

Mécanotransduction et cellules souches mésenchymateuses humaines : Etude de l'effet d'une contrainte d'étirement équibiaxial sur la voie de TGF-ß

Huahua Chen

▶ **To cite this version:**

Huahua Chen. Mécanotransduction et cellules souches mésenchymateuses humaines : Etude de l'effet d'une contrainte d'étirement équibiaxial sur la voie de TGF-ß. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2009. Français. NNT : 2009NAN10068 . tel-01748384

HAL Id: tel-01748384
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748384

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

Ecole Doctorale Biologie-Santé-Environnement

Thèse

Présentée et soutenue le 21 juillet 2009
pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY I

Spécialité : Ingénierie cellulaire et tissulaire

Par

Huahua CHEN

Titre :

Mécanotransduction et cellules souches mésenchymateuses humaines.

Etude de l'effet d'une contrainte d'étirement équibiaxial sur la voie de TGFβ

Directeur de thèse : Docteur Danièle BENSOUSSAN
Co-Directeur de thèse : Docteur Natalia de ISLA

JURY

Rapporteurs :	
Mme. Nadia BENKIRANE-JESSEL	DR/INSERM U977, Université Louis Pasteur, Strasbourg
M. René SANTUS	PU/INSERM U312, MNHN, Paris
Examinateurs :	
M. Jean-François STOLTZ	PU-PH, UMR 7561 CNRS-UHP, Nancy
Mme. Danièle BENSOUSSAN	HDR-PH, UTCT, CHU, Nancy
Mme. Natalia de ISLA	MCU, UMR 7561 CNRS-UHP, Nancy
M. Daniel ISABEY	DR/ INSERM U841, Université Paris 12, Créteil

Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires
UMR 7561 CNRS-UHP, Faculté de Médecine - 54505 Vandœuvre-lès-Nancy

AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration scientifique entre le Laboratoire de Physiopathologie, Pharmacologie et Ingénierie Articulaires (CNRS UMR 7561) de la Faculté de Médecine de l'UHP, l'Unité de Thérapie Cellulaire et Tissulaire du CHU de Nancy, et le Département de Physiopathologie de la Faculté de Médecine de l'Université de Wuhan, Chine.

A mes parents

A mon mari

A toute ma famille et tous mes amis

Au terme de ce travail, je tiens avant tout à adresser mes remerciements les plus chaleureux à tous ceux qui m'ont aidée au cours de sa réalisation.

Je tiens tout d'abord à manifester ma gratitude à Monsieur le Professeur **Jean-François STOLTZ**, directeur du laboratoire, qui m'a fait l'honneur de m'accueillier et m'a permis de réaliser ce travail dans son laboratoire. Je lui suis très reconnaissante pour sa confiance, ses remarques, son soutien financier et scientifique.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Madame le Docteur **Danièle BENSOUSSAN**, mon directeur de thèse qui m'a encadrée. Je la remercie plus spécialement pour les nombreuses discussions et suggestions précieuses et pour la patience et le courage dont elle a témoigné lors de la correction de ce manuscrit.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Madame le Docteur **Natalia DE ISLA**, maître de conférence, ma co-directrice de recherche, pour ses nombreux conseils scientifiques durant ces trois années. Je la remercie plus spécialement pour la patience et le courage dont elle a témoigné lors de la correction de ce manuscrit.

Je remercie très sincèrement Madame le Professeur **Jing-Ping OUYANG**, directeur de laboratoire à Wuhan, pour m'avoir donné la possibilité de participer à cette collaboration scientifique, pour son aide et ses conseils scientifiques.

J'exprime ma profonde reconnaissance également à Monsieur le Professeur **Xiong WANG**, pour sa disponibilité et ses encouragements au cours de ma thèse ainsi que pour son aide, sa gentillesse et ses précieux conseils.

Je tiens à remercier Madame le Docteur **Sylvaine MULLER,** CR1 INSERM, pour m'avoir aidée lors de mon initiation à ces travaux.

Je tiens à remercier Madame le Docteur **Céline GIGANT-HUSELSTEIN**, maître de conférence, pour ses encouragements et son amitié.

Je remercie beaucoup **Claude WENDLING**, pour sa gentillesse, son aide et sa disponibilité.

Mesdames **Ghislaine CAUCHOIS**, **Monique GENTILS**, **Brigitte GUERBER** et **Karine LORCIN**, pour leur gentillesse à mon égard et leur soutien constant. Je leur exprime ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur **Dominique DUMAS**, Ingénieur de Recherche, pour sa sympathie, sons conseils et son aide concernant notamment la microscopie confocale.

Enfin, mes remerciements vont également vers mes chers collègues et amis du laboratoire pour m'avoir encouragée et supportée durant ces années :
Assia, Leticia, Nicolas B, Jessica, Nicolas S, Nasser, Estelle, Mariama, Lei, Cyril, Cédryck, Jingwei, Yinping, Yun, Elisabeth, Vanessa, Halima.

TABLE DE MATIERES

AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS 1
TABLE DE MATIERES 6
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 13
LISTE DES ABREVIATIONS 15
LISTE D'ILLUSTRATIONS..... 18
INTRODUCTION GENERALE..... 29
CHAPITRE I : ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES..... 33
I. Physiologie du cartilage articulaire 34
I.1. Constitution du cartilage articulaire 34
I.2. Structure du cartilage articulaire 37
I.3. Les contraintes mécaniques sur le cartilage articulaire..... 38
I.4. Fonctions du cartilage articulaire..... 38
II. Physiopathologie du cartilage articulaire 39
II.1. Stratégies thérapeutiques concernant les lésions cartilagineuses 40
II.1.1. Les traitements médicaux 40
II.1.2. Les traitements chirurgicaux..... 41
II.1.3. L'ingénierie tissulaire du cartilage..... 42
III. Cellules souches (CSs)..... 43
III.1. Les cellules souches embryonnaires (CSEs)..... 44
III.2. Les cellules souches fœtales et ombilicales 46
III.3. Les cellules souches adultes..... 46
III.3.1. Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) 47
III.3.2. Utilisation des CSMs en ingénierie cellulaire et tissulaire..... 53
IV. La différenciation de CSMs..... 54
IV.1. La régulation de la différenciation des CSMs..... 54
IV.1.1. Runx2 dans l'ostéogenèse et la chondrogenèse 56
IV.1.2. Sox9 dans la chondrogenèse 58
V. La chondrogenèse..... 59
V.1. La condensation de CSMs..... 59
V.2. La différenciation chondrocytaire..... 60

V.3. L'hypertrophie des chondrocytes 61

VI. La voie de signalisation de TGF-β et les protéines Smads 62

VI.1. Membres de la famille du TGF-β 62

VI.1.1. Le TGF-β 62

VI.2. Le modèle général de la voie de signalisation de TGF-β via Smads 63

VI.2.1. La « navette » des Smads entre le noyau et le cytoplasme 70

VI.3. La phosphorylation de Smads régulée par les voies de kinase 71

VI.4. La signalisation de TGF-β Smad-indépendante 72

VI.5. La relation entre la signalisation par TGF-β et le cytosquelette 73

VI.6. Rôle des TGF-βs dans la différenciation des CSMs 74

VI.7. Rôle de la protéine Smad3 dans la différenciation des CSMs 75

VII. Les contraintes mécaniques 75

VII.1. Réponse des cellules aux contraintes mécaniques 76

VII.1.1. Le mécanisme de la mécanotransduction cellulaire 76

VII.2. Les « comportements » cellulaires et la « précontrainte » (tensegrity) 78

VII.2.1. La précontrainte cellulaire et le modèle tenségrité 79

VII.2.2. La morphologie cellulaire et leur destiné 81

VII.3. Différenciation des CSMs par des contraintes mécaniques externes 82

VII.3.1. La compression 83

VII.3.2. L'étirement 84

VII.3.3. La pression hydrostatique 85

VII.3.4. Le cisaillement 86

VII.3.5. Contraintes mécaniques complexes 86

VII.4. Application de contraintes mécaniques contrôlées 87

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES 88

I. Culture cellulaire 89

I.1. Réactifs 89

I.2. Protocoles 90

I.2.1. Isolement des cellules à partir des prélèvements 90

I.2.2. Comptage des cellules 92

I.2.3. Comptage des CFU-Fs 92

I.2.4. Passage et congélation des cellules 92
I.3. Mise en condition des cellules 93
II. La stimulation mécanique 94
II.1. Les appareils de stimulation mécanique 94
II.1.1. L'appareil d'étirement 94
II.1.2. L'appareil de compression 95
II.2. Réactifs et matériels 96
II.3. Protocole 97
II.3.1. Fabrication des cylindres d'alginate/HA 97
II.3.2 La stimulation mécanique 97
III La stimulation biochimique 98
III.1. Réactifs 98
III.2. Protocole 98
IV. Cytométrie en flux 99
IV.1. Analyse de viabilité cellulaire, apoptose et nécrose en cytométrie en flux 99
IV.1.1. Principe 99
IV.1.2. Réactifs 100
IV.1.3. Protocole 100
IV.2. Analyse du cycle cellulaire en cytométrie en flux 101
IV.2.1 Principe 101
IV.2.2 Réactifs 103
IV.2.3 Protocole 103
IV.3. Analyse de l'expression de marqueur de surface cellulaire en cytométrie en flux 103
IV.3.1. Marquage par immunofluorescence directe 103
V. Analyse du métabolisme cellulaire 105
V.1. Principe 105
V.2. Réactifs 106
V.3. Protocole 106
VI. Etude de l'expression de protéines en microscope confocal 107
VI.1. Marquage par immunofluorescence indirect 107

VI.1.1 Principe du marquage par immunofluorescence indirecte 107
VI.1. 2 Réactifs 107
VI.1.3 Protocole 108
VI.2. Observation en microscopie confocale à balayage laser 109
VI.2. 1 Principe 109
VI.2.2. Protocole 112
VI.3. Analyse de la densité de fluorescence 112
VII. Etude de l'expression des protéines par Immuno-empreinte (Western blot) 113
VII.1. Principe 113
VII.2. Réactifs 113
VII.3. Protocole 115
VII.3.1. Extraction et préparation des protéines des cellules 115
VII.3.2. Electrophorèse des protéines 116
VII.3.3 Transfert 117
VII.3.4. Coloration au rouge ponceau 118
VII.3.5. Blocage de la membrane 119
VII.3.6 Immunomarquage 119
VII.3.7. Révélation par chimiluminescence 119
VIII. Etude de l'expression de gènes par RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 120
VIII.1. Principe 120
VIII.2. Réactifs 120
VIII.3. Protocole 122
VIII.3.1. Extraction des ARN totaux des cellules 122
VIII.3.2. Rétrotranscription des ARNm (RT) 123
VIII.3.3. Réaction de PCR 123
VIII.3.4. Electrophorèse des produits d'ADNs 124
IX. Etude de la concentration de TGFβ-1 dans le milieu de culture par ELISA 125
IX.1 Le principe d'ELISA 125
IX.2. Réactifs 126
IX.3. Protocole 127

X. Etude de l'élongation des cellules par microscope optique..... 127

XI. Analyse statistique..... 128

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS 129

Partie I : Optimisation des conditions de culture pour l'isolement et l'expansion des CSMs..... 130

I.1. Caractérisation morphologique des CSMs..... 130

I.2. Formation de colonies (CFU-Fs) 134

I.3. Prolifération cellulaire..... 135

I.4. Caractérisation phénotypique des cellules 136

I.5. Discussion :..... 138

Partie II : Etude de l'effet du TGF-β1 sur les CSMs et les chondrocytes..... 142

II.1. Effet du TGF-β1 sur la viabilité cellulaire..... 143

II.2. Effet du TGFβ1 sur le métabolisme des CSMs 143

II.3. L'effet du TGF-β1 sur le cycle cellulaire des CSMs 144

II.4. Etude de l'effet du TGF-β1 sur la phosphorylation de Smad3 (Smad3p) dans les CSMs et les chondrocytes 145

II.5. Effet du TGF-β1 sur l'expression des gènes de Sox9, Runx2 et PPARγ dans les CSMs par RT-PCR. 149

II.6. Discussion..... 151

Partie III: Etude de l'effet d'une contrainte d'étirement sur les CSMs et les chondrocytes 154

III.1. L'effet de l'étirement sur la viabilité des CSMs et des chondrocytes. 155

III.2. L'effet de l'étirement sur la prolifération des CSMs et des chondrocytes. 156

III.3. L'effet de l'étirement équiaxial sur la phosphorylation de protéines Smad3 (Smad3p) 158

III.3.1. L'effet de l'étirement en fonction du temps 158

III.3.2. Effet de l'interaction de l'étirement et du TGF-β1 sur la phosphorylation de Smad3 163

III.3.3. Effet de la fréquence d'application de l'étirement sur la phosphorylation des protéines Smad3..... 164

III.4. Effet de l'étirement sur l'expression des gènes Sox9, Runx2, PPARγ et du

Collagène II dans les CSMs. 166

III.5. Vers un mécanisme de mécanotransduction conduisant à la phosphorylation de Samd3 168

III.5.1. Implication du récepteur du TGFβ 168

III.5.2. Activation du TGFβ latent par la contrainte mécanique 170

III.5.3. Implication du cytosquelette 173

III.6. Discussion 178

CHAPITRE IV : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 181

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 187

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications dans des revues internationales

1. **H.H. Chen**, V. Decot, J.P. Ouyang, J.F. Stoltz, D. Bensoussan, N.G. de Isla. In vitro initial expansion of mesenchymal stem cells is influenced by the culture parameters used in the isolation process. **Bio-Medical Materials and Engineering**, 2009 (*sous presse*).
2. **H.H. Chen**, J.P. Ou-Yang, J.F. Stoltz, D. Bensoussan, N. de Isla. Effects of short-term cyclic tensile strain and TGF-β1 on smad pathway in undifferentiated human mesenchymal stem cells (*en preparation).*

Communications dans des congrès

1. **H.H. Chen**, J.P. Ou-Yang, J.F. Stoltz, N. de Isla. Effect of short-term cyclic tensile strain and TGF-β1 on smad pathway in human mesenchymal stem cells. (Abstract) **FASEB Journal**, 2009 (*sous presse*)
2. **H.H. Chen**, N.G. de Isla, N. Wang, H. Louis, C. Huselstein, P. Lacolley, J.P. Ouyang, J-F. Stoltz. Cyclic tensile strain effects on smad3 phosphorylation in human chondrocytes and mesenchymal stem cells. (Abstract, poster presentation) OARSI septembre 2008 Rome, **Osteoarthritis & cartilage**, 2008, Volume 16 (supplement 4): S199
3. **H.H. Chen**, V. Decot, J.P. Ouyang, J.F. Stoltz, D. Bensoussan, N.G. de Isla. In vitro initial expansion of mesenchymal stem cells is influenced by the culture parameters used in the isolation process. (Abstract, poster) **5rd meeting on "Bioengineering and biotherapies"** and 4rd meeting of Lorraine Center of Cartilage Engineering. Septembre 2008 Nancy
4. N.G. de Isla, **H.H. Chen**, C. Huselstein, D. Mainard, P, Netter, J.F. Stoltz, S. Muller. Mechanical compression effects on NO production in human OA cartilage explants under different oxygen tensions. (Abstract, poster) 4**rd meeting on "Bioengineering and biotherapies"** and 3rd meeting of Lorraine Center of Cartilage Engineering. Septembre 2007 Nancy

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN Complémentaire
ARN	Acide Ribonucléique
BMPs	Bone Morphogenetic Proteins
BSA	Albumine de Sérum Bovin
CD	Cluster de Différenciation
CMF	Cytométrie en Flux
COMP	Cartilage Oligo Matrix Protein
CSEs	Cellules souches embryonnaires
CSHs	Cellules Souches Hématpoïéptiques
CSMs	Cellules Souches Mésenchymateuses
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DO	Densité Optique
EDTA	Acide Ethylènedinitrilotétraacétique
ET	Etirement
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FSC	Forward Scatter
GAGs	Glycosaminoglycannes
HA	Acide Hyaluronique
HBSS	Hank's Balanced Salts Solution
HLA	Humain Leukocyte Antigen
HS	Sulfate d'Héparanne
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IMF	Intensité Moyenne de Fluorescence
IP	Iodure de Propidium
KS	Sulfate de Kératanne
MAPCs	Multipotent Adult Progenitor Cells
MEC	Matrice Extracellulaire

PAF	paraformaldéhyde
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
PMT	Photomultiplicateur
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SC	Sans contrainte
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TF	Facteurs de Transcription
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
VCAM-1	Vascular Cellular Adhesion Molecule-1
α-MEM	Alpha MEM Eagle avec EBSS

LISTE D'ILLUSTRATIONS

Figures

Chapitre I :

Figure 1 : Etapes impliquées dans l'ingénierie du cartilage.

