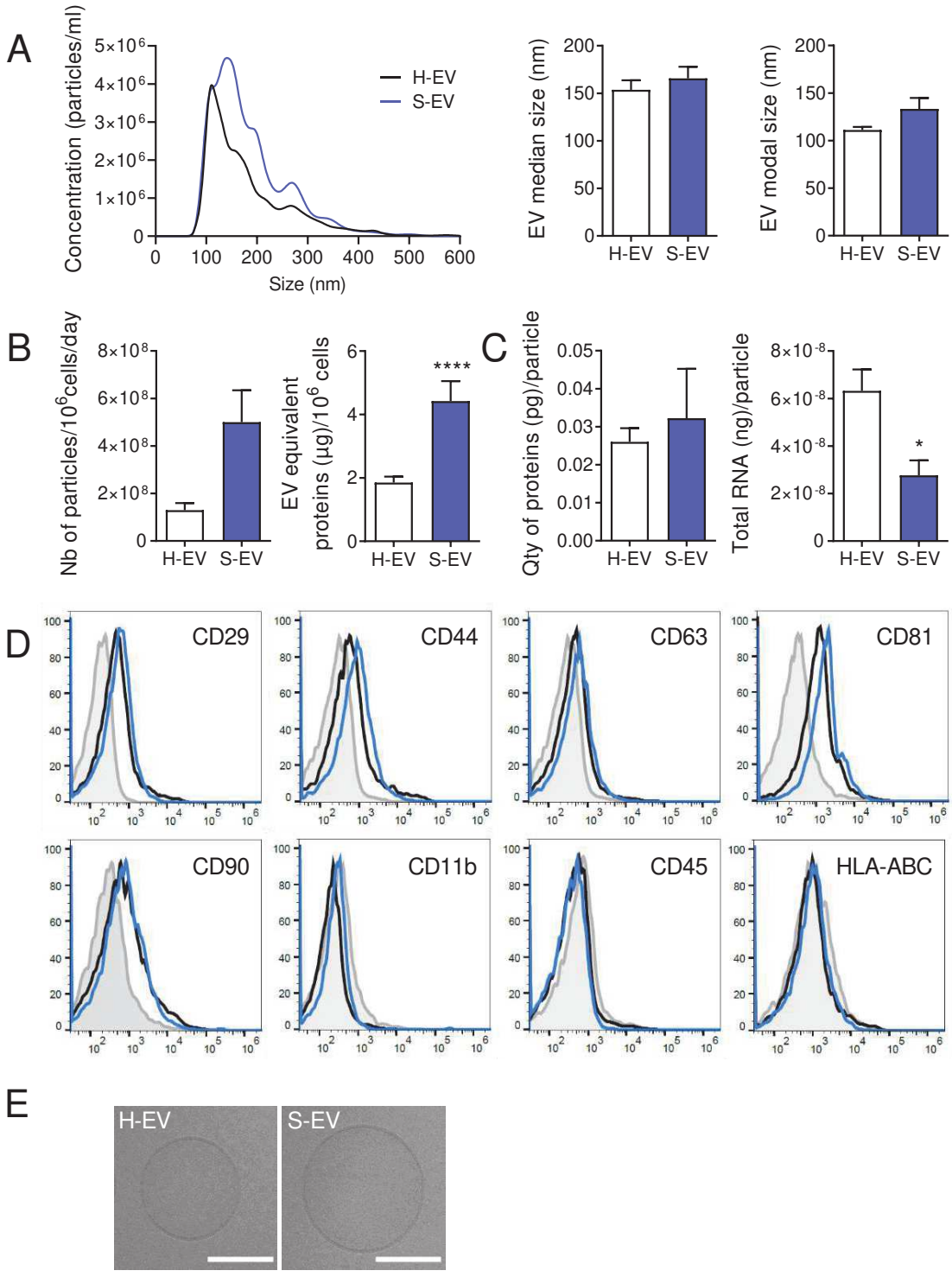

A
Concentration (particles/ml)
5×10^6
4×10^6
3×10^6
2×10^6
1×10^6
0
0 100 200 300 400 500 600
Size (nm)
H-EV
S-EV
EV median size (nm)
200
150
100
50
0
H-EV S-EV
EV modal size (nm)
200
150
100
50
0
H-EV S-EV
B
Nb of particles/10^6cells/day
8×10^8
6×10^8
4×10^8
2×10^8
0
H-EV S-EV
EV equivalent proteins (µg)/10^6 cells
6
4
2
0
****
H-EV S-EV
C
Qty of proteins (pg)/particle
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
H-EV S-EV
Total RNA (ng)/particle
8×10^-8
6×10^-8
4×10^-8
2×10^-8
0
*
H-EV S-EV
D
CD29
CD44
CD63
CD81
CD90
CD11b
CD45
HLA-ABC
E
H-EV
S-EV

Figure 4

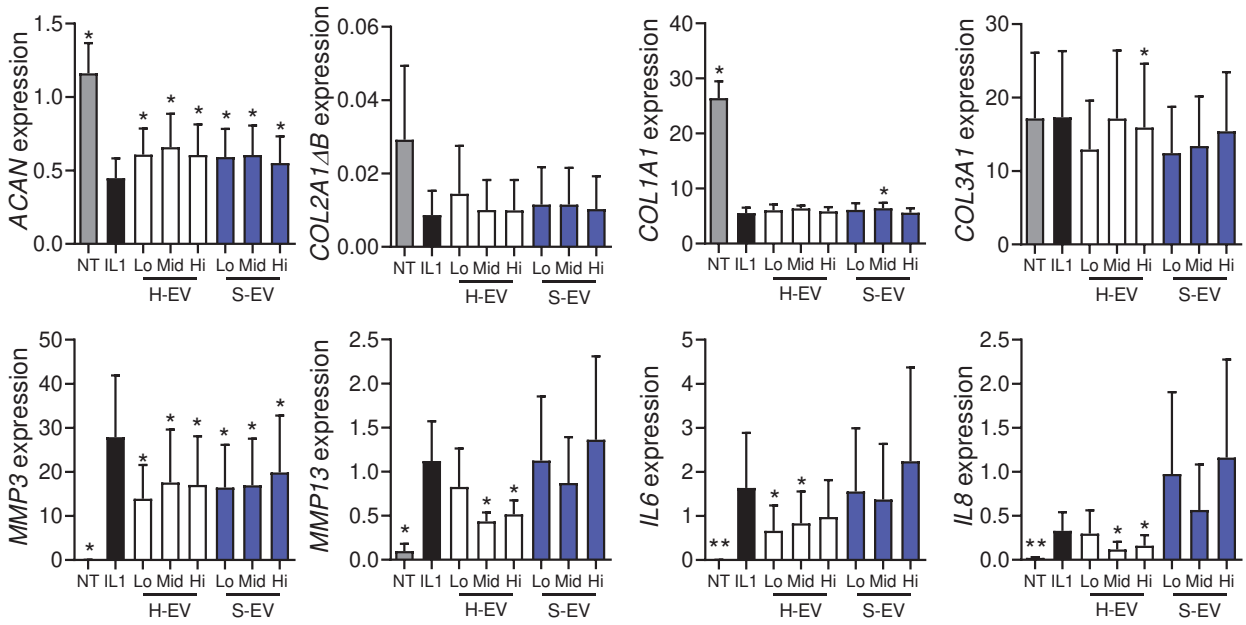

ACAN expression
COL2A1Δ B expression
COL1A1 expression
COL3A1 expression
MMP3 expression
MMP13 expression
IL6 expression
IL8 expression
NT IL1 Lo Mid Hi Lo Mid Hi
H-EV
S-EV

Figure 5

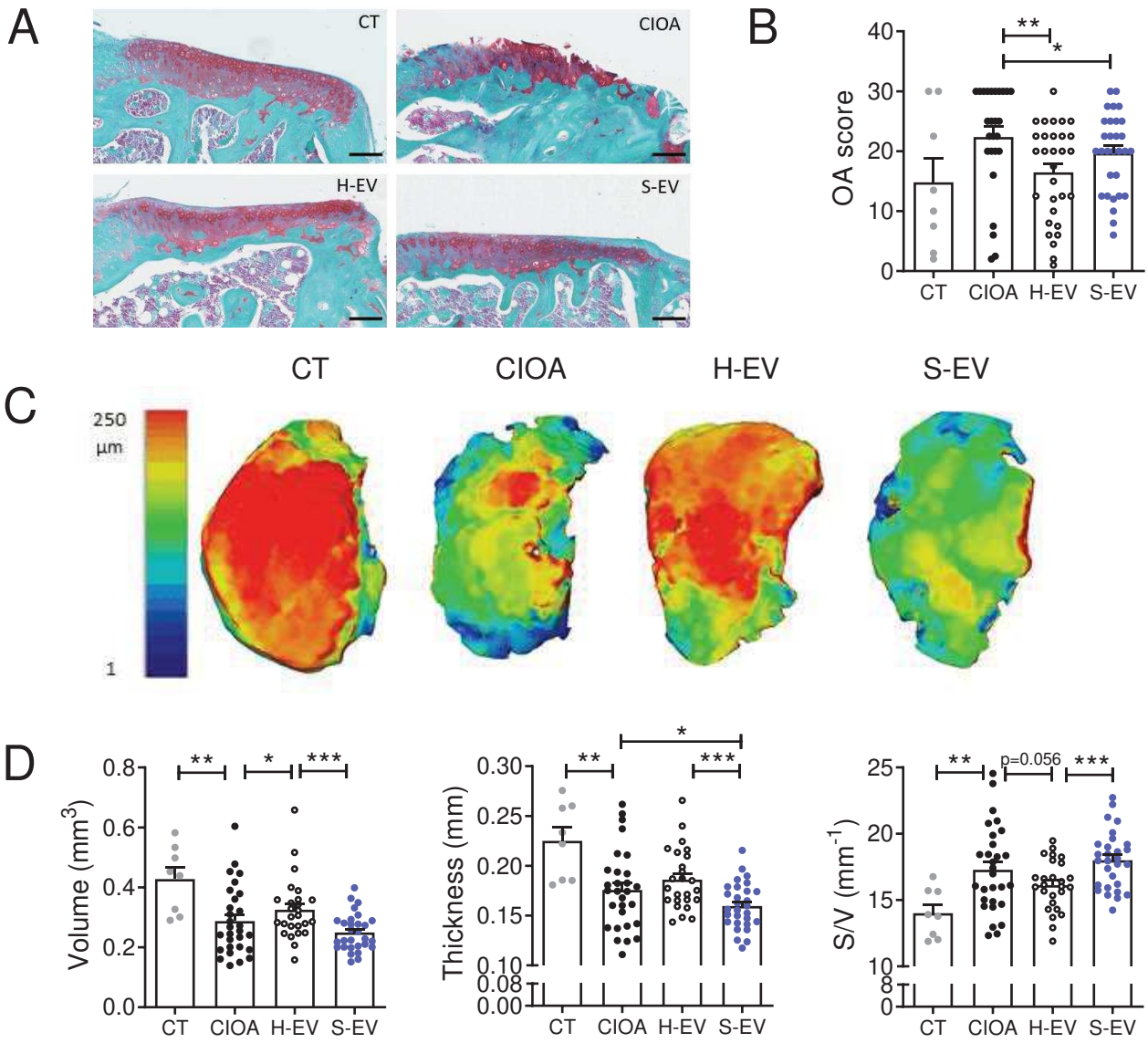
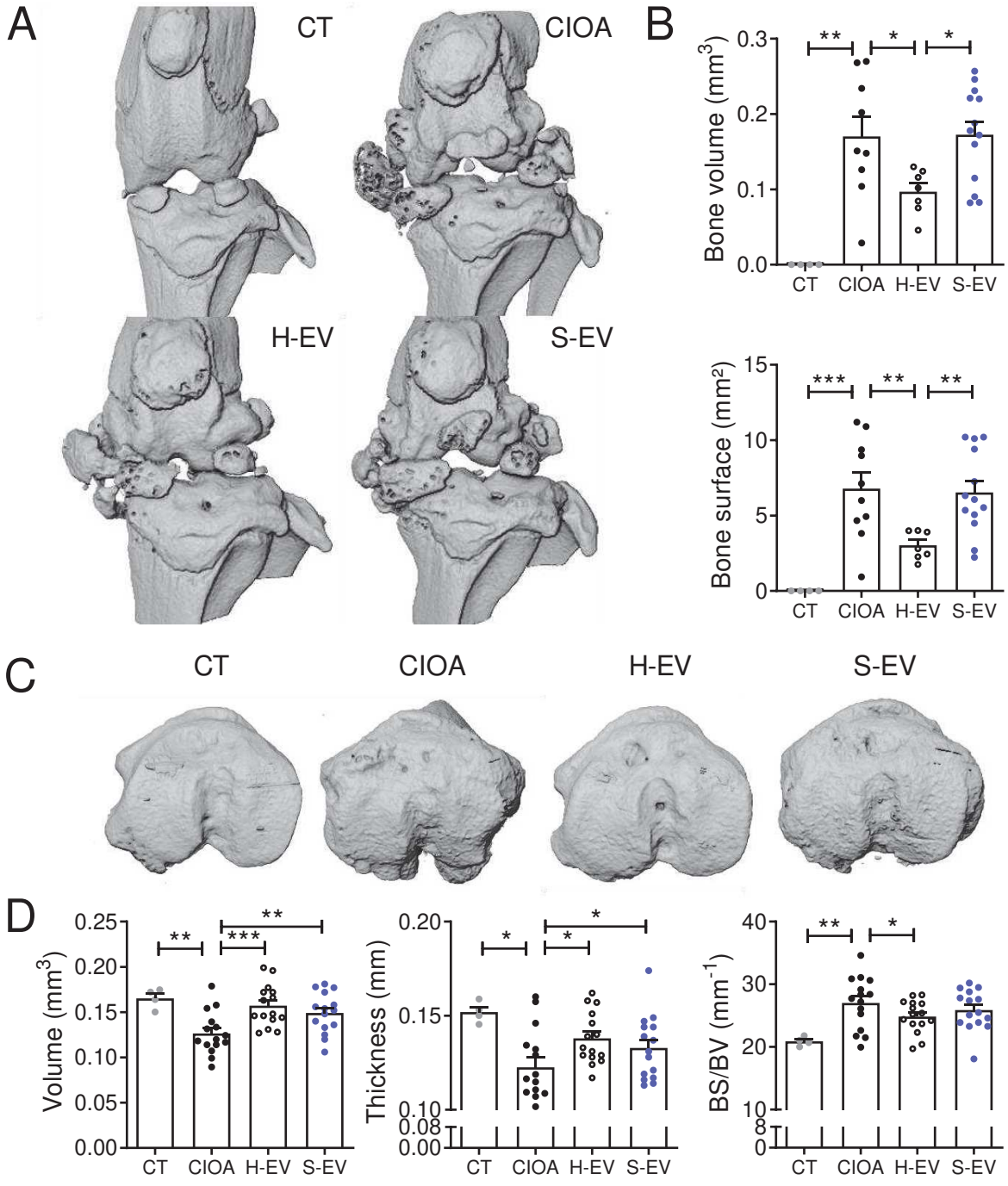

A
CT
CIOA
H-EV
S-EV
B
OA score
40
30
20
10
0
**
*
CT
CIOA
H-EV
S-EV
C
CT
CIOA
H-EV
S-EV
250
µm
1
D
Volume (mm3)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
*
***
CT
CIOA
H-EV
S-EV
Thickness (mm)
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.08
0.00
*
**
***
CT
CIOA
H-EV
S-EV
S/V (mm-1)
25
20
15
10
0
**
p=0.056
***
CT
CIOA
H-EV
S-EV

Figure 6


A
CT
ClOA
H-EV
S-EV
B
Bone volume (mm3)
0.3
0.2
0.1
0.0
**
*
*
CT
ClOA
H-EV
S-EV
Bone surface (mm2)
15
10
5
0
***
**
**
CT
ClOA
H-EV
S-EV
C
CT
ClOA
H-EV
S-EV
D
Volume (mm3)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
**
***
**
CT
ClOA
H-EV
S-EV
Thickness (mm)
0.20
0.15
0.10
0.08
0.00
*
*
*
CT
ClOA
H-EV
S-EV
BS/BV (mm-1)
40
30
20
10
8
0
**
*
CT
ClOA
H-EV
S-EV

2ème partie : Effet sénoprotecteur des vésicules extracellulaires des cellules stromales mésenchymateuses dans l'arthrose.

Le vieillissement est un processus complexe résultant de l'accumulation d'altérations moléculaires et cellulaires. La sénescence est l'une des caractéristiques du vieillissement et est impliquée dans la pathogenèse et la progression de l'arthrose (Coryell et al., 2021). La sénescence cellulaire est caractérisée par un arrêt permanent du cycle cellulaire, une résistance à l'apoptose et la production d'un SASP. Des marqueurs de sénescence ont été détectés dans le cartilage de patients arthrosiques, de plus la sénescence des chondrocytes contribuerait à l'augmentation de la prévalence de l'OA et à une efficacité réduite de la réparation du cartilage (Martin et Buckwalter, 2003). Parmi les stratégies thérapeutiques étudiées pour le traitement de l'arthrose se trouve l'utilisation des EV dérivées des CSM. Plusieurs études non-cliniques ont montré l'intérêt thérapeutique des EV dans l'arthrose expérimentale mais aucune n'a étudié l'impact de ces EV sur l'induction de la sénescence dans l'arthrose. Seule une publication a montré l'effet sénothérapeutique du sécrétome des CSM sur des chondrocytes humains stimulés à l'IL1β (Platas et al., 2016). De plus, la fonction thérapeutique et sénoprotectrice des EV issues de MSC sénescentes n'a à notre connaissance jamais été rapportée.

Dans cette seconde partie de mes travaux de thèse, nous avons évalué l'effet sénoprotecteur des EV dérivées d'ASCs. Nous avons choisi deux modèles de chondrocytes induits en sénescence : 1) une sénescence induite par des dommages à l'ADN et 2) une sénescence induite par l'inflammation en utilisant, respectivement, l'étoposide et l'IL-1β.

Différentes doses d'EV d'ASCs saines ont été ajoutées sur ces chondrocytes traités à l'IL-1β ou à l'étoposide, dans une approche préventive. Les cellules ont été maintenues en culture durant 7 jours avant d'évaluer les marqueurs de sénescence et d'autophagie. Dans les deux modèles de chondrocytes sénescents, les EV diminuent les marqueurs de sénescence tels que le nombre de cellules SA-β-Gal positives, la taille du noyau (augmentée dans les cellules sénescentes) et la production des facteurs du SASP. De plus, dans le modèle étoposide, l'accumulation nucléaire de foyers γH2AX, un marqueur des dommages à l'ADN, est fortement diminuée. En parallèle, nous avons montré que les EV ont tendance à améliorer les marqueurs d'autophagie, ce qui suggère que les EV pourraient impacter positivement le processus d'autophagie associée à la sénescence.

De manière intéressante, nous démontrons que les EV issues d'ASCs sénescentes ont le même effet sénoprotecteur que des EVs d'ASCs saines et que cet effet est en partie perdu lorsque les ASCs saines ou sénescents sont placées en coculture avec les chondrocytes induits en sénescence.

Ces travaux démontrent que les EV isolées d'ASCs saines ou sénescentes possèdent un effet sénoprotecteur in vitro sur deux modèles de chondrocytes induits en sénescence. Ces données suggèrent que les EV peuvent être une option pertinente pour de futures applications cliniques dans les maladies dégénératives telles que l'arthrose.

Article 5 (article original) : Effet sénoprotecteur des vésicules extracellulaires dérivées de cellules stromales mésenchymateuses sur des chondrocytes arthrosiques.

Senoprotective effect of extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells on osteoarthritic chondrocytes.

Jérémy Boulestreau, Marie Maumus, Christian Jorgensen and Danièle Noël.

En préparation

Senoprotective effect of extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells on osteoarthritic chondrocytes

Boulestreau Jérémy[1], Maumus Marie[1,2], Jorgensen Christian[1,3] and Noël Danièle[1,3,*]

[1]IRMB, University of Montpellier, INSERM, Montpellier, France; [2]Bauerfeind France, IRMB, Montpellier, France; [3]Clinical Immunology and Osteoarticular Disease Therapeutic Unit, Department of Rheumatology, CHU Montpellier, France.

* Corresponding author: Danièle Noël, PhD

Inserm U1183, IRMB, Hôpital Saint-Eloi,

80 avenue Augustin Fliche, 34295 Montpellier cedex 5, France

Tel: +33 4 67 33 04 73 – Fax: +33 4 67 33 01 13 -- E-mail: daniele.noel@inserm.fr

Abstract

Age is the most important risk factor in degenerative diseases as osteoarthritis (OA). It is associated with the accumulation of senescent cells in joint tissues that contribute to OA pathogenesis, in particular via the release of senescence-associated secretory phenotype (SASP) factors. Mesenchymal stromal cells (MSCs) and their derived extracellular vesicles (MSC-EVs) are promising treatments for OA, exerting pleiotropic functions by producing a variety of factors including anti-aging factors. However, the anti-aging properties of EVs from senescent MSCs are never being evaluated. To answer this question, we isolated EVs from adipose MSCs (ASCs) induced in senescence by etoposide to induce DNA damage. The anti-aging properties of EVs derived from these senescent ASCs were investigated using two models of inflammaging- and DNA damage-induced senescence in chondrocytes isolated from OA patients. Chondrocytes received an acute treatment of different doses of EVs and senescence features were investigated after 1 week. We showed that addition of EVs from healthy and senescent ASCs were equally effective in decreasing senescence parameters, including the number of SA-β-Gal-positive cells, accumulation of γH2AX foci in nuclei and the secretion of SASP factors. Of note, ASCs were less efficient to prevent senescence induction suggesting a deleterious effect of the senescent environment. In conclusion, this is the first demonstration that EVs from senescent ASCs maintain a senoprotective function in two models of senescent OA chondrocytes.

Keywords: Mesenchymal stromal cell, Extracellular vesicle, Senescence, Aging, Osteoarthritis, Regenerative medicine

Introduction

Osteoarthritis (OA) is the most common joint disorder characterized by cartilage degradation, bone alterations including osteophytes and subchondral sclerosis and, low-grade synovitis. Several risk factors have been identified namely obesity, repeated traumas, metabolic disorders, genetics but the most prevalent one is age. Aging is a complex process resulting from the accumulation of unpredictable molecular and cellular alterations. It is characterized by nine hallmarks: genomic instability, telomere attrition, epigenetic alteration, loss of proteostasis, metabolic dysfunction, mitochondrial dysfunction, stem cell exhaustion, cellular senescence and altered intercellular communications [1,2]. Cellular senescence has been associated to the pathogenesis and course of OA and is described by permanent cell cycle arrest with resistance to cell death through necrosis, apoptosis or autophagy [3]. Senescent cells release a secretome containing various bioactive molecules, called the senescence-associated secretory phenotype (SASP). The bioactive molecules can be released in extracellular vesicles (EVs), which participate to cell-to-cell communication, and can be involved in disease propagation [4]. In late OA, failure of repair responses due to senescence would result in a progressive degeneration of cartilage [5]. However, the exact mechanism connecting senescence and OA pathology remains unclear.

Among the therapeutic strategies being investigated for the treatment of OA is the use of mesenchymal stromal cells (MSCs). They have proved therapeutic efficacy in preclinical models of OA by damping inflammation and reducing cartilage and bone lesions and, by improving pain and functional parameters in the clinics [6,7]. More recently, EVs released by MSCs (MSC-EVs) were reported to be the main mediators of the beneficial effects of parental cells. They exerted a chondroprotective effect on OA chondrocytes in vitro and in murine models of OA or, promoted osteochondral regeneration [8-10]. The beneficial action of MSC-EVs was associated to a lower apoptosis rate and a regulation of genes involved in cartilage homeostasis, including anabolic, catabolic and inflammatory genes [8,11-13]. However, little is known on the role of EVs on the senescence of

chondrocytes, osteoblasts or other cells of the joint compartment that participate to OA initiation and progression.

The first demonstration that EVs from ASCs (ASC-EVs) can down-regulate senescence features in OA was done on primary human osteoblasts isolated from patients with advanced OA and stimulated with IL1β [14]. The authors reported decreased SA-β-Gal activity, γH2AX foci accumulation and production of inflammatory mediators in osteoblasts. In another study, the conditioned medium (CM) of ASCs was able to down-regulate senescence markers in primary OA chondrocytes subjected to inflammatory stress [15]. A down-regulation of SA-β-Gal activity was shown together with diminution of γH2AX foci number, actin stress fiber formation as well as p21 and p16 mRNA expression. Very recently, one study has investigated the effect of ASC-EVs on the accumulation of senescent cells in the cartilage of mice induced to develop OA [16]. In this model of anterior cruciate ligament transection (ACTL), the number of p16-positive cells was lower in the cartilage of mice treated with EVs. The lower number of p16-positive chondrocytes was correlated with the improvement of OA score and inversely correlated with the number of Ki67-positive proliferating cells. Besides these studies, it has been reported that umbilical cord-derived EVs, ASC-EVs or embryonic stem cells-derived EVs can alleviate cellular aging in senescence-induced bone marrow-derived MSCs [17-19]. However, no study has investigated the effect of isolated ASC-EVs on senescent OA chondrocytes.

The objective of the present study was to develop an in vitro model of human chondrocytes induced in senescence by DNA damage in order to investigate the senomorphic properties of ASC-EVs on the senescence features of primary chondrocytes.

Materials and methods

Cells and culture media

ASCs were obtained from 7 healthy donors (aged 48.14 ± 5 years) from surgical residues obtained after aesthetic liposuction. Isolation and characterization of ASCs have been reported previously [20]. ASCs

were expanded in α-MEM medium containing 10% fetal calf serum (FCS), 100 µg/mL penicillin/streptomycin, 2 mM glutamine, and 1 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF; CellGenix, Freiburg, Germany). ASCs were used between passages 1 to 3.

Chondrocytes were isolated from patients with OA undergoing total knee replacement surgery. Articular cartilage was harvested from the femoral condyles of patients (1 women and 6 men; mean age: 73.7 ± 2.1). Consent of donors was approved by the French Ministry of Research and Innovation (approval DC-2010-1185). For chondrocyte isolation, knee cartilage slices were incubated in 2.5 mg/mL pronase (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) for 1 h at 37 °C followed by 2 mg/mL collagenase type II (Sigma), overnight at 37 °C. Digested pieces were filtrated through a 70 µm cell strainer and the cell suspension was cultured in DMEM/PS/Glu/Fongizone/10% FCS (proliferative medium) at the density of 25,000 cell/cm² till the end of passage 1.

In Vitro Model of etoposide-Induced senescence chondrocytes

Chondrocytes were plated 10,000 cells/cm² in proliferative medium for 24H and incubated with presence or absence of etoposide (Sigma) (25µM) for 24 hours. Then cells were wash 3 times with PBS and maintained in proliferative media for 7 or 12 days in culture. Finally, chondrocytes were collected for RT-qPCR analysis, supernatants were stored at − 20 °C, cells were fixed for SA β-Gal staining, immunofluorescence assay for γH2AX and F-actin staining.

In Vitro Model of IL-1β-Induced senescence chondrocytes

Chondrocytes were plated 10,000 cells/cm² in proliferative medium for 24H and incubated with presence or absence of etoposide (Sigma) (25µM) for 24 hours. Then cells were wash 3 times with PBS and maintained in proliferative media for 7 days in culture. Finally, chondrocytes were collected for RT-qPCR analysis, supernatants were stored at -20 °C, cells were fixed for SA β-Gal staining, immunofluorescence assay for γH2AX.

Cell proliferation assay

Chondrocytes were plated at low density ($1.0x10^4$ cells/cm²) in a 6 well plate in proliferative medium. After 7 and 12 days, cells were trypsinized and cells number was quantifed by counting. Additionally, an ELISA BrdU incorporation (Roche) was performed as described by manufacturer.

Senescence-associated β-galactosidase assays

Cells were washed 3 times with PBS and fixed with 2,5% glutaraldehyde in PBS for 5 minutes at room temperature. After 3 washes in PBS, cells were incubated with staining solution at room temperature for 4 hours. Cells were examined and photographed under a microscope (EVOS M5000, Invitrogen). Cells were quantified with the Image J software using the cell counter complement.

SA-β-Gal assay was performed using the cellular senescence assay kit, fluorometric format (Cell Biolabs) following manufacturer's instructions. Fluorescence was measured in a VarioskanFlash microplate reader (Thermoscientific).

Immunofluorescence assay for γH2AX

Cells were washed 3 times with PBS and fixed with 4% formaldehyde in PBS for 15 minutes at room temperature and blocked with 5% normal goat serum and 0.3% Triton X-100 in PBS for 1 hour at room temperature. After 3 washes in PBS, ASC were incubated with Phospho-histone H2AX (Ser139) antibody (Cell Signalling Technology Inc., Beverly, MA, USA) overnight at 4°C. Finally, cells were incubated with Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) and DAPI. Cells were examined and photographed under a microscope (EVOS M5000, Invitrogen). γH2AX foci and nucleus area were quantified with the Image J software using the counter complement.

For F-actin staining, cells were washed with PBS and fixed with 3,7% formaldehyde in PBS. Cells were permeabilized with 0.1% TRITON X-100 in PBS and stained with a 50 µg/ml fluorescent phalloidin

conjugated with Tetramethyl-rhodamine B isothiocyanate (TRITC) solution in PBS for 40 minutes at room temperature. Cells were stained with DAPI and washed 3 times in PBS. Cells were examined and photographed under a microscope (EVOS M5000, Invitrogen). Using the Image J software, cells surface and the corrected total cell fluorescence (CTCF) were quantified. CTCF = Integrated Density – (Area of selected cell x Mean fluorescence of background readings).

RNA Extraction and RT-qPCR

The total RNA was extracted using 350 µL RLT buffer from the RNeasy Mini Kit according to the supplier's recommendations (Qiagen, Les Ulis, France). The reverse transcription of 500 ng RNA was obtained by M-MLV reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific). Real-time PCR was done on 10 ng cDNA using SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics, Meylan, France) and specific primers (Table 1). Values were normalized to the Ribosomal Protein S9 (RPS9) housekeeping gene and expressed as a relative expression or fold change using the respective formulae $2^{-\Delta CT}$ or $2^{-\Delta\Delta CT}$.

ELISA assays

Supernatants from cultures were used to quantify HGF, VEGF, MMP-3, MMP13, IL-6, IL8 by specific Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA; R&D Systems).

Production and Isolation of EVs

ASCs were seeded at 2.5×10^3 cells/cm^2 and cultured for 4 days. The EV-free medium was obtained by recovering the αMEM medium containing 20% FCS after overnight ultracentrifugation at 100,000× g at 4 °C. This medium was then diluted to get the production medium containing 3% EV-free FCS. After a wash with phosphate buffer saline (PBS), ASCs were further cultured in the production medium. After 72 h, cells were eliminated from the conditioned supernatant by centrifugation at 300× g, 4 °C for 10 min, whereas debris and apoptotic bodies were discarded by centrifugation at 2500× g, 4 °C for 25 min.

Total EVs were then pelleted by two ultracentrifugation steps at 100,000× g, 4 °C for 2 h. EVs were characterized by their size and concentration (by Nanoparticles Tracking Analysis), their structure (by cryo-TEM), and their protein content (by flow cytometery). EVs were used freshly prepared.