Figure I-1 : Représentation schématique de l'organisation des collagènes dans le tissu cartilagineux.

Figure I-2 : Structure du cartilage articulaire.

Figure I-3 : Etapes impliquées dans l'ingénierie du cartilage.

Figure I-4 : Représentation schématique des différentes étapes de la chondrogenèse et de l'ostéogenèse au cours du développement des os longs.

Figure I-5 : Représentation schématique de l'expression des facteurs transcriptionnels lors des différentes étapes de la chondrogenèse et de l'ossification endochondrale.

Figure I-6 : Classification des cellules souches selon leur origine.

Figure I-7 : Différenciation des tissus humains.

Figure I-8 : Filiation des différentes populations cellulaires de la moelle osseuse.

Figure I-9 : Capacité de différenciation des cellules souches mésenchymateuses.

Figure I-10 : Conditions de culture favorisant le processus de la différenciation *in vitro* des CSMs en tissu spécifique (légende encadré).

Figure I-11 : Régulation de la différenciation des CSMs par les facteurs de transcription spécifiques.

Figure I-12 : Processus de sécrétion du TGF-β.

Figure I-13 : Le mécanisme général de la voie de signalisation de TGF-β via les protéines Smads.

Figure I-15 : La localisation subcellulaire des récepteurs et la régulation de la voie de la signalisation de TGF-β.

Figure I-16 : La structure et le rôle des domaines de Smads.

Figure I-17 : Le complexe R-Smads/Smad4 s'associe avec les facteurs de transcription spécifiques de séquence (X) qui ont une affinité haute pour la séquence d'ADN (XBE).

Figure I-18 : Modèle de la navette des Smads dans les cellules avec ou sans la stimulation de TGF-β.

Figure I-19 : Les voie de signalisation de TGF-β Smad-indépendantes.

Figure I-20 : Signalisation de TGF-β sur le cytosquelette de l'actine.

Figure I-21 : Les effets des protéines membres de la famille de TGF-β sur la différenciation des CSMs.

Figure I-22 : Les médiateurs de la méchanotransduction cellulaire.

Figure I-23 : La voie de mécanotraduction par les intégrines, le complexe d'adhénsion focale (CAF) et le cytosquelette.

Figure I-24 : La morphologie des cellules sur des substrats élastique dépend de la rigidité du substrat.

Chapitre II :

Figure II-1 : La plaque BioFlex et les chambres de lab-tek.

Figure II-2 : Appareil d'étirement « Flexcell Tension Plus System » (FX-4000T)

Figure II-3 : Principe d'étirement.

Figure II-4 : Appareil de compression et son principe.

Figure II-5 : Moule pour la création de cylindre d'alginate/HA.

Figure II-6 : La structure de l'inhibiteur de Smad3.

Figure II-7: La structure de l'inhibiteur du récepteur de type I.

Figure II-8: Différentes phases du cycle cellulaire.

Figure II-9 : Analyse des phases du cycle cellulaire par cytométrie en flux.

Figure II-10 : Principe du marquage par immunofluorescence directe.

Figure II-11 : Principe du marquage par immunofluorescence indirecte.

Figure II-12: Acquisition de l'image en microscopie confocale. Déplacement dans les axes x, y et z.

Figure II-13 : Géométrie de l'optique confocale à balayage laser.

Figure II-14 : Principe de l'illumination laser en mode Multiphoton.

Figure II-15: Microscope à optique confocale Leica TSC SP2-AOBS.

Figure II-16: Le montage de transfert des protéines du gel vers la membrane PVDF.

Figure II-17 : Principe de la technique de PCR

Figure II-18 : Principe et étapes principales d'ELISA.

Figure II-19 : Méthodes d'analyse de l'indice d'élongation des cellules.

Chapitre III :

Figure III-1 : La morphologie des cellules sous la microscopie optique dans les milieux de α-MEM (A, B, C, D), et DMEM (E, F, G, H).

Figure III-2 : La morphologie des cellules des clonies sous la microscopie optique.

Figure III-3 : Effet du milieu de culture sur le nombre de colonies de CSMs en P0 (*p<0,05).

Figure III-4 : Effet des conditions de culture sur le nombre de colonies de CSMs en P1 et P2 (*p<0,05).

Figure III-5 : Etude de l'effet du milieu de culture sur le nombre des cellules de P0, P1 et P2 (*p<0,05).

Figure III-6 : Etude du population doubling (PD) des cellules de P1 et P2 (*p<0,05).

Figure III-7 : Expression des marqueurs CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 et CD166 à la surface de CSMs humaines.

Figure III-8 : Etude de la viabilité des CSMs soumises à différentes concentrations de TGF-β1 à l'aide du kit Vybrant / Apoptosis TM.

Figure III-9 : Etude du métabolisme des CSMs soumises aux différentes concentrations de TGF-β1 en utilisant l'Alamar Blue.

Figure III-10 : Analyse la phase de G1 du cycle cellulaire des CSMs.

Figure III-11 : Analyse la phase de S du cycle cellulaire des CSMs

Figure III-12: Expression de Smad3p dans les CSMs soumises aux différentes concentrations de TGF-β1 pendant 1 heure par western-blot.

Figure III-13 : Images des CSMs soumises aux différentes concentrations en TGF-β1 pendant 1 heure (Microscope confocal Leica, objectif 40x).

Figure III-14 : Analyse de l'intensité de fluorescence dans les noyaux des CSMs par le logiciel ImageJ (IMF : intensité moyenne de fluorescence ; *p<0,05, N=10).

Figure III-15 : Images des chondrocytes soumises aux différentes concentrations en TGF-β1 pendant 1 heure (Microscope confocal Leica, objectif 40x).

Figure III-16 : Analyse de l'intensité de fluorescence dans les noyaux des chondrocytes par le logiciel ImageJ (IMF : intensité moyenne de fluorescence ; *p<0,05, N=10).

Figure III-17 : Image de l'électrophorèse des ADNs (Sox9).

Figure III-18 : Analyse de la densité d'ADN avec le logiciel QuantityOne.

Figure III-19 : Image de l'électrophorèse des ADNs (Runx2, PPARγ).

Figure III-20 : Viabilité des CSMs cultivées dans une plaque six puits coatée avec du collagène de type I ou dans une plaque BioFlex en utilisant le kit Vybrant / Apoptosis TM.

Figure III-21 : Viabilité des CSMs avec ou sans étirement en utilisant le kit Vybrant / Apoptosis TM (SC: sans contrainte ; ET: étirement).

Figure III-22 : Viabilité des chondrocytes avec ou sans étirement en utilisant le kit Vybrant / Apoptosis TM (SC: sans contrainte ; ET: étirement).

Figure III-23 : Etude de la prolifération des CSMs cultivées dans une plaque six puits coatée avec du collagène de type I ou dans une plaque BioFlex en utilisant

l'Alamar Blue.

Figure III-24 : Etude de la prolifération des CSMs avec ou sans étirement en utilisant l'Alamar Blue. (SC: sans contrainte ; ET: étirement)

Figure III-25 : Etude de la prolifération des chondrocytes avec ou sans étirement en utilisant l'Alamar Blue. (SC: sans contrainte ; ET: étirement)

Figure III-26: Expression de Smad3p et Smad2/3 dans les CSMs soumises ou non à un étirement pendant 10min, 30min, 1h et 3h. Analyse réalisé par western-blot (SC: sans contrainte ; ET: étirement).

Figure III-27: Expression relative de Smad3p dans les CSMs pendant 10min, 30min, 1h et 3h par le logiciel QuantityOne (SC: sans contrainte ; ET: étirement) (BioRad, USA).

Figure III-28: Ratio de l'expression de Smad3p entre l'étirement et sans contrainte dans les CSMs (SC: sans contrainte ; ET: étirement ; N=5, **p<0,05).

Figure III-29 : Expression de Smad3p dans les CSMs avec ou sans étirement, en présence ou absence de TGF-β1 pendant 10min, 30min, 1h et 3h (SC: sans contrainte ; ET: étirement) (Microscope confocal Leica, objectif 40x).

Figure III-30: Analyse l'intensité de fluorescence dans les noyaux des CSMs pendant 10min, 30min, 1h et 3h par le logiciel ImageJ (SC: sans contrainte ; ET: étirement ; *P<0,05, N=10).

Figure III-31: Expression de Smad3p dans les chondrocytes avec ou sans étirement pendant 10min, 30min, 1h et 3h par western-blot (SC: sans contrainte ; ET: étirement).

Figure III-32: Expression relative de Smad3p dans les chondrocytes avec ou sans étirement pendant 10min, 30min, 1h et 3h par le logiciel QuantityOne (BioRad, USA). (SC: sans contrainte ; ET: étirement)

Figure III-33 : Expression de Smad2/3 dans les chondrocytes avec ou sans étirement pendant 10min, 30min, 1h et 3h (SC: sans contrainte ; ET: étirement) (Microscope confocal Leica, objectif 40x).

Figure III-34 : Analyse de l'intensité de fluorescence dans les noyaux des chondrocytes pendant 10min, 30min, 1h et 3h par le logiciel ImageJ (SC: sans contrainte ; ET: étirement ; IMF : intensité moyenne de fluorescence ; *p<0,05, N=10).

Figure III-35: Expression de Smad3p dans les CSMs avec étirement, ou avec 5 ng/mL de TGF-β1 pendant 10min, 30min, 1h et 3h par western-blot. (SC: sans contrainte ; ET: étirement)

Figure III-36: Expression de Smad3p dans les CSMs avec étirement, avec ou sans TGF-β1 pendant 10min, 30min, 1h et 3h par western-blot. (SC: sans contrainte ; ET: étirement ; ET+ : étirement+5 ng/mL de TGF-β1)

Figure III-37: Expression de Smad3p dans les CSMs avec TGF-β1, avec étirement, et avec étirement plus TGF-β1 pendant 10min, 30min, 1h et 3h par western-blott. (ET: étirement ; ET+ : étirement+5 ng/mL de TGF-β1)

Figure III-38: Expression relative de Smad3p des CSMs avec TGF-β1, avec étirement, et avec TGF-β1 plus étirement pendant 10min, 30min, 1h et 3h. (SC: sans contrainte ; ET: étirement)

Figure III-39: Expression de Smad3p des CSMs avec deux fréquences d'étirement pendant 30min et 1h par western-blot. (SC: sans contrainte)

Figure III-40: Expression relative de Smad3p dans les CSMs avec deux fréquences d'étirement pendant 30min et 1h par le logiciel Multi Gauge (Fujifilm, Japon) (SC: sans contrainte)

Figure III-41 : Expression de Smad3p dans les CSMs avec deux fréquences d'étirement pendant 30min (SC: sans contrainte ; vert : Smad3p, bleu : noyau) (Microscope confocal Leica, objectif 40x).

Figure III-42 : Analyse de l'intensité de fluorescence dans les noyaux des CSMs avec deux fréquences d'étirement pendant 30min et 1h par le logiciel ImageJ (SC: sans contrainte ; *p<0,05, N=10).

Figure III-43 : Image de l'électrophorèse des ADNs (Sox9, Col II). (-): contrôle négatif.

Figure III-44: Analyse de la densité optique des bandes avec le logiciel d'image Quantity

One.

Figure III-45 : Image de l'électrophorèse des ADNs (Sox9, Runx2, PPARγ).

Figure III-46: Analyse de la densité optique des bandes avec le logiciel d'image Quantity One.

Figure III-47 : Expression de RII des CSMs avec deux fréquences d'étirement pendant 30min et 1h (SC: sans contrainte) (Microscope confocal Leica, objectif 40x).

Figure III-48 : Expression de la phosphorylation de Smad3 par western-blot. (iRI : inhibiteur du RI ; Témoin : étirement)

Figure III-49 : Analyse de l'expression de la phosphorylation de Smad3 par western-blot. (iRI : inhibiteur du RI ; Témoin : étirement)

Figure III-50: Expression de LTBP-1 dans la matrice extracellulaire des CSMs pendant 1 jour, 2 jours et 5 jours par immunofluorescence. (Les points rouges représentent l'expression de LTBP-1)

Figure III-51: Analyse de la concentration de TGFβ-1 dans le surnageant de milieu de culture des CSMs avec ou sans contrainte d'étirement pendant 30min ou 1h par ELISA. (SC: sans contrainte ; *p<0,05)

Figure III-52: Expression de Smad3p et Smad2/3 dans les CSMs après 1 jour, 2 jours et 5 jours de prolifération, par western-blot, avec ou sans contrainte d'étirement pendant 30min ou 1h . (ET : étirement ; SC : sans contrainte)

Figure III-53 : Analyse de l'expression relative de Smad3p dans les CSMs avec ou sans l'étirement pendant 30min, 1h de 1 jour, 2 jours et 5 jours par le logiciel Multi Gauge (Fujifilm, Japon). (ET: étirement; SC : sans contrainte)

Figure III-54 : Histrogrammes de distribution de l'indice de forme des CSMs soumises ou non à une contrainte d'étirement pendant 10min, 30min, 1h et 3h. Analyse avec le logiciel de traitement d'image (ImageJ) et le logiciel statistique (Microcal Origin 6.0).

Figure III-55 : Variation de l'indice de forme des CSMs (médium) soumises ou non à une contrainte d'étirement pendant 10min, 30min, 1h et 3h (SC : sans contrainte).

Figure III-56 : Images du cytosquelette des CSMs (vert: microfilaments; rouge: microtubules; bleu: noyau) avec deux fréquences d'étirement pendant 30min (SC: sans contrainte) (Microscope confocal Leica, objectif 40x).

Figure III-57 : Voies de différenciation des CSMs et influence du cytosquelette *in vitro*.

Figure III-58 : Comparaison de l'expression de gène de Sox9 sous l'effet de TGF-β1 et d'étirement.

Figure III-59 : Schéma de l'activation de TGFβ dans la matrice extracellulaire.

Chapitre IV :

Figure IV-1 : Etapes impliquées dans l'ingénierie du cartilage.

Figure IV-2: Expression de Smad3 dans les CSMs après stimulation avec TGF-β1 ou pas.

Figure IV-3: Expression du cytosquelette des CSMs avec ou san une contrainte de compression (vert : microfilament ; rouge : microtubule ; SC : sans contrainte)

Figure IV-4: Expression du cytosquelette des CSMs après stimulation avec TGF-β1 (vert : microfilament)

Tableaux

Chapitre I :

Tableau I-1 : Comparaison des constitutions des trois cartilages.

Tableau I-2 : Classifications et caractéristiques des cellules souches.

Tableau I-3 : Comparaison des potentiels de prolifération et de différenciation chondrocytaire en fonction de l'origine des CSMs.

Tableau I-4 : Liste des marqueurs de surface exprimés ou non par les CSMs humains.

Tableau I-5 : Les facteurs de transcription associés à l'ADN et interagissant avec les Smads dans les cellules de mammifères.

Tableau I-6 : Les kinases et la phosphorylation des Smads, avec la fonction positive (+) ou négative (-).

Tableau I-7 : Effets de la compression sur la réponse cellulaire en fonction du modèle.

Tableau I-8 : Effets de l'étirement sur la réponse cellulaire.

Tableau I-9 : Effets de la pression hydrostatique sur la réponse cellulaire en fonction du modèle.

Chapitre II :

Tableau II-1 : Les paramètres de culture testés pour les CSMs.

Tableau II-2 : Conditions de stimulations mécaniques utilisées dans l'étude.

Tableau II-3 : Anticorps impliqués dans les immunomarquages directs.

Tableau II-4: Anticorps impliqués dans les immunomarquages indirects.

Tableau II-5 : Réactifs pour le marquage des structures cellulaires par fluorescence.

Tableau II-6 : Composition des différents tampons.

Tableau II-7 : Anticorps primaires impliqués dans les immunomarquages.

Tableau II-8 : Anticorps secondaires impliqués dans les immunomarquages.

Tableau II-9 : Préparation de la gamme étalon des protéines.