Co-culture experiments

Chondrocytes were seeded at high density ($5.0x10^4$ cells/cm²) in proliferative media for 24H. These plating conditions correspond to confluent cultures in each compartment. Then cells were treated with or without etoposide (25µM) for 24H (d-1) or with or without IL-1β (10ng/mL) for 48H (d-2). Then cells were wash 3 times with PBS and cultured in presence or not of different doses of extracellular vesicles (d0) and maintained for 7 days in 3 mL of minimal medium (DMEM supplemented with PS, proline (0.35 mmol/L), ascorbic acid (0.17 mmol/L) and sodium pyruvate (1 mmol/L). Chondrocytes were collected for RT-qPCR analysis, supernatants were stored at − 20 °C, cells were fixed for SA β-Gal staining or immunofluorescence assay for γH2AX.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad 9 Prism Software. Data distribution was assessed using the Shapiro–Wilk normality test. A one-sample t test was done when the values displayed a normal distribution to compare one group to the control normalized to 1 or 100, either wise a Wilcoxon signed-rank test was used. If controls were not normalized, the statistical analyses between two groups were compared using the Student's t-test or the Mann–Whitney test when values were unpaired, parametric or non-parametric, respectively. Paired t test or Wilcoxon matched-pairs signed rank test were used to compare two paired groups, parametric or non-parametric, respectively. Data are presented as mean ± SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Results

Characterization of etoposide-induced senescent chondrocytes

With the aim of generating a model of DNA damage-induced senescence model, we incubated primary human chondrocytes isolated from OA donors with ETO for 24 h and cultured them for 7 or 12 days (Fig. 1A). As soon as day 7, ETO-treated chondrocytes stopped to proliferate, as indicated by low levels of BrdU incorporation and low proliferation rate compared with non-treated (NT) chondrocytes (Fig. 1B-C). Concomitantly, the expression levels of three main Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors (CDKI), p15INK4b, p16INK4a and p21cdkn1a were significantly increased (Fig. 1-D). SA-β-Gal staining revealed an increase in the number of SA-β-Gal-positive cells in ETO-treated chondrocytes and in SA-β-Gal activity (Fig. 1E). The presence of stress fibers was observed using Phalloidin staining, which also revealed the increased cell surface in ETO-treated chondrocytes together with the related increased fluorescence (Fig. 1F). ETO treatment induced DNA damage foci indicated by the appearance of chondrocytes with γH2AX-positive nuclei and the increase of nucleus surface (Fig. 1G). Finally, we evaluated the secretory profile of ETO-treated chondrocytes for several cytokines, metalloproteinases and growth factors and did not observe any increase in the SASP compared to NT chondrocytes (Fig. 1H and data not shown). Similar senescence features was also observed at day 12 confirming that we generated a model of DNA damage-induced senescence in human OA chondrocytes (Fig. S1).

Senoprotective effect of ASC-EVs on etoposide-induced chondrocytes

We then aimed at evaluating the effect of ASC-EVs on the prevention of senescence in OA chondrocytes. EVs were produced from healthy ASCs, isolated and characterized as described elsewhere (submitted manuscript). ETO-treated chondrocytes received an acute treatment with EVs at different doses, one day after treatment (Fig. 2A). At day 7, senescence induction in ETO-treated chondrocytes was revealed by SA-β-Gal staining (Fig. 2B). In presence of EVs, the number of SA-β-Gal-positive chondrocytes was significantly lower, whatever the dose of EVs. In addition, the number of

γH2AX-positive foci in nuclei of ETO-treated chondrocytes was lower when incubated with different doses of EVs (Fig. 2C). A dose effect of EVs was observed and the highest dose was the most efficient. In accordance with morphologic changes occurring during senescence, we observed enlarged nuclei in ETO-treated chondrocytes, which were smaller when EVs were added to cultures. We also found that addition of EVs on ETO-treated chondrocytes significantly decreased the production of SASP factors, including IL6, MMP3 and MMP13 and tended to decrease IL8 (Fig. 2D). By contrast, addition of EVs did not impact the expression of CDKI (Fig. 2E). Finally, we investigated the impact of EVs on autophagy markers, which are deregulated during senescence and OA. We observed a dose-related tendency of EVs to upregulate the positive regulators of autophagy FOXO1 and FOXO3 in ETO-treated chondrocytes (Fig. 2F). These results indicate that ASC-EVs can prevent the up-regulation of major markers of senescence in OA chondrocytes submitted to DNA damage-related stress.

IL-1β induced senescence features in chondrocytes

We wondered whether the beneficial effect of ASC-EVs on the senescence induction of OA chondrocytes was specific for DNA damage-induced senescence. A second model of inflammation-induced senescence in chondrocytes was therefore evaluated using IL1β as inducer. Although a number of primary human OA chondrocytes already stained positive for SA-β-Gal in control conditions, treatment with IL1β for 2 days significantly increased the number of SA-β-Gal-positive chondrocytes (Fig. 3A). As expected, IL1β treatment did not induce DNA damages as noticed by similar low number of nuclei with γH2AX-positive foci compared to NT cells (Fig. 3C). However, the nucleus surface, which is indicative of morphological changes, was increased in IL1β-treated chondrocytes. The expression levels of CDKIs were unchanged in IL1β-treated chondrocytes, except for p15INK4b, which was significantly up-regulated (Fig. 3D). Importantly, we found a huge increase of SASP factors, namely inflammatory (IL6, IL8) and catabolic (MMP3, MMP13) factors as well as the growth factor VEGF in IL1β-treated chondrocytes (Fig. 3E). Therefore by comparison with ETO-induced senescent

chondrocytes, IL1β-induced senescent chondrocytes are characterized by a lack of DNA damage and an inflammatory SASP.

Senoprotective effect of ASC-EVs on IL-1β induced chondrocytes

Using the IL1β-induced senescence model, chondrocytes were incubated with different doses of EVs two days after induction (Fig. 4A). At day 7, we did not investigate γH2AX staining since DNA damage was weakly induced in this model. However, the percentage of SA-β-Gal-positive chondrocytes was lower when EVs have been added, with the highest dose reaching significance (Fig. 4B). The secretion of the SASP factors IL6, IL8, MMP3, MMP13 and VEGF were all significantly lower when IL1β-treated chondrocytes have been incubated with EVs (Fig. 4C). The expression of CDKIs was not changed upon addition of EVs (Fig. 4D). However, although FOXO1 was not regulated in IL1β-treated chondrocytes upon EV addition, the expression of FOXO3 was higher, at least significantly with the middle dose of EVs (Fig. 4E). The senoprotective effect of ASC-EVs was therefore evidenced in this second model of inflammation-driven senescence in chondrocytes.

EVs from senescent ASCs maintained their senoprotective effect on chondrocytes

The next question was to determine whether EVs derived from senescent ASCs maintain their senoprotective effect and compare it to that of senescent ASCs. In the model of ETO-induced senescent chondrocytes, the number of SA-β-Gal-positive chondrocytes was lower when they were incubated with healthy or senescent ASCs and with their EVs (Fig. 5A-B). Addition of healthy EVs was even more efficient than healthy ASCs. The number of chondrocytes with γH2AX-positive nuclei was lower in all groups of treatment compared to the control group, even though the nucleus surface was not significantly lower in the group of senescent ASCs (Fig. 5C-D). Expression of p15INK4b and p21cdkn1a was increased in ETO-treated chondrocytes and only the addition of healthy ASCs was able to normalize the expression of p15INK4b (Fig. 5E). We also noticed that healthy ASCs up-regulated the expression of p16INK4A compared to healthy EVs while senescent ASCs up-regulated p21cdkn1a

compared to healthy ASCs or senescent EVs. Of note, addition of both healthy and senescent EVs decreased the secretion of IL6, IL8, MMP3, MMP13 while the addition of healthy and senescent ASCs highly up-regulated the secretion of IL6, IL8 and MMP3 (Fig. 5F). Interestingly, the secretion of all markers was significantly increased by the presence of senescent ASCs compared to healthy ASCs and senescent EVs.

In the inflammation-mediated senescence model, the addition of EVs from healthy and senescent ASCs was able to prevent the increase of SA-β-Gal-positive chondrocytes, contrary to their parental cells (Fig. 6A). The expression of CDKIs was increased in chondrocytes cultured with senescent ASCs or EVs but not in chondrocytes cultured with healthy ASCs or EVs (Fig. 6B). Finally, the secretion of the SASP factors were all decreased in chondrocytes cultured with healthy or senescent EVs (Fig. 6C). However, addition of healthy or senescent ASCs did not reduce the production of IL6, IL8, HGF and increased VEGF. Altogether, these results indicated that EVs were more effective that their parental ASCs to decrease SASP factors in ETO- and IL1β-induced chondrocytes and the number of SA-β-Gal-positive chondrocytes in IL1β-induced chondrocytes. Senescent ASCs increased p21 expression in ETO-induced chondrocytes and all CDKIs in IL1β-induced chondrocytes and the secretion of SASP factor in the two models.

Discussion

We demonstrated that EVs from senescent or healthy ASCs are equally senoprotective in the two models of inflammation- and DNA damage-induced senescence in OA chondrocytes. Furthermore, EVs are more efficient than ASCs to minor the number of SA-β-Gal-positive chondrocytes and the secretion of the SASP.

A number of studies have reported the interest of stem cells-derived EVs to exert anti-aging effect primarily via the production of anti-oxidative stress and anti-inflammatory factors (for review, see [21]). Indeed, MSC-EVs were shown to inhibit the production of reactive oxygen species (ROS), protect

fibroblasts against cell cycle arrest, decrease cell senescence and enhance the expression of anti-oxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase 1, glutathione peroxidase 1) in models of dermal fibroblast photoaging induced by UVB radiation [22,23]. In inflammaging diseases, inhibition of inflammation is a critical mechanism of anti-aging effect of MSC-EVs. The inhibition of NF-κB/TNFα signaling by the lncRNA MALAT1 expressed by MSC-EVs was found to prevent aging in cardiomyocytes [24]. Promotion of macrophage polarization towards the M2 phenotype was also shown to prevent cardiac damage via S1P/SK1 signaling [25]. Donor age of MSCs used for EV production is another essential parameter to prevent cell senescence. Several studies have reported that MSC-EVs from young donors can rejuvenate aging cells [19,26,27]. However, few studies have described a direct senoprotective effect of MSC-EVs in OA (for review, see [4]). MSC-EVs were shown to prevent the induction of senescence in OA osteoblasts but a single report has provided evidence that senescence can be prevented in IL1β-treated OA chondrocytes using the conditioned medium from MSCs [28]. To our knowledge, our study is the first to demonstrate that EVs isolated from ASCs can exert a senoprotective function by preventing senescence induction in two models of OA chondrocytes and improving several senescence-associated features. The major finding of our study was to establish that EVs from healthy or senescent ASCs exert equivalent senoprotective functions on OA chondrocytes indicating that senescence induction in ASCs does not dramatically impact the anti-aging factors in EV cargoes.

We also found that healthy or senescent ASCs are less efficient than the EVs they released to protect OA chondrocytes from senescence induction. This is likely due to the crosstalk between chondrocytes and ASCs in the cocultures that activates the ASC compartment. In presence of senescent OA chondrocytes, ASCs were subjected to an inflammatory and catabolic SASP in the IL1β-induced inflammaging model and probably to an oxidative stress-induced SASP in the ETO-induced DNA damage model. The release of deleterious SASP factors could therefore explained the reduced capacity of ASCs to exert a protective function. When cocultured with ETO-treated chondrocytes, both healthy and senescent ASCs up-regulated the production of inflammatory factors. Moreover, senescent ASCs

were less protective than healthy ASCs. They highly up-regulated the secretion of the SASP and the expression of CDKIs in IL1β- and ETO-treated chondrocytes. Similar findings have already been reported. It has been shown that a senescent environment can induce senescence of MSCs and impact their functions [29,30]. In particular, SASP factors in EVs from aged patients can have deleterious effect on MSC viability and induce senescence [31,32].

In conclusion, we provided evidence that MSC-EVs exert a senoprotective effect on OA chondrocytes using two models of induced senescence. This effect is not lost when using EVs from senescent ASCs indicating that senescence induction could not impact the anti-aging factors that are released within EVs. By contract, ASCs that are submitted to a senescent environment partly lose their anti-aging effect indicating that MSC-EVs may be a relevant option for future clinical applications in degenerative diseases.

Author statement

Jérémy Boulestreau: Experimental work, data formal analysis, manuscript writing; Marie Maumus: Experimental work, data formal analysis; Christian Jorgensen: Conception and design; Danièle Noel: Conception and design, data formal analysis, manuscript writing.

Data availability statement

The authors declare that all data have been provided within the manuscript.

Declaration of competing of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We acknowledge support from the Inserm Institute, the University of Montpellier and University Hospital of Montpellier. We also acknowledge the Agence Nationale pour la Recherche for support of the national infrastructure: "ECELLFRANCE: Development of a national adult mesenchymal stem cell

based therapy platform" (ANR-11-INSB-005). Study was also supported by a research grant from FOREUM Foundation for Research in Rheumatology.

References

1. Lidzbarsky, G.; Gutman, D.; Shekhidem, H.A.; Sharvit, L.; Atzmon, G. Genomic Instabilities, Cellular Senescence, and Aging: In Vitro, In Vivo and Aging-Like Human Syndromes. *Front Med (Lausanne)* **2018**, *5*, 104, doi:10.3389/fmed.2018.00104.
2. Lopez-Otin, C.; Blasco, M.A.; Partridge, L.; Serrano, M.; Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* **2013**, *153*, 1194-1217, doi:10.1016/j.cell.2013.05.039.
3. Coryell, P.R.; Diekman, B.O.; Loeser, R.F. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **2021**, *17*, 47-57, doi:10.1038/s41584-020-00533-7.
4. Boulestreau, J.; Maumus, M.; Jorgensen, C.; Noel, D. Extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells: Therapeutic perspectives for targeting senescence in osteoarthritis. *Adv Drug Deliv Rev* **2021**, *175*, 113836, doi:10.1016/j.addr.2021.113836.
5. Martin, J.A.; Buckwalter, J.A. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am* **2003**, *85-A Suppl 2*, 106-110.
6. Ter Huurne, M.; Schelbergen, R.; Blattes, R.; Blom, A.; de Munter, W.; Grevers, L.C.; Jeanson, J.; Noel, D.; Casteilla, L.; Jorgensen, C.; et al. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **2012**, *64*, 3604-3613.
7. Wei, Z.J.; Wang, Q.Q.; Cui, Z.G.; Inadera, H.; Jiang, X.; Wu, C.A. Which is the most effective one in knee osteoarthritis treatment from mesenchymal stem cells obtained from different sources?-A systematic review with conventional and network meta-analyses of randomized controlled trials. *Ann Transl Med* **2021**, *9*, 452, doi:10.21037/atm-20-5116.
8. Cosenza, S.; Ruiz, M.; Toupet, K.; Jorgensen, C.; Noel, D. Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis. *Sci Rep* **2017**, *7*, 16214, doi:10.1038/s41598-017-15376-8.

9. Tofino-Vian, M.; Guillen, M.I.; Perez Del Caz, M.D.; Silvestre, A.; Alcaraz, M.J. Microvesicles from Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a New Protective Strategy in Osteoarthritic Chondrocytes. *Cell Physiol Biochem* **2018**, *47*, 11-25, doi:10.1159/000489739.
10. Zhang, S.; Chu, W.C.; Lai, R.C.; Lim, S.K.; Hui, J.H.; Toh, W.S. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration. *Osteoarthritis Cartilage* **2016**, *24*, 2135-2140.
11. Cavallo, C.; Merli, G.; Borzi, R.M.; Zini, N.; D'Adamo, S.; Guescini, M.; Grigolo, B.; Di Martino, A.; Santi, S.; Filardo, G. Small Extracellular Vesicles from adipose derived stromal cells significantly attenuate in vitro the NF-kappaB dependent inflammatory/catabolic environment of osteoarthritis. *Sci Rep* **2021**, *11*, 1053, doi:10.1038/s41598-020-80032-7.
12. Rong, Y.; Zhang, J.; Jiang, D.; Ji, C.; Liu, W.; Wang, J.; Ge, X.; Tang, P.; Yu, S.; Cui, W.; et al. Hypoxic pretreatment of small extracellular vesicles mediates cartilage repair in osteoarthritis by delivering miR-216a-5p. *Acta Biomater* **2021**, *122*, 325-342, doi:10.1016/j.actbio.2020.12.034.
13. Woo, C.H.; Kim, H.K.; Jung, G.Y.; Jung, Y.J.; Lee, K.S.; Yun, Y.E.; Han, J.; Lee, J.; Kim, W.S.; Choi, J.S.; et al. Small extracellular vesicles from human adipose-derived stem cells attenuate cartilage degeneration. *J Extracell Vesicles* **2020**, *9*, 1735249, doi:10.1080/20013078.2020.1735249.
14. Tofino-Vian, M.; Guillen, M.I.; Perez Del Caz, M.D.; Castejon, M.A.; Alcaraz, M.J. Extracellular Vesicles from Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Downregulate Senescence Features in Osteoarthritic Osteoblasts. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, *2017*, 7197598, doi:10.1155/2017/7197598.
15. Platas, J.; Guillen, M.I.; Perez Del Caz, M.D.; Gomar, F.; Castejon, M.A.; Mirabet, V.; Alcaraz, M.J. Paracrine effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells in inflammatory stress-induced senescence features of osteoarthritic chondrocytes. *Aging (Albany NY)* **2016**, *8*, 1703-1717.
16. Lei, J.; Jiang, X.; Li, W.; Ren, J.; Wang, D.; Ji, Z.; Wu, Z.; Cheng, F.; Cai, Y.; Yu, Z.R.; et al. Exosomes from antler stem cells alleviate mesenchymal stem cell senescence and osteoarthritis. *Protein Cell* **2021**, doi:10.1007/s13238-021-00860-9.

17. Gong, L.; Chen, B.; Zhang, J.; Sun, Y.; Yuan, J.; Niu, X.; Hu, G.; Chen, Y.; Xie, Z.; Deng, Z.; et al. Human ESC-sEVs alleviate age-related bone loss by rejuvenating senescent bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Extracell Vesicles* **2020**, *9*, 1800971, doi:10.1080/20013078.2020.1800971.
18. Lei, Q.; Gao, F.; Liu, T.; Ren, W.; Chen, L.; Cao, Y.; Chen, W.; Guo, S.; Zhang, Q.; Chen, W.; et al. Extracellular vesicles deposit PCNA to rejuvenate aged bone marrow-derived mesenchymal stem cells and slow age-related degeneration. *Sci Transl Med* **2021**, *13*, doi:10.1126/scitranslmed.aaz8697.
19. Liu, S.; Mahairaki, V.; Bai, H.; Ding, Z.; Li, J.; Witwer, K.W.; Cheng, L. Highly Purified Human Extracellular Vesicles Produced by Stem Cells Alleviate Aging Cellular Phenotypes of Senescent Human Cells. *Stem Cells* **2019**, *37*, 779-790, doi:10.1002/stem.2996.
20. Maumus, M.; Manferdini, C.; Toupet, K.; Peyrafitte, J.A.; Ferreira, R.; Facchini, A.; Gabusi, E.; Bourin, P.; Jorgensen, C.; Lisignoli, G.; et al. Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis. *Stem Cell Res* **2013**, *11*, 834-844.
21. Yin, Y.; Chen, H.; Wang, Y.; Zhang, L.; Wang, X. Roles of extracellular vesicles in the aging microenvironment and age-related diseases. *J Extracell Vesicles* **2021**, *10*, e12154, doi:10.1002/jev2.12154.
22. Deng, M.; Yu, T.Z.; Li, D.; Wang, X.; Zhou, G.; Liu, W.; Cao, Y.; Xia, W.; Li, W.; Zhang, W.J. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived and dermal fibroblast-derived extracellular vesicles protect dermal fibroblasts from ultraviolet radiation-induced photoaging in vitro. *Photochem Photobiol Sci* **2020**, *19*, 406-414, doi:10.1039/c9pp00421a.
23. Xu, P.; Xin, Y.; Zhang, Z.; Zou, X.; Xue, K.; Zhang, H.; Zhang, W.; Liu, K. Extracellular vesicles from adipose-derived stem cells ameliorate ultraviolet B-induced skin photoaging by attenuating reactive oxygen species production and inflammation. *Stem Cell Res Ther* **2020**, *11*, 264, doi:10.1186/s13287-020-01777-6.

24. Zhu, B.; Zhang, L.; Liang, C.; Liu, B.; Pan, X.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Zhang, Y.; Xie, W.; Yan, B.; et al. Stem Cell-Derived Exosomes Prevent Aging-Induced Cardiac Dysfunction through a Novel Exosome/lncRNA MALAT1/NF-kappaB/TNF-alpha Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, *2019*, 9739258, doi:10.1155/2019/9739258.
25. Deng, S.; Zhou, X.; Ge, Z.; Song, Y.; Wang, H.; Liu, X.; Zhang, D. Exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate cardiac damage after myocardial infarction by activating S1P/SK1/S1PR1 signaling and promoting macrophage M2 polarization. *Int J Biochem Cell Biol* **2019**, *114*, 105564, doi:10.1016/j.biocel.2019.105564.
26. Bian, S.; Zhang, L.; Duan, L.; Wang, X.; Min, Y.; Yu, H. Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. *J Mol Med (Berl)* **2014**, *92*, 387-397, doi:10.1007/s00109-013-1110-5.
27. Kulkarni, R.; Bajaj, M.; Ghode, S.; Jalnapurkar, S.; Limaye, L.; Kale, V.P. Intercellular Transfer of Microvesicles from Young Mesenchymal Stromal Cells Rejuvenates Aged Murine Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cells* **2017**, doi:10.1002/stem.2756.
28. Ahmadi, M.; Rezaie, J. Ageing and mesenchymal stem cells derived exosomes: Molecular insight and challenges. *Cell Biochem Funct* **2021**, *39*, 60-66, doi:10.1002/cbf.3602.
29. Davis, C.; Dukes, A.; Drewry, M.; Helwa, I.; Johnson, M.H.; Isales, C.M.; Hill, W.D.; Liu, Y.; Shi, X.; Fulzele, S.; et al. MicroRNA-183-5p Increases with Age in Bone-Derived Extracellular Vesicles, Suppresses Bone Marrow Stromal (Stem) Cell Proliferation, and Induces Stem Cell Senescence. *Tissue Eng Part A* **2017**, *23*, 1231-1240, doi:10.1089/ten.TEA.2016.0525.
30. Wang, Y.; Fu, B.; Sun, X.; Li, D.; Huang, Q.; Zhao, W.; Chen, X. Differentially expressed microRNAs in bone marrow mesenchymal stem cell-derived microvesicles in young and older rats and their effect on tumor growth factor-beta1-mediated epithelial-mesenchymal transition in HK2 cells. *Stem Cell Res Ther* **2015**, *6*, 185, doi:10.1186/s13287-015-0179-x.
31. Fulzele, S.; Mendhe, B.; Khayrullin, A.; Johnson, M.; Kaiser, H.; Liu, Y.; Isales, C.M.; Hamrick, M.W. Muscle-derived miR-34a increases with age in circulating extracellular vesicles and induces

senescence of bone marrow stem cells. *Aging (Albany NY)* **2019**, *11*, 1791-1803, doi:10.18632/aging.101874.

32. Khayrullin, A.; Krishnan, P.; Martinez-Nater, L.; Mendhe, B.; Fulzele, S.; Liu, Y.; Mattison, J.A.; Hamrick, M.W. Very Long-Chain C24:1 Ceramide Is Increased in Serum Extracellular Vesicles with Aging and Can Induce Senescence in Bone-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cells* **2019**, *8*, doi:10.3390/cells8010037.

Table 1 - List of primers.

Gene	Sequence forward	Sequence reverse
p14ARF	CCCTCGTGCTGATGCTACTG	ACCTGGTCTTCTAGG AAGCGG
p15INK4b	GACCGGGAATAACCTTCCAT	CACCAGGTCCAGTCAAGGAT
p16INK4a	GAAGGTCCCTCAGACATCCCC	CCCTGTAGGACCTTCGGTGAC
p21cdkn1a	AGGTGGACCTGGAGACTCTCAG	TCCTCTTGGAGAAGATCAGCCG
p27KIP1	ATAAGGAAGCGACCTGCAACCG	TTCTTGGGCGTCTGCTCCACAG
p57KIP2	GCGGCGATCAAGAAGCTGT	GCTTGGCGAAGAAATCGGAGA
RPS9	GATTACATCCTGGGCCTGAA	ATGAAGGACGGGATGTTCAC

Table 2 - TaqMan® Gene Expression Assay ID

Gene	ID
FOXO1	Hs00231106_m1
FOXO3	Hs00818121_m1
PTEN	Hs02621230_s1
MAP1LC3A	Hs01076567_g1
SQSTM1	Hs00177654_m1

Figure legends

Fig. 1: Characterization of etoposide-induced senescence in human chondrocytes after one week. (A) Schematic workflow of etoposide (ETO)-induced senescence in osteoarthritic chondrocytes. (B) Level of BrdU incorporation in non-treated (NT) and ETO-treated chondrocytes (n=3). (C) Percentage of proliferation in NT and ETO chondrocytes (n=3). (D) Relative expression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in NT and ETO chondrocytes by RT-qPCR (n=3-7). (E) Representative pictures of SA-β-Galactosidase (Gal) staining in NT and ETO chondrocytes (left panel) (Bars:100µm). Percentage of SA-β-Gal-positive cells (n=7) and SA-β-Gal activity quantified by fluorometry (n=3). (F) Staining of actin stress fibers (in red) and nuclei (in blue) with Phalloidin and DAPI, respectively. Bars: 100µm (left panel). Quantification of cell surface (n=12) and corrected total cell fluorescence (CTCF) (n=9). (G) Representative pictures of γH2AX-positive foci (red spot) in DAPI stained nuclei (blue). Bars: 50µm (left panel). Percentage of cells with γH2AX-positive nuclei (n=8). Quantification of nucleus surface (n=7). (H) Protein secretion in supernatants of NT and ETO chondrocytes quantified by ELISA (n=7). Data are shown as mean ± SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Fig. 2: Senoprotective effect of extracellular vesicles from ASCs on etoposide-induced senescent chondrocytes. (A) Schematic workflow of etoposide (ETO)-treated human chondrocytes cultured with different doses of EVs isolated from ASCs: Low dose (LD), medium dose (MD) and high dose (HD). (B) Representative pictures of SA-β-Gal staining in human chondrocytes (left panel) (Bars: 100µm) and percentage of SA-β-Gal positive cells (right panel) (n=7-8). (C) Representative pictures of γH2AX foci (red) in the nuclei (blue) of chondrocytes (left panel). Bars: 50µm. (left panel). Percentage of cells with γH2AX foci in nuclei and quantification of nucleus surface (n=7-8). (D) Protein secretion in supernatants of ETO-treated chondrocytes quantified by ELISA (n=6-7). (E) Relative expression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in chondrocytes as fold change of gene expression compared to chondrocytes ETO (n=6-7). (F) Relative expression of autophagy markers in chondrocytes as fold change of gene

expression compared to chondrocytes ETO (n=6). Data are shown as mean ± SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.0001.

Fig. 3: Model of IL1β–induced senescence in chondrocytes. (A) Schematic workflow of IL1β–induced senescence in chondrocytes. (B) Representative pictures of SA-β-Gal staining in non-treated (NT) (Bars: 100µm) and IL1β–treated human chondrocytes and percentage of SA-β-Gal positive cells (n=7-8). (C) Representative pictures of chondrocytes with γH2AX foci (red) in nuclei (blue). Bars: 50µm. Percentage of chondrocytes with γH2AX foci (n=5) and quantification of nucleus surface (n=30). (D) Relative expression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in chondrocytes (n=6-7). (E) Protein secretion in supernatants of NT and ETO chondrocytes quantified by ELISA (n=6). Data are shown as mean ± SEM. *p<0.05, **p<0.01

Fig. 4: ASCs-derived extracellular vesicles exert a seno-protective effect on IL1β–induced senescence in chondrocytes. (A) Workflow of IL1β-induced senescence in primary human chondrocytes and treatment with different doses of ASCs-derived EVs: Low dose (LD), medium dose (MD) and high dose (HD). (B) Representative pictures of SA-β-Gal staining in chondrocytes (left panel) and percentage of SA-β-Gal positive cells (n=6-7) (right panel) (Bars: 100µm). (C) Protein secretion in supernatants of IL-treated chondrocytes quantified by ELISA (n=6). (D) Expression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in chondrocytes expressed as fold change of gene expression compared to chondrocytes IL1β (n=6). (E) Autophagy markers mRNA expression in human chondrocytes expressed as fold change of gene expression compared to chondrocytes IL1β (n=6). Data are shown as mean ± SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Fig. 5: Senescent ASCs and their extracellular vesicles protect chondrocytes from senescence induced by DNA damage. (A) Representative pictures of SA-β-Gal staining in not treated (NT) human chondrocytes or in chondrocytes induced to senescence by etoposide (ETO) treatment and cultured with healthy (H) or senescent (S) ASCs or EVs (Bars: 100µm). (B) Percentage of SA-β-Gal positive cells

(n=6-7). (C) Representative pictures of chondrocytes with γH2AX foci (red) in nuclei stained with DAPI (blue). Bars: 50µm. (D) Percentage of cells with γH2AX-positive nuclei (left panel) and quantification of nucleus surface (right panel) (n=8). (E) Relative expression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in chondrocytes (n=6). (F) Protein secretion in supernatants of ETO-treated chondrocytes quantified by ELISA (n=6). Data are shown as mean ± SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Fig. 6: Senescent ASCs and their extracellular vesicles protect chondrocytes from senescence induced by inflammation. (A) SA-β-Gal staining in not treated (NT) human chondrocytes or in chondrocytes induced to senescence by IL1β (IL1) treatment and cultured with healthy (H) or senescent (S) ASCs or EVs. (B) Percentage of SA-β-Gal positive cells (n=8) (Bars: 100µm). (C) Relative expression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in chondrocytes (n=6-7). (D) Protein secretion in supernatants of IL1-treated chondrocytes quantified by ELISA (n=6). Data are shown as mean ± SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure S1: Characterization of etoposide-induced senescence in human chondrocytes at twelve days. (A) Cumulative number of cells in non-treated (NT) and etoposide (ETO)-treated human OA chondrocytes (n=3-4). (B) Level of BrdU incorporation in NT and ETO-treated chondrocytes at day 12 (n=3). (C) Relative expression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in chondrocytes (n=3). (D) Representative pictures of SA-β-Gal staining in NT and ETO chondrocytes (left panel) (Bars: 100µm). Percentage of SA-β-Gal positive cells (n=3) and SA β-Gal activity quantified by fluorometry (n=3) (right panel). (E) Staining of actin stress fibers with phalloidin (red) and nuclei with DAPI (blue). Bars: 100µm (left panel). Quantification of cell surface (n=22-30) and corrected total cell fluorescence (CTCF) (n=24) (right panel). (F) Representative pictures of nuclei stained with DAPI (blue) and γH2AX-positive foci in chondrocytes (red). Bars: 50µm (left panel). Percentage of chondrocytes with γH2AX foci in nuclei (n=3) and quantification of nucleus surface (n=3) (=n=36) (right panel). Data are shown as mean ± SEM. *p<0.05, ***p<0.001

Figure 1

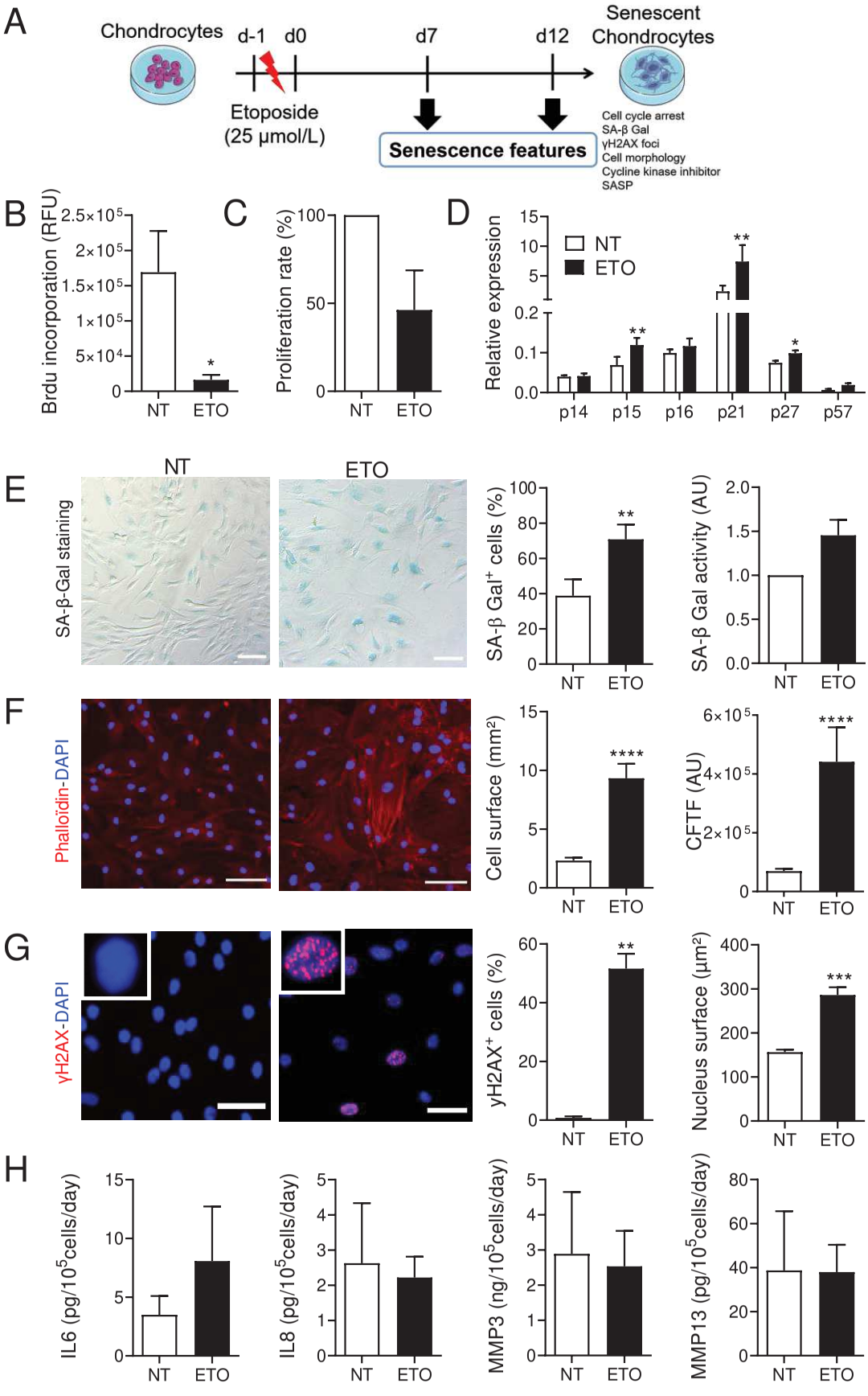
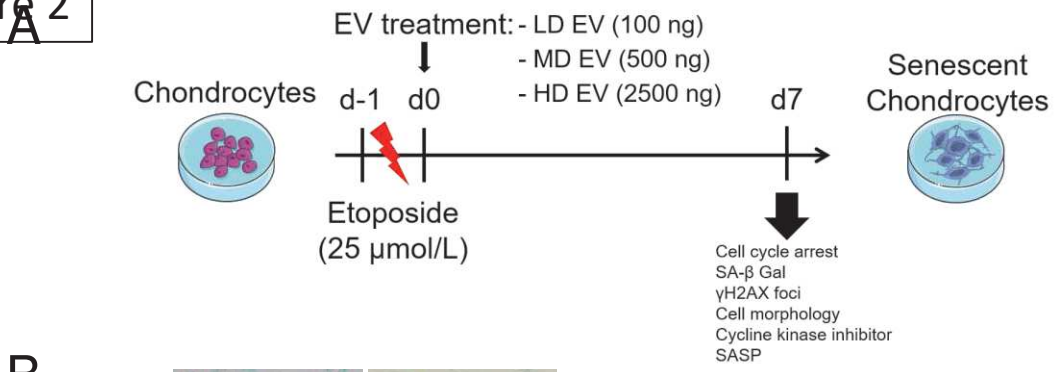
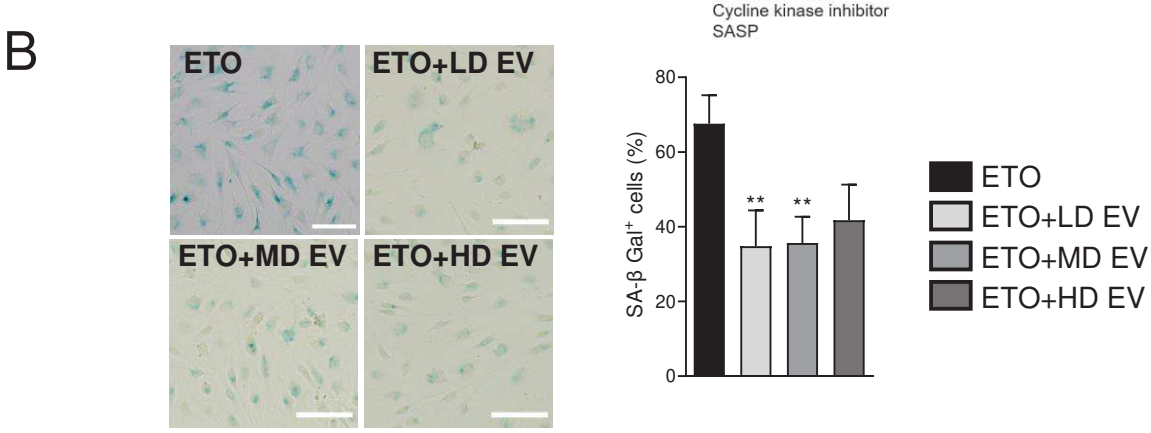
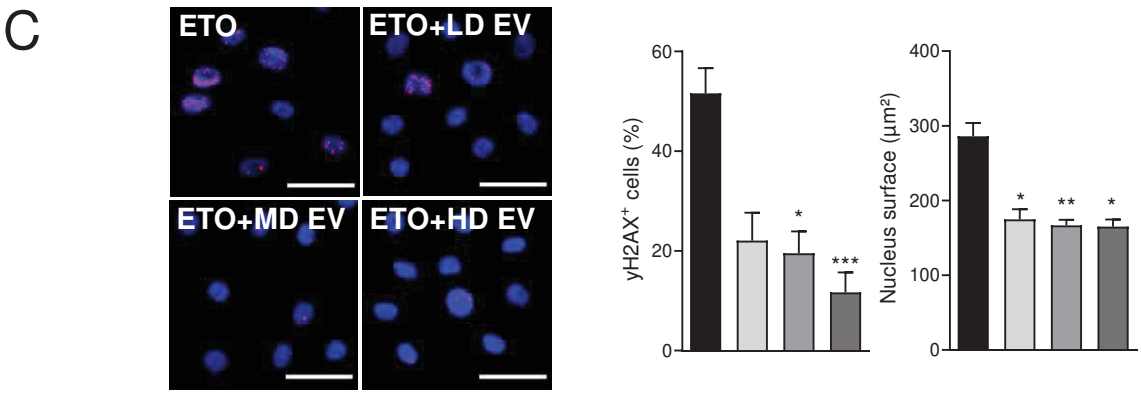
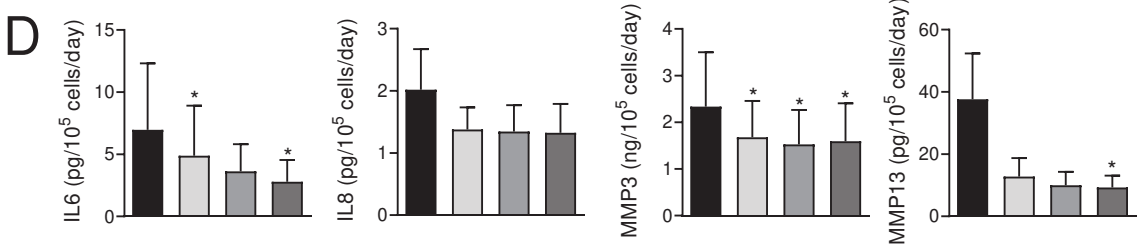

A
Chondrocytes
d-1
d0
d7
d12
Senescent Chondrocytes
Etoposide (25 µmol/L)
Senescence features
Cell cycle arrest
SA-β Gal
γH2AX foci
Cell morphology
Cycline kinase inhibitor
SASP
B
Brdu incorporation (RFU)
C
Proliferation rate (%)
D
Relative expression
NT
ETO
p14
p15
p16
p21
p27
p57
E
SA-β-Gal staining
SA-β Gal+ cells (%)
SA-β Gal activity (AU)
F
Phalloïdin-DAPI
Cell surface (mm²)
CFTF (AU)
G
γH2AX-DAPI
γH2AX+ cells (%)
Nucleus surface (µm²)
H
IL6 (pg/10⁵cells/day)
IL8 (pg/10⁵cells/day)
MMP3 (ng/10⁵cells/day)
MMP13 (pg/10⁵cells/day)

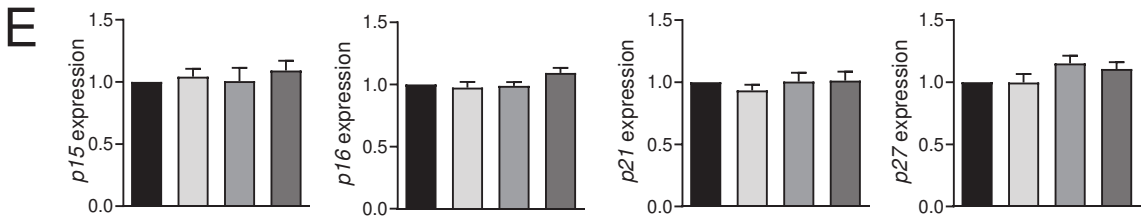
Figure 2


A
EV treatment: - LD EV (100 ng)
- MD EV (500 ng)
- HD EV (2500 ng)
Chondrocytes
d-1
d0
d7
Senescent Chondrocytes
Etoposide
(25 µmol/L)
Cell cycle arrest
SA-β Gal
γH2AX foci
Cell morphology
Cycline kinase inhibitor
SASP


B
ETO
ETO+LD EV
ETO+MD EV
ETO+HD EV
SA-β Gal+ cells (%)
ETO
ETO+LD EV
ETO+MD EV
ETO+HD EV


C
ETO
ETO+LD EV
ETO+MD EV
ETO+HD EV
γH2AX+ cells (%)
Nucleus surface (µm²)


D
IL6 (pg/10⁵ cells/day)
IL8 (pg/10⁵ cells/day)
MMP3 (ng/10⁵ cells/day)
MMP13 (pg/10⁵ cells/day)


E
p15 expression
p16 expression
p21 expression
p27 expression

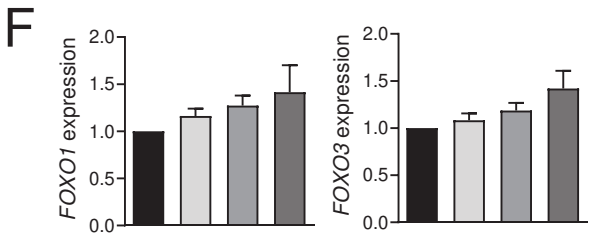

F
FOXO1 expression
FOXO3 expression

Figure 3

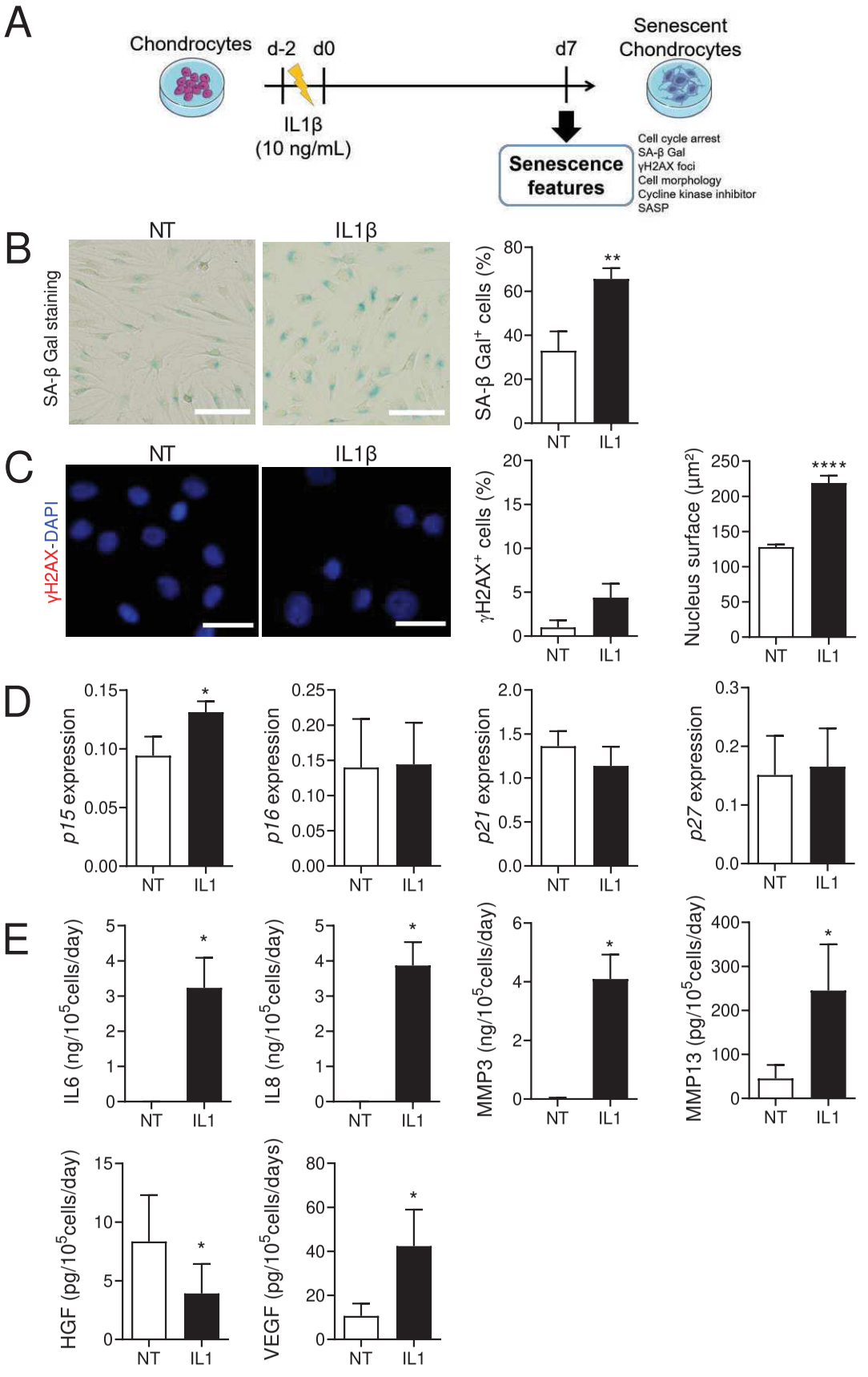

A
Chondrocytes
d-2
d0
IL1β
(10 ng/mL)
d7
Senescent
Chondrocytes
Senescence
features
Cell cycle arrest
SA-β Gal
γH2AX foci
Cell morphology
Cycline kinase inhibitor
SASP
B
NT
IL1β
SA-β Gal staining
SA-β Gal+ cells (%)
C
γH2AX-DAPI
γH2AX+ cells (%)
Nucleus surface (µm²)
D
p15 expression
p16 expression
p21 expression
p27 expression
E
IL6 (ng/10⁵cells/day)
IL8 (ng/10⁵cells/day)
MMP3 (ng/10⁵cells/day)
MMP13 (pg/10⁵cells/day)
HGF (pg/10⁵cells/day)
VEGF (pg/10⁵cells/days)

Figure 4

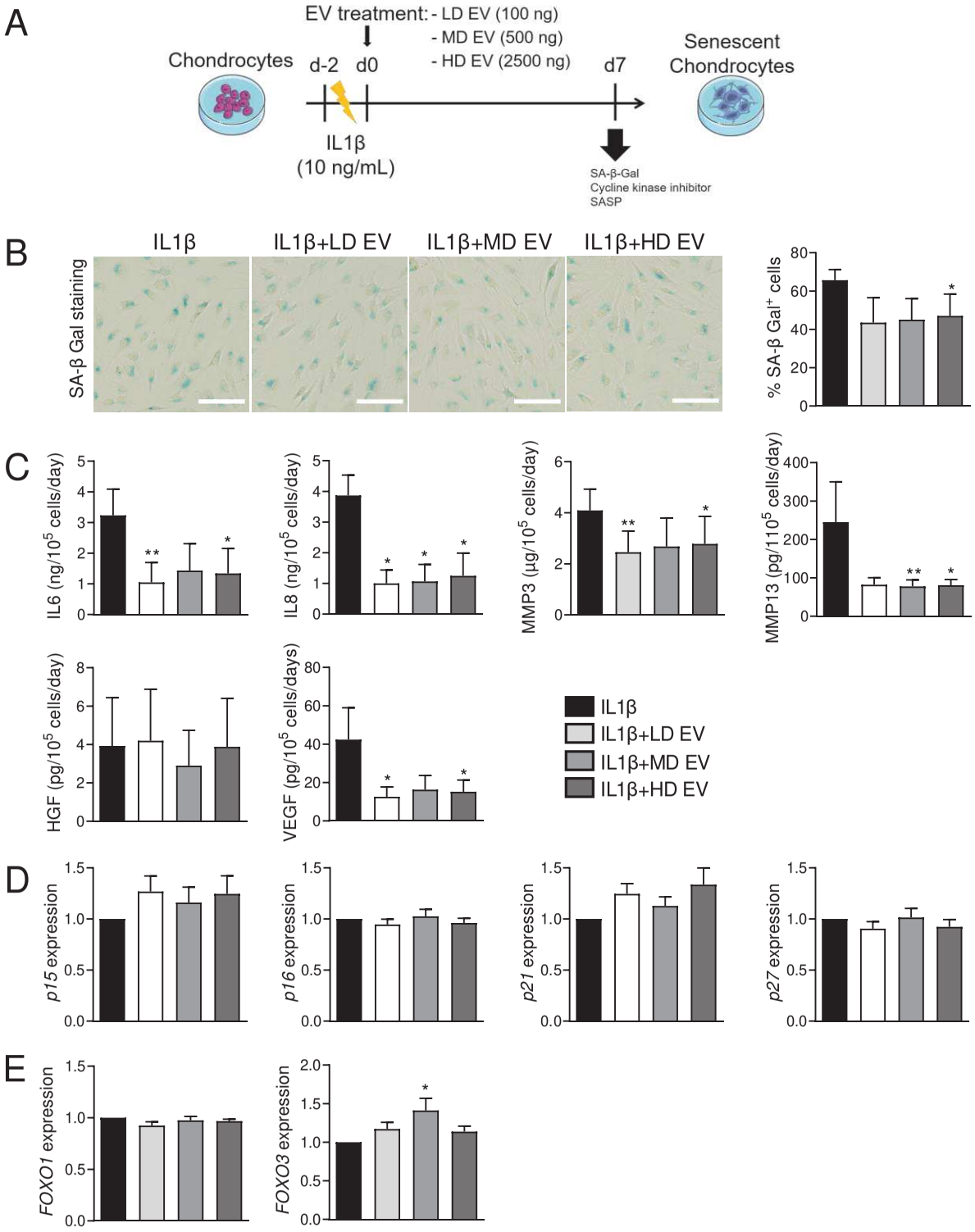

A
EV treatment: - LD EV (100 ng)
- MD EV (500 ng)
- HD EV (2500 ng)
Chondrocytes
d-2
d0
d7
Senescent Chondrocytes
IL1β (10 ng/mL)
SA-β-Gal
Cycline kinase inhibitor
SASP
B
IL1β
IL1β+LD EV
IL1β+MD EV
IL1β+HD EV
SA-β Gal staining
% SA-β Gal+ cells
C
IL6 (ng/10^5 cells/day)
IL8 (ng/10^5 cells/day)
MMP3 (µg/10^5 cells/day)
MMP13 (pg/110^5 cells/day)
HGF (pg/10^5 cells/day)
VEGF (pg/10^5 cells/days)
IL1β
IL1β+LD EV
IL1β+MD EV
IL1β+HD EV
D
p15 expression
p16 expression
p21 expression
p27 expression
E
FOXO1 expression
FOXO3 expression

Figure 5

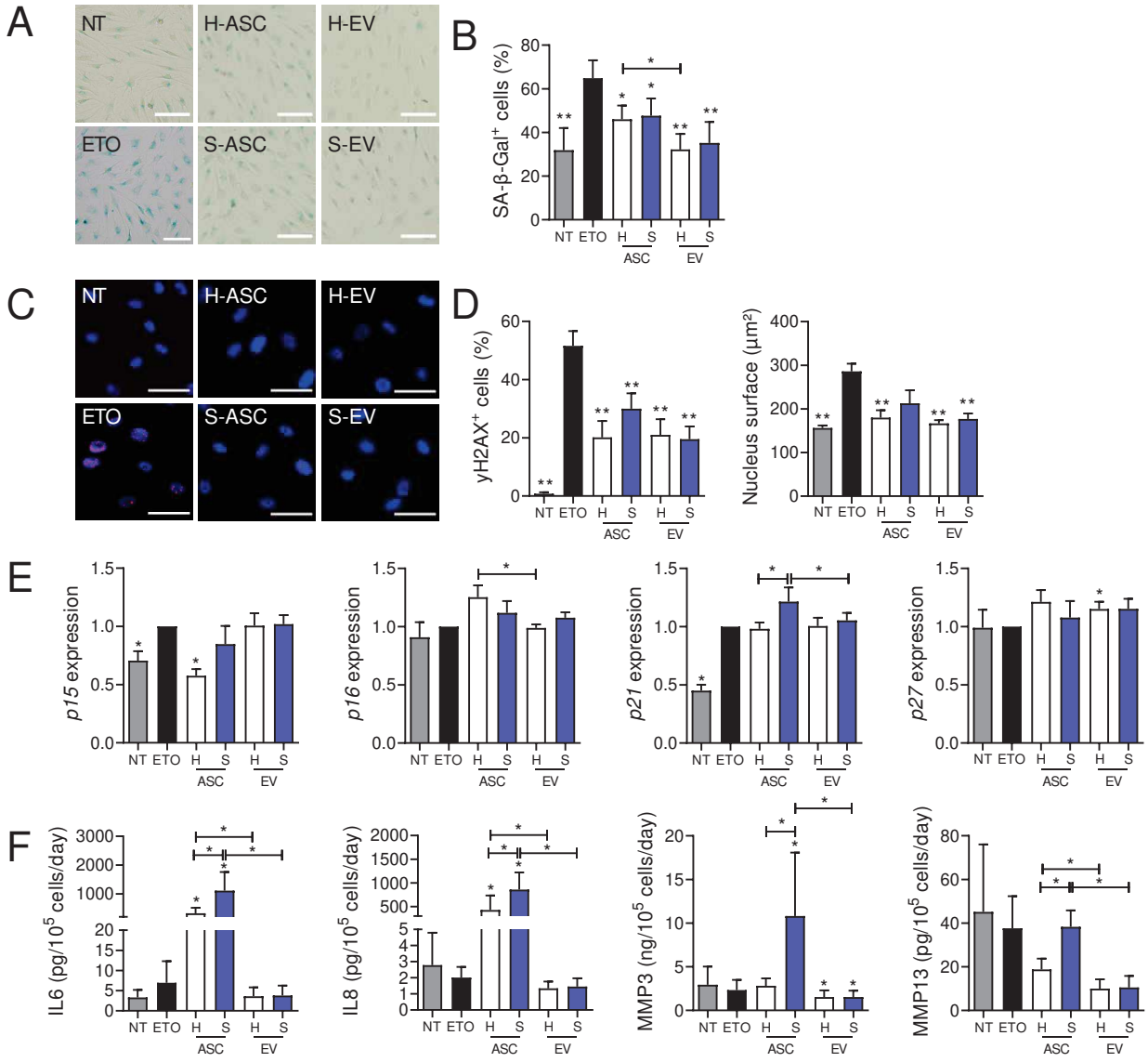
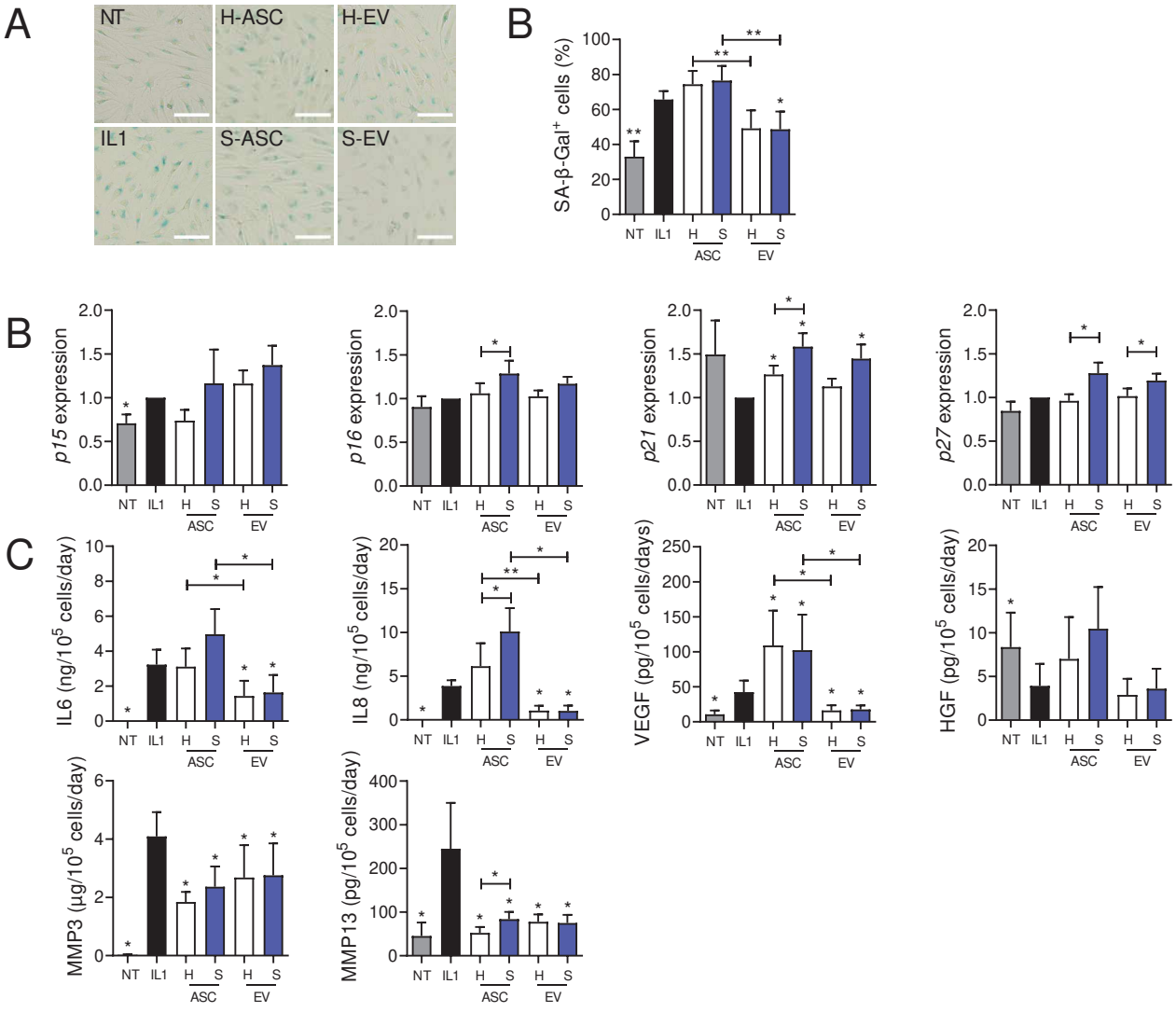
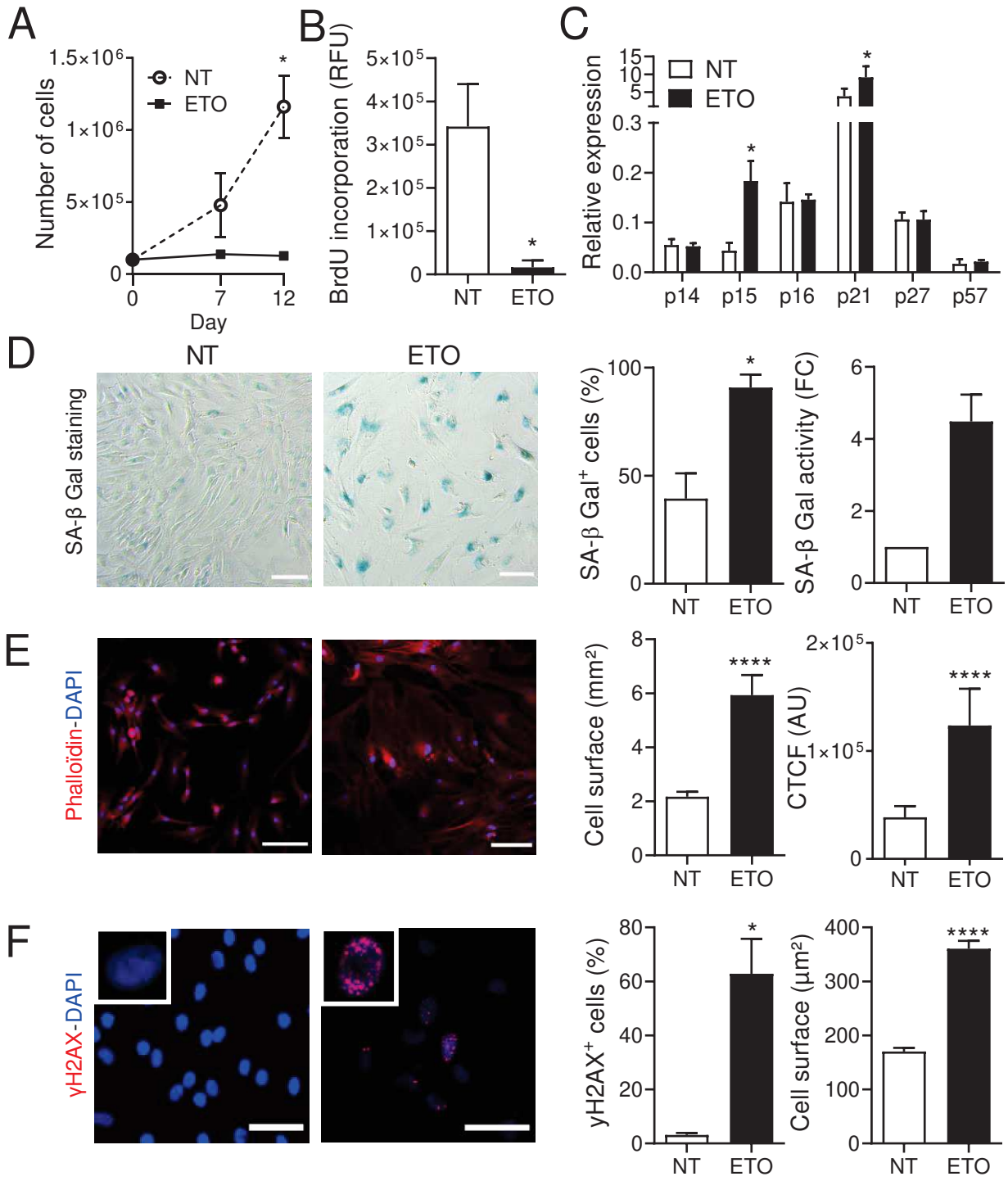

A
NT
H-ASC
H-EV
ETO
S-ASC
S-EV
B
SA-β-Gal+ cells (%)
NT ETO H S H S
ASC EV
C
NT
H-ASC
H-EV
ETO
S-ASC
S-EV
D
γH2AX+ cells (%)
Nucleus surface (µm²)
NT ETO H S H S
ASC EV
E
p15 expression
p16 expression
p21 expression
p27 expression
NT ETO H S H S
ASC EV
F
IL6 (pg/10⁵ cells/day)
IL8 (pg/10⁵ cells/day)
MMP3 (ng/10⁵ cells/day)
MMP13 (pg/10⁵ cells/day)
NT ETO H S H S
ASC EV

Figure 6


A
NT
H-ASC
H-EV
IL1
S-ASC
S-EV
B
SA-β-Gal+ cells (%)
NT IL1 H S H S
ASC EV
B
p15 expression
p16 expression
p21 expression
p27 expression
C
IL6 (ng/10^5 cells/day)
IL8 (ng/10^5 cells/day)
VEGF (pg/10^5 cells/days)
HGF (pg/10^5 cells/day)
MMP3 (µg/10^5 cells/day)
MMP13 (pg/10^5 cells/day)

Supplemental Figure 1



3 Conclusions générales & perspectives

Les EV constituent un domaine de recherche en pleine expansion depuis la dernière décennie. Ainsi, depuis les années 2000, le nombre de travaux impliquant les EV a augmenté de manière exponentielle, pour atteindre le nombre de 5 377 travaux référencés dans Pubmed en 2020. De nombreux progrès ont été réalisés ces dernières années dans la compréhension de la biologie fondamentale des EV et la standardisation des techniques de production et d'analyse, mais des travaux supplémentaires sont nécessaires pour comprendre pleinement les capacités fonctionnelles de ces vésicules. Comme nous l'avons vu précédemment, elles sont présentes dans les fluides biologiques et sont impliquées dans de multiples processus physiologiques et pathologiques. Les EV sont désormais considérées comme un mécanisme supplémentaire de communication intercellulaire, permettant aux cellules d'échanger des protéines, des lipides et du matériel génétique. Ainsi, leur action paracrine et leurs capacités à transporter diverses biomolécules font d'elles des outils thérapeutiques prometteurs. Dans ce contexte, les EV dérivées de CSM font l'objet de nombreuses recherches dans diverses pathologies, et notamment dans des pathologies liées à l'âge comme l'arthrose.