Tableua II-10: Amorces et conditions de PCR des gènes.

Tableau II- 11 : Composants de la réaction de rétrotranscription.

Tableau II-12 : Composants de la phase d'amplification.

Chapitre III :

Tableau III-1 : Caractéristiques des cellules selon les conditions de culture initiales.

Tableau III-2 : Conditions de culture choisies pour les experiences.

Chapitre IV :

Tableau IV-1 : Conditions de culture choisies pour les expériences.

INTRODUCTION GENERALE

Le cartilage est un tissu hautement spécialisé qui a un rôle d'amortisseur et de transmission des forces lorsqu'une pression ou une charge est exercée sur une articulation. Le cartilage est donc nécessaire au fonctionnement articulaire. Le cartilage articulaire est un cartilage hyalin de faible cellularité avec une matrice extracellulaire (MEC) riche en collagènes et protéoglycannes. La composition et l'organisation structurale de la MEC sont responsables des propriétés biomécaniques du cartilage et protègent les surfaces osseuses au niveau des zones articulaires. Les protéoglycannes offrent au cartilage une résistance à la pression et les fibres de collagène forment un réseau résistant à la tension.

Le cartilage articulaire peut être lésé par des traumatismes ou au cours de pathologies dégénératives, comme l'arthrose. Sa capacité d'autoréparation est fortement limitée, car le cartilage est un tissu avasculaire. Les thérapies actuelles utilisées sont les traitements pharmacologiques anti-douleurs et anti-inflammatoires ou des approches chirurgicales (autogreffes de cartilage, greffes de tissu synthétique, stimulation de la réparation spontanée par microfractures). Cependant, aucune thérapie ne permet la régénération d'un tissu fonctionnel. Depuis quelques années, l'ingénierie tissulaire constitue une ouverture qui pourrait conduire à la régénération d'un néo-cartilage réimplantable.

L'ingénierie tissulaire du cartilage consiste en la culture de cellules dans un biomatériau tridimensionnel, sous des conditions biochimiques ou mécaniques contrôlées, afin de reconstruire un cartilage fonctionnel artificiel. La figure 1 présente une stratégie classique d'ingénierie tissulaire, les paramètres à contrôler pour son élaboration et les connaissances multidisciplinaires nécessaires.

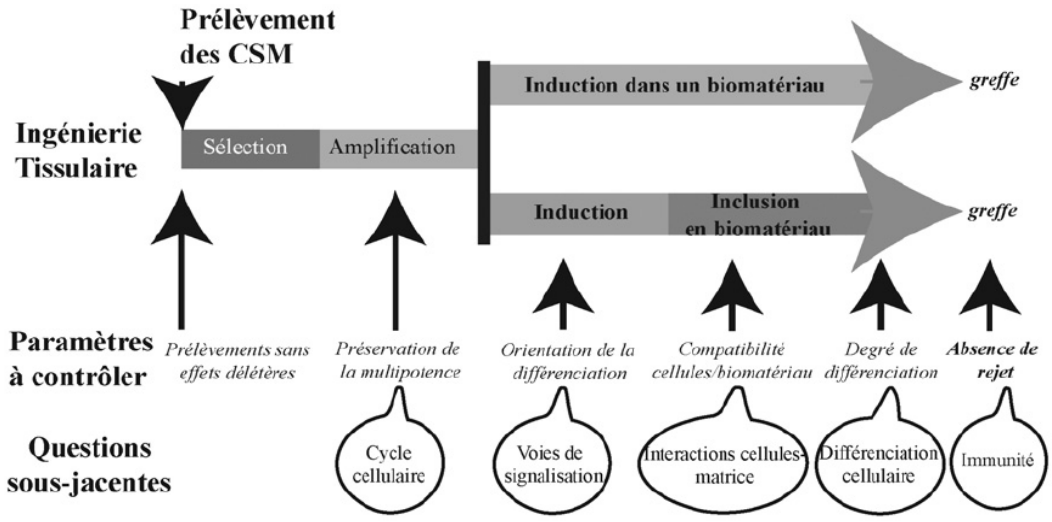


Figure 1 : Etapes impliquées dans l'ingénierie du cartilage. [*D'après Freyria AM et al, 2008***]**

Deux sources principales de cellules sont proposées pour l'ingénierie du cartilage : les chondrocytes et les cellules souches mésenchymateuses (CSMs). La transplantation de chondrocytes autologues après expansion *in vitro* est déjà au stade de l'application clinique. Mais, elle n'est pas très satisfaisante car les chondrocytes présentent des problèmes d'amplification et de dédifférenciation *in vitro*. Par apport aux chondrocytes, les CSMs adultes offrent des facilités d'obtention, d'expansion (autorenouvellement) et de différenciation (multipotence). C'est ainsi que les CSMs sont de plus en plus utilisées en ingénierie tissulaire. Il est nécessaire cependant d'amplifier les CSMs *in vitro* car elles sont très peu abondantes dans la moelle osseuse. De ce fait, la mise au point des conditions de culture des CSMs est une étape importante préalable aux applications en ingénierie tissulaire.

Les CSMs peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires (chondrocytes, ostéoblastes, adipocytes et myoblastes) sous l'influence de stimulations biochimiques ou biomécaniques. Les membres de la famille du TGF-β jouent un rôle important dans la différenciation des CSMs. Plusieurs études montrent que les TGF-βs activent les premiers stades de la chondrogenèse et de l'osteogenèse, mais ils inhibent la myogenèse, l'adipogenèse, et l'étape finale de la différenciation ostéoblastique. Les TGF-β transmettent leur signal à l'intérieur de la cellule à travers des récepteurs membranaires, puis par l'activation de facteurs de transcription de type Smad, en particulier Smad2 et Smad3. La protéine Smad3 est très importante pour que s'exerce l'effet inhibiteur des TGF-βs sur la myogenèse, l'adipogenèse, et la fin de l'étape de la différenciation ostéoblastique. En fait, Smad3 peut s'associer physiquement avec les facteurs de transcriptions, par exemple, MyoD, C/EBPs et Runx2, et inhiber leur activité. En revanche, Smad3 stimule l'activité de Sox9 en s'associant à lui, et joue un rôle pendant les premiers stades de la différenciation chondrocytaire.

En ce qui concerne la stimulation biomécanique, plusieurs types de contrainte sont impliqués, par exemple, la compression, le cisaillement, la pression hydrostatique et l'étirement. La compression est la contrainte la plus couramment utilisée dans l'ingénierie du cartilage. Dans notre travail, nous avons fait le choix d'une contrainte d'étirement équibiaxial, comme une forme de distorsion de stress. Ce choix repose sur des études qui montrent que ce type de stimulation favorise l'engagement des CSMs vers la lignée

chondrocytaire.

Cependant, les paramètres optimaux pour favoriser la formation d'un néo-cartilage *in vitro* sont loin d'être déterminés. Il est donc nécessaire de développer les connaissances sur les comportements des cellules en réponse aux stimuli biochimiques et mécaniques pour en comprendre le mécanisme ainsi que pour contrôler les conditions *in vitro* afin d'aboutir à un néo-tissu fonctionnel.

Dans la première partie de notre travail, nous avons défini les conditions de culture optimales pour l'isolement et l'expansion des CSM humaines obtenues à partir de la moelle osseuse, et ceci en absence des facteurs de croissance exogènes.

Dans la deuxième partie, nous avons étudié l'effet du TGF-β1 sur la phosphorylation de la protéine Smad3 (Smad3p) ainsi que sa localisation dans les CSMs et les chondrocytes. L'effet du TGF-β1 sur l'expression des gènes des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des CSMs, Sox9, Runx2 et PPARγ a également été analysé.

Dans la troisième partie, nous avons étudié l'effet de l'étirement équibiaxial sur la voie de signalisation de TGF-β. Pour cela nous avons analysé la phosphorylation et la localisation de la protéine Smad3 dans les CSMs et les chondrocytes, en fonction du temps et de la fréquence de stimulation. De plus, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre l'étirement équibiaxial et le TGF-β1. Nous avons également étudié l'expression des gènes des facteurs de transcription Sox9, Runx2 et PPARγ après stimulation mécanique des cellules. Enfin, pour essayer de comprendre le mécanisme conduisant à la phosphorylation de Smad3 dans les cellules après stimulation mécanique, nous avons étudié l'effet de l'étirement sur la localisation du récepteur du TGF-β de type II, l'activation de TGF-β1 latent et sur le cytosquelette cellulaire.

CHAPITRE I : ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Physiologie du cartilage articulaire

Le cartilage est un tissu hautement spécialisé qui a un rôle d'amortisseur et de transmission des forces lorsqu'une pression ou une charge est exercée sur une articulation.

C'est un tissu conjonctif avasculaire et non innervé. La nutrition du cartilage est donc assurée par le liquide synovial et les vaisseaux sanguins provenant de l'os sous-chondral. Il est constitué d'un seul type cellulaire, le chondrocyte, qui synthétise la matrice extracellulaire (MEC) [Steinert AF et al, 2007]. Les composants majeurs de cette MEC sont l'eau, les collagènes, les protéoglycannes et aussi des électrolytes.

Chez l'homme, trois types de cartilage sont présents. Ils ont des localisations, des compositions et des fonctions différentes (tableau I-1) : le cartilage hyalin, le cartilage élastique et le cartilage fibreux. Le cartilage articulaire est un cartilage hyalin.

Tableau I-1 : Comparaison des constitutions des trois cartilages.

Cartilage	Composition de la MEC	Localisation
Hyalin	- collagène de type II (majoritaire), IX et XI - microfibrilles de collagène peu abondantes, de petit calibre, non visibles en microscopie optique (MO) d'où l'aspect amorphe et homogène de la MEC	nez, bronches, trachée, côtes, articulations
Elastique	- en plus du collagène de type II, présence de nombreuses fibres élastiques	trompe d'Eustache, pavillon de l'oreille externe, épiglotte, certains cartilages laryngés
Fibreux	- épais faisceaux de fibres de collagène de type I	disques intervertébraux, symphyse pubienne, ménisque du genou, insertion du tendon d'Achille

I.1. Constitution du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire normal apparaît blanc, brillant et discrètement translucide. Il est constitué de deux éléments principaux : les chondrocytes et la MEC [Muir H et al. 1986 ;

Schulz RM et al, 2007].

Les chondrocytes constituent le seul type cellulaire (3%-8% du volume total) du cartilage articulaire [Heath CA, 1996]. Les chondrocytes synthétisent tous les composants de la MEC, ainsi que les enzymes de dégradation de cette matrice, afin d'assurer un équilibre. Dans des cas pathologiques, les cellules peuvent aussi produire des cytokines pro-inflammatoires provoquant la destruction du cartilage par augmentation de la synthèse et de l'activité des métalloprotéinases [Shlopov BV et al, 1997], des hyaluronidases et des agrécannases.

Les chondrocytes sont séparés de la MEC par un espace péricellulaire particulier. Le métabolisme des chondrocytes est influencé par les conditions physico-chimiques définies dans cet espace péricellulaire [Wilkins RJ et al, 1995], qui entraîne des modifications du pH, et a des incidences sur la forme et la déformabilité du chondrocyte.

La matrice extracellulaire (MEC) est principalement constituée d'eau (60%-80%), de fibres de collagènes et de protéoglycannes.

- Réseau du collagène : au niveau du cartilage articulaire, sept principaux types de collagènes (II, IX, XI, X, V, VI et VII) ont été identifiés (Figure I-1). Ces collagènes confèrent à ce tissu sa propriété mécanique d'élasticité.

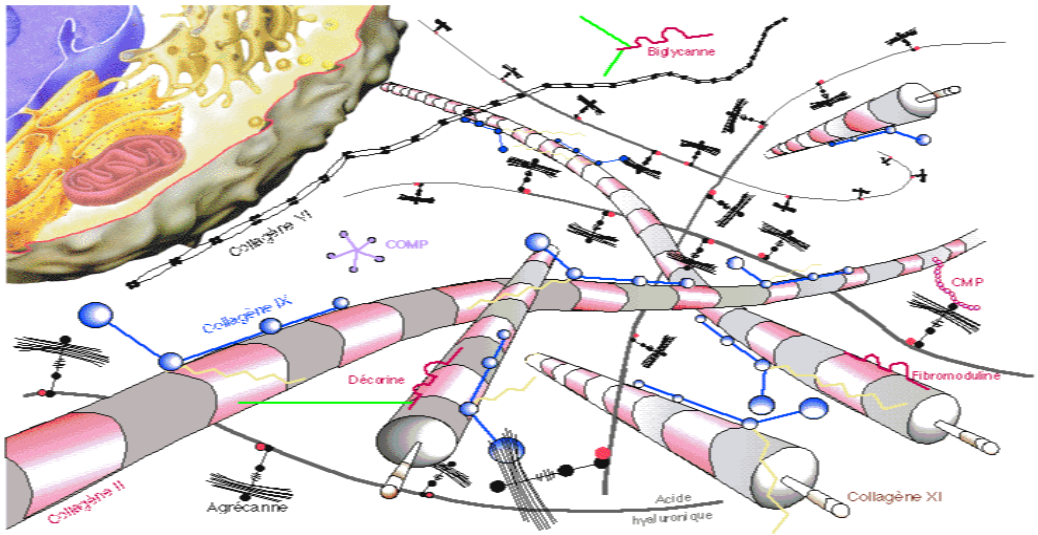


Figure I-1 : Représentation schématique de l'organisation des collagènes dans le tissu cartilagineux.

Les collagènes de types II, VI, IX, XI constituent les principaux collagènes impliqués dans la charpente de la MEC du cartilage articulaire. [D'après Mallein-Gerin F et al, 1996]

Le collagène de type II est la protéine collagénique la plus abondante trouvée dans le

cartilage et constitue 80 à 85 % du contenu en collagènes [Cremer MA et al, 1998]. Il est spécifique du cartilage articulaire et très résistant aux attaques protéolytiques. Il est composé de trois chaînes de type α1 (II) codées par le gène Col2a1. La synthèse de collagène est quasiment nulle dans le cartilage adulte.

- Les protéoglycannes constituent la substance fondamentale, située entre les cellules et les fibres. Ce sont des macromolécules formées par une protéine axiale ou porteuse (protéine de noyau) sur laquelle se branchent une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycannes (GAGs). Le cartilage articulaire contient deux sortes de protéoglycannes : d'une part des protéoglycannes formant de larges agrégats, d'autre part des protéoglycannes de petites tailles. La fonction principale des protéoglycannes est de retenir l'eau dans le cartilage, ce qui confère à ce tissu sa propriété mécanique de viscosité.

Les GAGs sont des polysaccharides composés d'une répétition de disaccharides contenant un sucre aminé (hexosamine) et un sucre de type hexuronique [Roughley PJ et al, 2006]. Il existe 5 types de chaînes de GAGs : le sulfate de chondroïtine (CS), le sulfate de dermatanne (DS), le sulfate d'héparanne (HS), le sulfate de kératane (KS) et l'acide hyaluronique (HA). Tous ces GAGs sont retrouvés dans le cartilage, en concentration variable en fonction de la zone du cartilage considérée.

Le HA est le seul GAG qui ne posséde pas de groupement SO42- et qui ne soit pas lié à une chaîne protéique. Il joue un rôle structural indispensable au niveau de la matrice cartilagineuse puisqu'il participe à la formation des agrégats de protéoglycannes. De plus, le HA influence de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la migration, l'adhérence ou la prolifération, en raison de la présence de récepteurs spécifiques sur les chondrocytes [Lindenhayn K et al, 1999]. Au niveau de la MEC, il jouerait un rôle important dans la rétention des protéoglycannes [D'Souza AL et al, 2000] et favoriserait leur synthèse par les chondrocytes [Kawasaki K et al, 1999].

L'agrécanne est le plus important des protéoglycannes parce qu'il constitue 90 % des protéoglycannes du cartilage articulaire. Il est composé d'une protéine axiale de 220kDa sur laquelle sont fixées, de façon covalente, une centaine de CS et une trentaine de KS. L'agrécanne se lie avec HA, de façon non-covalente. Cette interaction est stabilisée par une

protéine de liaison. Plus de 300 molécules d'agrécannes peuvent s'associer autour d'un squelette d'HA et constituer un ensemble pouvant atteindre 10 µm [Buckwalter JA et al, 1998] et créant de larges domaines hydrodynamiques entre les fibres de collagène. Du fait de leur taille, ces protéoglycannes sont retenus dans la MEC durant les déformations subies par le cartilage. La perte de ces macromolécules conduit à une diminution de la viscosité du tissu et est observée lors de l'arthrose.

I.2. Structure du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est constitué de quatre couches successives : la couche superficielle (5 à 10 % de la hauteur totale du cartilage), la couche moyenne (40 à 45 %), la couche profonde (40 à 45 %) puis la couche basale (5 à 10 %) (Figure I-2). Les chondrocytes et les constituants de la MEC sont organisés différemment suivant la couche considérée. Par ailleurs, les contraintes mécaniques ne sont pas ressenties de la même manière selon la couche.

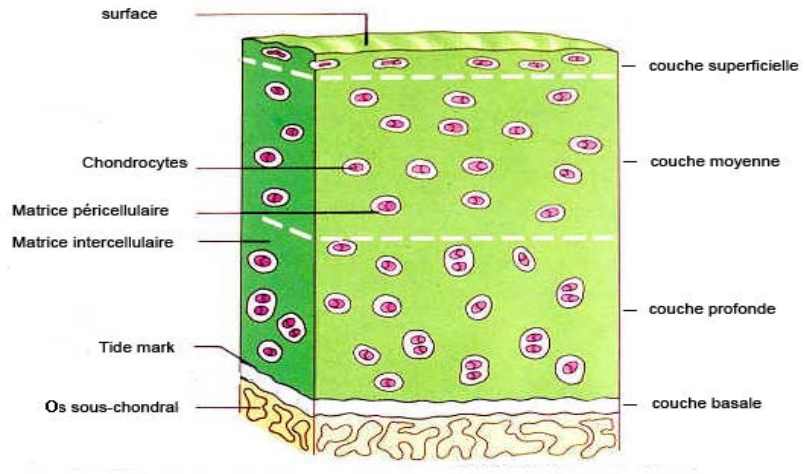


Figure I-2 : Structure du cartilage articulaire.

[http: //www.ukcte.org/images/cartilage.jpg]

Couche superficielle : fibres de collagènes très tassées entre elles et parallèles à la surface articulaire, peu de protéoglycannes

Couche moyenne : fibres de collagène entrecroisées obliquement en un réseau non orienté

Couche profonde : fibres de collagènes perpendiculaires à la surface articulaire, chondrocytes alignés verticalement en colonnes, zone la plus riche en protéoglycannes

Couche basale ou intermédiaire : en contact avec la plaque osseuse sous-chondrale, cartilage en voie de calcification

I.3. Les contraintes mécaniques sur le cartilage articulaire

Le cartilage est soumis en permanence à plusieurs contraintes mécaniques. La contrainte principale est la compression qui engendre d'autres contraintes telles que des flux de liquide, des contraintes de cisaillement, des pressions hydrostatiques et des forces de tension ou d'étirement etc. [Kerin A et al, 2002 ; Urban JP, 1994 ; Smith RL et al, 1995]. La capacité du cartilage articulaire à exercer sa fonction physiologique, quand il est soumis à différents types de contraintes, dépend de l'interaction sensible des constituants du cartilage et de l'écoulement du fluide interstitiel à travers la matrice perméable [Hasler EM, 1999]. De nombreuses études ont montré que les forces mécaniques influencent la prolifération de chondrocytes et stimulent la synthèse de la MEC, maintiennent la structure et l'intégrité, améliorent les propriétés mécaniques du tissu cartilagineux [Lee CR et al, 2005]. En revanche, la MEC régule les propriétés biomécaniques du cartilage articulaire. Généralement, le réseau de collagène agit au niveau de l'étirement [Mow WC et al, 1990], tandis que les protéoglycannes interviennent sur la compression [Bader DL et al, 1994 ; Korhonen RK et al, 2003]. Ainsi, la résistance à l'étirement décroît alors que la résistance à la compression croît lorsque l'on s'enfonce dans le cartilage, définissant ainsi une anisotropie axiale [Schinagl RM et al, 1997, Wang CC et al, 2002].

I.4. Fonctions du cartilage articulaire

Le cartilage constitue la partie essentielle de l'articulation. Il recouvre les extrémités osseuses et il joue un rôle de " film protecteur " de l'articulation. Lors de la réalisation de mouvement, il remplit deux fonctions principales. Il assure d'une part, le glissement des segments osseux les uns contre les autres, en diminuant au maximum les forces de friction présentes. Le cartilage étant non innervé, il ne peut donc transmettre aucune information au cerveau, ce qui rend le mouvement imperceptible et indolore. D'autre part, le cartilage assure la transmission, la répartition et l'amortissement des contraintes subies par l'articulation. Une troisième fonction, dépendante des deux premières, peut lui être attribuée : celle d'assurer sa propre trophicité. Le cartilage est effectivement "nourri" par le liquide synovial, lui-même sécrété par la membrane synoviale.

II. Physiopathologie du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire peut être lésé par des traumatismes ou au cours de pathologies dégénératives, comme l'arthrose.

La dégradation du cartilage peut conduire, à plus ou moins long terme, à l'apparition de lésions qui peuvent aller jusqu'à l'os sous-chondral, où il se produit au niveau du foyer lésionnel, une invasion de cellules issues de la moelle osseuse [Setton LA et al, 1999]. La réaction de type inflammatoire qui s'ensuit engendre alors la formation d'un tissu cartilagineux proche du fibrocartilage, par sa constitution riche en collagène de type I et faible en élastine [Setton LA et al, 1999]. Les propriétés mécaniques, moins élastiques et moins résistantes, d'un tel tissu ne lui permettent pas de résister aux fortes contraintes que subirait sans dommage un cartilage articulaire sain ; il finit généralement par se fissurer [Naumann A et al, 2002]. Or le cartilage articulaire n'a pas la capacité de se régénérer naturellement dans le cas de lésions qui dépassent 2 millimètres de diamètre [Ghivizzani SC et al, 2000]. Ceci explique que l'on rencontre des lésions du cartilage articulaire dans plus de 10% de la population [Bliddal H et al, 2006].

L'exposition du cartilage à des éléments agressifs (enzymes protéolytiques, cytokines inflammatoires, *etc*.) peut stimuler la dégénérescence des protéoglycannes ou en inhiber la synthèse [Zhang L et al, 2007]. Ces agressions peuvent également agir sur le collagène et les chondrocytes. La plupart des lésions ont une origine traumatologique (entorses graves ou luxations rotuliennes) mais elles peuvent également apparaître à la suite de phénomènes inflammatoires (ostéochondrite juvénile ou après une corticothérapie). Elles peuvent aussi être dues au vieillissement. La réparation spontanée de ces lésions est déterminée par de nombreux facteurs : le type, l'ampleur et la sévérité des lésions, l'état général du cartilage et l'âge de l'individu [Zhang L et al, 2007].

Il faut bien souligner que les influences mécaniques sont souvent à l'origine du développement de pathologies du cartilage [Hayes DW et al, 2001]. Les lésions du cartilage se produisent quand la contrainte appliquée excède la capacité d'absorption de charge du tissu [Cornwall MW, 1984]. Tout d'abord, un dommage mécanique peut se produire dès qu'une articulation se déplace au delà de sa possibilité habituelle de mouvement, induisant un effort sur les parties plus molles du cartilage qui ne peuvent pas supporter la contrainte,

et endommagent ainsi le réseau de collagène. [Andersson S et al, 1989].

Par ailleurs, il peut également avoir lieu de manière chronique lors d'exercices sportifs physiques intenses et repétés. Dans ce cas, les articulations sont répétitivement exposées à des contraintes de niveaux élevés, et les dommages sont associés à une fissure de fatigue [Kujala UM et al, 1995].

Enfin, l'exposition à des surcharges et une utilisation anormale et répétée de l'articulation déjà endommagée mènent à des lésions plus graves et à la dégénérescence du cartilage [Simmons EJ et al, 1999 ; Van de Breevaart Bravenboer J et al, 2004].

II.1. Stratégies thérapeutiques concernant les lésions cartilagineuses

Après un traumatisme, le cartilage articulaire ne peut se réparer spontanément. Actuellement, on dispose de traitements médicaux et chirurgicaux, auxquels s'ajoute l'aide de l'ingénierie tissulaire.

II.1.1. Les traitements médicaux

Le traitement médical combine généralement plusieurs des techniques suivantes [Minas T et al, 1997] :

- Mise en décharge : on retrouve souvent comme point commun une pression intra-articulaire trop élevée, entraînant pour le cartilage une surcharge mécanique néfaste. De plus, il a été démontré que dans des conditions de pression moindre, l'activité métabolique du chondrocyte s'accroît, ce qui pourrait favoriser la régénération matricielle.

- Agents pharmacologiques : de nombreuses études sont effectuées sur des substances comme les corticostéroïdes, des acides hyaluroniques et des facteurs de croissance. Cependant, leur utilisation est assez controversée.

- Mouvement passif : cette technique est aujourd'hui massivement reconnue pour son succès dans le traitement des lésions cartilagineuses. Le mouvement est nécessaire à l'inhibition du cartilage alors que l'immobilisation complète d'un membre produit son amincissement et une diminution de son contenu en protéoglycannes.

Lorsque le traitement médical est un échec, on peut alors recourir au traitement chirurgical.

II.1.2. Les traitements chirurgicaux

II.1.2.1. Techniques palliatives

- Lavage articulaire : il permet le renouvellement du liquide synovial, permet d'éliminer les médiateurs inflammatoires produits par la membrane synoviale du milieu intra-articulaire [Minas T et al, 1997].

- Stimulation de l'os sous-chondral : il s'agit de favoriser l'apparition d'un fibrocartilage à partir de cellules souches de la moelle osseuse de l'os sous-chondral [Minas T et al, 1997].

II.1.2.2. Techniques de réparation cartilagineuse

- Greffe de périoste ou de périchondre : ce type de greffe aboutit à la formation de ce que les auteurs appellent un "hyalin-like cartilage". Cependant, il existe un risque d'ossification endochondrale du greffon qui évolue vers un pronostic défavorable à long terme.

- Implantation de chondrocytes autologues : des chondrocytes sains prélevés chez le patient sont mis en culture pendant plusieurs semaines puis sont réimplantés au niveau de la lésion cartilagineuse. Cette technique reste insatisfaisante car elle se heurte au problème d'amplification et de dédifférentiation *in vitro* des chondrocytes. Il y a ainsi formation *in vivo* d'un fibrocartilage peu fonctionnel [Brittberg M et al, 2003].

- Greffes ostéochondrales : l'allogreffe ostéochondrale est une bonne solution pour le traitement des lésions cartilagineuses. L'os sous-chondral supportant le cartilage lésé est creusé pour former une cavité correspondant exactement à la forme du greffon prélevé. Le cartilage étant un tissu fragile, il ne peut donc pas subir de procédé de stérilisation agressif. Il existe donc un risque de transmissions virales au niveau des allogreffes cartilagineuses. L'autogreffe ostéochondrale est réalisée grâce au prélèvement d'un greffon ostéochondral en zone de moindre portance. L'intégration du greffon est généralement excellente. Cependant, cette technique est limitée par la quantité de cartilage disponible et ne permet donc pas de traiter des lésions cartilagineuses étendues.

A ce jour, aucune méthode n'est disponible pour produire de manière reproductible et fiable du cartilage pleinement fonctionnel. Une nouvelle génération de traitement a vu le

jour récemment : l'ingénierie tissulaire.

II.1.3. L'ingénierie tissulaire du cartilage

Dans le cas de l'ingénierie tissulaire du cartilage, il sera possible de créer un cartilage artificiel pour combler les lésions articulaires et maintenir, améliorer ou restaurer les fonctions au niveau de cette zone [Jorgensen C et al, 2004].

En ingénierie tissulaire, c'est certainement la combinaison d'un support tridimensionnel, de cellules et de facteurs de différenciation qui permettra d'améliorer la fonctionnalité du tissu néoformé [Galois L et al, 2005].

Cette technique a besoin d'une source abondante de cellules saines. Le choix des cellules est conditionné par la nécessité d'obtenir une nouvelle matrice la plus proche possible du tissu d'origine. Une des sources cellulaires pouvant servir à la réparation du cartilage est le chondrocyte, du fait de sa capacité à synthétiser la MEC. Cependant, compte tenu du nombre limité de cellules, l'amplification nécessaire de ces cellules entraîne une dédifférenciation cellulaire, occasionnant ainsi une modification de la morphologie cellulaire et de la synthèse de la matrice.

Pour s'affranchir de ce problème, une autre source cellulaire peut être utilisée : les cellules souches mésenchymateuses.

La figure I-3 présente une stratégie classique d'ingénierie tissulaire du cartilage.

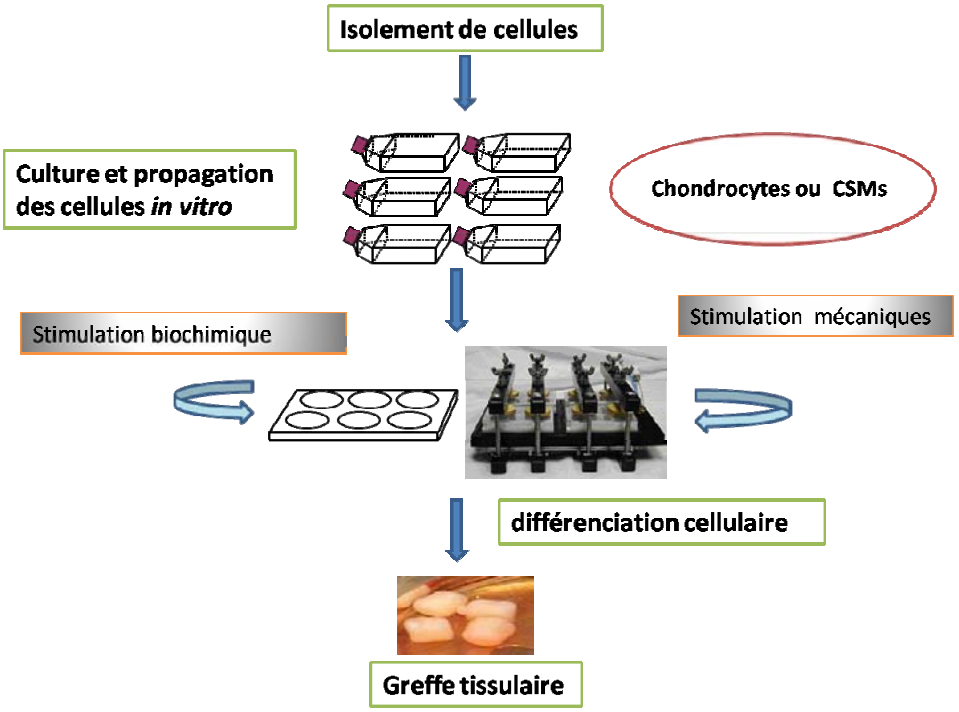


Figure I-3 : Etapes impliquées dans l'ingénierie du cartilage.

III. Cellules souches (CSs)

Les cellules souches sont des cellules immatures indifférenciées, caractérisées par leur capacité de s'autorenouveler sur une très longue durée et de se différencier en cellules spécifiques d'organe. Ces deux propriétés – **multipotence** (ou pluripotence dans le cas de cellules embryonnaires), et **auto-renouvellement** sont absolument nécessaires pour affirmer le caractère «souche » d'une cellule ; celle-ci doit en effet pouvoir être cultivée à long terme, et donc être capable d'un grand nombre de divisions cellulaires [Weissman IL et al, 2001 ; Coulombel L, 2004 ; 2005 ; 2007].

Le terme de cellule souche regroupe plusieurs sous-types cellulaires présentant d'importantes différences biologiques et fonctionnelles. La classification des cellules souches est basée sur leur potentiel de différentiation ou sur leur origine. Selon leur capacité de différentiation, les cellules souches sont classées comme étant totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou unipotentes (Tableau I-2). Selon leur origine, on distingue les cellules souches embryonnaires, fœtales, ombilicales, et adultes (Figure I-4).

Tableau I-2 : Classifications et caractéristiques des cellules souches.