En effet, l'utilisation thérapeutique des CSM-EV a prouvé leur efficacité dans des modèles pré-cliniques d'arthrose en diminuant l'inflammation, en protégeant le cartilage et l'os de la dégradation et, en clinique, en améliorant la douleur et les paramètres fonctionnels (Desando et al., 2013; ter Huurne et al., 2012; Song et al., 2020). Avant mon arrivée au laboratoire, le groupe de D. Noël avait montré que l'injection intra-articulaire d'EV produites à partir de CSM murines dérivées de la moelle osseuse protège de l'OA induite chez la souris, et de manière aussi efficace que les CSM parentales (Cosenza et al., 2017). Ces résultats et ceux d'autres équipes permettent d'envisager l'utilisation des EV en clinique et donc de s'affranchir de certaines contraintes logistiques inhérentes à la thérapie cellulaire en termes de préparation, de stockage et de transport. Les EV possèdent en effet des avantages dans le contexte de la médecine régénérative par rapport aux CSM. Le procédé de production des CSM en grade clinique requiert une logistique complexe, lourde et coûteuse. La possibilité d'une production d'EV en très grandes quantités à partir de cellules cultivées dans un bioréacteur permet de générer des lots homogènes. De plus, les EV exigent des conditions de stockage (sous forme lyophilisée par exemple) et des conditions de préparation moins contraignantes. Aussi, les EV présentent un avantage majeur : selon leur source, elles peuvent être moins immunogènes que leurs cellules parentales, probablement en raison d'une plus faible abondance de protéines transmembranaires telles que les complexes majeurs d'histocompatibilité à leur surface (Ong et Wu, 2015). Contrairement aux cellules mères, les EV ne possèdent pas de noyau et donc ne peuvent pas se répliquer ou se différencier après l'injection. Elles présentent donc moins de risques de génération de tumeurs et de transfert d'agents pathogènes viraux latents (Murphy et al., 2019). Les EV ne sont pas activées par l'environnement au site d'injection

contrairement aux CSM, qui peuvent adapter leur sécrétome aux signaux de l'environnement extracellulaire. Cependant il n'est pas à exclure qu'un environnement inflammatoire chronique ou la sécrétion d'un SAPS altèrent leurs propriétés, notamment dans le cadre de l'arthrose qui est prévalente chez des patients âgés. Les EV sont aussi moins immunogènes et moins toxiques que les liposomes artificiels et semblent également posséder une capacité intrinsèque à traverser les barrières tissulaires et cellulaires (Alvarez-Erviti et al., 2011; Kooijmans et al., 2016).

Quelle que soit la pathologie ciblée, les essais cliniques montrent une utilisation croissante des CSM allogéniques car l'utilisation de CSM autologues présentent certaines limites. Premièrement, le coût élevé de la préparation des cellules pour un seul receveur. Deuxièmement, les CSM isolées de donneurs âgés ont montré une prolifération cellulaire réduite, un potentiel de différenciation altéré et un potentiel de régénération plus faible réduisant l'efficacité du traitement (Marędziak et al., 2016). A cela s'ajoute d'autres contraintes à l'utilisation de CSM autologues. L'expansion des CSM autologues nécessite du temps, ce qui rend cette approche thérapeutique difficile pour le traitement des maladies en phase aiguë. De plus, il a été démontré que le vieillissement cellulaire (sénescence réplicative et sénescence associée à l'âge du donneur) affecte la production d'EV. Les CSM sénescentes sécrètent un plus grand nombre d'EV que les CSM non sénescentes (Fafián-Labora et al., 2020; Huang et al., 2019). Enfin, une étude a rapporté que les EV dérivées de CSM âgées ne montrent pas d'effet protecteur dans un modèle de lésion pulmonaire aiguë comparées à des EV dérivées de CSM jeunes (Huang et al., 2019).

Concernant les EV dérivées de CSM allogéniques, le recours à de jeunes donneurs sains semble être un choix optimal. En effet, cela permet d'éviter la perte de fonctionnalité liée à l'âge ou à la sénescence cellulaire. De plus, des EV allogéniques produites en grandes quantités, caractérisées et stockées, peuvent être rapidement disponibles et immédiatement administrées au patient même en phase aigüe de sa maladie. Pour ces raisons, les EV allogéniques constituent une alternative thérapeutique plus prometteuse aux EV autologues avec de multiples avantages en termes de temps, de coût de production et d'assurance qualité (García-Bernal et al., 2021). Il n'existe cependant que très peu de données confirmant ces hypothèses.

Au vu de ces observations, mon projet de thèse a pris naissance autour de cette question : Quel est l'impact de la sénescence sur les propriétés thérapeutiques des EV dérivées des CSM du tissu adipeux dans l'OA ?

En utilisant différents modèles de sénescence, d'ASCs et de chondrocytes sénescents, nous avons évalué les propriétés thérapeutiques des EV. En résumé, les conclusions de ces travaux de thèse se résument en deux points :

- La sénescence des ASCs impacte les propriétés thérapeutiques de leurs EV dans un modèle in vivo d'arthrose.
- Les EV d'ASCs saines ou sénescentes freinent l'induction de la sénescence des chondrocytes induite par l'inflammation ou les dommages à l'ADN.

Dans cette dernière partie, nous allons discuter des résultats autour de chacun de ces points, puis nous proposerons les différentes perspectives envisagées à la suite de ces travaux.

3.1 Impact de la sénescence des ASCs sur l'effet thérapeutique des EV

Au cours de mes travaux de thèse, nous avons évalué l'impact de la sénescence sur la production et les fonctions des EV dérivées des ASCs. Nous avons généré dans un premier temps un modèle de sénescence induite par des dommages à l'ADN sur des ASCs en utilisant l'étoposide. Nous avons montré que le traitement des ASCs induit l'apparition des principaux marqueurs de sénescence : activité SA-β-Gal augmentée, arrêt de la prolifération cellulaire, présence de foyers de dommages à l'ADN, changement de morphologie cellulaire et production d'un SAPS, observables dès 7 jours après-traitement. Nous avons produit et caractérisé les EV isolées de ces ASCs sénescentes. Nous avons confirmé une étude qui montre que les ASCs sénescentes produisent plus d'EV que les ASCs saines (Fafián-Labora et al., 2020). Nous avons également mis en évidence que ces EV ont une taille légèrement supérieure, mais contrairement à ce qui avait été publié, les EV produites contiennent la même quantité de protéines mais moins d'ARN.

Nous avons ensuite évalué les propriétés fonctionnelles des EV d'ASCs sénescentes, sur des chondrocytes humains primaires traités à l'IL-1β pendant 48 h afin d'exacerber leur phénotype arthrosique. Les EV sénescentes sont capables d'augmenter l'expression de l'aggrécane tout en diminuant l'expression de MMP3, de manière similaire à ce qui est observé avec les EV saines. En revanche, elles ne sont pas capables de diminuer l'expression de MMP13 et des cytokines inflammatoires IL-6 et IL-8. *In vivo,* seules les EV sénescentes sont incapables de protéger les souris contre les lésions articulaires associées au développement de l'arthrose. Notre hypothèse est que le contenu des EV sénescentes est modifié au profit de l'acquisition d'un phénotype délétère (SASP inflammatoire et catabolique) et d'une perte des molécules responsables des propriétés thérapeutiques des EV. En soutien de cette hypothèse, il a été démontré que certains miARN associés au profil immunosuppresseur des CSM sont diminués dans les EV des CSM âgées et liés à la perte de leur fonction thérapeutique (Fafián-Labora et al., 2017; Huang et al., 2019). Ces EV sont incapables de favoriser la polarisation des macrophages vers le phénotype M2 anti-inflammatoire.

Dans l'étude in vitro, nous nous sommes focalisés sur un seul type cellulaire, le chondrocyte, dont le phénotype est profondément dérégulé lors du développement de l'arthrose. Au vu des résultats in vivo, notre objectif à court terme est de tester l'impact des EV sénescentes sur d'autres types cellulaires du compartiment articulaire, notamment les cellules de la membrane synoviale. Pour ce faire, j'ai isolé des synoviocytes issus de la membrane synoviale de patients arthrosiques ayant subi une arthroplastie du genou. Nous allons évaluer l'effet des EV sénescentes sur les facteurs inflammatoires produits par ces cellules au niveau ARNm et protéique dans le surnageant de culture. Nous évaluerons également leur impact sur la polarisation des macrophages résidant de la membrane synoviale.

La perte de fonctionnalité des EV sénescentes pourrait être en partie expliquée par le contenu en protéines. Pour tenter de répondre à cette question, nous avons entrepris une analyse protéomique afin de comparer le contenu en protéines des EV isolées d'ASC saines et sénescentes issues de 3 donneurs. L'analyse en spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence des différences d'expression du contenu protéique. Douze protéines sont différentiellement exprimées dans les EV sénescentes. La validation de cette analyse sera réalisée sur de nouveaux lots d'EV par des techniques ELISA et/ou de western blot. Leur rôle fonctionnel pourra être validé en produisant des EV à partir de CSM dont l'expression des molécules identifiées aura été inhibée par siRNA, par exemple. La fonctionnalité de ces EV pourra être évalué in vitro, sur des modèles de chondrocytes ou de synoviocytes arthrosiques, induits ou pas en sénescence et in vivo, dans le modèle CIOA. Ces résultats pourraient permettre d'identifier des protéines clés afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques en augmentant l'effet régénératif des EV ou mettre en place des tests de « potency » pour la production de lots de grade clinique.

Au cours de ces travaux, l'ensemble des expérimentations ont été réalisées avec des EV « fraiches » produites, séparées et concentrées extemporanément en vue de leur utilisation en culture cellulaire ou de leur injection in vivo. Cependant, l'utilisation des EV « fraîches » requière une organisation et une planification des expérimentations lourdes et complexe. Nous avons entrepris d'évaluer l'impact de la congélation à -80°C sur la fonctionnalité des EV que nous produisons. En effet, si le stockage à -80°C facilite les études utilisant des EV, il peut affecter la taille, le nombre et la fonction des EV (Cosenza et al., 2018; Lőrincz et al., 2014). Nous envisageons de tester l'ajout de disaccharides comme le tréhalose, de diméthylsulfoxyde (DMSO) à 5 ou 10% ou la lyophilisation pour leur capacité à maintenir la structure et la fonctionnalité des EV (Maumus et al., 2020).

3.2 Effet sénoprotecteur des EV dans l'arthrose

Un deuxième axe de mes travaux de thèse a été d'évaluer l'effet sénoprotecteur des EV dérivées des ASCs saines ou sénescentes sur les chondrocytes OA. Pour mettre en place un modèle de chondrocytes sénescents, nous avons repris les résultats de la littérature qui indiquent l'impact de plusieurs types de stress, tels que le stress oxydatif ou les cytokines pro-inflammatoires sur la sénescence (Di Micco et al., 2021). L'IL-1β est la cytokine majoritairement présente dans une articulation OA et capable d'induire une réponse de stress inflammatoire tandis que l'étoposide induit des dommages à l'ADN conduisant à la sénescence mais qui n'a pas été utilisé sur des chondrocytes (Malaise et al., 2019; Platas et al., 2016). Une conséquence importante de la sénescence prématurée induite par les cytokines pro-inflammatoires ou le stress oxydatif dans les chondrocytes pourrait être l'altération de l'homéostasie articulaire diminuant la capacité des chondrocytes à maintenir et réparer le tissu (Martin et Buckwalter, 2003). Nous avons donc choisi de générer deux modèles de chondrocytes induits en sénescence : 1) par des dommages à l'ADN en utilisant l'étoposide et 2) une sénescence induite par l'inflammation en utilisant l'IL1β.

L'effet sénoprotecteur des EV dérivées d'ASCs saines et sénescentes a été testé dans ces deux modèles de chondrocytes induits en sénescence. Nous avons montré que quel que soit le statut des cellules parentales, les EV freinent l'apparition des marqueurs de sénescence tels que l'accumulation de foyers γH2AX, le nombre de cellules SA-β-Gal, la taille du noyau des chondrocytes et la production des facteurs du SASP (IL-6, IL-8, MMP3, MMP13) qui participent à la dérégulation de l'homéostasie articulaire. Nous avons également montré que les ASCs soumises à un environnement sénescent perdent en partie leur effet sénomorphique, ce qui indique que les CSM-EV peuvent être une meilleure option pour de futures applications cliniques dans les maladies dégénératives.

Nous nous sommes également intéressés à l'activité autophagique des chondrocytes qui diminue avec l'âge et qui pourrait avoir un rôle causal dans la perte d'homéostasie des cellules âgées (Caramés et al., 2010). Nous avons montré que les EV ont tendance à augmenter les marqueurs d'autophagie. Ces résultats préliminaires doivent être confirmés par l'étude d'autres marqueurs du flux autophagique, notamment par western blot. Le flux autophagique récapitule le processus autophagique de la génération de l'autophagosome à la fusion/dégradation par le lysosome. Des travaux basés sur l'imagerie cellulaire ont été développés pour surveiller le flux autophagique à l'aide de LC3 en tant que rapporteur du flux autophagique (mCherry-EGFP-LC3B) dans les chondrocytes humains. Brièvement, l'acquisition des données est effectuée à l'aide d'un microscope et un protocole d'analyse d'images automatisée basé sur un algorithme a été développé et validé pour identifier des molécules activant le flux autophagique (Nogueira-Recalde et al., 2020).

Les perspectives de cette partie de mes travaux seront d'évaluer l'effet sénoprotecteur d'EV dérivées d'ASCs en sénescence réplicative sur nos modèles de chondrocytes sénescents. Nous avons également à notre disposition au laboratoire des prélèvements d'ASCs de sujets jeunes et âgés qui pourront être utilisés pour produire des EV. Enfin, nous avons initié une collaboration pour étudier les EV issues de CSM de donneurs atteints de Progéria qui est un modèle de vieillissement prématuré. Ainsi, il serait intéressant de tester les propriétés thérapeutiques des EV de ces différents modèles de vieillissement/sénescence.

Enfin, les EV contiennent des miRNAs qui ont été associés à certains de leurs effets thérapeutiques. Différentes études ont mis en évidence des différences de profil d'expression des miRNAs entre des cellules jeunes et des cellules âgées/sénescentes. Dans cette perspective, nous avons extrait l'ARN total de nos EV saines et sénescentes provenant de différents donneurs. Notre objectif est de comparer les niveaux d'expression de certains miRNAs décrits dans la littérature comme étant dérégulés avec l'âge, notamment miR-34a, miR-17, miR-146a, miR-183-5p et miR-335-5p.

En parallèle, nous avons entrepris une analyse de séquençage des ARNm sur cellule unique afin de comparer les transcriptomes d'ASCs en sénescence: 1) des ASCs en sénescence réplicative, 2) des ASCs en sénescence induite à l'étoposide et 3) des ASCs en sénescence induite à l'IL-1β, versus un contrôle sain. Les résultats de ces analyses de RNAseq devront bien sûr être confirmés par d'autres techniques de biologie moléculaire et cellulaire telles que la RT-qPCR, le western blot ou l'ELISA. Cette analyse du transcriptome pourra nous apporter des éléments de réponse quant aux mécanismes moléculaires régulés de manière similaire ou spécifique à différents processus de sénescence. Une analyse comparative avec les ARNm ou les protéines contenus dans les EV pourrait également permettre de donner des éléments de compréhension aux différences d'efficacité thérapeutique des ASCs parentales et de leurs EV. Enfin, l'étude de ces différents transcriptomes pourrait permettre d'identifier des cibles thérapeutiques afin de potentialiser l'effet des CSM et de leurs EV.

En conclusion générale, mon projet de thèse a permis de démontrer que les EV isolées d'ASCs sénescentes perdent leur effet thérapeutique dans un modèle pré-clinique d'arthrose, bien que ces EV possèdent un effet sénoprotecteur sur des chondrocytes arthrosiques. Ces résultats révèlent l'intérêt de mieux comprendre l'impact de la sénescence dans l'arthrose et d'étudier plus en avant les mécanismes d'action des EV. Il serait nécessaire d'étudier les autres processus cellulaires dérégulés dans l'arthrose et associés à la sénescence, notamment le stress oxydant, l'autophagie, l'activité métabolique afin de concevoir des traitements plus efficaces pour la l'arthrose et envisager l'utilisation optimisée des EV en clinique.

4 Bibliographie

Aggarwal, S., and Pittenger, M.F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood *105*, 1815–1822.

Agha-Hosseini, F., Jahani, M.-A., Jahani, M., Mirzaii-Dizgah, I., and Ali-Moghaddam, K. (2010). In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp: Stem cells from dental pulp. Clin. Transplant. *24*, E23–E28.

Ahmadi, M., and Rezaie, J. (2021). Ageing and mesenchymal stem cells derived exosomes: Molecular insight and challenges. Cell Biochem. Funct. *39*, 60–66.

Alcorta, D.A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., and Barrett, J.C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 13742–13747.

Alford, J.W., and Cole, B.J. (2005). Cartilage Restoration, Part 1: Basic Science, Historical Perspective, Patient Evaluation, and Treatment Options. Am. J. Sports Med. *33*, 295–306.

de Almeida, D.C., Donizetti-Oliveira, C., Barbosa-Costa, P., Origassa, C.S., and Câmara, N.O. (2013). In search of mechanisms associated with mesenchymal stem cell-based therapies for acute kidney injury. Clin. Biochem. Rev. *34*, 131–144.

Almonte-Becerril, M., Navarro-Garcia, F., Gonzalez-Robles, A., Vega-Lopez, M.A., Lavalle, C., and Kouri, J.B. (2010). Cell death of chondrocytes is a combination between apoptosis and autophagy during the pathogenesis of Osteoarthritis within an experimental model. Apoptosis *15*, 631–638.

Altman, R.D., and Gold, G.E. (2007). Atlas of individual radiographic features in osteoarthritis, revised. Osteoarthritis Cartilage *15*, A1–A56.

Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhal, S., and Wood, M.J.A. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. Nat. Biotechnol. *29*, 341–345.

Anandacoomarasamy, A., Caterson, I., Sambrook, P., Fransen, M., and March, L. (2008). The impact of obesity on the musculoskeletal system. Int. J. Obes. *32*, 211–222.

Arden, N.K., Reading, I.C., Jordan, K.M., Thomas, L., Platten, H., Hassan, A., and Ledingham, J. (2008). A randomised controlled trial of tidal irrigation vs corticosteroid injection in knee osteoarthritis: the KIVIS Study. Osteoarthritis Cartilage *16*, 733–739.

Ashcroft, B.A., de Sonneville, J., Yuana, Y., Osanto, S., Bertina, R., Kuil, M.E., and Oosterkamp, T.H. (2012). Determination of the size distribution of blood microparticles directly in plasma using atomic force microscopy and microfluidics. Biomed. Microdevices *14*, 641–649.

Astle, M.V., Hannan, K.M., Ng, P.Y., Lee, R.S., George, A.J., Hsu, A.K., Haupt, Y., Hannan, R.D., and Pearson, R.B. (2012). AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. Oncogene *31*, 1949–1962.

Aygun, A.D., Gungor, S., Ustundag, B., Gurgoze, M.K., and Sen, Y. (2005). Proinflammatory Cytokines and Leptin Are Increased in Serum of Prepubertal Obese Children. Mediators Inflamm. *2005*, 180–183.

Azmi, A.S., Wang, Z., Philip, P.A., Mohammad, R.M., and Sarkar, F.H. (2011). Emerging Bcl-2 inhibitors for the treatment of cancer. Expert Opin. Emerg. Drugs *16*, 59–70.

Baar, M.P., Brandt, R.M.C., Putavet, D.A., Klein, J.D.D., Derks, K.W.J., Bourgeois, B.R.M., Stryeck, S., Rijksen, Y., van Willigenburg, H., Feijtel, D.A., et al. (2017). Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. Cell *169*, 132-147.e16.

Bae, N.S., and Baumann, P. (2007). A RAP1/TRF2 complex inhibits nonhomologous end-joining at human telomeric DNA ends. Mol. Cell *26*, 323–334.

Balaj, L., Lessard, R., Dai, L., Cho, Y.-J., Pomeroy, S.L., Breakefield, X.O., and Skog, J. (2011). Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. Nat. Commun. *2*, 180.

Bank, R.A., Soudry, M., Maroudas, A., Mizrahi, J., and TeKoppele, J.M. (2000). The increased swelling and instantaneous deformation of osteoarthritic cartilage is highly correlated with collagen degradation. Arthritis Rheum. *43*, 2202–2210.

Baraibar, M.A., Hyzewicz, J., Rogowska-Wrzesinska, A., Bulteau, A.-L., Prip-Buus, C., Butler-Browne, G., and Friguet, B. (2016). Impaired energy metabolism of senescent muscle satellite cells is associated with oxidative modifications of glycolytic enzymes. Aging *8*, 3375–3389.

Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.-V.F., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. Nature *444*, 633–637.

Barzilay, R., Melamed, E., and Offen, D. (2009). Introducing Transcription Factors to Multipotent Mesenchymal Stem Cells: Making Transdifferentiation Possible. Stem Cells *27*, 2509–2515.

Basisty, N., Kale, A., Jeon, O.H., Kuehnemann, C., Payne, T., Rao, C., Holtz, A., Shah, S., Sharma, V., Ferrucci, L., et al. (2020). A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. PLOS Biol. *18*, e3000599.

Beer, L., Zimmermann, M., Mitterbauer, A., Ellinger, A., Gruber, F., Narzt, M.-S., Zellner, M., Gyöngyösi, M., Madlener, S., Simader, E., et al. (2015). Analysis of the Secretome of Apoptotic Peripheral Blood Mononuclear Cells: Impact of Released Proteins and Exosomes for Tissue Regeneration. Sci. Rep. *5*, 16662.

Belo, J.N., Berger, M.Y., Reijman, M., Koes, B.W., and Bierma-Zeinstra, S.M.A. (2007). Prognostic factors of progression of osteoarthritis of the knee: A systematic review of observational studies. Arthritis Rheum. *57*, 13–26.

Benetos, A., Kark, J.D., Susser, E., Kimura, M., Sinnreich, R., Chen, W., Steenstrup, T., Christensen, K., Herbig, U., von Bornemann Hjelmborg, J., et al. (2013). Tracking and fixed ranking of leukocyte telomere length across the adult life course. Aging Cell *12*, 615–621.

Berenbaum, F. (2013). Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). Osteoarthritis Cartilage *21*, 16–21.

Bianco, P., Robey, P.G., and Simmons, P.J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. Cell Stem Cell *2*, 313–319.

Biernacka, A., Dobaczewski, M., and Frangogiannis, N.G. (2011). TGF-β signaling in fibrosis. Growth Factors *29*, 196–202.

Biran, A., Zada, L., Abou Karam, P., Vadai, E., Roitman, L., Ovadya, Y., Porat, Z., and Krizhanovsky, V. (2017). Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. Aging Cell *16*, 661–671.

Blackburn, E.H. (1991). Structure and function of telomeres. Nature *350*, 569–573.

Blaney Davidson, E.N., Remst, D.F.G., Vitters, E.L., van Beuningen, H.M., Blom, A.B., Goumans, M.-J., van den Berg, W.B., and van der Kraan, P.M. (2009). Increase in ALK1/ALK5 Ratio as a Cause for Elevated MMP-13 Expression in Osteoarthritis in Humans and Mice. J. Immunol. *182*, 7937–7945.

Bobrie, A., Colombo, M., Krumeich, S., Raposo, G., and Théry, C. (2012). Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. J. Extracell. Vesicles *1*, 18397.

Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., and Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. Science *279*, 349–352.

Böing, A.N., van der Pol, E., Grootemaat, A.E., Coumans, F.A.W., Sturk, A., and Nieuwland, R. (2014). Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. J. Extracell. Vesicles *3*, 23430.

Bondeson, J., Wainwright, S., Hughes, C., and Caterson, B. (2008). The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis: a review. Clin. Exp. Rheumatol. *26*, 139–145.

Bornstein, P., Kyriakides, T.R., Yang, Z., Armstrong, L.C., and Birk, D.E. (2000). Thrombospondin 2 Modulates Collagen Fibrillogenesis and Angiogenesis. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. *5*, 61–66.

Boulestreau, J., Véret, D., Brondello, J.-M., and Noël, D. (2020). La sénescence : de son implication physiopathologique aux traitements futurs. Rev. Rhum. Monogr.

Brama, P.A.J., Holopainen, J., Weeren, P.R., Firth, E.C., Helminen, H.J., and Hyttinen, M.M. (2009). Influence of exercise and joint topography on depth-related spatial distribution of proteoglycan and collagen content in immature equine articular cartilage. Equine Vet. J. *41*, 557–563.

Brown, J.M., Nemeth, K., Kushnir-Sukhov, N.M., Metcalfe, D.D., and Mezey, E. (2011). Bone marrow stromal cells inhibit mast cell function via a COX2-dependent mechanism: Mast cell inhibition by BMSC. Clin. Exp. Allergy *41*, 526–534.

Brown, M.L., Yukata, K., Farnsworth, C.W., Chen, D.-G., Awad, H., Hilton, M.J., O'Keefe, R.J., Xing, L., Mooney, R.A., and Zuscik, M.J. (2014). Delayed Fracture Healing and Increased Callus Adiposity in a C57BL/6J Murine Model of Obesity-Associated Type 2 Diabetes Mellitus. PLoS ONE *9*, e99656.

Bunout, D., Muñoz, C., López, M., de la Maza, M.P., Schlesinger, L., Hirsch, S., and Pettermann, M. (1996). Interleukin 1 and tumor necrosis factor in obese alcoholics compared with normal-weight patients. Am. J. Clin. Nutr. *63*, 373–376.

Burton, D.G.A., and Krizhanovsky, V. (2014). Physiological and pathological consequences of cellular senescence. Cell. Mol. Life Sci. *71*, 4373–4386.

Burton-Wurster, N., Lust, G., and Macleod, J.N. (1997). Cartilage fibronectin isoforms: In search of functions for a special populations of matrix glycoproteins. Matrix Biol. *15*, 441–454.

Busso, N., Peclat, V., So, A., and Sappino, A.-P. (1997). Plasminogen activation in synovial tissues: differences between normal, osteoarthritis, and rheumatoid arthritis joints. Ann. Rheum. Dis. *56*, 550–557.

Cahill, E.F., Kennelly, H., Carty, F., Mahon, B.P., and English, K. (2016). Hepatocyte Growth Factor Is Required for Mesenchymal Stromal Cell Protection Against Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis: MSC to Treat Pulmonary Fibrosis. STEM CELLS Transl. Med. *5*, 1307–1318.

Cai, S., Liu, A., Chen, S., He, H., Chen, Q., Xu, J., Pan, C., Yang, Y., Guo, F., Huang, Y., et al. (2015). Activation of Wnt/β-catenin signalling promotes mesenchymal stem cells to repair injured alveolar epithelium induced by lipopolysaccharide in mice. Stem Cell Res. Ther. *6*, 65.

Campbell, T.M., Churchman, S.M., Gomez, A., McGonagle, D., Conaghan, P.G., Ponchel, F., and Jones, E. (2016). Mesenchymal Stem Cell Alterations in Bone Marrow Lesions in Patients With Hip Osteoarthritis. Arthritis Rheumatol. *68*, 1648–1659.

Cantinieaux, D., Quertainmont, R., Blacher, S., Rossi, L., Wanet, T., Noël, A., Brook, G., Schoenen, J., and Franzen, R. (2013). Conditioned Medium from Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Recovery after Spinal Cord Injury in Rats: An Original Strategy to Avoid Cell Transplantation. PLoS ONE *8*, e69515.

Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc. *9*, 641–650.

Caplan, A.I. (2017). Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! Stem Cells Transl. Med. *6*, 1445–1451.

Caplan, A.I., and Dennis, J.E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J. Cell. Biochem. *98*, 1076–1084.

Caramés, B., Taniguchi, N., Otsuki, S., Blanco, F.J., and Lotz, M. (2010). Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. Arthritis Rheum. *62*, 791–801.

Caramés, B., Hasegawa, A., Taniguchi, N., Miyaki, S., Blanco, F.J., and Lotz, M. (2012a). Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis. Ann. Rheum. Dis. *71*, 575–581.

Caramés, B., Taniguchi, N., Seino, D., Blanco, F.J., D'Lima, D., and Lotz, M. (2012b). Mechanical injury suppresses autophagy regulators and pharmacologic activation of autophagy results in chondroprotection. Arthritis Rheum. *64*, 1182–1192.

Chan, K.T., Blake, S., Zhu, H., Kang, J., Trigos, A.S., Madhamshettiwar, P.B., Diesch, J., Paavolainen, L., Horvath, P., Hannan, R.D., et al. (2020). A functional genetic screen defines the AKT-induced senescence signaling network. Cell Death Differ. *27*, 725–741.

Chandler, W.L., Yeung, W., and Tait, J.F. (2011). A new microparticle size calibration standard for use in measuring smaller microparticles using a new flow cytometer: Size calibration and microparticles. J. Thromb. Haemost. *9*, 1216–1224.

Chandra, T., Kirschner, K., Thuret, J.-Y., Pope, B.D., Ryba, T., Newman, S., Ahmed, K., Samarajiwa, S.A., Salama, R., Carroll, T., et al. (2012). Independence of Repressive Histone Marks and Chromatin Compaction during Senescent Heterochromatic Layer Formation. Mol. Cell *47*, 203–214.

Chapman, J., Fielder, E., and Passos, J.F. (2019). Mitochondrial dysfunction and cell senescence: deciphering a complex relationship. FEBS Lett. *593*, 1566–1579.

Chargaff, E., and West, R. (1946). The biological significance of the thromboplastic protein of blood. J. Biol. Chem. *166*, 189–197.

Charlier, E., Deroyer, C., Ciregia, F., Malaise, O., Neuville, S., Plener, Z., Malaise, M., and de Seny, D. (2019). Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA). Biochem. Pharmacol. *165*, 49–65.

Charoenviriyakul, C., Takahashi, Y., Nishikawa, M., and Takakura, Y. (2018). Preservation of exosomes at room temperature using lyophilization. Int. J. Pharm. *553*, 1–7.

Chen, C., Skog, J., Hsu, C.-H., Lessard, R.T., Balaj, L., Wurdinger, T., Carter, B.S., Breakefield, X.O., Toner, M., and Irimia, D. (2010). Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. Lab Chip *10*, 505–511.

Chen, J., Si, L., Zhou, L., and Deng, Y. (2019). Role of bone marrow mesenchymal stem cells in the development of PQ-induced pulmonary fibrosis. Mol. Med. Rep.

Chen, P.-M., Liu, K.-J., Hsu, P.-J., Wei, C.-F., Bai, C.-H., Ho, L.-J., Sytwu, H.-K., and Yen, B.L. (2014). Induction of immunomodulatory monocytes by human mesenchymal stem cell-derived hepatocyte growth factor through ERK1/2. J. Leukoc. Biol. *96*, 295–303.

Chen, Y.-T., Wei, J.-D., Wang, J.-P., Lee, H.-H., Chiang, E.-R., Lai, H.-C., Chen, L.-L., Lee, Y.-T., Tsai, C.-C., Liu, C.-L., et al. (2011). Isolation of Mesenchymal Stem Cells From Human Ligamentum Flavum: Implicating Etiology of Ligamentum Flavum Hypertrophy. Spine *36*, E1193–E1200.

Chiche, A., Le Roux, I., von Joest, M., Sakai, H., Aguín, S.B., Cazin, C., Salam, R., Fiette, L., Alegria, O., Flamant, P., et al. (2017). Injury-Induced Senescence Enables In Vivo Reprogramming in Skeletal Muscle. Cell Stem Cell *20*, 407-414.e4.

Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J.E., Premsrirut, P., Luo, W., Chicas, A., Lee, C.S., et al. (2011). Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- B promotes senescence and enhances chemosensitivity. Genes Dev. *25*, 2125–2136.

Childs, B.G., Gluscevic, M., Baker, D.J., Laberge, R.-M., Marquess, D., Dananberg, J., and van Deursen, J.M. (2017). Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. Nat. Rev. Drug Discov. *16*, 718–735.

Chistiakov, D., Melnichenko, A., Myasoedova, V., Grechko, A., and Orekhov, A. (2017). Thrombospondins: A Role in Cardiovascular Disease. Int. J. Mol. Sci. *18*, 1540.