Types de cellules souches	Capacités et rôles	Exemples
Totipotentes	Premières cellules embryonnaires directement issues du zygote jusqu'au stade Morula, du premier au quatrième jour Ebauche d'embryon complet	Zygote et cellules filles immédiates
Pluripotentes	Peuvent se différencier en n'importe quelle cellule originaire des 3 feuillets embryonnaires (=200 variétés) Ne peuvent pas reproduire un être humain en entier	Cellules souches embryonnaires de la masse interne du blastocyte Cellules germinales embryonnaires
Multipotentes	Peuvent se différencier en plusieurs lignées cellulaires différentes	Cellules souches hématopoïétiques Cellules souches mésenchymateuses
Unipotentes	Ne peuvent se différencier que vers un seul tissu spécifique	Kératinocytes Oligodendrocytes immatures

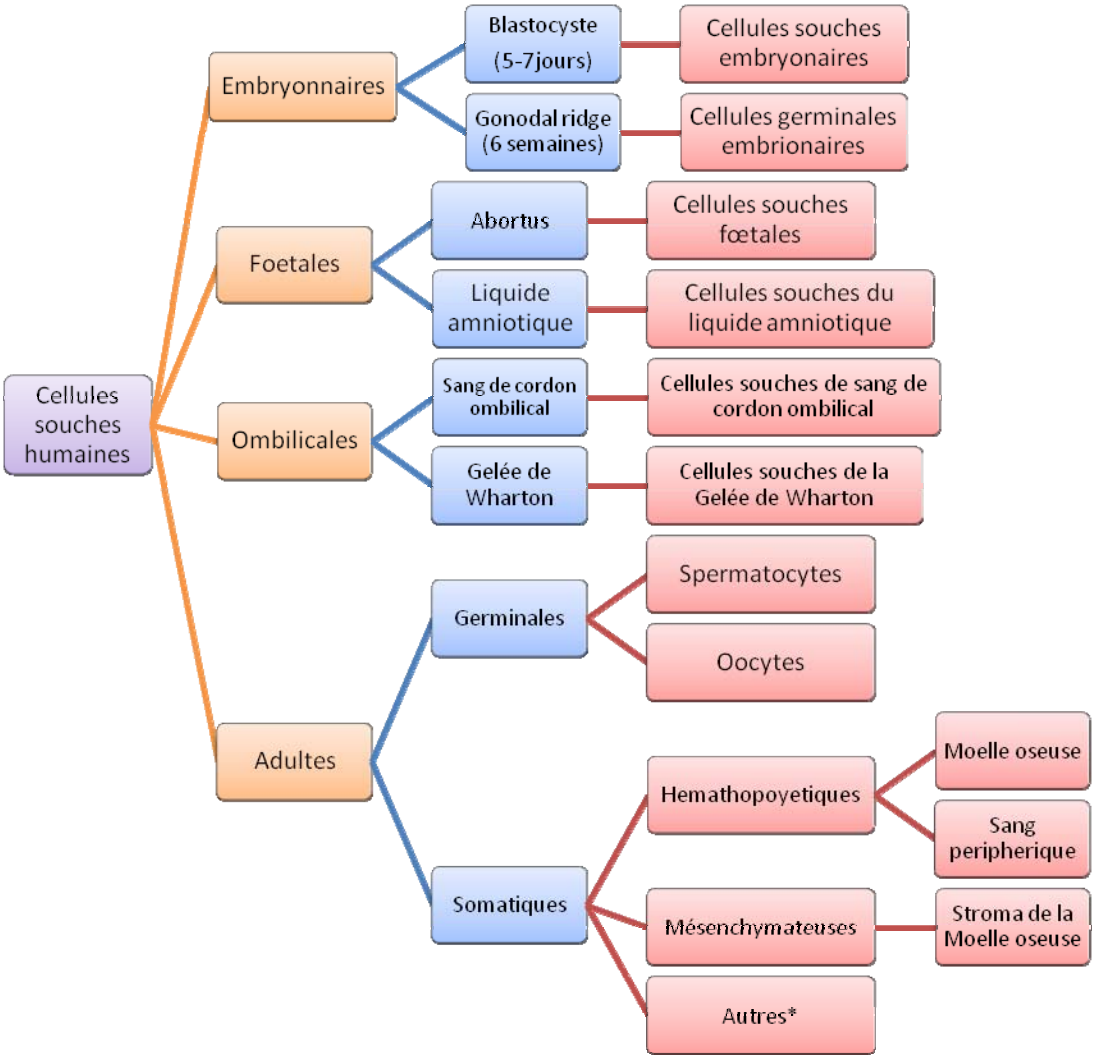


Figure I-4 : Classification des cellules souches selon leur origine. *[Modifié d'après Godara et al, 2008]. * inclut les cellules de l'épiderme (peau, cheveux), des yeux, du foie et les cellules neuronales.*

III.1. Les cellules souches embryonnaires (CSEs)

Les cellules souches embryonnaires (CSEs) proviennent de la masse interne du "blastocyte", qui définit le premier stade de l'embryon, quand celui-ci a cinq ou six jours et possède moins de 64 cellules (Figure I-5). Elles sont pluripotentes, voire totipotentes puisqu'elles peuvent donner tous les feuillets embryonnaires (mésoderme, endoderme, ectoderme) qui sont à l'origine de tous les tissus de l'organisme, y compris les tissus de la lignée germinale, même après une culture prolongée *in vitro* [Kerr CL et al, 2006]. En même temps, Elles conservent leur état indifférencié, ce qui leur permet de s'autorenouveler [Boyer LA et al, 2006].

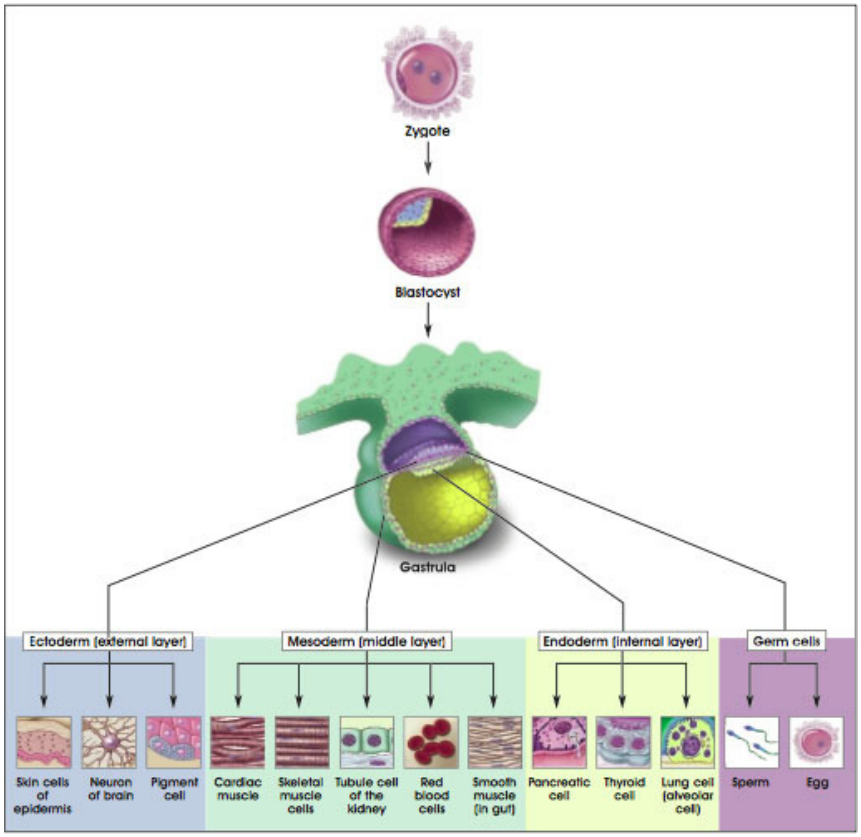


Figure I-5 : Différenciation des tissus humains

(http://stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter1.asp)

Bien qu'il soit possible d'induire la différenciation *in vitro* des cellules souches embryonnaires [Hwang NS et al, 2006 ; zur Nieden NI et al, 2005], plusieurs problèmes devront être résolus avant d'arriver à l'étape finale d'application clinique. D'abord, le maintien en culture de cellules peut entraîner des mutations génétiques, et induire un risque de développement ultérieur de tumeurs [Draper JS et al, 2004]. Ensuite, la réponse immune de l'hôte aux CSEs doit être prise en compte. Une autre difficulté majeure, non résolue à ce jour, est l'absence de facteurs contrôlant de façon systématisée la différenciation cellulaire *in vitro* pour pouvoir orienter spécifiquement les CSEs vers un lignage tissulaire défini. Enfin, l'obstacle majeur au développement de la recherche sur les CSEs humaines reste, notamment en France, d'ordre éthique. L'absence d'accords quant à l'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines dans un but expérimental limite leur application en ingénierie tissulaire [Bobbert M, 2006].

III.2. Les cellules souches fœtales et ombilicales

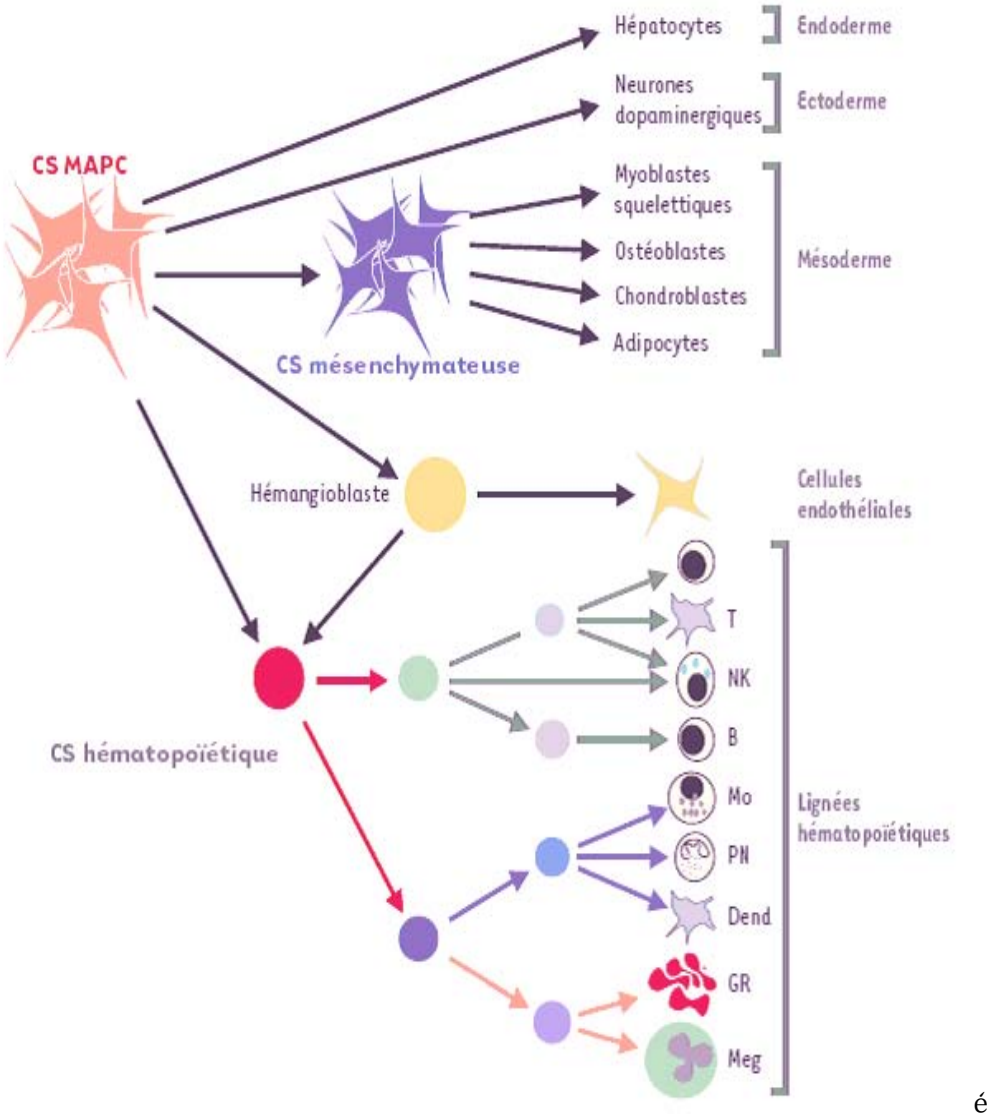
Les cellules souches fœtales sont issues de tissus fœtaux à un stade beaucoup plus tardif (5-9 semaines) que le stade de blastocyte embryonnaire et sont isolées à partir de fœtus résultant d'avortements [Guillot PV et al, 2006].

III.3. Les cellules souches adultes

L'existence, dès la naissance, de cellules souches dites adultes, au sein des différents tissus de l'organisme, est connue depuis longtemps. La plupart sont unipotentes, uniquement dédiées au maintien d'un tissu cellulaire déterminé : peau, muscle, pulpe dentaire, par exemple. Les cellules souches adultes multipotentes sont plus rares, plus difficiles à identifier et à purifier *in vitro*. On peut citer les cellules souches hématopoïétiques, mésenchymateuses, neuronales, épithéliales, gastro-intestinales, épidermiques *etc*. [Tarnowski M et al, 2006].

- La moelle osseuse est une source riche et accessible de cellules souches adultes [Tuan RS et al, 2003]. Elle contient plusieurs types de cellules souches : les cellules souches hématopoïétiques (CSHs) qui donnent naissance aux différentes lignées de cellules sanguines, les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) qui assurent la fonction de soutien stromal, et une troisième population découverte en 2002 par l' équipe de Verfaillie, des cellules souches très primitives de type embryonnaire qui correspondent à la définition d'une cellule souche « somatique » est qui sont pluripotentes désignées sous le terme de multipotent adult progenitor cell (MAPC) (Figure I-6) [Coulombel L, 2003]. Il s'agit d'une nouvelle population de cellules souches pluripotentes, dont la localisation n'est probablement pas restreinte à la moelle osseuse, et dont le potentiel de différenciation les apparente aux cellules souches embryonnaires [Jiang Y et al, 2002; Reyes M et al, 2001]. Les MAPCs sont décrites comme étant les ancêtres de toutes les populations hématopoïétiques et mésenchymateuses présentes dans la moelle osseuse humaine [Verfaillie CM, 2005]. A la différence des cellules souches adultes connues, elles possèdent certains marqueurs moléculaires, Oct-4 et Rex, spécifiques jusqu' à maintenant aux cellules souches embryonnaires. Les MAPCs ne peuvent être amplifiées efficacement que si elles sont ensemencées dans un milieu de culture très pauvre en sérum et à une très faible densité cellulaire, ce qui représentent deux

avantages en culture cellulaire, notamment à orientation clinique.



é

Figure I-6 : Filiation des différentes populations cellulaires de la moelle osseuse

MAPCs : multipotent adult progenitor cells; CS : Cellule Souche ; GR : Globule Rouge ; PN : Polynucléaire neutrophile ; NK : naturel killer ; Mo : Monocyte ; Meg : Mégacaryocyte ; T, B : Lymphocyte T et B ; Dend : Cellule dendritique. [D'après Coulombel L et al, 2003].

III.3.1. Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs)

Friedenstein *et al* ont identifié des progéniteurs capables de produire des colonies de cellules d'allure fibroblastique. Ces progéniteurs ont été appelés CFU-F pour « Colony Forming Unit-Fibroblast » ; capables de se différencier en tissus osseu ou cartilagineux, et

de soutenir l'hématopoïèse [Friedenstein et al, 1976 ; 1978 ; 1987]. Ce n'est que très récemment que le concept de l'existence de CSMs post-natales a émergé pour une utilisation thérapeutique. Les travaux de Prockop et de Pittenger et al ont permis l'identification, parmi la population des CFU-F, de cellules possédant des propriétés biologiques de cellules souches et depuis, de nombreuses études ont montré que les CSMs constituent un potentiel énorme pour l'ingénierie cellulaire et tissulaire [Prockop DJ, 1997 ; Pittenger MF et al, 1999 ; Uccelli A et al, 2008].

III.3.1.1. Localisation des CSMs

La moelle osseuse est considérée comme la source la plus riche et la plus accessible de CSMs [Tuan RS et al, 2003]. En plus de la moelle osseuse, d'autres CSMs ayant des caractéristiques biologiques similaires ont été isolées à partir d'organes tels que :

- Le tissu adipeux [Wickham MQ et al, 2003 ; Katz AJ et al, 2005 ; Zuk PA et al, 2002]
- Le sang périphérique adulte [Kuznetsov SA et al, 2001; Zvaifler NJ et al, 2000]
- Le sang de cordon [Rosada C et al, 2003 ; Bieback K et al, 2004 ; Romanov YA et al, 2003 ; Erices A et al, 2000 ; Goodwin HS et al, 2001]
- Le placenta [Battula VL et al, 2007 ; Yen BL et al, 2005 ; Igura K et al, 2004], la veine et les artères de cordon ombilical [Romanov YA et al, 2003 ; Sarugaser R et al, 2005], la gelée de Wharton du cordon [Wang HS *et al*, 2004], le liquide amniotique [Tsai MS et al, 2004 ; In't Anker PS et al, 2003],
- Le cartilage [Romanov YA et al, 2003 ; Alsalameh S et al, 2004]
- Le tissu synovial [Fickert S et al, 2003] et la membrane synoviale [De Bari C et al, 2001]
- Les dents de lait [Miura M et al, 2003], la pulpe dentaire [Gronthos S et al, 2000] et le ligament péridentaire [Seo BM et al, 2005]
- Le muscle cardiaque [Warejcka DJ et al, 1996]
- Le pancréas [Hu Y et al, 2003]
- La rate [Derubeis AR et al, 2003]
- Le périoste [Fukumoto T et al, 2003]
- L'os trabéculaire [Nöth U et al, 2002]
- Le poumon [Sabatini F et al, 2005]

- Le muscle squelettique [Levy MM et al, 2001 ; Wada MR et al, 2002]
- Le derme [Yong HE et al, 2001]

Les CSMs isolées à partir de différents tissus présentent une expression des marqueurs de surface cellulaire similaire quelle que soit l'origine du tissu [Yoshimura H et al, 2007]. Cependant, leurs potentiels d'expansion et de différenciation chondrogénique sont différents :

- Les CSMs issues de la moelle osseuse ont un taux de prolifération important et peuvent se différencier en chondrocytes en présence de facteurs de croissances tels que les TGF-βs, les BMPs *etc*. Cependant, leur potentiel de différenciation cartilagineuse diminue au fur et à mesure des passages [Sakaguchi Y et al, 2005].
- Les CSMs provenant du cordon ombilical peuvent se multiplier rapidement et suivent la voie de la différenciation chondrocytaire même après plusieurs passages [Wang JF et al, 2004].
- Les CSMs isolées à partir du périoste et de la membrane synoviale ont un potentiel plus important d'expansion que celles de la moelle osseuse [Sakaguchi Y et al, 2005 ; Yoshimura H et al, 2007]. Le nombre de colonies obtenues après 7 jours de culture est 6 fois plus élevé que celui de CSMs d'origine médullaire. De plus, une meilleure potentialité de synthèse de la MEC cartilagineuse a été décrite pour des CSMs isolées à partir du périoste et de la membrane synoviale, comparativement aux CSMs d'origine médullaire [Shirasawa S et al, 2006].
- Le tissu adipeux pourrait servir d'excellente source de CSMs du fait de la importante quantité présente dans l'organisme humain et de la disponibilité de déchets opératoires liés à la chirurgie [Mehlhorn AT et al, 2006]. Il est à noter que les CSMs, isolées à partir du tissu adipeux, ont un potentiel d'expansion supérieur, mais un potentiel chondrogénique inférieur à celui des CSMs isolées à partir de la moelle osseuse [Sakaguchi Y et al, 2005 ; Yoshimura H et al, 2007]. Après 2 semaines de culture dans un gel d'alginate en présence de TGF-β1, les CSMs originaires du tissu adipeux expriment 10 fois moins le gène de col2α1 et 4 fois moins d'agrécanne, deux marqueurs caractéristiques de la lignée chondrocytaire, que celles de la moelle osseuse [Mehlhorn AT et al, 2006].

Le tableau I-3 rassemble des études portant sur les potentiels de prolifération et de différenciation cartilagineuse de CSMs selon leur origine.

Tableau I-3 : Comparaison des potentiels de prolifération et de différenciation chondrocytaire en fonction de l'origine des CSMs

Origine de CSMs	Prolifération	Différenciation chondrocytaire		Références
		Expression du collagène II	Synthèse de MEC	
Moelle osseuse	+	+++	+++	*Sakaguchi Y et al, 2005* *Mehlhorn AT et al, 2006* *Yoshimura H et al, 2007*
Périoste	++++	++++	++++	*Sakaguchi Y et al, 2005* *Shirasava S et al, 2006* *Yoshimura H et al, 2007*
Membrane synoviale	+++++	++++	+++++	*Sakaguchi Y et al, 2005* *Yoshimura H et al, 2007*
Muscles	++	++	++	*Sakaguchi Y et al, 2005* *Yoshimura H et al, 2007*
Tissu adipeux	+++	+	+	*Sakaguchi Y et al, 2005* *Mehlhorn AT et al, 2006* *Yoshimura H et al, 2007*

III.3.1.2. Morphologie cellulaire et capacité de prolifération des CSMs

Pendant leur prolifération en monocouche *in vitro*, les CSMs peuvent produire des colonies de cellules d'allure fibroblastique, sous le terme Colony-forming unit-fibroblasts (CFU-Fs). C'est un des critères pour l'identification des CSMs cultivées *in vitro* [Friedenstein AJ et al, 1970].

Les CSMs ont une forme de fuseau et ressemblent aux fibroblastes en état indifférencié [Roberts I, 2004].

Une propriété intéressant des CSMs est leur capacité d'adhérence au plastique. Cette propriété en permet l'isolement à partir de la moelle osseuse, contrairement aux CSHs. [Kassem M et al, 2004 ; Rickard DJ et al, 1996].

De plus, les CSMs ont un pouvoir de prolifération élevé. Les CSMs se développent rapidement sous l'influence de mitogènes tels que le PDGF, le bFGF et l'IGF-1 [Colter DC

et al, 2000 ; Bianco P et al, 2001]. Ceci permet de créer facilement « une banque» de cellules souches. De plus, les CSMs peuvent garder leur phénotye en culture sur plusieurs passages [Pittenger MF et al, 1999 ; Leo AJ et al, 2006] et conserver leur capacité à se différencier [Bhatia R et al, 2005 ; Pereira RF et al, 1995].

III.3.1.3. Les marqueurs de surface

Comme toutes les autres cellules, les CSMs présentent de nombreux marqueurs de surface cellulaire. Mais, à ce jour, il n'existe aucun marqueur spécifique pour identifier les CSMs. Donc les CSMs sont définies par un profil d'expression d'antigènes. Elles sont identifiées principalement par l'expression de CD105 (endogline), CD73 (5' terminal nucleotidase) et CD90 (Thy-1), et sont négatives pour les marqueurés hématopoïétiques, notamment CD34 et CD45 [Noël D et al, 2002]. Cette propriété permet de distinguer aisément les CSMs des CSHs à partir d'un échantillon de la moelle osseuse. Mais, les CSMs isolées directement de la moelle osseuse sont positives pour CD34, elles perdent cet antigène lors de la culture *in vitro.* Les différents marqueurs de surface exprimés par les CSMs humaines actuellement connus sont regroupés dans le Tableau I-4 [Pittenger MF et al, 2004]

Tableau I-4 : Liste des marqueurs de surface exprimés ou non par les CSMs humains

CD = Cluster de Différenciation ; TGFβIR = Transform growth factor β receptor type I; TGFβIIR = Transform growth factor β receptor type II; HLA = Humain leukocyte antigen; SSEA = Stage specific embrynnic antigen.

Marqueurs présents	CD13, CD29, CD44, CD49a, b, c, e, f, CD51, CD54 (ICAM1), CD58, CD71, CD73, CD90 (Thy-1), CD102, CD105, CD106 (VCAM), CDw119, CD120a, CD120b, CD123, CD124, CD126 (ALCAM), CD127, CD140a, CD166, P75, TGFβIR, TGFβIIR, HLA-A, B,C, SSEA-3, SSEA-4, D7, CD271.
Marqueurs absents	CD3, CD4, CD6, CD9, CD10, CD11a, CD14, CD15, CD18, CD21, CD25, CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD49d, CD50, CD62E,L,S, CD80, CD86, CD95,

CD117, CD133, SSEA-1, HLA-DR.

III.3.1.4. Propriétés biologiques

Comme toute cellule souche, les CSMs ont deux propriétés principales : auto-renouvellement [Carlo-Stella C et al, 1993] et multipotence [Deans RJ et al, 2000 ; Caplan AL et al, 2006]. La figure I-7 montre la capacité de différentiation des CSM.

Elles possèdent aussi la propriété de transdifférenciation. Cette propriété désigne la possibilité qu'aurait une cellule déjà engagée dans une voie de différenciation de changer de cap et d'emprunter une autre route. Par exemple, les CSMs peuvent se différencier, dans certaines conditions, en cellules épidermiques [Deng W et al, 2005].

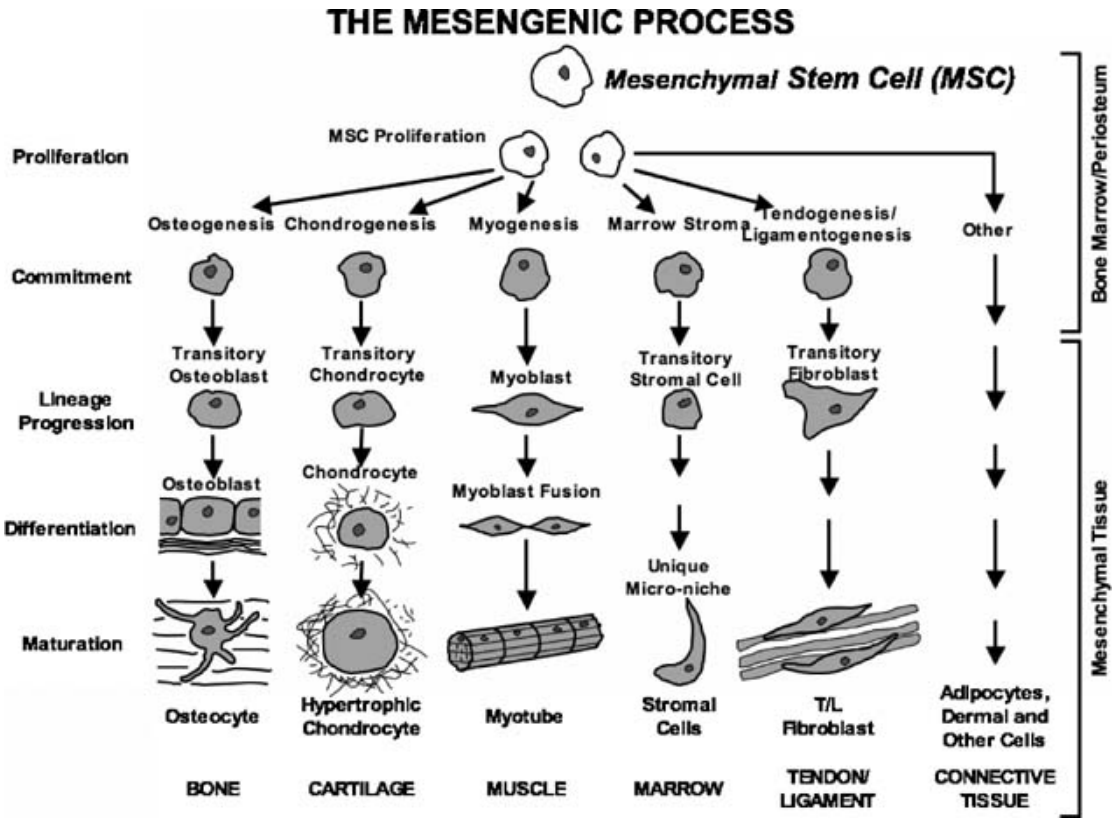


Figure I-7 : Capacité de différenciation des cellules souches mésenchymateuses. *[D'après Caplan AL et al, 2006]*

Les CSMs peuvent sécréter un ensemble de cytokines et de facteurs de croissance, par exemple, IL (interleukine)1α, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15, LIF (leukemia inhibitory factor), SCF (stem cell factor), G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor), M-CSF (macrophage-

colony stimulating factor), GM-CSF (granulocyte/ macrophage -colony stimulating factor) ; IL-1R, Il-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, LIF-R, SCF-R, G-CSFR, TNF-IR, TNF-IIR, TGF-bIR, TGF-bIIR, bFGF-R, PDGF-R, EGF-R [Minguell JJ et al, 2001 ; Molloy AP et al, 2009]. Grace à cette propriété de sécrétion, les CSMs favorisent la prolifération et la différenciation des CSHs, et ainsi sont impliquées dans le soutien de l'hématopoïèse [Minguell JJ et al, 2001 ; Almeida-Porada G et al, 2000].

Les CSMs, par leurs propriétés immunomodulatrices, inhibent la prolifération des cellules T *in vitro* [Di Nicola M et al, 2002 ; Bartholomew A et al, 2002; Le Blanck et al, 2003; Tse WT et al, 2003; Krampera M et al, 2003; Maitra B et al, 2004; Bhatia R et al, 2005]. Plusieurs études *in vitro* ou *in vivo*, aussi bien chez l'animal que chez l'homme, ont mis en évidence l'influence des CSMs, grâce à leurs propriétés immunosuppressives, non seulement sur la différenciation des lymphocytes mais aussi sur la réponse immunitaire T. *In vitro*, les CSMs humaines ont une action suppressive sur la prolifération des lymphocytes T , en partie liée a la production du *transforming growth factor beta 1* (TGFβ1) et à l'*hepatocyte growth factor* (HGF) [Di Nicola M et al,2002]. De par leurs propriétés immunosuppressives, il devient évident que les CSMs peuvent avoir une incidence sur la survenue et l'intensité des réactions du greffon contre l'hôte (*graft versus host disease* ou GvHD). La GvHD est la réaction miroir ou symétrique du rejet, médiée par les lymphocytes T, qui présents dans le greffon hématopoïétique, vis-à-vis des tissus du receveur. En effet, les CSMs n'expriment pas les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe II, HLA-DR. D'une manière générale, les molécules HLA de classe II sont présentes sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et servent à présenter au récepteur T (TcR) des lymphocytes T des peptides, processés par les CPA à partir d'antigènes exogènes. Les CSMs n'exprimant HLA-DR, sont incapables de présenter un peptide antigénique et d'être immunostimulantes. Lorsque les CSMs sont ajoutées dans une culture mixte, on oberve qu'elles inhibent la réaction d'alloréactivité.

III.3.2. Utilisation des CSMs en ingénierie cellulaire et tissulaire

Grâce à leurs propriétés biologiques, à la facilité pour les isoler, les faire proliférer et différencier en culture, les CSMs deviennent la source de cellules idéales pour l'ingénierie cellulaire et tissulaire [Bartmann C et al, 2007].

Plusieurs études dans une variété de systèmes ont mis en évidence la grande perspective de construire les tissus en bioingénierie à base de CSMs. Les cellules souches ont servi, dans en premier temps, à reconstruire des tissus mésenchymateux [Bianco P et al, 2001] et récemment, une vaste gamme de tissus épithéliaux est concernée. Il a été rapporté que les CSMs avaient le potentiel de se différencier en cellules épidermiques, sous certaines conditions, et qu'elles peuvent servir comme source de cellules pour l'ingénierie tissulaire de la peau [Han CM et al, 2007; Paunescu V et al, 2007]. De même, de nombreuses recherches sur l'utilisation des CSMs en ingénierie tissulaire de l'os, du cartilage, du tissu adipeux, du vaisseau, du foie, etc... ont été effectuées récemment [Bianco P et al, 2000; Fraser JK et al, 2004; Hui JH et al, 2005; Risbud MV et al, 2005; Wang QW et al, 2005 ; Tong ZC et al, 2008].

En conclusion, les CSMs constituent un outil original et offrent un potentiel pour la thérapie cellulaire et la bioingénierie tissulaire.

IV. La différenciation de CSMs

In vitro, les CSMs peuvent se différencier en plusieurs types des cellules selon les conditions de culture utilisées. Le microenvironnement cellulaire est en effet très important pour l'orientation de la différenciation des CSMs [Grassel S et al, 2007]. La figure I-8 montre plusieurs conditions de culture *in vitro* qui favorisent le processus de différenciation des CSMs en tissu spécifique [Tuan RS et al, 2003].