Cho, S., and Hwang, E.S. (2012). Status of mTOR activity may phenotypically differentiate senescence and quiescence. Mol. Cells *33*, 597–604.

Chondrogianni, N., Stratford, F.L.L., Trougakos, I.P., Friguet, B., Rivett, A.J., and Gonos, E.S. (2003). Central Role of the Proteasome in Senescence and Survival of Human Fibroblasts. J. Biol. Chem. *278*, 28026–28037.

Chuprin, A., Gal, H., Biron-Shental, T., Biran, A., Amiel, A., Rozenblatt, S., and Krizhanovsky, V. (2013). Cell fusion induced by ERVWE1 or measles virus causes cellular senescence. Genes Dev. *27*, 2356–2366.

Clark, J., and Huber, J. (1990). The structure of the human subchondral plate. J. Bone Joint Surg. Br. *72-B*, 866–873.

Cognault, J., Seurat, O., Chaussard, C., Ionescu, S., and Saragaglia, D. (2015). Reprise du sport après autogreffe ostéochondrale en mosaïque des condyles fémoraux : 25 cas à 9ans de recul moyen. Rev. Chir. Orthopédique Traumatol. *101*, 215–220.

Colombo, M., Raposo, G., and Théry, C. (2014). Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *30*, 255–289.

Conde, J., Scotece, M., Gómez, R., Lopez, V., Gómez-Reino, J.J., and Gualillo, O. (2011). Adipokines and Osteoarthritis: Novel Molecules Involved in the Pathogenesis and Progression of Disease. Arthritis *2011*, 1–8.

Coppé, J.-P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. PLoS Biol. *6*, e301.

Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. *5*, 99–118.

Coppé, J.-P., Rodier, F., Patil, C.K., Freund, A., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2011). Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. J. Biol. Chem. *286*, 36396–36403.

Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G.L., Pistoia, V., et al. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. Blood *107*, 367–372.

Correia-Melo, C., Marques, F.D.M., Anderson, R., Hewitt, G., Hewitt, R., Cole, J., Carroll, B.M., Miwa, S., Birch, J., Merz, A., et al. (2016). Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. EMBO J. *35*, 724–742.

Cory, S., Huang, D.C.S., and Adams, J.M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. Oncogene *22*, 8590–8607.

Coryell, P.R., Diekman, B.O., and Loeser, R.F. (2021). Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis. Nat. Rev. Rheumatol. *17*, 47–57.

Cosenza, S., Ruiz, M., Toupet, K., Jorgensen, C., and Noël, D. (2017). Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis. Sci. Rep. *7*, 16214.

Cosenza, S., Toupet, K., Maumus, M., Luz-Crawford, P., Blanc-Brude, O., Jorgensen, C., and Noël, D. (2018). Mesenchymal stem cells-derived exosomes are more immunosuppressive than microparticles in inflammatory arthritis. Theranostics *8*, 1399–1410.

Courtois-Cox, S., Jones, S.L., and Cichowski, K. (2008). Many roads lead to oncogene-induced senescence. Oncogene *27*, 2801–2809.

Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., et al. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. Cell Stem Cell *3*, 301–313.

Da Silva-Álvarez, S., Guerra-Varela, J., Sobrido-Cameán, D., Quelle, A., Barreiro-Iglesias, A., Sánchez, L., and Collado, M. (2020). Cell senescence contributes to tissue regeneration in zebrafish. Aging Cell *19*.

Dalton, A.J. (1975). Microvesicles and Vesicles of Multivesicular Bodies Versus "Virus-Like" Particles. JNCI J. Natl. Cancer Inst. *54*, 1137–1148.

D'Arrigo, D., Roffi, A., Cucchiarini, M., Moretti, M., Candrian, C., and Filardo, G. (2019). Secretome and Extracellular Vesicles as New Biological Therapies for Knee Osteoarthritis: A Systematic Review. J. Clin. Med. *8*.

Das, U.N. (2001). Is obesity an inflammatory condition? Nutrition *17*, 953–966.

Davaapil, H., Brockes, J.P., and Yun, M.H. (2016). Conserved and novel functions of programmed cellular senescence during vertebrate development. Development dev.138222.

De Broe, M.E., Wieme, R.J., Logghe, G.N., and Roels, F. (1977). Spontaneous shedding of plasma membrane fragments by human cells in vivo and in vitro. Clin. Chim. Acta *81*, 237–245.

Del Rey, M.J., Valín, Á., Usategui, A., Ergueta, S., Martín, E., Municio, C., Cañete, J.D., Blanco, F.J., Criado, G., and Pablos, J.L. (2019). Senescent synovial fibroblasts accumulate prematurely in rheumatoid arthritis tissues and display an enhanced inflammatory phenotype. Immun. Ageing *16*, 29.

Delplace, V., Boutet, M.-A., Le Visage, C., Maugars, Y., Guicheux, J., and Vinatier, C. (2021). Arthrose : des traitements à venir aux traitements d'avenir. Rev. Rhum. Monogr. *88*, 165–171.

Desando, G., Cavallo, C., Sartoni, F., Martini, L., Parrilli, A., Veronesi, F., Fini, M., Giardino, R., Facchini, A., and Grigolo, B. (2013). Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. Arthritis Res. Ther. *15*, R22.

Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre', M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. Nature *444*, 638–642.

Di Micco, R., Sulli, G., Dobreva, M., Liontos, M., Botrugno, O.A., Gargiulo, G., dal Zuffo, R., Matti, V., d'Ario, G., Montani, E., et al. (2011). Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. Nat. Cell Biol. *13*, 292–302.

Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D., and d'Adda di Fagagna, F. (2021). Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *22*, 75–95.

Diekman, B.O., Sessions, G.A., Collins, J.A., Knecht, A.K., Strum, S.L., Mitin, N.K., Carlson, C.S., Loeser, R.F., and Sharpless, N.E. (2018). Expression of p16INK4a is a biomarker of chondrocyte aging but does not cause osteoarthritis. Aging Cell *17*, e12771.

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 9363–9367.

Ding, C., Stannus, O., Cicuttini, F., Antony, B., and Jones, G. (2013). Body fat is associated with increased and lean mass with decreased knee cartilage loss in older adults: a prospective cohort study. Int. J. Obes. *37*, 822–827.

D'Mello, M.J.J., Ross, S.A., Briel, M., Anand, S.S., Gerstein, H., and Paré, G. (2015). Association Between Shortened Leukocyte Telomere Length and Cardiometabolic Outcomes: Systematic Review and Meta-Analysis. Circ. Cardiovasc. Genet. *8*, 82–90.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., and Horwitz, E.M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy *8*, 315–317.

Donell, S. (2019). Subchondral bone remodelling in osteoarthritis. EFORT Open Rev. *4*, 221–229.

Dou, Z., Xu, C., Donahue, G., Shimi, T., Pan, J.-A., Zhu, J., Ivanov, A., Capell, B.C., Drake, A.M., Shah, P.P., et al. (2015). Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. Nature *527*, 105–109.

Dou, Z., Ghosh, K., Vizioli, M.G., Zhu, J., Sen, P., Wangensteen, K.J., Simithy, J., Lan, Y., Lin, Y., Zhou, Z., et al. (2017). Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. Nature *550*, 402–406.

Dreesen, O., Chojnowski, A., Ong, P.F., Zhao, T.Y., Common, J.E., Lunny, D., Lane, E.B., Lee, S.J., Vardy, L.A., Stewart, C.L., et al. (2013a). Lamin B1 fluctuations have differential effects on cellular proliferation and senescence. J. Cell Biol. *200*, 605–617.

Dreesen, O., Ong, P.F., Chojnowski, A., and Colman, A. (2013b). The contrasting roles of lamin B1 in cellular aging and human disease. Nucleus *4*, 283–290.

D'Souza-Schorey, C., and Clancy, J.W. (2012). Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. Genes Dev. *26*, 1287–1299.

Dulić, V., Beney, G.E., Frebourg, G., Drullinger, L.F., and Stein, G.H. (2000). Uncoupling between phenotypic senescence and cell cycle arrest in aging p21-deficient fibroblasts. Mol. Cell. Biol. *20*, 6741–6754.

Duman, D.G., Zibandeh, N., Ugurlu, M.U., Celikel, C., Akkoc, T., Banzragch, M., Genc, D., Ozdogan, O., and Akkoc, T. (2019). Mesenchymal stem cells suppress hepatic fibrosis accompanied by expanded intrahepatic natural killer cells in rat fibrosis model. Mol. Biol. Rep. *46*, 2997–3008.

Duncan, B.B., Schmidt, M.I., Pankow, J.S., Ballantyne, C.M., Couper, D., Vigo, A., Hoogeveen, R., Folsom, A.R., and Heiss, G. (2003). Low-Grade Systemic Inflammation and the Development of Type 2 Diabetes: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. Diabetes *52*, 1799–1805.

Eggli, P.S., Herrmann, W., Hunziker, E.B., and Schenk, R.K. (1985). Matrix compartments in the growth plate of the proximal tibia of rats. Anat. Rec. *211*, 246–257.

Eliopoulos, N., Zhao, J., Bouchentouf, M., Forner, K., Birman, E., Yuan, S., Boivin, M.-N., and Martineau, D. (2010). Human marrow-derived mesenchymal stromal cells decrease cisplatin renotoxicity in vitro and in vivo and enhance survival of mice post-intraperitoneal injection. Am. J. Physiol.-Ren. Physiol. *299*, F1288–F1298.

Eom, Y.W., Shim, K.Y., and Baik, S.K. (2015). Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. Korean J. Intern. Med. *30*, 580–589.

Erices, A., Conget, P., and Minguell, J.J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood: Mesenchymal Progenitors in Cord Blood. Br. J. Haematol. *109*, 235–242.

Evangelou, K., Lougiakis, N., Rizou, S.V., Kotsinas, A., Kletsas, D., Muñoz-Espín, D., Kastrinakis, N.G., Pouli, N., Marakos, P., Townsend, P., et al. (2017). Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens. Aging Cell *16*, 192–197.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature *292*, 154–156.

Fabbri, E., An, Y., Zoli, M., Simonsick, E.M., Guralnik, J.M., Bandinelli, S., Boyd, C.M., and Ferrucci, L. (2015). Aging and the Burden of Multimorbidity: Associations With Inflammatory and Anabolic Hormonal Biomarkers. J. Gerontol. Ser. A *70*, 63–70.

Fafián-Labora, J., Lesende-Rodriguez, I., Fernández-Pernas, P., Sangiao-Alvarellos, S., Monserrat, L., Arntz, O.J., van de Loo, F.J., Mateos, J., and Arufe, M.C. (2017). Effect of age on pro-inflammatory miRNAs contained in mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. Sci. Rep. *7*, 43923.

Fafián-Labora, J., Morente-López, M., Sánchez-Dopico, M.J., Arntz, O.J., van de Loo, F.A.J., De Toro, J., and Arufe, M.C. (2020). Influence of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in vitro and their role in ageing. Stem Cell Res. Ther. *11*, 13.

Fafián-Labora, J.A., Morente-López, M., and Arufe, M.C. (2019). Effect of aging on behaviour of mesenchymal stem cells. World J. Stem Cells *11*, 337–346.

Fagagna, F. d'Adda di, Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. Nature *426*, 194–198.

Fain, J.N. (2010). Release of Inflammatory Mediators by Human Adipose Tissue Is Enhanced in Obesity and Primarily by the Nonfat Cells: A Review. Mediators Inflamm. *2010*, 1–20.

Farr, J.N., Fraser, D.G., Wang, H., Jaehn, K., Ogrodnik, M.B., Weivoda, M.M., Drake, M.T., Tchkonia, T., LeBrasseur, N.K., Kirkland, J.L., et al. (2016). Identification of Senescent Cells in the Bone Microenvironment: SENESCENCE IN THE BONE MICROENVIRONMENT. J. Bone Miner. Res. *31*, 1920–1929.

Felson, D.T. (1988). Obesity and Knee Osteoarthritis: The Framingham Study. Ann. Intern. Med. *109*, 18.

Felson, D.T., Naimark, A., Anderson, J., Kazis, L., Castelli, W., and Meenan, R.F. (1987). The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. the framingham osteoarthritis study. Arthritis Rheum. *30*, 914–918.

Felson, D.T., Goggins, J., Niu, J., Zhang, Y., and Hunter, D.J. (2004). The effect of body weight on progression of knee osteoarthritis is dependent on alignment. Arthritis Rheum. *50*, 3904–3909.

Feng, D., Zhao, W.-L., Ye, Y.-Y., Bai, X.-C., Liu, R.-Q., Chang, L.-F., Zhou, Q., and Sui, S.-F. (2010). Cellular Internalization of Exosomes Occurs Through Phagocytosis. Traffic *11*, 675–687.

Fernandes, J.C., Martel-Pelletier, J., and Pelletier, J.-P. (2002). The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. Biorheology *39*, 237–246.

Fernandes, L., Hagen, K.B., Bijlsma, J.W.J., Andreassen, O., Christensen, P., Conaghan, P.G., Doherty, M., Geenen, R., Hammond, A., Kjeken, I., et al. (2013). EULAR recommendations for the non-pharmacological core management of hip and knee osteoarthritis. Ann. Rheum. Dis. *72*, 1125–1135.

Fitzgerald, J., Leonard, P., Darcy, E., Sharma, S., and O'Kennedy, R. (2017). Immunoaffinity Chromatography: Concepts and Applications. In Protein Chromatography, D. Walls, and S.T. Loughran, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 27–51.

Fitzner, B., Müller, S., Walther, M., Fischer, M., Engelmann, R., Müller-Hilke, B., Pützer, B.M., Kreutzer, M., Nizze, H., and Jaster, R. (2012). Senescence determines the fate of activated rat pancreatic stellate cells. J. Cell. Mol. Med. *16*, 2620–2630.

Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., and De Benedictis, G. (2006). Inflamm-aging: An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. Ann. N. Y. Acad. Sci. *908*, 244–254.

Fransès, R.E., McWilliams, D.F., Mapp, P.I., and Walsh, D.A. (2010). Osteochondral angiogenesis and increased protease inhibitor expression in OA. Osteoarthritis Cartilage *18*, 563–571.

Freund, A., Orjalo, A.V., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. Trends Mol. Med. *16*, 238–246.

Freund, A., Laberge, R.-M., Demaria, M., and Campisi, J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. Mol. Biol. Cell *23*, 2066–2075.

Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I., and Frolova, G.P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation *6*, 230–247.

Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., and Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet. *3*, 393–403.

Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., Latsinik, N.V., Panasyuk, A.F., and Keiliss-Borok, I.V. (1974). STROMAL CELLS RESPONSIBLE FOR TRANSFERRING THE MICROENVIRONMENT OF THE HEMOPOIETIC TISSUES: Cloning In Vitro and Retransplantation In Vivo. Transplantation *17*, 331–340.

Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D., Kaplunov, J.M., Bucci, G., Dobreva, M., Matti, V., Beausejour, C.M., et al. (2012). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. Nat. Cell Biol. *14*, 355–365.

Fumagalli, M., Rossiello, F., Mondello, C., and d'Adda di Fagagna, F. (2014). Stable Cellular Senescence Is Associated with Persistent DDR Activation. PLoS ONE *9*, e110969.

Gabel, V., Miglis, M., and Zeitzer, J.M. (2020). Effect of artificial dawn light on cardiovascular function, alertness, and balance in middle-aged and older adults. Sleep *43*, zsaa082.

Gaffney, K., Ledingham, J., and Perry, J.D. (1995). Intra-articular triamcinolone hexacetonide in knee osteoarthritis: factors influencing the clinical response. Ann. Rheum. Dis. *54*, 379–381.

Gal, H., Lysenko, M., Stroganov, S., Vadai, E., Youssef, S.A., Tzadikevitch-Geffen, K., Rotkopf, R., Biron-Shental, T., Bruin, A., Neeman, M., et al. (2019). Molecular pathways of senescence regulate placental structure and function. EMBO J. *38*.

Galbiati, A., Beauséjour, C., and Fagagna, F. d'Adda di (2017). A novel single-cell method provides direct evidence of persistent DNA damage in senescent cells and aged mammalian tissues. Aging Cell *16*, 422–427.

Gao, S., Mao, F., Zhang, B., Zhang, L., Zhang, X., Wang, M., Yan, Y., Yang, T., Zhang, J., Zhu, W., et al. (2014a). Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce macrophage M2 polarization through the nuclear factor-κB and signal transducer and activator of transcription 3 pathways. Exp. Biol. Med. *239*, 366–375.

Gao, Y., Liu, S., Huang, J., Guo, W., Chen, J., Zhang, L., Zhao, B., Peng, J., Wang, A., Wang, Y., et al. (2014b). The ECM-Cell Interaction of Cartilage Extracellular Matrix on Chondrocytes. BioMed Res. Int. *2014*, 1–8.

García-Bernal, D., García-Arranz, M., Yáñez, R.M., Hervás-Salcedo, R., Cortés, A., Fernández-García, M., Hernando-Rodríguez, M., Quintana-Bustamante, Ó., Bueren, J.A., García-Olmo, D., et al. (2021). The Current Status of Mesenchymal Stromal Cells: Controversies, Unresolved Issues and Some Promising Solutions to Improve Their Therapeutic Efficacy. Front. Cell Dev. Biol. *9*, 650664.

García-Prat, L., Martínez-Vicente, M., Perdiguero, E., Ortet, L., Rodríguez-Ubreva, J., Rebollo, E., Ruiz-Bonilla, V., Gutarra, S., Ballestar, E., Serrano, A.L., et al. (2016). Autophagy maintains stemness by preventing senescence. Nature *529*, 37–42.

Ghannam, S., Pène, J., Moquet-Torcy, G., Torcy-Moquet, G., Jorgensen, C., and Yssel, H. (2010). Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *185*, 302–312.

Girdlestone, J., Limbani, V.A., Cutler, A.J., and Navarrete, C.V. (2009). Efficient expansion of mesenchymal stromal cells from umbilical cord under low serum conditions. Cytotherapy *11*, 738–748.

Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P.J., Lam, E.W.-F., and Dazzi, F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. Blood *105*, 2821–2827.

Glyn-Jones, S., Palmer, A.J.R., Agricola, R., Price, A.J., Vincent, T.L., Weinans, H., and Carr, A.J. (2015). Osteoarthritis. Lancet Lond. Engl. *386*, 376–387.

Gnani, D., Crippa, S., Della Volpe, L., Rossella, V., Conti, A., Lettera, E., Rivis, S., Ometti, M., Fraschini, G., Bernardo, M.E., et al. (2019). An early-senescence state in aged mesenchymal stromal cells contributes to hematopoietic stem and progenitor cell clonogenic impairment through the activation of a pro-inflammatory program. Aging Cell *18*, e12933.

Godwin, M., and Dawes, M. (2004). Intra-articular steroid injections for painful knees. Systematic review with meta-analysis. Can. Fam. Physician Med. Fam. Can. *50*, 241–248.

Gronthos, S., Zannettino, A.C.W., Hay, S.J., Shi, S., Graves, S.E., Kortesidis, A., and Simmons, P.J. (2003). Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. J. Cell Sci. *116*, 1827–1835.

Guermazi, A., Niu, J., Hayashi, D., Roemer, F.W., Englund, M., Neogi, T., Aliabadi, P., McLennan, C.E., and Felson, D.T. (2012). Prevalence of abnormalities in knees detected by MRI in adults without knee osteoarthritis: population based observational study (Framingham Osteoarthritis Study). BMJ *345*, e5339–e5339.

Guilak, F., and Mow, V.C. (2000). The mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell–matrix interactions in articular cartilage. J. Biomech. *33*, 1663–1673.

Gurunathan, S., Kang, M.-H., Jeyaraj, M., Qasim, M., and Kim, J.-H. (2019). Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. Cells *8*, 307.

Halász, K., Kassner, A., Mörgelin, M., and Heinegård, D. (2007). COMP Acts as a Catalyst in Collagen Fibrillogenesis. J. Biol. Chem. *282*, 31166–31173.

Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G., and Bartek, J. (2008). An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. Science *319*, 1352–1355.

Hamilton, M.L., Van Remmen, H., Drake, J.A., Yang, H., Guo, Z.M., Kewitt, K., Walter, C.A., and Richardson, A. (2001). Does oxidative damage to DNA increase with age? Proc. Natl. Acad. Sci. *98*, 10469–10474.

Hansen, M., Rubinsztein, D.C., and Walker, D.W. (2018). Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *19*, 579–593.

Hansen, U., Platz, N., Becker, A., Bruckner, P., Paulsson, M., and Zaucke, F. (2011). A secreted variant of cartilage oligomeric matrix protein carrying a chondrodysplasia-causing mutation (p.H587R) disrupts collagen fibrillogenesis. Arthritis Rheum. *63*, 159–167.

Harding, C., Heuser, J., and Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. J. Cell Biol. *97*, 329–339.

Hardingham, T., and Bayliss, M. (1990). Proteoglycans of articular cartilage: Changes in aging and in joint disease. Semin. Arthritis Rheum. *20*, 12–33.

Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., and Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. Cell Commun. Signal. *9*, 12.

Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. *37*, 614–636.

Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. *25*, 585–621.

He, S., and Sharpless, N.E. (2017). Senescence in Health and Disease. Cell *169*, 1000–1011.

He, A., Jiang, Y., Gui, C., Sun, Y., Li, J., and Wang, J. (2009). The antiapoptotic effect of mesenchymal stem cell transplantation on ischemic myocardium is enhanced by anoxic preconditioning. Can. J. Cardiol. *25*, 353–358.

Hemann, M.T., Strong, M.A., Hao, L.Y., and Greider, C.W. (2001). The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. Cell *107*, 67–77.

Hemler, M.E. (2003). Tetraspanin Proteins Mediate Cellular Penetration, Invasion, and Fusion Events and Define a Novel Type of Membrane Microdomain. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *19*, 397–422.

Henriksen, K., Neutzsky-Wulff, A.V., Bonewald, L.F., and Karsdal, M.A. (2009). Local communication on and within bone controls bone remodeling. Bone *44*, 1026–1033.

Heo, J.S., Choi, Y., Kim, H.-S., and Kim, H.O. (2016). Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. Int. J. Mol. Med. *37*, 115–125.

Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P.C., Chen, D.J., and Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). Mol. Cell *14*, 501–513.

Hewitt, G., Jurk, D., Marques, F.D.M., Correia-Melo, C., Hardy, T., Gackowska, A., Anderson, R., Taschuk, M., Mann, J., and Passos, J.F. (2012). Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. Nat. Commun. *3*, 708.

Hickson, L.J., Langhi Prata, L.G.P., Bobart, S.A., Evans, T.K., Giorgadze, N., Hashmi, S.K., Herrmann, S.M., Jensen, M.D., Jia, Q., Jordan, K.L., et al. (2019). Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. EBioMedicine *47*, 446–456.

Hirano, T., Yamaguchi, R., Asami, S., Iwamoto, N., and Kasai, H. (1996). 8-Hydroxyguanine Levels in Nuclear DNA and Its Repair Activity in Rat Organs Associated With Age. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. *51A*, B303–B307.

den Hollander, W., Pulyakhina, I., Boer, C., Bomer, N., van der Breggen, R., Arindrarto, W., Couthino de Almeida, R., Lakenberg, N., Sentner, T., Laros, J.F.J., et al. (2019). Annotating Transcriptional Effects of Genetic Variants in Disease-Relevant Tissue: Transcriptome-Wide Allelic Imbalance in Osteoarthritic Cartilage. Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ *71*, 561–570.

van den Hoogen, P., de Jager, S.C.A., Mol, E.A., Schoneveld, A.S., Huibers, M.M.H., Vink, A., Doevendans, P.A., Laman, J.D., and Sluijter, J.P.G. (2019). Potential of mesenchymal- and cardiac progenitor cells for therapeutic targeting of B-cells and antibody responses in end-stage heart failure. PLOS ONE *14*, e0227283.

Hoogendijk, E.O., Afilalo, J., Ensrud, K.E., Kowal, P., Onder, G., and Fried, L.P. (2019). Frailty: implications for clinical practice and public health. The Lancet *394*, 1365–1375.

Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., and Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy *7*, 393–395.

Huang, R., Qin, C., Wang, J., Hu, Y., Zheng, G., Qiu, G., Ge, M., Tao, H., Shu, Q., and Xu, J. (2019). Differential effects of extracellular vesicles from aging and young mesenchymal stem cells in acute lung injury. Aging *11*, 7996–8014.

Hügle, T., and Geurts, J. (2016). What drives osteoarthritis?—synovial *versus* subchondral bone pathology. Rheumatology kew389.

Hunter, D.J., Gerstenfeld, L., Bishop, G., Davis, A.D., Mason, Z.D., Einhorn, T.A., Maciewicz, R.A., Newham, P., Foster, M., Jackson, S., et al. (2009). Bone marrow lesions from osteoarthritis knees are characterized by sclerotic bone that is less well mineralized. Arthritis Res. Ther. *11*, R11.

ter Huurne, M., Schelbergen, R., Blattes, R., Blom, A., de Munter, W., Grevers, L.C., Jeanson, J., Noël, D., Casteilla, L., Jorgensen, C., et al. (2012). Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. Arthritis Rheum. *64*, 3604–3613.

Imberti, B., Morigi, M., Tomasoni, S., Rota, C., Corna, D., Longaretti, L., Rottoli, D., Valsecchi, F., Benigni, A., Wang, J., et al. (2007). Insulin-Like Growth Factor-1 Sustains Stem Cell–Mediated Renal Repair. J. Am. Soc. Nephrol. *18*, 2921–2928.

Institute of Medical Sciences, Foresterhill, Aberdeen AB25 2ZD, UK, Augello, A., Kurth, T., and De Bari, C. (2010). Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. Eur. Cell. Mater. *20*, 121–133.

Ivanov, A., Pawlikowski, J., Manoharan, I., van Tuyn, J., Nelson, D.M., Rai, T.S., Shah, P.P., Hewitt, G., Korolchuk, V.I., Passos, J.F., et al. (2013). Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. J. Cell Biol. *202*, 129–143.

Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. Nature *461*, 1071–1078.

Jahn, R., and Südhof, T.C. (1999). Membrane Fusion and Exocytosis. Annu. Rev. Biochem. *68*, 863–911.

Jaiprakash, A., Prasadam, I., Feng, J.Q., Liu, Y., Crawford, R., and Xiao, Y. (2012). Phenotypic Characterization of Osteoarthritic Osteocytes from the Sclerotic Zones: A Possible Pathological Role in Subchondral Bone Sclerosis. Int. J. Biol. Sci. *8*, 406–417.

Jeck, W.R., Siebold, A.P., and Sharpless, N.E. (2012). Review: a meta-analysis of GWAS and age-associated diseases: GWAS and age-associated diseases. Aging Cell *11*, 727–731.

Jeon, O.H., Kim, C., Laberge, R.-M., Demaria, M., Rathod, S., Vasserot, A.P., Chung, J.W., Kim, D.H., Poon, Y., David, N., et al. (2017). Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. Nat. Med. *23*, 775–781.

Johnson, S.C., Dong, X., Vijg, J., and Suh, Y. (2015). Genetic evidence for common pathways in human age-related diseases. Aging Cell *14*, 809–817.

Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., and Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). J. Biol. Chem. *262*, 9412–9420.

Jung, T., Bader, N., and Grune, T. (2007). Lipofuscin: Formation, Distribution, and Metabolic Consequences. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1119*, 97–111.

Justice, J.N., Nambiar, A.M., Tchkonia, T., LeBrasseur, N.K., Pascual, R., Hashmi, S.K., Prata, L., Masternak, M.M., Kritchevsky, S.B., Musi, N., et al. (2019). Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study. EBioMedicine *40*, 554–563.

Kafienah, W., Brömme, D., Buttle, D.J., Croucher, L.J., and Hollander, A.P. (1998). Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. Biochem. J. *331*, 727–732.

Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grosveld, G., and Sherr, C.J. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. Cell *91*, 649–659.

Kang, H.T., Park, J.T., Choi, K., Kim, Y., Choi, H.J.C., Jung, C.W., Lee, Y.-S., and Park, S.C. (2017). Chemical screening identifies ATM as a target for alleviating senescence. Nat. Chem. Biol. *13*, 616–623.

Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J.-P., and Fahmi, H. (2011). Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. Nat. Rev. Rheumatol. *7*, 33–42.

Karlson, E.W., Mandl, L.A., Aweh, G.N., Sangha, O., Liang, M.H., and Grodstein, F. (2003). Total hip replacement due to osteoarthritis: the importance of age, obesity, and other modifiable risk factors. Am. J. Med. *114*, 93–98.

Kassis, I., Zangi, L., Rivkin, R., Levdansky, L., Samuel, S., Marx, G., and Gorodetsky, R. (2006). Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. Bone Marrow Transplant. *37*, 967–976.

Katz, A.J., Tholpady, A., Tholpady, S.S., Shang, H., and Ogle, R.C. (2005). Cell Surface and Transcriptional Characterization of Human Adipose-Derived Adherent Stromal (hADAS) Cells. Stem Cells *23*, 412–423.

Keller, S., Ridinger, J., Rupp, A.-K., Janssen, J.W., and Altevogt, P. (2011). Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. J. Transl. Med. *9*, 86.

Kellgren, J.H., and Lawrence, J.S. (1957). Radiological assessment of osteo-arthrosis. Ann. Rheum. Dis. *16*, 494–502.

Kempson, G., Muir, H., Pollard, C., and Tuke, M. (1973). The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. *297*, 456–472.

Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., and Bieback, K. (2006). Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. Stem Cells *24*, 1294–1301.

Kerns, J.G., Gikas, P.D., Buckley, K., Shepperd, A., Birch, H.L., McCarthy, I., Miles, J., Briggs, T.W.R., Keen, R., Parker, A.W., et al. (2014). Evidence from Raman Spectroscopy of a Putative Link Between Inherent Bone Matrix Chemistry and Degenerative Joint Disease. Arthritis Rheumatol. *66*, 1237–1246.

Kim, S.-Y., Lee, J.-H., Kim, H.J., Park, M.K., Huh, J.W., Ro, J.Y., Oh, Y.-M., Lee, S.-D., and Lee, Y.-S. (2012). Mesenchymal stem cell-conditioned media recovers lung fibroblasts from cigarette smoke-induced damage. Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol. *302*, L891–L908.

Kirkwood, T.B.L. (2005). Understanding the odd science of aging. Cell *120*, 437–447.

Klein-Wieringa, I.R., de Lange-Brokaar, B.J.E., Yusuf, E., Andersen, S.N., Kwekkeboom, J.C., Kroon, H.M., van Osch, G.J.V.M., Zuurmond, A.-M., Stojanovic-Susulic, V., Nelissen, R.G.H.H., et al. (2016). Inflammatory Cells in Patients with Endstage Knee Osteoarthritis: A Comparison between the Synovium and the Infrapatellar Fat Pad. J. Rheumatol. *43*, 771–778.

de Klerk, B.M., Schiphof, D., Groeneveld, F.P.M.J., Koes, B.W., van Osch, G.J.V.M., van Meurs, J.B.J., and Bierma-Zeinstra, S.M.A. (2009). No clear association between female hormonal aspects and osteoarthritis of the hand, hip and knee: a systematic review. Rheumatology *48*, 1160–1165.

Kloppenburg, M., and Berenbaum, F. (2020). Osteoarthritis year in review 2019: epidemiology and therapy. Osteoarthritis Cartilage *28*, 242–248.

Kloppenburg, M., Kroon, F.P., Blanco, F.J., Doherty, M., Dziedzic, K.S., Greibrokk, E., Haugen, I.K., Herrero-Beaumont, G., Jonsson, H., Kjeken, I., et al. (2019). 2018 update of the EULAR recommendations for the management of hand osteoarthritis. Ann. Rheum. Dis. *78*, 16–24.

Koliha, N., Wiencek, Y., Heider, U., Jüngst, C., Kladt, N., Krauthäuser, S., Johnston, I.C.D., Bosio, A., Schauss, A., and Wild, S. (2016). A novel multiplex bead-based platform highlights the diversity of extracellular vesicles. J. Extracell. Vesicles *5*, 29975.

Kolios, G., and Moodley, Y. (2013). Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. Respiration *85*, 3–10.

Kooijmans, S.A.A., Schiffelers, R.M., Zarovni, N., and Vago, R. (2016). Modulation of tissue tropism and biological activity of exosomes and other extracellular vesicles: New nanotools for cancer treatment. Pharmacol. Res. *111*, 487–500.

van der Kraan, P.M., Blaney Davidson, E.N., and van den Berg, W.B. (2010). A role for age-related changes in TGFβ signaling in aberrant chondrocyte differentiation and osteoarthritis. Arthritis Res. Ther. *12*, 201.