IV.1. La régulation de la différenciation des CSMs

Les processus de différenciation des CSMs sont contrôlés de façon organisée et dynamique par des facteurs spécifiques impliqués dans différentes voies de signalisation. Plusieurs facteurs de transcription qui contrôlent spécifiquement les programmes de différentiation des CSMs ont été identifiés dans la décennie passée. La figure I-11 montre la régulation de la différenciation des CSMs par les facteurs spécifiques de transcription [Nishimura R et al, 2008]. On y trouve :

- Runx2 (Cbfα1) et Ostérix (Sp7), des facteurs de transcription indispensables pour le développement d'osteoblastes [Komori T et al, 1997 ; Otto F et al, 1997 ; Nakashima K et al, 2002].

- Les membres de la famille de Sox, nécessaires dans les premiers étapes de la différenciation chondrocytaire [de Crombrugghe B et al, 2001 ; Kronenberg HM, 2003 ; Komori T, 2006].
- Les membres de la famille C/EBP (*CCAAT enhancer binding protein*) et PPAR-γ (*peroxisome proliferator-activated receptor-γ*), très importants dans la différenciation en adipocyte [Morrison RF et al, 1999; Spiegelman BM, 1998].
- Les membres de la famille MyoD (*myogenic differentiation antigen*), sont importants dans la myogenèse.

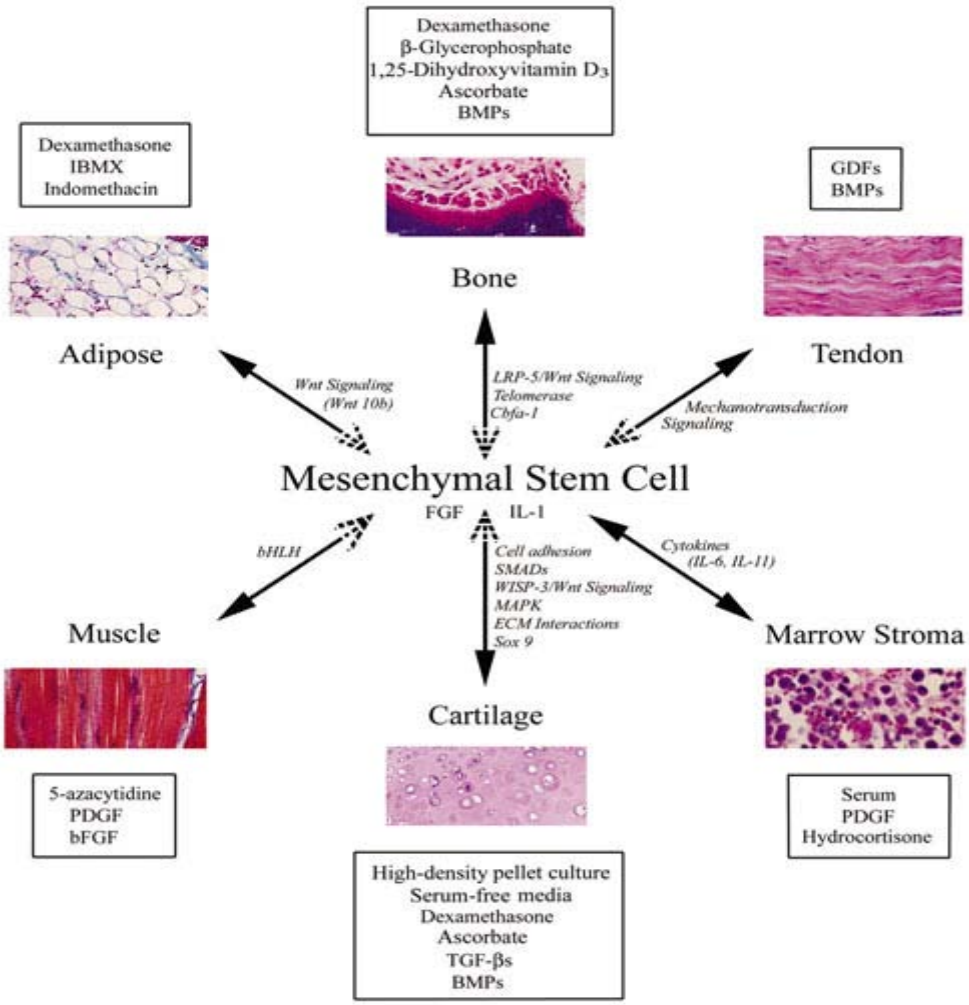


Figure I-8 : Conditions de culture favorisant le processus de la différenciation *in vitro* des CSMs en tissu spécifique (légende encadré).

Les composants des voies de signalisation sont montrés en italiques. Les pointes de flèches pointillées dénotent des événements « reversibles » de la différentiation. bFGF, basic fibroblast growth factor; bHLH, basic helix–loop–helix; BMP, bone morphogenetic protein; Cbfα1, core binding factor alpha 1; ECM, extracellular matrix; FGF, fibroblast growth factor; GDF,

growth/differentiation factor; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; LRP, low-density lipoprotein receptor-related peptide; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PDGF, platelet-derived growth factor; SMAD, vertebrate homologue of Drosophila Mothers Against Decapentaplegic (MAD); TGF-β, transforming growth factor beta; WISP, Wnt-1-inducible protein. [D'après Tuan RS et al, 2003]

Le rôle fonctionnel des facteurs de transcription est régulé strictement par la transduction de signal qui lie les changements extracellulaires avec le noyau via le cytoplasme. Plusieurs cytokines et hormones, telles que BMP, TGF-β, Wnt, hedgehog, FGF, œstrogène et androgène, sont impliquées dans la régulation de la différentiation des CSMs en stimulant des voies de signalisation intracellulaires [Karsenty G, 2003; Komori T, 2006]. Les molécules de signalisation intracellulaires spécifiques sont activées par phosphorylation, ubiquitination, interaction protéine- protéine ou changement de conformation en réponse à la stimulation par un ligand. Puis, ces molécules activées activent des facteurs de transcription spécifiques.

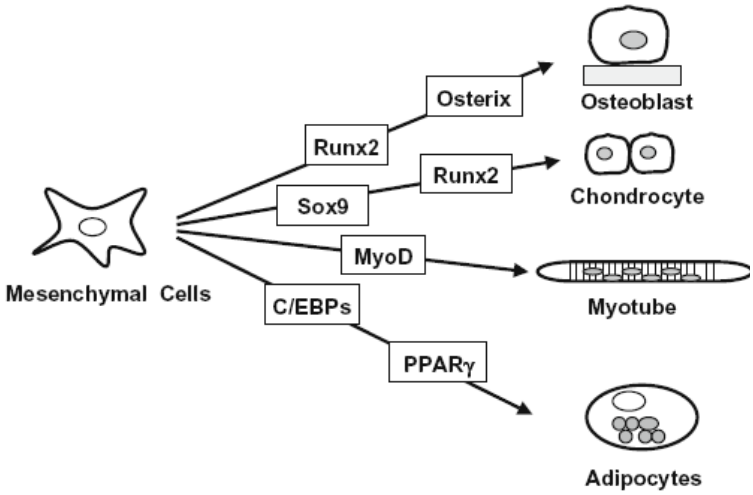


Figure I-9 : Régulation de la différenciation des CSMs par les facteurs de transcription spécifiques. *[Nishimura R et al, 2008]*

IV.1.1. Runx2 dans l'ostéogenèse et la chondrogenèse

Runx2 (appelé aussi Cbfα1), un membre de la famille des facteurs de transcription Runx, est le plus spécifique des marqueurs moléculaires de la lignée des ostéoblastes. Son

expression est à la fois nécessaire et suffisante pour induire l'ostéogènese et il régule l'expression des gènes de la plupart des caractéristiques phénotypiques des ostéocytes.

Plusieurs études indiquent le rôle essentiel de Runx2 dans la formation de l'os et dans l'ostéoblastogenèse. Komori *et al.* et Otto *et al.* ont constaté que les souris de Runx2-null n'ont pas d'os, ni d'ostéoblastes [Komori T et al, 1997; Otto F et al, 1997]. Mundlos *et al.* identifient que Runx2 est un gène responsable de la dysplasie cleidocranial (CCD) [Mundlos S et al, 1997]. D'ailleurs, Ducy *et al*. ont prouvé que Runx2 se lie à l'ADN-liant élément d'ostéoblaste-spécifique dans la région du promoteur du gène de l'ostéocalcin et règle ainsi la transcription de l'ostéocalcine, de l'ostéopondine, et des sialoprotéines de l'os [Ducy P et al, 1997]. En outre, Harada *et al*. ont démontré que l'augmentation de l'expression de Runx2 favorise la différentiation ostéogénique des CSMs [Harada H et al, 1999]. Mais il est intéressant que chez les souris transgéniques dont l'ostéopenia et la fréquente fracture d'os sont découvertes, l'expression de Runx2 est beaucoup augmentée [Liu W et al, 2001 ; Geoffroy V et al, 2002]. Par conséquent, Runx2 semble empêcher la formation d'os à l'étape en retard.

Runx2 est exprimé aussi dans les chondrocytes hypertrophiques. De nombreuses études démontrent que Runx2 et Runx3 sont essentiels pour la différenciation chondrocytaire à l'étape hypertrophique [Enomoto H et al, 2000 ; Yoshida CA et al, 2002 ; Ueta C et al, 2001 ; Yoshida CA et al, 2004]. En outre, il semble que Runx2 et Runx3 règlent la chondrogenèse par Ihh, car il n'y a pas expression de Ihh chez les souris de double-coupe de Runx2 et Runx3 [Yoshida CA et al, 2004].

Il y a beaucoup de facteurs impliqués sur la regulation de Runx2 pendant la différentiation ostéogénique. Runx2 a besoin de Cbfβ pour s'associer à l'ADN [Yoshida CA et al, 2002]; l'expression de Runx2 est augmentée par BMP-2 en activant la voie de signalisation des Smads [Lee KS et al, 2000 ; Nishimura R et al, 2002]. De plus, Smad1 et Smad5 peuvent interagir avec Runx2 et améliorer son activité transcriptionnelle et ostéoblastique [Hanai J et al, 1999 ; Zhang YW et al, 2000 ; Nishimura R et al, 2002] ; C/EBPβ et C/EBPδ s'associent avec Runx2, puis améliorent l'activité du promoteur de l'ostéocalcine [Gutierrez S et al, 2002]. Par ailleurs, C/EBPβ promeut la différentiation ostéoblastique en s'associant avec Runx2 [Hata K et al, 2002], bien que la famille de C/EBP joue un essentiel rôle dans la différentiation des CSMs en adipocytes ; ATF4, un

facteur transcriptionnel de la famille de CREB (*cAMP-responsive element-binding protein*), règle le promoteur du gène d'ostéocalcine en collaboration avec Runx2; les facteurs transcriptionnels Twist-1 et Twist-2, inhibent la formation d'os et la différenciation ostéoblastique en interagissant avec Runx2 [Bialek P et al, 2004].

IV.1.2. Sox9 dans la chondrogenèse

Sox9, qui a un SRY-related high mobility group box, est un facteur de transcription essentiel et indispensable pendant la chondrogenèse et l'expression des gènes de la matrice extracellulaire du cartilage, incluant la chaine α de collagène de type II (Col2α1), collagène de type 11 (Col11) et aggrécanne [de Crombrugghe B et al, 2001 ; Lefebvre V et al, 1997 ; McDowall S et al, 1999 ; Bi W et al, 1999 ; Akiyama H et al, 2002]. Sox9 joue notamment un rôle dans les étapes précoces de la chondrogenèse.

Sox9 peut former un complexe transcriptionnel avec plusieurs protéines, par exemple Sox5 et Sox6, induites par Sox9, qui intervient dans la régulation de la chondrogenèse. La CBP (*CREB binding protein*), la p300 histone acétylase et le PGC-1α sont identifiés comme des coactivateurs de Sox9 [Kawakami Y et al, 2005].

Liu CJ *et al.* ont montré que Sox9 peut activer l'expression des gènes des protéines oligomérique de la matrice du cartilage qui codent pour les protéines de matrice non-collgènique, ceci nécessite la participation de facteurs de transcription Sox5 et Sox6 ainsi que les coactivateurs CBP et p300 histone acétylase [Liu CJ et al, 2007 ; Takayuki F et al, 2005].

En outre, l'activation de la transcription du gène de Sox9 par BMP-2 est associée au remodelage de la chromatine et à la modification des histones [Pan Q et al, 2009]. Furumatsu T *et al.* ont trouvé que Sox9 interagit avec la chromatine en régulant la modification de la chromatine et active ainsi la transcription de gènes cibles en collaboration avec p300 [Furumatsu T et al, 2005]. Ces études expliquent la fonction de Sox9 pendant la chondrogenèse en s'intéressant au remodelage de la chromatine et à la modification des histones.

V. La chondrogenèse

La chondrogenèse est le processus qui permet la formation du cartilage par la différenciation de CSMs au cours du développement du squelette. Les chondrocytes différenciés passent ensuite par une étape de maturation hypertrophique et aboutissent à une ossification endochondrale. Ce processus est régulé par de nombreux facteurs de croissance qui interviennent dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la maturation des cellules. Ces facteurs induisent des changements de l'expression des gènes à l'aide des facteurs de transcription de la famille des Sox entre autres. Ce processus s'effectue en trois étapes : la condensation de CSMs, la différenciation chondrocytaire et l'hypertrophie des chondrocytes (Figure I-10) [Goldring MB et al, 2006].

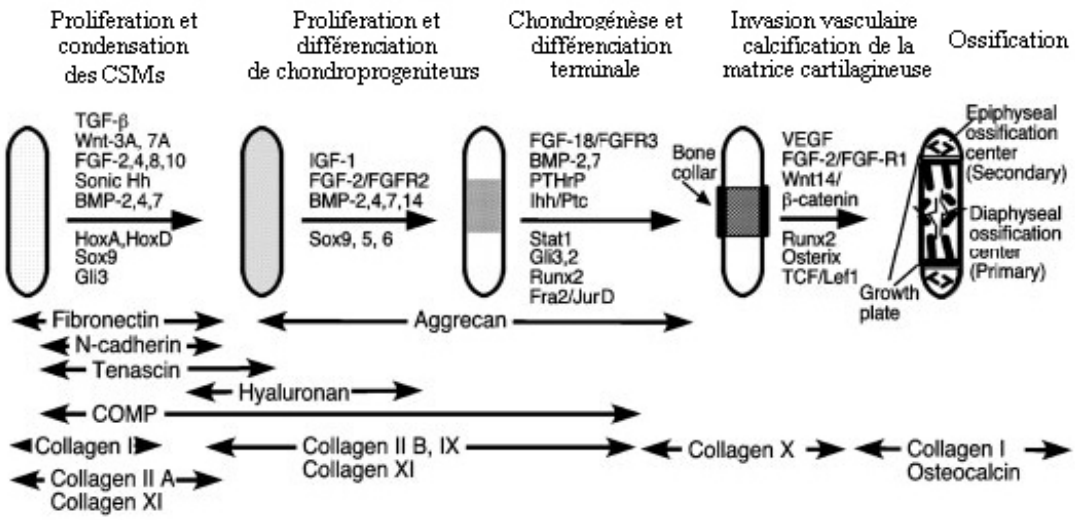


Figure I-10 : Représentation schématique des différentes étapes de la chondrogenèse et de l'ostéogenèse au cours du développement des os longs. *Différents facteurs de croissance et facteurs de transcription interviennent dans l'expression des gènes à chaque étape. [D'après Goldring MB et al, 2006]*

V.1. La condensation de CSMs

Cette étape est composée de la sélection, la migration, la prolifération et la condensation des CSMs (Figure I-10). Ces actions sont régulées par des interactions cellules-cellules et cellules-matrice [Hall BK, 2000 ; Tuan RS, 2004]. La condensation correspond à une augmentation de l'adhésion cellulaire et à des modifications du cytosquelette. Préalablement à la condensation, les CSMs produisent une MEC riche en HA

et en collagène de types I et IIa [Sandell LJ, 1994]. L'initiation de la condensation est associée à une augmentation de l'activité de la hyaluronidase et à l'apparition de molécules d'adhésion telles que les N-cadhérines et les N-CAMs (Neural Cell Adhesion Molecules). Le facteur de croissance TGFβ, un des premiers stimuli dans la condensation chondrogénique, stimule la synthèse de la fibronectine, qui en retour régule les récepteurs N-CAM. Les syndécanes, un type de protéoglycannes membranaires, se fixent à la fibronectine et régulent négativement les récepteurs N-CAM, définissant ainsi les limites de la condensation. La matrice, contenant aussi la ténascine, la thrombospondine, les protéines COMP (cartilage oligomeric matrix protein), interagit avec les molécules d'adhésion pour activer les voies de signalisation intracellulaires. Les molécules N-cadhérines et N-CAM ne seront plus exprimées à la surface des chondrocytes mais réapparaîtront plus tard à la surface des cellules du périchondre [DeLise AM et al, 2000].