Krampera, M., Galipeau, J., Shi, Y., Tarte, K., and Sensebe, L. (2013). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells—The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. Cytotherapy *15*, 1054–1061.

Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R.A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., and Lowe, S.W. (2008). Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. Cell *134*, 657–667.

Kroon, F.P.B., Carmona, L., Schoones, J.W., and Kloppenburg, M. (2018). Efficacy and safety of non-pharmacological, pharmacological and surgical treatment for hand osteoarthritis: a systematic literature review informing the 2018 update of the EULAR recommendations for the management of hand osteoarthritis. RMD Open *4*, e000734.

Kuilman, T., and Peeper, D.S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. Nat. Rev. Cancer *9*, 81–94.

Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. J. Cell Sci. *113 (Pt 20)*, 3613–3622.

Kwiecinski, M., Noetel, A., Elfimova, N., Trebicka, J., Schievenbusch, S., Strack, I., Molnar, L., von Brandenstein, M., Töx, U., Nischt, R., et al. (2011). Hepatocyte Growth Factor (HGF) Inhibits Collagen I and IV Synthesis in Hepatic Stellate Cells by miRNA-29 Induction. PLoS ONE *6*, e24568.

Kwon, S., Ki, S.M., Park, S.E., Kim, M.-J., Hyung, B., Lee, N.K., Shim, S., Choi, B.-O., Na, D.L., Lee, J.E., et al. (2016). Anti-apoptotic Effects of Human Wharton's Jelly-derived Mesenchymal Stem Cells on Skeletal Muscle Cells Mediated via Secretion of XCL1. Mol. Ther. *24*, 1550–1560.

Kyriakides, T.R., Zhu, Y.-H., Smith, L.T., Bain, S.D., Yang, Z., Lin, M.T., Danielson, K.G., Iozzo, R.V., LaMarca, M., McKinney, C.E., et al. (1998). Mice That Lack Thrombospondin 2 Display Connective Tissue Abnormalities That Are Associated with Disordered Collagen Fibrillogenesis, an Increased Vascular Density, and a Bleeding Diathesis. J. Cell Biol. *140*, 419–430.

Lai, W.M., Hou, J.S., and Mow, V.C. (1991). A Triphasic Theory for the Swelling and Deformation Behaviors of Articular Cartilage. J. Biomech. Eng. *113*, 245–258.

Lan, Y.-W., Theng, S.-M., Huang, T.-T., Choo, K.-B., Chen, C.-M., Kuo, H.-P., and Chong, K.-Y. (2017). Oncostatin M-Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Alleviate Bleomycin-Induced Pulmonary

Fibrosis Through Paracrine Effects of the Hepatocyte Growth Factor: OSM-Preconditioned MSCs Ameliorate Lung Fibrosis. STEM CELLS Transl. Med. *6*, 1006–1017.

de Lange-Brokaar, B.J.E., Ioan-Facsinay, A., van Osch, G.J.V.M., Zuurmond, A.-M., Schoones, J., Toes, R.E.M., Huizinga, T.W.J., and Kloppenburg, M. (2012). Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. Osteoarthritis Cartilage *20*, 1484–1499.

Lässer, C. (2015). Exosomes in diagnostic and therapeutic applications: biomarker, vaccine and RNA interference delivery vehicle. Expert Opin. Biol. Ther. *15*, 103–117.

Le Boulch, M., Ahmed, E.K., Rogowska-Wrzesinska, A., Baraibar, M.A., and Friguet, B. (2018). Proteome oxidative carbonylation during oxidative stress-induced premature senescence of WI-38 human fibroblasts. Mech. Ageing Dev. *170*, 59–71.

Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D., and Hwang, E.S. (2006). Senescence-associated β-galactosidase is lysosomal β-galactosidase. Aging Cell *5*, 187–195.

Lehmann, B.D., Paine, M.S., Brooks, A.M., McCubrey, J.A., Renegar, R.H., Wang, R., and Terrian, D.M. (2008). Senescence-Associated Exosome Release from Human Prostate Cancer Cells. Cancer Res. *68*, 7864–7871.

Lei, Q., Liu, T., Gao, F., Xie, H., Sun, L., Zhao, A., Ren, W., Guo, H., Zhang, L., Wang, H., et al. (2017). Microvesicles as Potential Biomarkers for the Identification of Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells. Theranostics *7*, 2673–2689.

Leifer, V.P., Katz, J.N., and Losina, E. (2021). The burden of OA-health services and economics. Osteoarthritis Cartilage.

Lener, T., Gimona, M., Aigner, L., Börger, V., Buzas, E., Camussi, G., Chaput, N., Chatterjee, D., Court, F.A., Portillo, H.A. del, et al. (2015). Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials – an ISEV position paper. J. Extracell. Vesicles *4*, 30087.

Lewis, G.N., Rice, D.A., McNair, P.J., and Kluger, M. (2015). Predictors of persistent pain after total knee arthroplasty: a systematic review and meta-analysis. Br. J. Anaesth. *114*, 551–561.

Li, P., Kaslan, M., Lee, S.H., Yao, J., and Gao, Z. (2017). Progress in Exosome Isolation Techniques. Theranostics *7*, 789–804.

Li, W., Jiang, H., and Feng, J.-M. (2012). Isogenic mesenchymal stem cells transplantation improves a rat model of chronic aristolochic acid nephropathy via upregulation of hepatic growth factor and downregulation of transforming growth factor β1. Mol. Cell. Biochem. *368*, 137–145.

Linn, F.C., and Sokoloff, L. (1965). Movement and composition of interstitial fluid of cartilage. Arthritis Rheum. *8*, 481–494.

Liu, J., Yu, F., Sun, Y., Jiang, B., Zhang, W., Yang, J., Xu, G.-T., Liang, A., and Liu, S. (2015). Concise Reviews: Characteristics and Potential Applications of Human Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: An Overview of Human Dental Tissue-Derived MSCs. STEM CELLS *33*, 627–638.

Liu, S., Mahairaki, V., Bai, H., Ding, Z., Li, J., Witwer, K.W., and Cheng, L. (2019). Highly Purified Human Extracellular Vesicles Produced by Stem Cells Alleviate Aging Cellular Phenotypes of Senescent Human Cells. Stem Cells Dayt. Ohio *37*, 779–790.

Livshits, M.A., Khomyakova, E., Evtushenko, E.G., Lazarev, V.N., Kulemin, N.A., Semina, S.E., Generozov, E.V., and Govorun, V.M. (2015). Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. Sci. Rep. *5*, 17319.

Lo Cicero, A., Stahl, P.D., and Raposo, G. (2015). Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. Curr. Opin. Cell Biol. *35*, 69–77.

Lobb, R.J., Becker, M., Wen Wen, S., Wong, C.S.F., Wiegmans, A.P., Leimgruber, A., and Möller, A. (2015). Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. J. Extracell. Vesicles *4*, 27031.

Loef, M., van Beest, S., Kroon, F.P.B., Bloem, J.L., Dekkers, O.M., Reijnierse, M., Schoones, J.W., and Kloppenburg, M. (2018). Comparison of histological and morphometrical changes underlying subchondral bone abnormalities in inflammatory and degenerative musculoskeletal disorders: a systematic review. Osteoarthritis Cartilage *26*, 992–1002.

Loeser, R.F. (2009). Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. Osteoarthritis Cartilage *17*, 971–979.

Loeser, R.F. (2011). Aging and osteoarthritis. Curr. Opin. Rheumatol. *23*, 492–496.

Loeser, R.F. (2013). Aging processes and the development of osteoarthritis. Curr. Opin. Rheumatol. *25*, 108–113.

Loeser, R.F. (2014). Integrins and chondrocyte–matrix interactions in articular cartilage. Matrix Biol. *39*, 11–16.

Loeser, R.F. (2017). The Role of Aging in the Development of Osteoarthritis. Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc. *128*, 44–54.

Loi, F., Córdova, L.A., Pajarinen, J., Lin, T., Yao, Z., and Goodman, S.B. (2016). Inflammation, fracture and bone repair. Bone *86*, 119–130.

López de Figueroa, P., Lotz, M.K., Blanco, F.J., and Caramés, B. (2015). Autophagy Activation and Protection From Mitochondrial Dysfunction in Human Chondrocytes: Role of Autophagy in Mitochondrial Dysfunction. Arthritis Rheumatol. *67*, 966–976.

López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. Cell *153*, 1194–1217.

Lőrincz, Á.M., Timár, C.I., Marosvári, K.A., Veres, D.S., Otrokocsi, L., Kittel, Á., and Ligeti, E. (2014). Effect of storage on physical and functional properties of extracellular vesicles derived from neutrophilic granulocytes. J. Extracell. Vesicles *3*, 25465.

Lotz, M.K., Otsuki, S., Grogan, S.P., Sah, R., Terkeltaub, R., and D'Lima, D. (2010). Cartilage cell clusters. Arthritis Rheum. *62*, 2206–2218.

Louer, C.R., Furman, B.D., Huebner, J.L., Kraus, V.B., Olson, S.A., and Guilak, F. (2012). Diet-induced obesity significantly increases the severity of posttraumatic arthritis in mice. Arthritis Rheum. *64*, 3220–3230.

Lozano-Ramos, I., Bancu, I., Oliveira-Tercero, A., Armengol, M.P., Menezes-Neto, A., Portillo, H.A.D., Lauzurica-Valdemoros, R., and Borràs, F.E. (2015). Size-exclusion chromatography-based enrichment of extracellular vesicles from urine samples. J. Extracell. Vesicles *4*, 27369.

Lu, W., Zhang, Y., Liu, D., Songyang, Z., and Wan, M. (2013). Telomeres—structure, function, and regulation. Exp. Cell Res. *319*, 133–141.

Ma, H., Wu, W., Yang, X., Liu, J., and Gong, Y. (2015). Genetic effects of common polymorphisms in estrogen receptor alpha gene on osteoarthritis: a meta-analysis. Int. J. Clin. Exp. Med. *8*, 13446–13454.

Macias, M.I., Grande, J., Moreno, A., Domínguez, I., Bornstein, R., and Flores, A.I. (2010). Isolation and characterization of true mesenchymal stem cells derived from human term decidua capable of multilineage differentiation into all 3 embryonic layers. Am. J. Obstet. Gynecol. *203*, 495.e9-495.e23.

MacKay, J.W., Murray, P.J., Kasmai, B., Johnson, G., Donell, S.T., and Toms, A.P. (2017). Subchondral bone in osteoarthritis: association between MRI texture analysis and histomorphometry. Osteoarthritis Cartilage *25*, 700–707.

Malaise, O., Tachikart, Y., Constantinides, M., Mumme, M., Ferreira-Lopez, R., Noack, S., Krettek, C., Noël, D., Wang, J., Jorgensen, C., et al. (2019). Mesenchymal stem cell senescence alleviates their intrinsic and seno-suppressive paracrine properties contributing to osteoarthritis development. Aging *11*, 9128–9146.

Mallette, F.A., and Ferbeyre, G. (2007). The DNA Damage Signaling Pathway Connects Oncogenic Stress to Cellular Senescence. Cell Cycle *6*, 1831–1836.

Marędziak, M., Marycz, K., Tomaszewski, K.A., Kornicka, K., and Henry, B.M. (2016). The Influence of Aging on the Regenerative Potential of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells Int. *2016*, 1–15.

Markle-Reid, M., and Browne, G. (2003). Conceptualizations of frailty in relation to older adults: *Conceptualizations of frailty in relation to older adults*. J. Adv. Nurs. *44*, 58–68.

Markov, O., Oshchepkova, A., and Mironova, N. (2019). Immunotherapy Based on Dendritic Cell-Targeted/-Derived Extracellular Vesicles—A Novel Strategy for Enhancement of the Anti-tumor Immune Response. Front. Pharmacol. *10*, 1152.

Marongiu, F., Gramignoli, R., Sun, Q., Tahan, V., Miki, T., Dorko, K., Ellis, E., and Strom, S.C. (2010). Isolation of Amniotic Mesenchymal Stem Cells. In Current Protocols in Stem Cell Biology, M. Bhatia, A.G. Elefanty, S.J. Fisher, R. Patient, T. Schlaeger, and E.Y. Snyder, eds. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), p. sc01e05s12.

Maroudas, A., Wachtel, E., Grushko, G., Katz, E.P., and Weinberg, P. (1991). The effect of osmotic and mechanical pressures on water partitioning in articular cartilage. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. *1073*, 285–294.

Martel-Pelletier, J. (1999). Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. Front. Biosci. *4*, d694.

Martel-Pelletier, J., Barr, A.J., Cicuttini, F.M., Conaghan, P.G., Cooper, C., Goldring, M.B., Goldring, S.R., Jones, G., Teichtahl, A.J., and Pelletier, J.-P. (2016). Osteoarthritis. Nat. Rev. Dis. Primer *2*, 16072.

Martin, J.A., and Buckwalter, J.A. (2001). Telomere Erosion and Senescence in Human Articular Cartilage Chondrocytes. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. *56*, B172–B179.

Martin, J.A., and Buckwalter, J.A. (2003). THE ROLE OF CHONDROCYTE SENESCENCE IN THE PATHOGENESIS OF OSTEOARTHRITIS AND IN LIMITING CARTILAGE REPAIR: J. Bone Jt. Surg.-Am. Vol. *85*, 106–110.

Martin, J.A., Ellerbroek, S.M., and Buckwalter, J.A. (1997). Age-related decline in chondrocyte response to insulin-like growth factor-I: The role of growth factor binding proteins. J. Orthop. Res. *15*, 491–498.

Martín-Millán, M., and Castañeda, S. (2013). Estrogens, osteoarthritis and inflammation. Joint Bone Spine *80*, 368–373.

Martyanov, V., Whitfield, M.L., and Varga, J. (2019). Senescence Signature in Skin Biopsies From Systemic Sclerosis Patients Treated With Senolytic Therapy: Potential Predictor of Clinical Response? Arthritis Rheumatol. *71*, 1766–1767.

Mathiessen, A., and Conaghan, P.G. (2017). Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. Arthritis Res. Ther. *19*, 18.

Maumus, M., Jorgensen, C., and Noël, D. (2013a). Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: Role of secretome and exosomes. Biochimie *95*, 2229–2234.

Maumus, M., Manferdini, C., Toupet, K., Peyrafitte, J.-A., Ferreira, R., Facchini, A., Gabusi, E., Bourin, P., Jorgensen, C., Lisignoli, G., et al. (2013b). Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis. Stem Cell Res. *11*, 834–844.

Maumus, M., Rozier, P., Boulestreau, J., Jorgensen, C., and Noël, D. (2020). Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Opportunities and Challenges for Clinical Translation. Front. Bioeng. Biotechnol. *8*, 997.

McAlindon, T.E., Bannuru, R.R., Sullivan, M.C., Arden, N.K., Berenbaum, F., Bierma-Zeinstra, S.M., Hawker, G.A., Henrotin, Y., Hunter, D.J., Kawaguchi, H., et al. (2014). OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage *22*, 363–388.

Mecocci, P., MacGarvey, U., Kaufman, A.E., Koontz, D., Shoffner, J.M., Wallace, D.C., and Beal, M.F. (1993). Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. Ann. Neurol. *34*, 609–616.

Melzer, D. (2008). Genetic Polymorphisms and Human Aging: Association Studies Deliver. Rejuvenation Res. *11*, 523–526.

Melzer, D., Frayling, T.M., Murray, A., Hurst, A.J., Harries, L.W., Song, H., Khaw, K., Luben, R., Surtees, P.G., Bandinelli, S.S., et al. (2007). A common variant of the p16INK4a genetic region is associated with physical function in older people. Mech. Ageing Dev. *128*, 370–377.

Mendt, M., Kamerkar, S., Sugimoto, H., McAndrews, K.M., Wu, C.-C., Gagea, M., Yang, S., Blanko, E.V.R., Peng, Q., Ma, X., et al. (2018). Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer. JCI Insight *3*, e99263.

Meng, X., Ichim, T.E., Zhong, J., Rogers, A., Yin, Z., Jackson, J., Wang, H., Ge, W., Bogin, V., Chan, K.W., et al. (2007). Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population. J. Transl. Med. *5*, 57.

Mennan, C., Garcia, J., Roberts, S., Hulme, C., and Wright, K. (2019). A comprehensive characterisation of large-scale expanded human bone marrow and umbilical cord mesenchymal stem cells. Stem Cell Res. Ther. *10*, 99.

Miao, Z., Jin, J., Chen, L., Zhu, J., Huang, W., Zhao, J., Qian, H., and Zhang, X. (2006). Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. Cell Biol. Int. *30*, 681–687.

Miller, E.J., Harris, E.D., Chung, E., Finch, J.E., McCroskery, P.A., and Butler, W.T. (1976). Cleavage of type II and III collagens with mammalian collagenase: site of cleavage and primary structure at the amino-terminal portion of the smaller fragment released from both collagens. Biochemistry *15*, 787–792.

Miranda-Duarte, A. (2018). DNA Methylation in Osteoarthritis: Current Status and Therapeutic Implications. Open Rheumatol. J. *12*, 37–49.

Moll, G., Jitschin, R., von Bahr, L., Rasmusson-Duprez, I., Sundberg, B., Lönnies, L., Elgue, G., Nilsson-Ekdahl, K., Mougiakakos, D., Lambris, J.D., et al. (2011). Mesenchymal Stromal Cells Engage Complement and Complement Receptor Bearing Innate Effector Cells to Modulate Immune Responses. PLoS ONE *6*, e21703.

Momen-Heravi, F., Balaj, L., Alian, S., Mantel, P.-Y., Halleck, A.E., Trachtenberg, A.J., Soria, C.E., Oquin, S., Bonebreak, C.M., Saracoglu, E., et al. (2013). Current methods for the isolation of extracellular vesicles. Biol. Chem. *394*, 1253–1262.

Moses, M.A., Wiederschain, D., Wu, I., Fernandez, C.A., Ghazizadeh, V., Lane, W.S., Flynn, E., Sytkowski, A., Tao, T., and Langer, R. (1999). Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. *96*, 2645–2650.

Mow, V.C., and Guo, X.E. (2002). Mechano-Electrochemical Properties Of Articular Cartilage: Their Inhomogeneities and Anisotropies. Annu. Rev. Biomed. Eng. *4*, 175–209.

Mow, V.C., Kuei, S.C., Lai, W.M., and Armstrong, C.G. (1980). Biphasic Creep and Stress Relaxation of Articular Cartilage in Compression: Theory and Experiments. J. Biomech. Eng. *102*, 73–84.

Mow, V.C., Ratcliffe, A., and Robin Poole, A. (1992). Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. Biomaterials *13*, 67–97.

Muhammad, G., Jablonska, A., Rose, L., Walczak, P., and Janowski, M. (2015). Effect of MRI tags: SPIO nanoparticles and 19F nanoemulsion on various populations of mouse mesenchymal stem cells. Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.) *75*, 144–159.

Muir, H. (1995). The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. BioEssays *17*, 1039–1048.

Mulcahy, L.A., Pink, R.C., and Carter, D.R.F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. J. Extracell. Vesicles *3*, 24641.

Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., et al. (2013). Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. Cell *155*, 1104–1118.

Murphy, D.E., de Jong, O.G., Brouwer, M., Wood, M.J., Lavieu, G., Schiffelers, R.M., and Vader, P. (2019). Extracellular vesicle-based therapeutics: natural versus engineered targeting and trafficking. Exp. Mol. Med. *51*, 32.

Musumeci, G., Castrogiovanni, P., Trovato, F., Weinberg, A., Al-Wasiyah, M., Alqahtani, M., and Mobasheri, A. (2015). Biomarkers of Chondrocyte Apoptosis and Autophagy in Osteoarthritis. Int. J. Mol. Sci. *16*, 20560–20575.

Nakase, I., Kobayashi, N.B., Takatani-Nakase, T., and Yoshida, T. (2015). Active macropinocytosis induction by stimulation of epidermal growth factor receptor and oncogenic Ras expression potentiates cellular uptake efficacy of exosomes. Sci. Rep. *5*, 10300.

Narita, M., Nuñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence. Cell *113*, 703–716.

Narita, M., Young, A.R.J., Arakawa, S., Samarajiwa, S.A., Nakashima, T., Yoshida, S., Hong, S., Berry, L.S., Reichelt, S., Ferreira, M., et al. (2011). Spatial Coupling of mTOR and Autophagy Augments Secretory Phenotypes. Science *332*, 966–970.

Neels, J.G., Badeanlou, L., Hester, K.D., and Samad, F. (2009). Keratinocyte-derived Chemokine in Obesity. J. Biol. Chem. *284*, 20692–20698.

Nelson, G., Wordsworth, J., Wang, C., Jurk, D., Lawless, C., Martin-Ruiz, C., and von Zglinicki, T. (2012). A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. Aging Cell *11*, 345–349.

Neurohr, G.E., Terry, R.L., Lengefeld, J., Bonney, M., Brittingham, G.P., Moretto, F., Miettinen, T.P., Vaites, L.P., Soares, L.M., Paulo, J.A., et al. (2019). Excessive Cell Growth Causes Cytoplasm Dilution And Contributes to Senescence. Cell *176*, 1083-1097.e18.

van Niel, G., D'Angelo, G., and Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *19*, 213–228.

Nishioka, T., Arima, N., Kano, K., Hama, K., Itai, E., Yukiura, H., Kise, R., Inoue, A., Kim, S.-H., Solnica-Krezel, L., et al. (2016). ATX-LPA1 axis contributes to proliferation of chondrocytes by regulating fibronectin assembly leading to proper cartilage formation. Sci. Rep. *6*, 23433.

Nogueira-Recalde, U., Lorenzo-Gómez, I., Loza, M.I., Domínguez, E., and Caramés, B. (2020). Flux-Based Assay for the Identification of Autophagy Modulators for Osteoarthritis. J. Vis. Exp. 61078.

Nowotny, K., Jung, T., Grune, T., and Höhn, A. (2014). Accumulation of modified proteins and aggregate formation in aging. Exp. Gerontol. *57*, 122–131.

Nunnari, J., and Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In Sickness and in Health. Cell *148*, 1145–1159.

Nyström, T. (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. EMBO J. *24*, 1311–1317.

Ogrodnik, M., Salmonowicz, H., Jurk, D., and Passos, J.F. (2019). Expansion and Cell-Cycle Arrest: Common Denominators of Cellular Senescence. Trends Biochem. Sci. *44*, 996–1008.

O'Loghlen, A. (2018). Role for extracellular vesicles in the tumour microenvironment. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. *373*, 20160488.

Ong, S.-G., and Wu, J.C. (2015). Exosomes as Potential Alternatives to Stem Cell Therapy in Mediating Cardiac Regeneration. Circ. Res. *117*, 7–9.

Orozco, A.F., and Lewis, D.E. (2010). Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma. Cytometry A *77A*, 502–514.

Osta, B., Benedetti, G., and Miossec, P. (2014). Classical and Paradoxical Effects of TNF-α on Bone Homeostasis. Front. Immunol. *5*.

Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., et al. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. Nat. Cell Biol. *12*, 19–30.

Ovadya, Y., Landsberger, T., Leins, H., Vadai, E., Gal, H., Biran, A., Yosef, R., Sagiv, A., Agrawal, A., Shapira, A., et al. (2018). Impaired immune surveillance accelerates accumulation of senescent cells and aging. Nat. Commun. *9*, 5435.

P. De Miguel, M., Fuentes-Julián, S., and Alcaina, Y. (2010). Pluripotent Stem Cells: Origin, Maintenance and Induction. Stem Cell Rev. Rep. *6*, 633–649.

Palmer, A.J.R., Brown, C.P., McNally, E.G., Price, A.J., Tracey, I., Jezzard, P., Carr, A.J., and Glyn-Jones, S. (2013). Non-invasive imaging of cartilage in early osteoarthritis. Bone Jt. J. *95-B*, 738–746.

Parisotto, M., Grelet, E., El Bizri, R., Dai, Y., Terzic, J., Eckert, D., Gargowitsch, L., Bornert, J.-M., and Metzger, D. (2018). PTEN deletion in luminal cells of mature prostate induces replication stress and senescence in vivo. J. Exp. Med. *215*, 1749–1763.

Park, D., Spencer, J.A., Koh, B.I., Kobayashi, T., Fujisaki, J., Clemens, T.L., Lin, C.P., Kronenberg, H.M., and Scadden, D.T. (2012). Endogenous Bone Marrow MSCs Are Dynamic, Fate-Restricted Participants in Bone Maintenance and Regeneration. Cell Stem Cell *10*, 259–272.

Park, M., Kim, Y.-H., Woo, S.-Y., Lee, H.J., Yu, Y., Kim, H.S., Park, Y.S., Jo, I., Park, J.-W., Jung, S.-C., et al. (2015). Tonsil-derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate CCl4–induced Liver Fibrosis in Mice via Autophagy Activation. Sci. Rep. *5*, 8616.

Partridge, L., Deelen, J., and Slagboom, P.E. (2018). Facing up to the global challenges of ageing. Nature *561*, 45–56.

Patki, S., Kadam, S., Chandra, V., and Bhonde, R. (2010). Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells: Multipotent breast milk stem cells. Hum. Cell *23*, 35–40.

Pendleton, A. (2000). EULAR recommendations for the management of knee osteoarthritis: report of a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). Ann. Rheum. Dis. *59*, 936–944.

Pérez-García, S., Gutiérrez-Cañas, I., Seoane, I.V., Fernández, J., Mellado, M., Leceta, J., Tío, L., Villanueva-Romero, R., Juarranz, Y., and Gomariz, R.P. (2016). Healthy and Osteoarthritic Synovial Fibroblasts Produce a Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 4, 5, 7, and 12. Am. J. Pathol. *186*, 2449–2461.

Peterson, M.F., Otoc, N., Sethi, J.K., Gupta, A., and Antes, T.J. (2015). Integrated systems for exosome investigation. Methods *87*, 31–45.

Pfander, D. (2000). Expression of thrombospondin-1 and its receptor CD36 in human osteoarthritic cartilage. Ann. Rheum. Dis. *59*, 448–454.

Platas, J., Guillén, M., Pérez del Caz, M., Gomar, F., Castejón, M., Mirabet, V., and Alcaraz, M. (2016). Paracrine effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells in inflammatory stress-induced senescence features of osteoarthritic chondrocytes. Aging *8*, 1703–1717.

Poloni, A., Rosini, V., Mondini, E., Maurizi, G., Mancini, S., Discepoli, G., Biasio, S., Battaglini, G., Berardinelli, E., Serrani, F., et al. (2008). Characterization and expansion of mesenchymal progenitor cells from first-trimester chorionic villi of human placenta. Cytotherapy *10*, 690–697.

Pou, K.M., Massaro, J.M., Hoffmann, U., Vasan, R.S., Maurovich-Horvat, P., Larson, M.G., Keaney, J.F., Meigs, J.B., Lipinska, I., Kathiresan, S., et al. (2007). Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Volumes Are Cross-Sectionally Related to Markers of Inflammation and Oxidative Stress: The Framingham Heart Study. Circulation *116*, 1234–1241.

Prieto-Potin, I., Largo, R., Roman-Blas, J.A., Herrero-Beaumont, G., and Walsh, D.A. (2015). Characterization of multinucleated giant cells in synovium and subchondral bone in knee osteoarthritis and rheumatoid arthritis. BMC Musculoskelet. Disord. *16*, 226.

Radin, E.L., and Paul, I.L. (1971). Response of Joints to Impact Loading. I. In Vitro Wear. Arthritis Rheum. *14*, 356–362.

Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. J. Cell Biol. *200*, 373–383.

Ratajczak, M., Zuba-Surma, E., Kucia, M., Poniewierska, A., Suszynska, M., and Ratajczak, J. (2012). Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues. Adv. Med. Sci. *57*, 1–17.

Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C.J., Bovenkerk, J.E., Pell, C.L., Johnstone, B.H., Considine, R.V., and March, K.L. (2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. Circulation *109*, 1292–1298.

Riancho, J.A., García-Ibarbia, C., Gravani, A., Raine, E.V.A., Rodríguez-Fontenla, C., Soto-Hermida, A., Rego-Perez, I., Dodd, A.W., Gómez-Reino, J.J., Zarrabeitia, M.T., et al. (2010). Common variations in estrogen-related genes are associated with severe large-joint osteoarthritis: a multicenter genetic and functional study. Osteoarthritis Cartilage *18*, 927–933.

Rice, S.J., Tselepi, M., Sorial, A.K., Aubourg, G., Shepherd, C., Almarza, D., Skelton, A.J., Pangou, I., Deehan, D., Reynard, L.N., et al. (2019). Prioritization of *PLEC* and *GRINA* as Osteoarthritis Risk Genes Through the Identification and Characterization of Novel Methylation Quantitative Trait Loci. Arthritis Rheumatol. *71*, 1285–1296.

Rice, S.J., Beier, F., Young, D.A., and Loughlin, J. (2020). Interplay between genetics and epigenetics in osteoarthritis. Nat. Rev. Rheumatol. *16*, 268–281.

Ritschka, B., Storer, M., Mas, A., Heinzmann, F., Ortells, M.C., Morton, J.P., Sansom, O.J., Zender, L., and Keyes, W.M. (2017). The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. Genes Dev. *31*, 172–183.

Rockel, J.S., Rabani, R., and Viswanathan, S. (2020). Anti-fibrotic mechanisms of exogenously-expanded mesenchymal stromal cells for fibrotic diseases. Semin. Cell Dev. Biol. *101*, 87–103.

Rohde, E., Pachler, K., and Gimona, M. (2019). Manufacturing and characterization of extracellular vesicles from umbilical cord–derived mesenchymal stromal cells for clinical testing. Cytotherapy *21*, 581–592.

Rong, X., Liu, J., Yao, X., Jiang, T., Wang, Y., and Xie, F. (2019). Human bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes alleviate liver fibrosis through the Wnt/β-catenin pathway. Stem Cell Res. Ther. *10*, 98.

Rossant, J. (2001). Stem Cells from the Mammalian Blastocyst. Stem Cells *19*, 477–482.

Rossiello, F., Aguado, J., Sepe, S., Iannelli, F., Nguyen, Q., Pitchiaya, S., Carninci, P., and d'Adda di Fagagna, F. (2017). DNA damage response inhibition at dysfunctional telomeres by modulation of telomeric DNA damage response RNAs. Nat. Commun. *8*, 13980.

Roubelakis, M.G., Pappa, K.I., Bitsika, V., Zagoura, D., Vlahou, A., Papadaki, H.A., Antsaklis, A., and Anagnou, N.P. (2007). Molecular and Proteomic Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Amniotic Fluid: Comparison to Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells Dev. *16*, 931–952.

Ruiz, M., Cosenza, S., Maumus, M., Jorgensen, C., and Noël, D. (2016). Therapeutic application of mesenchymal stem cells in osteoarthritis. Expert Opin. Biol. Ther. *16*, 33–42.

Rutjes, A.W.S., Jüni, P., da Costa, B.R., Trelle, S., Nüesch, E., and Reichenbach, S. (2012). Viscosupplementation for Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review and Meta-analysis. Ann. Intern. Med. *157*, 180.

Ryan, M.C., and Sandell, L.J. (1990). Differential expression of a cysteine-rich domain in the amino-terminal propeptide of type II (cartilage) procollagen by alternative splicing of mRNA. J. Biol. Chem. *265*, 10334–10339.

van Saase, J.L., van Romunde, L.K., Cats, A., Vandenbroucke, J.P., and Valkenburg, H.A. (1989). Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. Ann. Rheum. Dis. *48*, 271–280.

Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P.G., Riminucci, M., et al. (2007). Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. Cell *131*, 324–336.

Sadaie, M., Salama, R., Carroll, T., Tomimatsu, K., Chandra, T., Young, A.R.J., Narita, M., Perez-Mancera, P.A., Bennett, D.C., Chong, H., et al. (2013). Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains and SAHF formation during senescence. Genes Dev. *27*, 1800–1808.

Sagiv, A., and Krizhanovsky, V. (2013). Immunosurveillance of senescent cells: the bright side of the senescence program. Biogerontology *14*, 617–628.

Sagiv, A., Biran, A., Yon, M., Simon, J., Lowe, S.W., and Krizhanovsky, V. (2013). Granule exocytosis mediates immune surveillance of senescent cells. Oncogene *32*, 1971–1977.

Sagiv, A., Burton, D.G.A., Moshayev, Z., Vadai, E., Wensveen, F., Ben-Dor, S., Golani, O., Polic, B., and Krizhanovsky, V. (2016). NKG2D ligands mediate immunosurveillance of senescent cells. Aging *8*, 328–344.

Sakellariou, G., Conaghan, P.G., Zhang, W., Bijlsma, J.W.J., Boyesen, P., D'Agostino, M.A., Doherty, M., Fodor, D., Kloppenburg, M., Miese, F., et al. (2017). EULAR recommendations for the use of imaging in the clinical management of peripheral joint osteoarthritis. Ann. Rheum. Dis. *76*, 1484–1494.

Sandell, L.J., Morris, N., Robbins, J.R., and Goldring, M.B. (1991). Alternatively spliced type II procollagen mRNAs define distinct populations of cells during vertebral development: differential expression of the amino-propeptide. J. Cell Biol. *114*, 1307–1319.

Sandell, L.J., Nalin, A.M., and Reife, R.A. (1994). Alternative splice form of type II procollagen mRNA (IIA) is predominant in skeletal precursors and non-cartilaginous tissues during early mouse development. Dev. Dyn. *199*, 129–140.

Sasaki, H., Takayama, K., Matsushita, T., Ishida, K., Kubo, S., Matsumoto, T., Fujita, N., Oka, S., Kurosaka, M., and Kuroda, R. (2012). Autophagy modulates osteoarthritis-related gene expression in human chondrocytes. Arthritis Rheum. *64*, 1920–1928.

Sasaki, M., Kumazaki, T., Takano, H., Nishiyama, M., and Mitsui, Y. (2001). Senescent cells are resistant to death despite low Bcl-2 level. Mech. Ageing Dev. *122*, 1695–1706.

Scanzello, C.R., and Goldring, S.R. (2012). The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. Bone *51*, 249–257.

Sellam, J., and Berenbaum, F. (2010). The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. Nat. Rev. Rheumatol. *6*, 625–635.

Serrano, M., Hannon, G.J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature *366*, 704–707.

Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D., and DePinho, R.A. (1996). Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. Cell *85*, 27–37.

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. Cell *88*, 593–602.

Shah, P.P., Donahue, G., Otte, G.L., Capell, B.C., Nelson, D.M., Cao, K., Aggarwala, V., Cruickshanks, H.A., Rai, T.S., McBryan, T., et al. (2013). Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape. Genes Dev. *27*, 1787–1799.

Sharif, B., Kopec, J., Bansback, N., Rahman, M.M., Flanagan, W.M., Wong, H., Fines, P., and Anis, A. (2015). Projecting the direct cost burden of osteoarthritis in Canada using a microsimulation model. Osteoarthritis Cartilage *23*, 1654–1663.

Shelton, D.N., Chang, E., Whittier, P.S., Choi, D., and Funk, W.D. (1999). Microarray analysis of replicative senescence. Curr. Biol. *9*, 939–945.

Shepherd, C., Zhu, D., Skelton, A.J., Combe, J., Threadgold, H., Zhu, L., Vincent, T.L., Stuart, P., Reynard, L.N., and Loughlin, J. (2018). Functional Characterization of the Osteoarthritis Genetic Risk Residing at *ALDH1A2* Identifies rs12915901 as a Key Target Variant. Arthritis Rheumatol. *70*, 1577–1587.

Shepherd, C., Reese, A.E., Reynard, L.N., and Loughlin, J. (2019). Expression analysis of the osteoarthritis genetic susceptibility mapping to the matrix Gla protein gene MGP. Arthritis Res. Ther. *21*, 149.

Shimi, T., Butin-Israeli, V., Adam, S.A., Hamanaka, R.B., Goldman, A.E., Lucas, C.A., Shumaker, D.K., Kosak, S.T., Chandel, N.S., and Goldman, R.D. (2011). The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. Genes Dev. *25*, 2579–2593.

Siebuhr, A., Bay-Jensen, A., Jordan, J., Kjelgaard-Petersen, C., Christiansen, C., Abramson, S., Attur, M., Berenbaum, F., Kraus, V., and Karsdal, M. (2016). Inflammation (or synovitis)-driven osteoarthritis: an opportunity for personalizing prognosis and treatment? Scand. J. Rheumatol. *45*, 87–98.

da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C., and Nardi, N.B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. J. Cell Sci. *119*, 2204–2213.

Simmons, P.J., and Torok-Storb, B. (1991). Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. Blood *78*, 55–62.

Singh, P., Marcu, K.B., Goldring, M.B., and Otero, M. (2019). Phenotypic instability of chondrocytes in osteoarthritis: on a path to hypertrophy. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1442*, 17–34.

Smith, M.D. (2011). The normal synovium. Open Rheumatol. J. *5*, 100–106.

Sokolove, J., and Lepus, C.M. (2013). Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. Ther. Adv. Musculoskelet. Dis. *5*, 77–94.

Song, Y., Zhang, J., Xu, H., Lin, Z., Chang, H., Liu, W., and Kong, L. (2020). Mesenchymal stem cells in knee osteoarthritis treatment: A systematic review and meta-analysis. J. Orthop. Transl. *24*, 121–130.

Sophia Fox, A.J., Bedi, A., and Rodeo, S.A. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. Sports Health *1*, 461–468.

Sousa-Victor, P., García-Prat, L., Serrano, A.L., Perdiguero, E., and Muñoz-Cánoves, P. (2015). Muscle stem cell aging: regulation and rejuvenation. Trends Endocrinol. Metab. *26*, 287–296.

Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M.C., and Moretta, L. (2006). Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. Blood *107*, 1484–1490.

Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M.C., and Moretta, L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer–cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. Blood *111*, 1327–1333.

Srikanth, V.K., Fryer, J.L., Zhai, G., Winzenberg, T.M., Hosmer, D., and Jones, G. (2005). A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage *13*, 769–781.

Stehouwer, C.D.A., Gall, M.-A., Twisk, J.W.R., Knudsen, E., Emeis, J.J., and Parving, H.-H. (2002). Increased Urinary Albumin Excretion, Endothelial Dysfunction, and Chronic Low-Grade Inflammation in Type 2 Diabetes: Progressive, Interrelated, and Independently Associated With Risk of Death. Diabetes *51*, 1157–1165.

Stevens-Lapsley, J.E., and Kohrt, W.M. (2010). Osteoarthritis in Women: Effects of Estrogen, Obesity and Physical Activity. Womens Health *6*, 601–615.

Stewart, C., and Burke, B. (1987). Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single major lamin polypeptide closely resembling lamin B. Cell *51*, 383–392.

Stewart, H.L., and Kawcak, C.E. (2018). The Importance of Subchondral Bone in the Pathophysiology of Osteoarthritis. Front. Vet. Sci. *5*, 178.

Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M.C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., et al. (2013). Senescence Is a Developmental Mechanism that Contributes to Embryonic Growth and Patterning. Cell *155*, 1119–1130.

Straczkowski, M., Dzienis-Straczkowska, S., Stêpieñ, A., Kowalska, I., Szelachowska, M., and Kinalska, I. (2002). Plasma Interleukin-8 Concentrations Are Increased in Obese Subjects and Related to Fat Mass and Tumor Necrosis Factor-α System. J. Clin. Endocrinol. Metab. *87*, 4602–4606.

Styrkarsdottir, U., Thorleifsson, G., Helgadottir, H.T., Bomer, N., Metrustry, S., Bierma-Zeinstra, S., Strijbosch, A.M., Evangelou, E., Hart, D., Beekman, M., et al. (2014). Severe osteoarthritis of the hand associates with common variants within the ALDH1A2 gene and with rare variants at 1p31. Nat. Genet. *46*, 498–502.

Styrkarsdottir, U., Helgason, H., Sigurdsson, A., Norddahl, G.L., Agustsdottir, A.B., Reynard, L.N., Villalvilla, A., Halldorsson, G.H., Jonasdottir, A., Magnusdottir, A., et al. (2017). Whole-genome sequencing identifies rare genotypes in COMP and CHADL associated with high risk of hip osteoarthritis. Nat. Genet. *49*, 801–805.

Styrkarsdottir, U., Lund, S.H., Thorleifsson, G., Zink, F., Stefansson, O.A., Sigurdsson, J.K., Juliusson, K., Bjarnadottir, K., Sigurbjornsdottir, S., Jonsson, S., et al. (2018). Meta-analysis of Icelandic and UK data sets identifies missense variants in SMO, IL11, COL11A1 and 13 more new loci associated with osteoarthritis. Nat. Genet. *50*, 1681–1687.

Styrkarsdottir, U., Stefansson, O.A., Gunnarsdottir, K., Thorleifsson, G., Lund, S.H., Stefansdottir, L., Juliusson, K., Agustsdottir, A.B., Zink, F., Halldorsson, G.H., et al. (2019). GWAS of bone size yields twelve loci that also affect height, BMD, osteoarthritis or fractures. Nat. Commun. *10*, 2054.

Su, W.-R., Zhang, Q.-Z., Shi, S.-H., Nguyen, A.L., and Le, A.D. (2011). Human Gingiva-Derived Mesenchymal Stromal Cells Attenuate Contact Hypersensitivity via Prostaglandin E2-Dependent Mechanisms. STEM CELLS *29*, 1849–1860.

Suárez, H., Gámez-Valero, A., Reyes, R., López-Martín, S., Rodríguez, M.J., Carrascosa, J.L., Cabañas, C., Borràs, F.E., and Yáñez-Mó, M. (2017). A bead-assisted flow cytometry method for the semi-quantitative analysis of Extracellular Vesicles. Sci. Rep. *7*, 11271.

Suri, S., and Walsh, D.A. (2012). Osteochondral alterations in osteoarthritis. Bone *51*, 204–211.

Suzman, R., Beard, J.R., Boerma, T., and Chatterji, S. (2015). Health in an ageing world—what do we know? The Lancet *385*, 484–486.

Swanson, E.C., Manning, B., Zhang, H., and Lawrence, J.B. (2013). Higher-order unfolding of satellite heterochromatin is a consistent and early event in cell senescence. J. Cell Biol. *203*, 929–942.

Tachmazidou, I., Hatzikotoulas, K., Southam, L., Esparza-Gordillo, J., Haberland, V., Zheng, J., Johnson, T., Koprulu, M., Zengini, E., Steinberg, J., et al. (2019). Identification of new therapeutic targets for osteoarthritis through genome-wide analyses of UK Biobank data. Nat. Genet. *51*, 230–236.

Tai, H., Wang, Z., Gong, H., Han, X., Zhou, J., Wang, X., Wei, X., Ding, Y., Huang, N., Qin, J., et al. (2017). Autophagy impairment with lysosomal and mitochondrial dysfunction is an important characteristic of oxidative stress-induced senescence. Autophagy *13*, 99–113.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell *126*, 663–676.

Takasugi, M., Okada, R., Takahashi, A., Virya Chen, D., Watanabe, S., and Hara, E. (2017). Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2. Nat. Commun. *8*, 15729.

Taniyama, Y., Morishita, R., Aoki, M., Hiraoka, K., Yamasaki, K., Hashiya, N., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kaneda, Y., and Ogihara, T. (2002). Angiogenesis and Antifibrotic Action by Hepatocyte Growth Factor in Cardiomyopathy. Hypertension *40*, 47–53.

Tchkonia, T., Zhu, Y., van Deursen, J., Campisi, J., and Kirkland, J.L. (2013). Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. J. Clin. Invest. *123*, 966–972.

Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. Curr. Protoc. Cell Biol. *30*.

Théry, C., Witwer, K.W., Aikawa, E., Alcaraz, M.J., Anderson, J.D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G.K., et al. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. J. Extracell. Vesicles *7*, 1535750.

Tian, T., Zhu, Y.-L., Zhou, Y.-Y., Liang, G.-F., Wang, Y.-Y., Hu, F.-H., and Xiao, Z.-D. (2014). Exosome Uptake through Clathrin-mediated Endocytosis and Macropinocytosis and Mediating miR-21 Delivery. J. Biol. Chem. *289*, 22258–22267.

Tofiño-Vian, M., Guillén, M.I., Pérez del Caz, M.D., Castejón, M.A., and Alcaraz, M.J. (2017). Extracellular Vesicles from Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Downregulate Senescence Features in Osteoarthritic Osteoblasts. Oxid. Med. Cell. Longev. *2017*, 1–12.

Tofiño-Vian, M., Guillén, M.I., Pérez del Caz, M.D., Silvestre, A., and Alcaraz, M.J. (2018). Microvesicles from Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a New Protective Strategy in Osteoarthritic Chondrocytes. Cell. Physiol. Biochem. *47*, 11–25.

Torzilli, P.A. (1985). Influence of cartilage conformation on its equilibrium water partition. J. Orthop. Res. *3*, 473–483.

Trams, E.G., Lauter, C.J., Norman Salem, Jr., and Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. *645*, 63–70.

Tschon, M., Contartese, D., Pagani, S., Borsari, V., and Fini, M. (2021). Gender and Sex Are Key Determinants in Osteoarthritis Not Only Confounding Variables. A Systematic Review of Clinical Data. J. Clin. Med. *10*, 3178.

Tu, Z., Li, Q., Bu, H., and Lin, F. (2010). Mesenchymal Stem Cells Inhibit Complement Activation by Secreting Factor H. Stem Cells Dev. *19*, 1803–1809.

Tuckwell, D.S., Ayad, S., Grant, M.E., Takigawa, M., and Humphries, M.J. (1994). Conformation dependence of integrin-type II collagen binding. Inability of collagen peptides to support alpha 2 beta 1 binding, and mediation of adhesion to denatured collagen by a novel alpha 5 beta 1-fibronectin bridge. J. Cell Sci. *107 (Pt 4)*, 993–1005.

Turiák, L., Misják, P., Szabó, T.G., Aradi, B., Pálóczi, K., Ozohanics, O., Drahos, L., Kittel, Á., Falus, A., Buzás, E.I., et al. (2011). Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. J. Proteomics *74*, 2025–2033.

Urbanelli, L., Buratta, S., Sagini, K., Tancini, B., and Emiliani, C. (2016). Extracellular Vesicles as New Players in Cellular Senescence. Int. J. Mol. Sci. *17*, 1408.

Vergauwen, G., Dhondt, B., Van Deun, J., De Smedt, E., Berx, G., Timmerman, E., Gevaert, K., Miinalainen, I., Cocquyt, V., Braems, G., et al. (2017). Confounding factors of ultrafiltration and protein analysis in extracellular vesicle research. Sci. Rep. *7*, 2704.

Vinatier, C., Domínguez, E., Guicheux, J., and Caramés, B. (2018). Role of the Inflammation-Autophagy-Senescence Integrative Network in Osteoarthritis. Front. Physiol. *9*, 706.

Visser, M. (2001). Higher levels of inflammation in obese children. Nutrition *17*, 480–481.

Viswanathan, S., Shi, Y., Galipeau, J., Krampera, M., Leblanc, K., Martin, I., Nolta, J., Phinney, D.G., and Sensebe, L. (2019). Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. Cytotherapy *21*, 1019–1024.

Vizioli, M.G., Liu, T., Miller, K.N., Robertson, N.A., Gilroy, K., Lagnado, A.B., Perez-Garcia, A., Kiourtis, C., Dasgupta, N., Lei, X., et al. (2020). Mitochondria-to-nucleus retrograde signaling drives formation of cytoplasmic chromatin and inflammation in senescence. Genes Dev. *34*, 428–445.

Vymetalova, L., Kucirkova, T., Knopfova, L., Pospisilova, V., Kasko, T., Lejdarova, H., Makaturova, E., Kuglik, P., Oralova, V., Matalova, E., et al. (2020). Large-Scale Automated Hollow-Fiber Bioreactor Expansion of Umbilical Cord-Derived Human Mesenchymal Stromal Cells for Neurological Disorders. Neurochem. Res. *45*, 204–214.

Wang, E. (1995). Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. Cancer Res. *55*, 2284–2292.

Wang, A.S., Ong, P.F., Chojnowski, A., Clavel, C., and Dreesen, O. (2017). Loss of lamin B1 is a biomarker to quantify cellular senescence in photoaged skin. Sci. Rep. *7*, 15678.

Wang, B., Lee, W.Y.-W., Huang, B., Zhang, J.-F., Wu, T., Jiang, X., Wang, C.C., and Li, G. (2016). Secretome of Human Fetal Mesenchymal Stem Cell Ameliorates Replicative Senescence. Stem Cells Dev. *25*, 1755–1766.

Wang, C., Zhu, H., Sun, Z., Xiang, Z., Ge, Y., Ni, C., Luo, Z., Qian, W., and Han, X. (2014). Inhibition of Wnt/β-catenin signaling promotes epithelial differentiation of mesenchymal stem cells and repairs bleomycin-induced lung injury. Am. J. Physiol.-Cell Physiol. *307*, C234–C244.

Wang, M., Sampson, E.R., Jin, H., Li, J., Ke, Q.H., Im, H.-J., and Chen, D. (2013). MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. Arthritis Res. Ther. *15*, R5.

Wang, Y., Simpson, J., Wluka, A.E., Teichtahl, A.J., English, D.R., Giles, G.G., Graves, S., and Cicuttini, F.M. (2009). Relationship between body adiposity measures and risk of primary knee and hip replacement for osteoarthritis: a prospective cohort study. Arthritis Res. Ther. *11*, R31.

Watson, D.C., Bayik, D., Srivatsan, A., Bergamaschi, C., Valentin, A., Niu, G., Bear, J., Monninger, M., Sun, M., Morales-Kastresana, A., et al. (2016). Efficient production and enhanced tumor delivery of engineered extracellular vesicles. Biomaterials *105*, 195–205.

Weber, A., Chan, P.M.B., and Wen, C. (2019). Do immune cells lead the way in subchondral bone disturbance in osteoarthritis? Prog. Biophys. Mol. Biol. *148*, 21–31.

Wellen, K.E., and Hotamisligil, G.S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. J. Clin. Invest. *115*, 1111–1119.

Wiggins, R., Glatfelter, A., Kshirsagar, B., and Beals, T. (1987). Lipid microvesicles and their association with procoagulant activity in urine and glomeruli of rabbits with nephrotoxic nephritis. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. *56*, 264–272.

Wiley, C.D., Velarde, M.C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E.A., Freund, A., Shirakawa, K., Lim, H.W., Davis, S.S., Ramanathan, A., et al. (2016). Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. Cell Metab. *23*, 303–314.

Willis, G.R., Fernandez-Gonzalez, A., Anastas, J., Vitali, S.H., Liu, X., Ericsson, M., Kwong, A., Mitsialis, S.A., and Kourembanas, S. (2018). Mesenchymal Stromal Cell Exosomes Ameliorate Experimental Bronchopulmonary Dysplasia and Restore Lung Function through Macrophage Immunomodulation. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *197*, 104–116.

Wirth, W., Buck, R., Nevitt, M., Le Graverand, M.P.H., Benichou, O., Dreher, D., Davies, R.Y., Lee, J.H., Picha, K., Gimona, A., et al. (2011). MRI-based extended ordered values more efficiently differentiate cartilage loss in knees with and without joint space narrowing than region-specific approaches using MRI or radiography – data from the OA initiative. Osteoarthritis Cartilage *19*, 689–699.

Witkiewicz, A.K., Knudsen, K.E., Dicker, A.P., and Knudsen, E.S. (2011). The meaning of p16(ink4a) expression in tumors: functional significance, clinical associations and future developments. Cell Cycle Georget. Tex *10*, 2497–2503.

Wolf, P. (1967). The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. Br. J. Haematol. *13*, 269–288.

Woo, S.L.-Y., and Buckwalter, J.A. (1988). Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues. Savannah, Georgia, June 18-20, 1987. J. Orthop. Res. *6*, 907–931.

Xu, M., Bradley, E.W., Weivoda, M.M., Hwang, S.M., Pirtskhalava, T., Decklever, T., Curran, G.L., Ogrodnik, M., Jurk, D., Johnson, K.O., et al. (2016). Transplanted Senescent Cells Induce an Osteoarthritis-Like Condition in Mice. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. glw154.

Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J.N., Weigand, B.M., Palmer, A.K., Weivoda, M.M., Inman, C.L., Ogrodnik, M.B., Hachfeld, C.M., Fraser, D.G., et al. (2018). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. Nat. Med. *24*, 1246–1256.

Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. Nature *445*, 656–660.

Yañez, R., Lamana, M.L., García-Castro, J., Colmenero, I., Ramírez, M., and Bueren, J.A. (2006). Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Have In Vivo Immunosuppressive Properties Applicable for the Control of the Graft-Versus-Host Disease. Stem Cells *24*, 2582–2591.

Yáñez-Mó, M., Siljander, P.R.-M., Andreu, Z., Bedina Zavec, A., Borràs, F.E., Buzas, E.I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., et al. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. J. Extracell. Vesicles *4*, 27066.

Yang, X.-X., Sun, C., Wang, L., and Guo, X.-L. (2019). New insight into isolation, identification techniques and medical applications of exosomes. J. Controlled Release *308*, 119–129.

Yin, F., Guo, L., Meng, C., Liu, Y., Lu, R., Li, P., and Zhou, Y. (2014). Transplantation of mesenchymal stem cells exerts anti-apoptotic effects in adult rats after spinal cord ischemia-reperfusion injury. Brain Res. *1561*, 1–10.

Yip, K.W., and Reed, J.C. (2008). Bcl-2 family proteins and cancer. Oncogene *27*, 6398–6406.

Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., Vadai, E., Dassa, L., Shahar, E., Condiotti, R., et al. (2016). Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. Nat. Commun. *7*, 11190.

Young, A.R.J., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F.J., Tavare, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F.M., et al. (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. Genes Dev. *23*, 798–803.

Yun, M.H., Davaapil, H., and Brockes, J.P. (2015). Recurrent turnover of senescent cells during regeneration of a complex structure. ELife *4*, e05505.

Yusuf, E., Nelissen, R.G., Ioan-Facsinay, A., Stojanovic-Susulic, V., DeGroot, J., van Osch, G., Middeldorp, S., Huizinga, T.W.J., and Kloppenburg, M. (2010). Association between weight or body mass index and hand osteoarthritis: a systematic review. Ann. Rheum. Dis. *69*, 761–765.

Zeddou, M., Briquet, A., Relic, B., Josse, C., Malaise, M.G., Gothot, A., Lechanteur, C., and Beguin, Y. (2010). The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. Cell Biol. Int. *34*, 693–701.

Zeitlin, B.D., Zeitlin, I.J., and Nör, J.E. (2008). Expanding Circle of Inhibition: Small-Molecule Inhibitors of Bcl-2 as Anticancer Cell and Antiangiogenic Agents. J. Clin. Oncol. *26*, 4180–4188.

Zeng, G.Q., Chen, A.B., Li, W., Song, J.H., and Gao, C.Y. (2015). High MMP-1, MMP-2, and MMP-9 protein levels in osteoarthritis. Genet. Mol. Res. *14*, 14811–14822.

Zengini, E., Hatzikotoulas, K., Tachmazidou, I., Steinberg, J., Hartwig, F.P., Southam, L., Hackinger, S., Boer, C.G., Styrkarsdottir, U., Gilly, A., et al. (2018). Genome-wide analyses using UK Biobank data provide insights into the genetic architecture of osteoarthritis. Nat. Genet. *50*, 549–558.

Zhang, R., Poustovoitov, M.V., Ye, X., Santos, H.A., Chen, W., Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Serebriiskii, I.G., Canutescu, A.A., Dunbrack, R.L., et al. (2005). Formation of MacroH2A-Containing Senescence-Associated Heterochromatin Foci and Senescence Driven by ASF1a and HIRA. Dev. Cell *8*, 19–30.

Zhang, R., Chen, W., and Adams, P.D. (2007). Molecular Dissection of Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci. Mol. Cell. Biol. *27*, 2343–2358.

Zhang, S., Chu, W.C., Lai, R.C., Lim, S.K., Hui, J.H.P., and Toh, W.S. (2016). Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration. Osteoarthritis Cartilage *24*, 2135–2140.

Zhang, W., Nuki, G., Moskowitz, R.W., Abramson, S., Altman, R.D., Arden, N.K., Bierma-Zeinstra, S., Brandt, K.D., Croft, P., Doherty, M., et al. (2010). OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage *18*, 476–499.

Zhang, Y., Vasheghani, F., Li, Y., Blati, M., Simeone, K., Fahmi, H., Lussier, B., Roughley, P., Lagares, D., Pelletier, J.-P., et al. (2015). Cartilage-specific deletion of mTOR upregulates autophagy and protects mice from osteoarthritis. Ann. Rheum. Dis. *74*, 1432–1440.

Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S., and Li, P. (2020). Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. Int. J. Nanomedicine *Volume 15*, 6917–6934.

Zhou, Q., Leeman, S.E., and Amar, S. (2011). Signaling mechanisms in the restoration of impaired immune function due to diet-induced obesity. Proc. Natl. Acad. Sci. *108*, 2867–2872.

Zhou, S., Greenberger, J.S., Epperly, M.W., Goff, J.P., Adler, C., LeBoff, M.S., and Glowacki, J. (2008). Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. Aging Cell *7*, 335–343.

Zhu, Y., Wang, Y., Zhao, B., Niu, X., Hu, B., Li, Q., Zhang, J., Ding, J., Chen, Y., and Wang, Y. (2017). Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis. Stem Cell Res. Ther. *8*, 64.

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., and Hedrick, M.H. (2002). Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. Mol. Biol. Cell *13*, 4279–4295.

(2006). Immunolocalization of matrix proteins in different human cartilage subtypes. Histol. Histopathol. 477–485.

(2020). Articular Cartilage of the Knee: Health, Disease and Therapy (New York, NY: Springer New York).

Curriculum vitae

Jérémy Boulestreau

Education

PhD student in Biological Sciences for Health — 2018 - 2021
University of Montpellier, Montpellier, France

Master of Sciences (MSc) in Drug Sciences — 2016 - 2018
Faculty of Pharmacy **- University of Nantes, Nantes, France**

Bachelor of Science (BSc) in Cell Biology and Physiology - Faculty of Sciences — 2013 - 2016
Faculty of Sciences **- University of Nantes, Nantes, France**

Experiences

IRMB (Unit 1183 - INSERM) - Phd student, Montpellier, France — 2018 - 2021
Institute for Regenerative Medicine and Biotherapy
Therapeutic role of extracellular vesicles from MSC in osteoarthritis: Impact of senescence

RMes Lab (Unit 1229 - INSERM) - Internship, Nantes, France — 2018
Regenerative Medicine and Skeleton research laboratory
Encapsulation of mesenchymal stem cells: biomechanical characterization of alginate hydrogel microparticles in an osteoarthritis context

RMes Lab (Unit 1229 - INSERM) - Internship, Nantes, France — 2017
Regenerative Medicine and Skeleton research laboratory
Analysis of the metabolic phenotype of mice invalidated for the PiT2 / Slc20a2 protein

Publications

Boulestreau J, Maumus M, Jorgensen C, Noël D. Extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells: Therapeutic perspectives for targeting senescence in osteoarthritis. Adv Drug Deliv Rev. 2021 Aug; 175:113836.

Boulestreau J, Véret D, Brondello J-M, Noël D. La sénescence : de son implication physiopathologique aux traitements futurs. Revue du Rhumatisme Monographies. Dec 2020. 88;2;87:91.

Maumus M, Rozier P, **Boulestreau J**, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Opportunities and Challenges for Clinical Translation. Front Bioeng Biotechnol. 2020 Sep. 10;8:997.

Boulestreau J, Maumus M, Rozier P, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles in Aging. Front Cell Dev Biol. 2020 Feb. 21;8:107.

Communications

Boulestreau J, Maumus M, Rozier P, Jorgensen C and Noël D. Impact of senescence on therapeutic properties of extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells in osteoarthritis. IFATS Congress (2021).

Boulestreau J, Maumus M, Rozier P, Jorgensen C and Noël D. Impact of senescence on therapeutic properties of extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells in osteoarthritis. EULAR Congress (2021).

Boulestreau J, Maumus M, Rozier P, Jorgensen C and Noël D. Impact of senescence on therapeutic properties of extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells in osteoarthritis. ISCT Congress (2021).

Boulestreau J, Maumus M, Rozier P, Jorgensen C and Noël D. Impact of senescence on therapeutic properties of extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells in osteoarthritis. ISEV Congress (2021).

Boulestreau J, Maumus M, Rozier P, Jorgensen C and Noël D. Impact of senescence on therapeutic properties of extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells in osteoarthritis. OARSI Congress (2021).

Frangi G, Kerckhofs G, **Boulestreau J**, Autrusseau F, Veziers J, Halgand B, Guicheux J, Prieur X, Beck L, Beck-Cormier S. PiT2/SLC20A2: a new regulator of the bone marrow adipose tissue homeostasis?, Bone Reports, Volume 13, Supplement,2020.

Smith A, **Boulestreau J**, Marquis M, Renard D, Legoff B, Blanchard F, Vinatier C, Guicheux J, Des Rieux A, Le Visage C, Mesenchymal stem cell encapsulation in alginate micro-particles for intra-articular injection in osteoarthritis, Osteoarthritis and Cartilage, Volume 27, Supplement 1, 2019, Page S424.

Frangi G, Kerckhofs G, **Boulestreau J,** Autrusseau F, Véziers J, et al. Role of PiT2 in Bone and Adipose Tissues Inter-Communication ?. Bone Marrow Adiposity, Aug 2018, Lille, France.

Bon N, **Boulestreau J**, Autrusseau F, Penel G, Chauveau C, et al. PiT2 deficiency results in skeletal phenotype associated with alteration of adipose tissues. International Meeting on Bone Marrow Adiposity, BMA 2017, Aug 2017, Lausanne, Switzerland.

Grants

ISEV2021 Oral Communication Award by FSEV (2021).

Additional information

Languages: French (mother tongue), Upper intermediate level in English (C1).

Computer skills:

- Certificat informatique et internet (C2i) – Certification in basic computer science and uses of internet.
- Basis in GraphPad Prism
- Manage the Microsoft Office software

Annexe

Article 6 (Revue de la littérature) : La sénescence : de son implication physiopathologique aux traitements futurs

Senescence: From physiopathology to future treatments

Jérémy Boulestreau, Damien Véret, Jean-Marc Brondello et Danièle Noël.

Publiée dans : Revue du Rhumatisme Monographies

Revue du rhumatisme monographies 88 (2021) 87–91

Disponible en ligne sur ScienceDirect www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France EM|consulte www.em-consulte.com

La sénescence : de son implication physiopathologique aux traitements futurs

Senescence: From physiopathology to future treatments

Jérémy Boulestreau[a,1], Damien Véret[a,1], Jean-Marc Brondello[a,1], Danièle Noël[a,b,1,*]

[a] *IRMB, University of Montpellier, INSERM, Montpellier, France*
[b] *Clinical immunology and osteoarticular disease therapeutic unit, department of rheumatology, CHU Montpellier, Montpellier, France*

INFO ARTICLE

Historique de l'article :
Accepté le 22 décembre 2020
Disponible sur Internet le 29 dï¿½cembre 2020

Mots clés :
Sénescence
Arthrose
Thérapie
Sénolytique
Cellule souche mésenchymateuse
Vésicule extracellulaire
MiRNA

RÉSUMÉ

La sénescence cellulaire est maintenant reconnue comme un mécanisme fondamental du vieillissement et l'élimination des cellules sénescentes est devenue une nouvelle cible thérapeutique pour les maladies dégénératives liées à l'âge, notamment dans l'arthrose. De nouvelles stratégies thérapeutiques qui visent à éliminer les cellules sénescentes ou sénothérapies se sont développées ces dernières années. Un certain nombre de cibles et de molécules thérapeutiques ont été identifiées et sont en cours d'évaluation en phases précliniques ou cliniques. Cette revue a pour objectif de faire le point sur l'avancée des traitements médicamenteux, cellulaires et acellulaires qui pourraient contribuer à retarder ou limiter la progression de l'arthrose.
© 2021 Société Française de Rhumatologie. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Keywords:
Senescence
Osteoarthritis
Therapy
Senolytic
Mesenchymal stem cell
Extracellular vesicle
miRNA

ABSTRACT

Cellular senescence has emerged as a fundamental mechanism of aging and neutralization of senescent cells has attracted much attention as a new therapeutic target for age-related diseases, including osteoarthritis. Novel therapeutic strategies that aim at eliminating senescent cells, called senotherapies, have been launched during the past few years. A number of therapeutic targets and drugs have been identified and are being evaluated in pre-clinical and clinical phases. Here, we review the growing field of senotherapies, including senolytics, cellular and acellular therapies that could contribute to delay or limit osteoarthritis progression.
© 2021 Société Française de Rhumatologie. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

L'arthrose est une pathologie dégénérative du sujet âgé qui touche tous les tissus de l'articulation et se caractérise par un déséquilibre entre anabolisme et catabolisme de la matrice extracellulaire du cartilage, une inflammation synoviale chronique et une augmentation de l'apoptose. À ces dysfonctionnements, s'ajoute l'accumulation de cellules sénescentes qui participent également à la physiopathologie de la maladie. L'élimination de ces cellules est l'objectif des sénothérapies qui sont en cours de développement pré-clinique et clinique afin de retarder la progression de l'arthrose.

2. Sénescence

La sénescence cellulaire est caractérisée par une perte de la capacité prolifératives des cellules [1]. Elle est induite en réponse à des signaux intrinsèques tels qu'une attrition des télomères et/ou des changements métaboliques (dommages de l'ADN, stress oxydant) mais aussi en réponse à des signaux extrinsèques via

* Auteur correspondant. Inserm U1183, IRMB, Hôpital Saint-Éloi, 80, avenue Augustin-Fliche, 34295 Montpellier cedex 5, France.
Adresse e-mail : daniele.noel@inserm.fr (D. Noël).
[1] Contribution égale des auteurs.

https://doi.org/10.1016/j.monrhu.2020.12.007
1878-6227/© 2021 Société Française de Rhumatologie. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

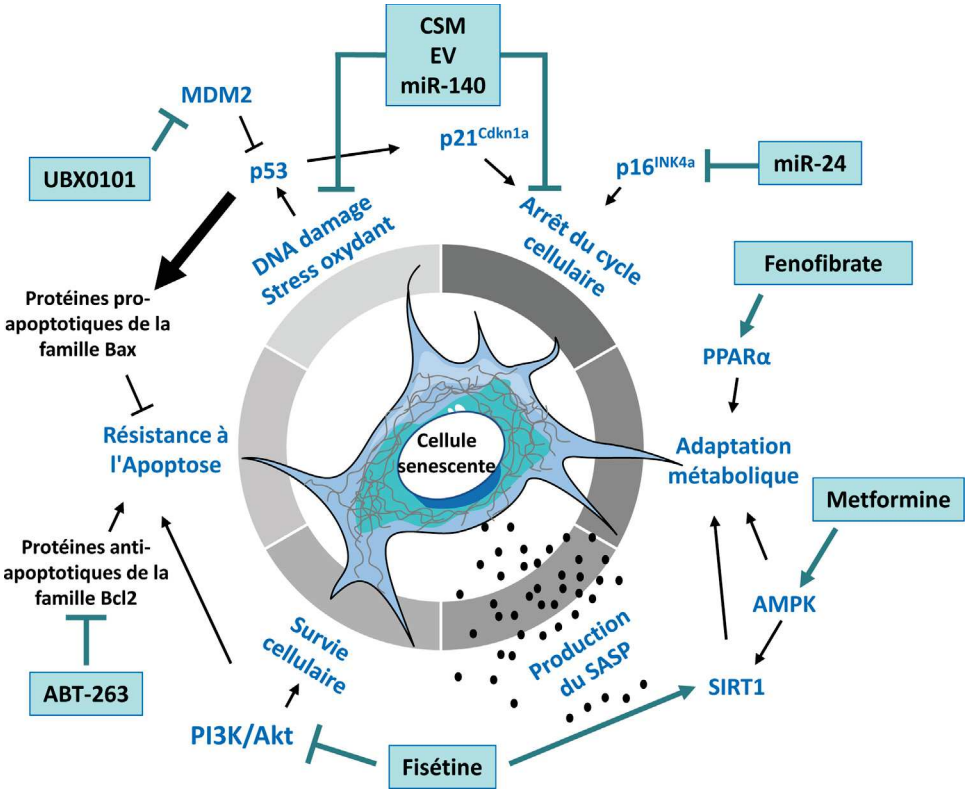


Fig. 1. Caractéristiques des cellules sénescentes et leurs ciblages sénothérapeutiques. Les principales voies et processus impliqués dans la sénescence sont indiqués en bleu et les principaux traitements en cours d'évaluation sont encadrés en vert.

Tableau 1
Caractéristiques des cellules sénescentes.

Arrêt du cycle cellulaire
Expression d'inhibiteurs du cycle mitotique : p16, p21
Changement morphologique hypertrophique
Résistance aux signaux apoptotiques
Lésions sur l'ADN avec ou sans érosion des télomères
Changement métabolique
Augmentation de l'activité lysosomale de la β-galactosidase
Changement chromatinien
Changement épigénétique
Établissement d'un sécretome inflammatoire et catabolique appelé SASP

l'action chronique de nombreux facteurs inflammatoires et/ou trophiques. Ce syndrome cellulaire peut affecter des cellules en prolifération, des cellules post-mitotiques ou quiescentes. Outre l'arrêt prolifératif, un ensemble de marqueurs permet de qualifier la sénescence (Tableau 1) (Fig. 1) [2]. On peut citer une adaptation métabolique comme une augmentation accrue de l'activité β-galactosidase lysosomale (SA-βGal), la détection de lésions sur l'ADN, une surexpression de protéines inhibitrices du cycle cellulaire telles que $p16^{INK4A}$, $p21^{Cdkn1a}$ ou p53, une résistance à l'apoptose et la production d'un sécrétome associé au phénotype sénescent (SASP) aux propriétés inflammatoires (IL-1α/β, IL-6, IL-8, TNFα) et de remodelage de la matrice (métalloprotéinases matricielles (MMP1/3/13)) (pour revue [3,4]). Par ses effets paracrines, la sénescence cellulaire orchestre ainsi le remodelage des tissus au cours de la réparation tissulaire ou du développement embryonnaire (pour revue [5]). Néanmoins, avec le vieillissement, les cellules sénescentes s'accumulent et sont à l'origine de l'apparition de nombreuses maladies du sujet âgé. En effet, le lien causal entre dégénérescence des tissus et accumulation de cellules sénescentes a pu être démontré grâce à deux modèles murins transgéniques (p16-INKATTAC et p16-3MR) qui permettent de tracer les cellules sénescentes [6,7]. Des cellules sénescentes sont détectées dans de nombreux tissus de différents modèles précliniques de pathologies dégénératives, et notamment dans le modèle murin d'arthrose induite par déstabilisation du ménisque [7]. Dans ce modèle, l'élimination des cellules sénescentes par une approche pharmacologique protège contre la dégradation du cartilage. Ainsi, l'utilisation de molécules dites sénothérapeutiques, capables de cibler les cellules sénescentes, ouvre de nouvelles perspectives cliniques à cette pathologie qui souffre toujours de l'absence de traitement curatif.

3. Sénothérapies appliquées à l'arthrose

3.1. UBX0101 et la voie MDM2/P53

Le niveau protéique du suppresseur de tumeur p53 est au centre du choix de la cellule entre l'entrée en sénescence où p53 est faiblement actif et la mort par apoptose où p53 est fortement actif (Fig. 1). Dès lors, cibler cette voie a été la première stratégie sénothérapeutique décrite pour le traitement de l'arthrose. UBX0101 est un antagoniste de MDM2, une ubiquitine-ligase impliquée dans la dégradation protéosomale de p53. Bloquer la dégradation de p53 induit sa forte accumulation. Des chondrocytes arthrosiques induits en sénescence in vitro sont sensibles à la mort cellulaire en dose réponse à l'UBX0101 [7]. De plus, le traitement in vitro d'explants de cartilage de patients ou l'injection intra-articulaire d'UBX0101 dans les modèles murins d'arthrose réduisent la production d'IL1β et de MMP-13 tout en rétablissant l'expression du collagène de type II et de l'aggrécane [7,8]. Ces travaux prometteurs ont permis le lancement d'un essai clinique randomisé multicentrique sur 161 patients, âgés de 40 à 85 ans pour un traitement de la gonarthrose chez l'homme (voir le site *clinicaltrials.gov*, ref NCT04349956). Néanmoins, aucune améliora-

tion significative de l'indice WOMAC n'a été observée, 12 semaines après l'injection intra-articulaire d'UBX0101 [9].

3.2. Fénofibrate et la voie PPARα

Les fibrates sont des agents hypolipidémiants utilisés depuis des décennies dans le traitement du cholestérol. Les fibrates inhibent les récepteurs activables par les proliférateurs des peroxysomes (PPAR). La stimulation des PPAR conduit à une augmentation du catabolisme des acides gras via les voies de β et ω-oxydation. Les PPAR possèdent également une activité anti-inflammatoire en inhibant la voie NF-κB et la production de cytokines pro-inflammatoires [10]. Des travaux récents ont permis de montrer que le fénofibrate réduit également la production des marqueurs du SASP sur des chondrocytes sénescents traités à l'IL-6 [11]. Sur des explants de cartilage de patients arthrosiques, cet agoniste peut également induire la mort cellulaire et réduire la sénescence. Il possède donc des propriétés hypolipidémiantes et sénothérapeutiques.

3.3. Fisétine et la voie des PI3K/Akt

La fisétine est un flavonoïde appartenant à la même famille que la quercétine, retrouvée dans de nombreux aliments. Elle agit sur la voie PI3K/Akt impliquée dans la survie des cellules à des signaux extrinsèques. L'ajout de fisétine sur des chondrocytes arthrosiques, pré-traités à l'IL1β pendant 24 h, réduit leur viabilité cellulaire [12]. La fisétine induit également une surexpression de SIRT1, une sirtuine ayant un rôle inhibiteur de la sénescence, tout en réduisant l'expression de COX2 et, la production d'oxyde nitrique (NO) et des composants du SASP. L'ajout de sirtinol, un inhibiteur de SIRT1, abolit les effets de la fisétine in vitro. Sur un modèle expérimental d'arthrose de souris, la fisétine administrée par gavage quotidien, prévient la dégradation du cartilage mais aussi l'hypertrophie de la membrane synoviale et la formation d'ostéophytes [12]. Suite à ces résultats, l'intérêt clinique de la fisétine est maintenant en cours d'évaluation dans un essai clinique de phase I dans le traitement de l'arthrose (NCT04210986).

3.4. ABT-263 (Navitoclax©) et les voies anti-apoptotiques

Pour échapper à l'apoptose, les cellules sénescentes surexpriment les Protéines Anti-apoptotiques des Cellules Sénescentes (ou SCAPs) appartenant à la famille Bcl-2. Les composés tels que ABT-263 inhibent compétitivement ces SCAPs et rétablissent la mort par apoptose des cellules sénescentes. Il a ainsi été montré qu'ABT-263/Navitoclax© réduit drastiquement le nombre de chondrocytes arthrosiques positifs pour la SA-βGal et l'expression des marqueurs du SASP, 10 jours après le début du traitement [13]. Le Navitoclax© restaure le niveau d'expression de Sox-9 et augmente le marquage à la Safranine O des micropellets indiquant un rééquilibre anabolique. Dans un modèle d'arthrose post-traumatique chez le rat, l'injection intra-articulaire d'ABT-263 réduit les lésions du cartilage et l'atteinte de l'os sous-chondral. En outre, le cartilage des rats traités exprime moins de marqueurs de sénescence et plus de collagène de type II, confirmant un rôle protecteur dans l'arthrose post-traumatique.

3.5. Metformine et la voie AMPK

La metformine, un antidiabétique oral très courant, est connue pour moduler le métabolisme cellulaire en activant AMPK tout en inhibant mTORC1. In vitro, la metformine contrecarre les effets délétères du TNF-α ou de l'IL-1β sur des chondrocytes murins en diminuant les marqueurs cataboliques du SASP et en stimulant l'expression de Sox-9, du collagène de type II, de l'agrécane et d'IGF-1 [14]. Dans un modèle de souris d'arthrose post-traumatique, la metformine distribuée dans l'eau de boisson prévient la dégradation du cartilage et ralentit la formation d'ostéophytes tout en augmentant la forme active de l'AMPK dans le cartilage des souris traitées [15,16]. À noter que tous les effets chondroprotecteurs de la metformine sont perdus dans les souris déficientes pour AMPK. Ainsi, ce composé possède des propriétés anti-diabétiques mais également sénolytiques en limitant la progression de l'arthrose.

3.6. MiRNAs et régulation de la sénescence

Les miRNAs sont un groupe conservé de petits ARN non codants composés de 20 à 22 nucléotides qui modulent l'expression post-transcriptionnelle des ARN messagers en se liant à leur région 3'-UTR, provoquant ainsi leur dégradation ou bloquant leur traduction. Plusieurs miRNAs ont été identifiés comme régulateurs de la sénescence dans les chondrocytes arthrosiques [17]. Par exemple, la surexpression de miR-34a inhibe l'expression de SIRT1 et induit l'apoptose de chondrocytes arthrosiques humains tandis que la diminution de miR-24 qui cible $p16^{INK4a}$ est associée à l'induction de sénescence dans ces cellules [18,19]. In vivo, l'injection intra-articulaire d'un inhibiteur de miR-34a abroge la destruction du cartilage dans un modèle d'arthrose chez le rat [18,20]. De même, un inhibiteur de miR-495 diminue la progression de l'arthrose dans un modèle de transsection du ligament croisé antérieur chez le rat [21]. Alors que l'injection de miR-204 accélère le développement de l'arthrose dans un modèle post-traumatique chez la souris, l'administration d'un inhibiteur de miR-204 améliore les symptômes de l'arthrose et réduit la sécrétion des facteurs du SASP [22]. Le miR-140 a été le premier miRNA identifié dans le cartilage articulaire et associé à un effet protecteur dans l'arthrose en régulant la production d'ADAMTS5 [23]. Une étude récente a révélé son rôle sénoprotecteur en montrant que la transfection de chondrocytes arthrosiques par miR-140 inhibe l'expression de SA-βGal, $p16^{INK4a}$, p21, p53 et l'apparition de foyers γH2AX [24]. Un autre exemple de la régulation de la sénescence des chondrocytes arthrosiques par un miRNA est celui de miR-21-5p dont l'expression est diminuée dans le cartilage arthrosique [25]. Sa régulation à la hausse augmente l'expression du collagène de type II et la viabilité cellulaire tout en diminuant l'expression de MMP13 et l'activité SA-βGal. Enfin, il a été montré que miR-101 peut se lier à LINC00623 et à l'oncogène HRAS qui sont tous deux diminués dans l'arthrose [26]. De manière intéressante, l'inhibition de miR-101 par un inhibiteur spécifique contribue à la réduction de l'activité SA-βGal et de marqueurs du SASP comme MMP13 dans les chondrocytes arthrosiques induits en sénescence par un stress inflammatoire. Ces exemples illustrent l'intérêt de développer des thérapies basées sur la régulation des miRNAs pour restaurer l'homéostasie cellulaire et contrecarrer les effets délétères de la sénescence associée à l'arthrose.

4. Sénothérapies cellulaires ou vésiculaires de l'arthrose

4.1. Thérapie cellulaire

Les premiers essais cliniques de thérapie cellulaire chez des patients atteints d'arthrose remontent à la fin des années 80 avec l'implantation de chondrocytes autologues [27]. Depuis, l'utilisation des cellules souches/stromales mésenchymateuses (CSM) pour atténuer les symptômes ou ralentir leur progression a été évaluée dans plusieurs essais cliniques et leur efficacité démontrée [28]. Le mécanisme d'action de ces cellules est large, allant de l'effet immunosuppresseur, prolifératif, anti-fibrotique à un rôle anti-apoptotique. Néanmoins, leur effet possible sur la sénescence n'a été évalué que récemment. Des travaux récents

ont confirmé l'effet protecteur des CSM sur la sénescence de chondrocytes arthrosiques, induite par des dommages à l'ADN [29]. Les CSM sont capables de réduire l'expression de molécules du SASP (TGF-β1, ADAMTS3, ADAMTS5) ainsi que l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire associés à la sénescence, à savoir $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$ et $p27^{KIP1}$ par les chondrocytes arthrosiques. En revanche, lorsqu'elles sont sénescentes, les CSM perdent leur capacité à réguler l'expression de $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p27^{KIP1}$ et des facteurs du SASP (TGF-β1 et ADAMTS3). Ainsi, l'effet sénosuppresseur des CSM semble impacté par leur entrée en sénescence.

Outre les CSM, l'intérêt des cellules CAR-T comme agents sénolytiques a récemment été démontré. Des cellules CAR-T ciblant le récepteur activateur du plasminogène de type urokinase (uPAR), une protéine de surface induite pendant la sénescence, peuvent détruire spécifiquement les cellules sénescentes [30]. L'effet sénolytique a été montré in vivo dans un modèle de fibrose hépatique mais les résultats spectaculaires ouvrent leur potentiel thérapeutique à d'autres pathologies chroniques associées au vieillissement, telles que l'arthrose.

4.2. Thérapie acellulaire

L'effet du sécrétome de CSM humaines sur les marqueurs de sénescence de chondrocytes arthrosiques a été évalué in vitro. Le milieu conditionné (MC) des CSM est capable de réguler à la baisse les marqueurs de sénescence, notamment l'activité SA-βGal, l'accumulation de foyers γH2AX, la production de marqueurs du stress oxydant, l'activation des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK), l'expression de la cavéoline-1 et celle de p21 chez des chondrocytes soumis à un stress inflammatoire [31]. Cet effet est médié par l'augmentation de l'expression de SIRT1 qui en retour diminue l'activité de p53. Des résultats similaires ont été décrits sur des ostéoblastes humains arthrosiques [32]. De plus, la production de médiateurs inflammatoires tels que l'IL-6 et la prostaglandine E2 (PGE2) était fortement diminuée. Il est donc montré que le MC des CSM exerce un effet protecteur sur des chondrocytes ou des ostéoblastes arthrosiques en contrant la sénescence prématurée induite par un stress inflammatoire. De plus, il a été rapporté que le sécrétome de CSM fœtales humaines améliore la sénescence réplicative des CSM adultes, comme le montre une activité SA-βGal significativement réduite, une prolifération cellulaire accrue et un potentiel de différenciation ostéogénique supérieur [33].

Les mécanismes sénosuppresseurs des CSM et de leur sécrétome ne sont pas encore élucidés mais les données de la littérature suggèrent que les vésicules extracellulaires (EV) libérées par les CSM seraient majoritairement responsables de leur effet protecteur. Les EV constituent une population hétérogène de vésicules produites soit, par bourgeonnement de la membrane plasmique (microvésicules ou microparticules de 120 à 500 nm de diamètre) soit, par le compartiment endosomal au travers de la formation des corps multivésiculaires (MVB) qui fusionnent ensuite avec la membrane plasmique pour libérer les exosomes de taille comprise entre 50 et 150 nm [34]. Un troisième type d'EV appelé corps apoptotique (500–5000 nm) est caractérisé par une libération lors de la fragmentation des cellules apoptotiques. Les EV contiennent des protéines, des lipides et des acides nucléiques, notamment des ARN non codants, qui sont libérés dans le cytosol de la cellule cible avant d'être utilisés par les mécanismes cellulaires.

Le rôle modulateur des EV sur le processus de vieillissement n'a été que peu étudié dans l'arthrose [35]. Cependant, il a été démontré que les EV de CSM réduisent la production d'IL6 et PGE2, l'expression des marqueurs du stress oxydant et les caractéristiques de sénescence d'ostéoblastes primaires issus de patients arthrosiques [32]. Les EV isolées de CSM adultes ou de cellules induites pluripotentes (iPS) réduisent les marqueurs de sénescence de CSM en sénescence réplicative ou génétiquement induite par expression de la progérine [36]. Cet effet est médié par les peroxiredoxines transportées par les EV qui diminuent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Une autre étude montre que des EV de CSM isolées de rats jeunes diminuent l'expression des marqueurs du vieillissement et des composants de la voie mTOR et augmentent les marqueurs de pluripotence des CSM isolées de rats âgés [37]. En revanche, l'incubation de CSM de rats jeunes avec des EV produites par des CSM de rats âgés a généré des effets inverses. Ces études indiquent que les EV libérées par les CSM sont largement responsables de leur effet sénoprotecteur. De manière similaire, il a été montré que les taux circulants de nicotinamide phosphoribosyltransférase extracellulaire (eNAMPT) diminuent avec l'âge et que la perfusion d'EV isolées de souris jeunes peut prolonger la durée de vie de souris âgées [38]. Cet effet est médié par l'eNAMPT contenu dans les EV qui, après internalisation dans les cellules cibles, augmente la synthèse de NAD^+, un facteur de régulation du processus de vieillissement. Il faut souligner que, non seulement les EV peuvent exercer un rôle de régulation des marqueurs de sénescence, mais elles peuvent également être associées à un profil sécréteur spécifique du vieillissement qui les rend particulièrement intéressantes pour le développement de nouveaux biomarqueurs.

5. Conclusion

L'élimination des cellules sénescentes par différents types de sénothérapies est l'objet d'un nombre croissant de projets de recherche et la translation vers la clinique pour le traitement des maladies dégénératives liées au vieillissement est déjà engagée. Plusieurs essais cliniques sont en cours pour le traitement de la dégénérescence rénale, de la fibrose pulmonaire idiopathique ou l'arthrose (pour revue : Veret et al., sous presse). Différentes molécules sont arrivées à un stade de développement dans une vingtaine de start-ups [9]. L'étape suivante consistera à développer des stratégies ciblant l'organe déficient, une articulation arthrosique par exemple, pour optimiser les sénothérapies.

Déclaration de liens d'intérêts

DN est cofondatrice de la société MedXcell Science. DV reçoit un financement de bourse CIFRE par la société MedXcell Science. Les autres auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Remerciements

Nous remercions l'Inserm et l'université de Montpellier pour leur soutien financier ainsi que l'Agence nationale pour la recherche qui finance l'Infrastructure Nationale « ECELLFRANCE : développement d'une plateforme de thérapie basée sur les cellules souches mésenchymateuses adultes » (ANR-11-INSB-005). JB bénéficie d'un financement de la fondation FOREUM, Fondation pour la Recherche en Rhumatologie.

Références

[1] Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res 1961;25:585–621.
[2] Tachikart Y, Malaise O, Constantinides M, et al. [Senescent cells: a target in osteo-articular diseases]. Med Sci (Paris) 2018;34:547–53.
[3] Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. Annu Rev Physiol 2013;75:685–705.
[4] Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, et al. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. Annu Rev Pathol 2010;5:99–118.
[5] He S, Sharpless NE. Senescence in health and disease. Cell 2017;169:1000–11.
[6] Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T, et al. Clearance of p16lnk4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. Nature 2011;479:232–6.
[7] Jeon OH, Kim C, Laberge RM, et al. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. Nat Med 2017;23:775–81.

[8] Jeon OH, David N, Campisi J, et al. Senescent cells and osteoarthritis: a painful connection. J Clin Invest 2018;128:1229–37.
[9] Dolgin E. Send in the senolytics. Nat Biotechnol 2020;38:1371–7.
[10] Scirpo R, Fiorotto R, Villani A, et al. Stimulation of nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-γ limits NF-κB-dependent inflammation in mouse cystic fibrosis biliary epithelium. Hepatology 2015;62:1551–62.
[11] Nogueira-Recalde U, Lorenzo-Gomez I, Blanco FJ, et al. Fibrates as drugs with senolytic and autophagic activity for osteoarthritis therapy. EBioMedicine 2019;45:588–605.
[12] Zheng W, Feng Z, You S, et al. Fisetin inhibits IL-1beta-induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes through activating SIRT1 and attenuates the progression of osteoarthritis in mice. Int Immunopharmacol 2017;45:135–47.
[13] Yang H, Chen C, Chen H, et al. Navitoclax (ABT263) reduces inflammation and promotes chondrogenic phenotype by clearing senescent osteoarthritic chondrocytes in osteoarthritis. Aging (Albany NY) 2020;12:12750–70.
[14] Feng X, Pan J, Li J, et al. Metformin attenuates cartilage degeneration in an experimental osteoarthritis model by regulating AMPK/mTOR. Aging (Albany NY) 2020;12:1087–103.
[15] Li J, Zhang B, Liu WX, et al. Metformin limits osteoarthritis development and progression through activation of AMPK signalling. Ann Rheum Dis 2020;79:635–45.
[16] Li H, Ding X, Terkeltaub R, et al. Exploration of metformin as novel therapy for osteoarthritis: preventing cartilage degeneration and reducing pain behavior. Arthritis Res Ther 2020;22:34.
[17] Swingler TE, Niu L, Smith P, et al. The function of microRNAs in cartilage and osteoarthritis. Clin Exp Rheumatol 2019;37:40–7.
[18] Yan S, Wang M, Zhao J, et al. MicroRNA-34a affects chondrocyte apoptosis and proliferation by targeting the SIRT1/p53 signaling pathway during the pathogenesis of osteoarthritis. Int J Mol Med 2016;38:201–9.
[19] Philipot D, Guerit D, Platano D, et al. p16INK4a and its regulator miR-24 link senescence and chondrocyte terminal differentiation-associated matrix remodeling in osteoarthritis. Arthritis Res Ther 2014;16:R58.
[20] Zhang W, Hsu P, Zhong B, et al. MiR-34a enhances chondrocyte apoptosis, senescence and facilitates development of osteoarthritis by targeting DLL1 and regulating PI3K/AKT pathway. Cell Physiol Biochem 2018;48:1304–16.
[21] Yang DW, Qian GB, Jiang MJ, et al. Inhibition of microRNA-495 suppresses chondrocyte apoptosis through activation of the NF-kappaB signaling pathway by regulating CCL4 in osteoarthritis. Gene Ther 2019;26:217–29.
[22] Kang D, Shin J, Cho Y, et al. Stress-activated miR-204 governs senescent phenotypes of chondrocytes to promote osteoarthritis development. Sci Transl Med 2019;11, eaar6659.
[23] Miyaki S, Sato T, Inoue A, et al. MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. Genes Dev 2010;24:1173–85.
[24] Si HB, Yang TM, Li L, et al. miR-140 attenuates the progression of early-stage osteoarthritis by retarding chondrocyte senescence. Mol Ther Nucleic Acids 2020;19:15–30.
[25] Zhu H, Yan X, Zhang M, et al. miR-21-5p protects IL-1beta-induced human chondrocytes from degradation. J Orthop Surg Res 2019;14:118.
[26] Lu G, Li L, Wang B, et al. LINC00623/miR-101/HRAS axis modulates IL-1beta-mediated ECM degradation, apoptosis and senescence of osteoarthritis chondrocytes. Aging (Albany NY) 2020;12:3218–37.
[27] Brittberg M. Autologous chondrocyte implantation–technique and long-term follow-up. Injury 2008;39:S40–9.
[28] Song Y, Zhang J, Xu H, et al. Mesenchymal stem cells in knee osteoarthritis treatment: a systematic review and meta-analysis. J Orthop Translat 2020;24:121–30.
[29] Malaise O, Tachikart Y, Constantinides M, et al. Mesenchymal stem cell senescence alleviates their intrinsic and seno-suppressive paracrine properties contributing to osteoarthritis development. Aging (Albany NY) 2019;11:9128–46.
[30] Amor C, Feucht J, Leibold J, et al. T cells reverse senescence-associated pathologies. Nature 2020;583:127–32.
[31] Platas J, Guillen MI, Perez Del Caz MD, et al. Paracrine effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells in inflammatory stress-induced senescence features of osteoarthritic chondrocytes. Aging (Albany NY) 2016;8:1703–17.
[32] Tofino-Vian M, Guillen MI, Perez Del Caz MD, et al. Extracellular Vesicles from Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Downregulate Senescence Features in Osteoarthritic Osteoblasts. Oxid Med Cell Longev 2017;2017 [7197598].
[33] Wang B, Lee WY, Huang B, et al. Secretome of human fetal mesenchymal stem cell ameliorates replicative senescen. Stem Cells Dev 2016;25:1755–66.
[34] van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Nat Rev Mol Cell Biol 2018;19:213–28.
[35] Boulestreau J, Maumus M, Rozier P, et al. Mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles in aging. Front Cell Dev Biol 2020;8:107.
[36] Liu S, Mahairaki V, Bai H, et al. Highly purified human extracellular vesicles produced by stem cells alleviate aging cellular phenotypes of senescent human cells. Stem Cells 2019;37:779–90.
[37] Fafian-Labora J, Morente-Lopez M, Sanchez-Dopico MJ, et al. Influence of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in vitro and their role in ageing. Stem Cell Res Ther 2020;11:13.
[38] Yoshida M, Satoh A, Lin JB, et al. Extracellular vesicle-contained eNAMPT delays aging and extends lifespan in mice. Cell Metab 2019;30 [329-42 e5].

Rôle thérapeutique des vésicules extracellulaires des cellules stromales mésenchymateuses dans l'arthrose : Impact de la sénescence

L'âge est le facteur de risque le plus important dans l'incidence des maladies dégénératives et notamment l'arthrose, qui est caractérisée par l'accumulation de cellules sénescentes au niveau des articulations. A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif de l'arthrose. Parmi les approches thérapeutiques en cours d'évaluation, l'injection de cellules stromales mésenchymateuses du tissu adipeux (ASCs) a montré des résultats prometteurs dans des études pré-cliniques et cliniques. Elles exercent leurs propriétés régénératrices au travers de la sécrétion de médiateurs libérés dans le milieu extracellulaire ou contenus dans des vésicules extracellulaires (EV). Le premier objectif de mon travail de thèse a été d'étudier l'impact de la sénescence des ASCs utilisées pour produire des EV sur leur rôle thérapeutique dans l'arthrose. Le second objectif a été de déterminer si les ASCs et leurs EV ont un effet sénoprotecteur sur des chondrocytes arthrosiques.

Nous avons développé un modèle d'ASCs sénescentes et montré que les EV qu'elles produisent conservent en partie les capacités des EV saines à réguler le phénotype des chondrocytes humains arthrosiques in vitro. En revanche, les EV d'ASCs sénescentes perdent leur effet thérapeutique dans un modèle murin d'arthrose induite à la collagénase. En parallèle, nous avons testé l'effet sénoprotecteur des EV dérivées d'ASCs saines et sénescentes dans deux modèles de chondrocytes induits en sénescence par un stimulus inflammatoire (IL1β) ou par induction de dommages à l'ADN (étoposide). Dans ces deux modèles, les EV d'ASCs saines ou sénescentes freinent l'induction de la sénescence des chondrocytes suggérant que ce mécanisme d'action participe à leur effet bénéfique dans l'arthrose. Nous avons également montré que les ASCs soumises à un environnement sénescent perdent en partie leur effet sénoprotecteur, ce qui indique que les CSM-EV peuvent être une option pertinente pour de futures applications cliniques dans les maladies dégénératives.

En conclusion, nous avons montré que les EV isolées d'ASCs sénescentes perdent leurs propriétés thérapeutiques dans un modèle murin d'arthrose malgré la conservation de leur effet sénoprotecteur sur des chondrocytes arthrosiques in vitro.

Mots-clés : Vieillissement ; sénescence ; cellules stromales mésenchymateuses ; vésicules extracellulaires ; arthrose.

Therapeutic role of extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells in osteoarthritis: Impact of senescence

Age is the most important risk factor in the incidence of degenerative diseases, especially osteoarthritis (OA), which is characterized by the accumulation of senescent cells in joints. Currently, there is no cure for osteoarthritis. Among the therapeutic approaches that are being evaluated, the injection of adipose mesenchymal stromal cells (ASCs) has shown promising results in pre-clinical and clinical studies. They exert their regenerative properties through the secretion of mediators released into the extracellular medium or contained in extracellular vesicles (EV). The first objective of my PhD thesis was to evaluate the impact of the senescence of ASCs used to produce EVson their therapeutic effect in osteoarthritis.The second objective was to determine whether ASCs and their EV exert a senoprotective effect on osteoarthritic chondrocytes.

We developed a model of senescent ASCs and showed that their EVs maintain the ability of EV from healthy ASCs to regulate *in vitro* the phenotype of human OA chondrocytes. By contrast, EV from senescent ASCs lose their therapeutic effect in the mouse model of collagenase-induced osteoarthritis. In parallel, we tested the senoprotective effect of EVs derived from healthy ASCs in two models of chondrocytes induced in senescence using either an inflammatory (IL1β) or a DNA damage (etoposide) stimulus. In the two models, EV from healthy or senescent ASCs prevent the induction of senescence on chondrocytes suggesting that this mechanism plays a role in their beneficial effect in OA. We also shown that ASCs exposed to a senescent environment partly lose their senoprotective effect, indicating that MSC-EV may be a relevant option for future clinical applications in degenerative diseases.

In conclusion, we provided evidence that EV isolated from senescent ASCs lose their therapeutic properties in a murine model of osteoarthritis even though they exert a senoprotective effect on OA chondrocytes in vitro.

Key words: Aging; senescence; mesenchymal stromal cells; extracellular vesicles; osteoarthritis.