Plusieurs auteurs ont décrit l'implication de nombreux facteurs de transcription mais aussi la présence de nombreux gènes dans le contrôle de la chondrogenèse (Figure I-4) [DeLise AM et al, 2000 ; Eames BF et al, 2003; Hall BK et al, 2000].

V.2. La différenciation chondrocytaire

Cette différenciation se caractérise par la formation d'une matrice contenant différents types de collagène tels que les collagènes de type II, IX et XI mais aussi des agrécannes (Figure I-4).

Le facteur de transcription Sox9 est un des premiers facteurs permettant aux cellules de commencer l'étape de condensation (Figure I-11). Dans la phase de différenciation, le facteur de transcription Sox9 permet l'expression du collagène de type IIa (Col2α1) mais aussi l'expression d'autres protéines matricielles du cartilage tels que Col1α2 [Eames BF et al, 2003]. Deux autres membres de la famille des facteurs transcriptionnels Sox (L-Sox5 et Sox6) co-exprimés avec Sox9 dans cette étape sont indispensables pour permettre la différenciation des chondro-progéniteurs en chondrocytes [Lefebvre V et al, 1998]. En effet, la présence de Sox5 et Sox6 permet l'expression des collagènes de type II, IX, des agrécannes et des protéines de liaison [Smits P et al, 2001]. Un autre facteur de transcription, le Runx2, intervient dans la phase de différenciation chondrocytaire. Comme le montre la figure I-4, ce facteur est également présent dans les autres étapes telles que la

condensation et l'ossification [Ducy P et al, 1997].

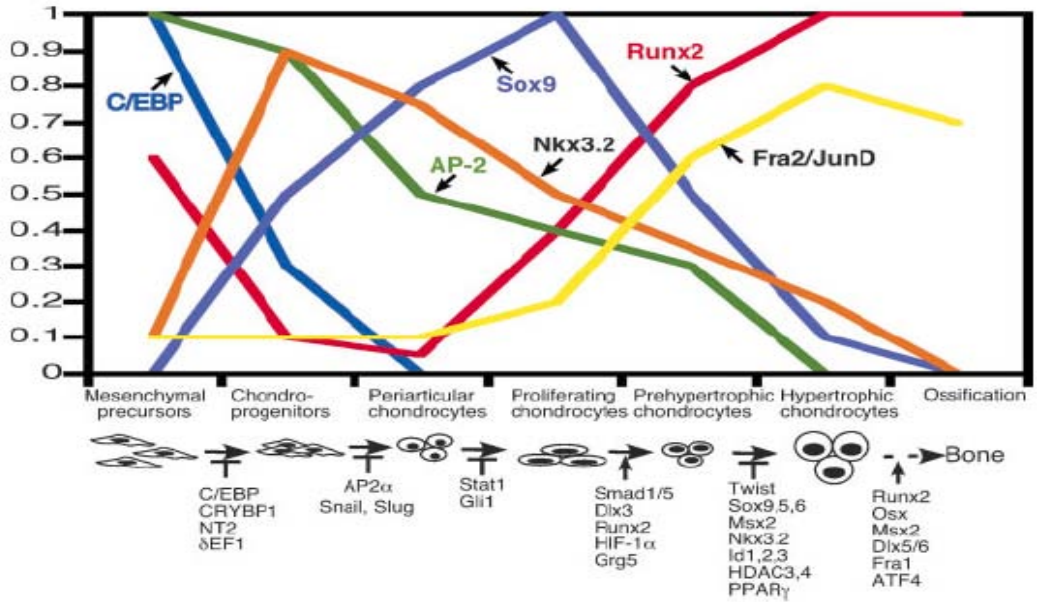


Figure I-11 : Représentation schématique de l'expression des facteurs transcriptionnels lors des différentes étapes de la chondrogenèse et de l'ossification endochondrale.

Des facteurs de transcription sont soit des inhibiteurs (⊤) soit des activateurs (↑) des différentes étapes. [D'après Goldring MB et al, 2006]

V.3. L'hypertrophie des chondrocytes

Dans cette étape, les chondrocytes différenciés deviennent des chondrocytes hypertrophiques et commencent à exprimer leur seul marqueur spécifique à savoir le collagène de type X [St-Jacques B et al, 1999]. La transcription du collagène de type X est régulée par le facteur de transcription Runx2 dont l'expression est augmentée dans l'étape d'hypertrophie de la chondrogenèse [Shen G et al, 2005]. L'apparition de ce type de collagène indique le stade terminal de la chondrogenèse et le début de l'ostéogenèse où le collagène de type X facilite le dépôt de la matrice osseuse et la calcification [Enomoto H et al, 2002]. La chondrogenèse et l'ostéogenèse sont donc étroitement coordonnées par l'étape d'hypertrophie de chondrocytes.

VI. La voie de signalisation de TGF-β et les protéines Smads

VI.1. Membres de la famille du TGF-β

Les membres de la famille du TGF-β sont des polypeptides sécrétés par la cellule qui interviennent dans de nombreuses réponses cellulaires telles que la prolifération, la différenciation et la migration. Plus de 60 membres sont identifiés dans les organismes multicellulaires, avec au moins 29 et probablement jusqu'à 42 protéines codées par le génome humain. Parmi ces 60, il y a trois TGF-βs, cinq activines, et au moins huit BMPs codés par les différents gènes.

Les membres de la famille du TGF-β sont exprimés dans presque tous les types de cellules. Les réponses cellulaires à TGF-β sont complexes. TGF-β peut avoir un effet transcriptionnel ou agir sur d'autres mécanismes cellulaires selon le contexte cellulaire et l'environnement physiologique.

VI.1.1. Le TGF-β

Trois isoformes, TGF-β1, TGF-β2 et TGF-β3 sont exprimées chez les mammifères. Chez l'homme, les trois isoformes sont localisées sur trois chromosomes différents, 19q13, 1q41 et 14q24 respectivement [Roberts AB, 1998].

Le TGF-β mature est un homodimère de deux polypeptides de 12,5-kD. Il est secrété par la cellule sous la forme d'un complexe latent dans lequel l'homodimère est associé de façon non-covalent à un peptide de 80-kD appelé LAP (latency-associated peptide). Ceci constitue 'le petit complexe' ou LTGFβ. LAP est une composante fondamentale de la voie du TGF-β nécessaire pour l'efficacité de sa sécrétion, l'empêchant de se lier à des récepteurs ubiquitaire de la surface cellulaire afin de maintenir sa disponibilité dans le réservoir extracellulaire qui est facilement accessible pour l'activation. Ce complexe latent est sécrété par toutes les cellules et se trouve soit en circulation soit lié à la matrice extracellulaire. [Gleizes PE et al, 1996; Munger JS et al, 1997].

Le complexe latent du TGF-β est lié à la matrice extracellulaire via les glycoprotéines appelées LTBP (*latent TGF-β-binding protein*). Il en existe 4 isoformes, LTBP-1, -2, -3, and -4. LTBP-1 en particulier est impliquée tant dans la séquestration de LTGFβ dans la matrice extracellulaire que dans la régulation de son activation dans l'environnement

extracellulaire. Le complexe du TGF-β, LAP et LTBP-1 est appelé le grand complexe. Un LTBP est souvent lié à un prosegment et joue un rôle dans le ciblage du complexe de la matrice extracellulaire, où le TGF-β est activé et libéré par clivage protéolytique du prosegment [Gualandris A et al, 2000; Annes JP et al, 2003]. En outre, plusieurs protéines de surface des cellules fonctionnent comme corécepteurs et aident à la présentation du ligand au récepteur. Figure I-12 montre le processus de la sécrétion de TGF-β.

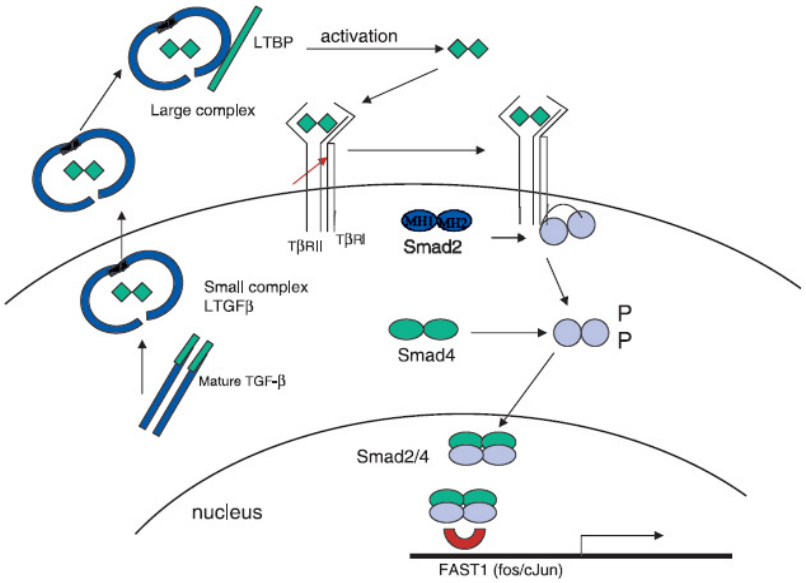


Figure I-12 : Processus de sécrétion du TGF-β. *Le TGF-β est sécrété sous la forme d'un complexe latent (LTGFβ), qui s'associe à LTBP pour former un grand complexe. Ce complexe peut être piégé dans la matrice cellulaire ou activé et alors libérer du TGF-β. [D'après Govinden R et al, 2003]*

VI.2. Le modèle général de la voie de signalisation de TGF-β via Smads

Les protéines membres de la famille du TGF-β transmettent le signal à l'intérieur de la cellule à travers un complexe de récepteurs de "type I" et de "type II" (RI et RII) à la surface cellulaire. Ces deux types sont des sérine / thréonine kinases transmembranaires structurellement similaires, sauf que le RI a une séquence conservée riche en Gly/Ser, 'séquence GS', en amont du domaine kinase. L'association des ligands permet la formation d'un complexe stable contenant deux récepteurs de chaque type, ce qui permet la phosphorylation de la séquence de GS du RI par la kinase du RII. Cette phosphorylation active la kinase du RI, qui entraîne l'autophosphorylation du RI et la phosphorylation des protéines R-Smads [Derynck R et al, 2003 ; Shi Y et al, 2003]. La protéine SARA (*smad*

anchor for receptor activation) peut s'associer avec RI et Smad2/3 afin d'améliorer la phosphorylation des Smad2/3 par RI. Après être phosphorylées, les R-Smads subissent un changement conformationnel, elles se dissocient du RI et forment un complexe trimérique de deux R-Smads (soit homomérique, soit hétéromérique) avec Smad4 ou Co-Smad. Ce complexe trimérique translocalise dans le noyau, où les protéines Smads fonctionnent comme facteurs de transcription [Ross S et al, 2008]. Le modèle général de la voie de signalisation du TGF-β est présenté sur la figure I-13.

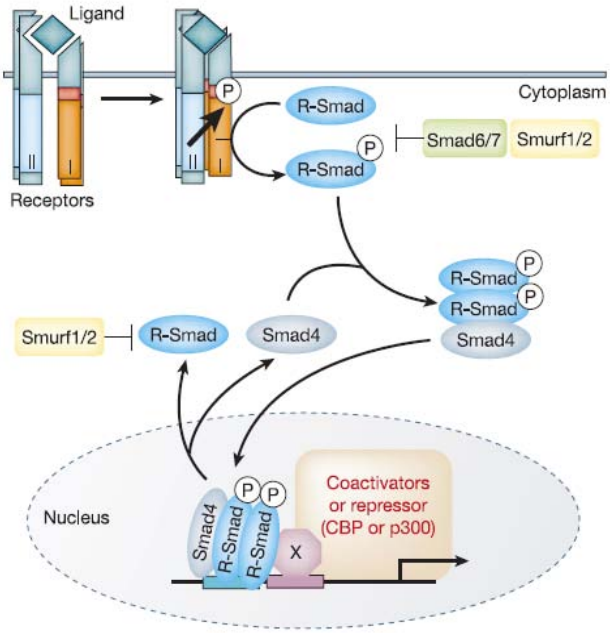


Figure I-13 : Le mécanisme général de la voie de signalisation de TGF-β via les protéines Smads. *[D'après Derynck R et al, 2003]*

Il faut souligner que le nombre de ligands de la famille du TGF-β excède le nombre des récepteurs de type I et de type II. A ce jour, 5 récepteurs de type II et 7 récepteurs de type I ont été identifiés, Ainsi, la combinaison des récepteurs de type I et II permet la formation de récepteurs fonctionnels qui vont permettre la liaison sélective des ligands ainsi que la transduction du signal intracellulaire. La figure I-14 montre les combinaisons hétéromériques des récepteurs de la superfamille du TGF-β en fonction des ligands et l'activation des R-Smads qui en résulte.

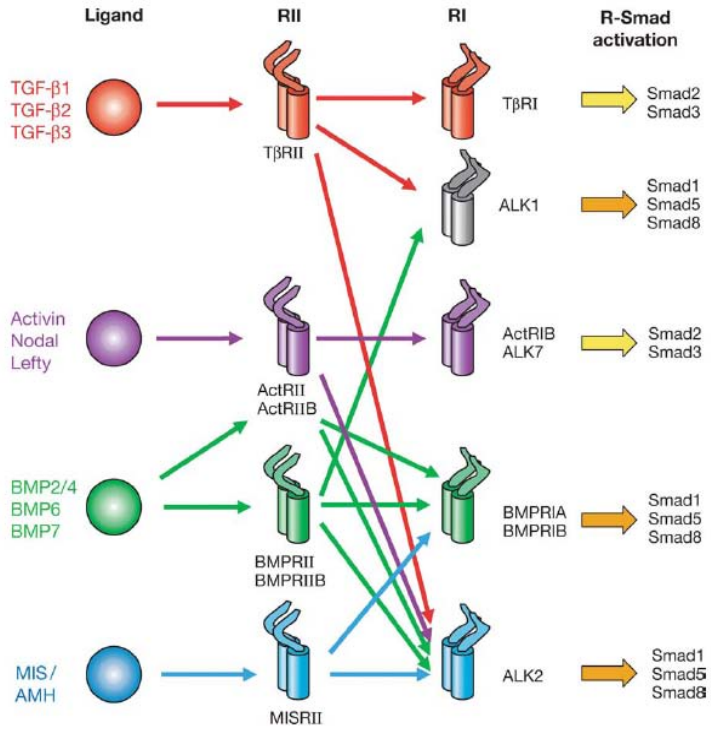


Figure I-14 : La combination hétéromérique des récepteurs de la famille du TGF-β.

Les ligands se lient aux combinaisons spécifiques de RII-RI (hétérotétramères) à la surface cellulaire. Les ligands, RII et RI sont colorés pour chaque voie de signalisation. L'activation de R-Smads est montrée à droite. [D'après Feng XH et al, 2005]

L'association du TGF-β avec RI/RII sur la surface cellulaire non seulement initie la transduction de signal, mais aussi entraîne l'internalisation du ligand et des récepteurs. L'endocytose de récepteurs peut se réaliser par deux mécanismes qui vont induire une réponse cellulaire différente : l'endocytose régulée par la clathrine ou l'endocytose régulée par les caveolae [Chen YG, 2009 ; Di Guglielmo GM et al, 2003]. La figure I-15 montre la localisation subcellulaire des recepteurs et la régulation de la voie de TGF-β.

L'endocytose régulée par la clathrine augmente l'activité de signalisation de TGF-β. Dans l'endosome précoce il y a plusieurs régulateurs positifs pour la voie de signalisation, par exemple, trois protéines contenant le domaine FYVE : SARA, endofin et Hrs/Hgs (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*). Cependant, l'endocytose régulée par la clathrine peut également induire une dégradation des récepteurs par l'internalisation des récepteurs de l'endosome précoce à l'endosome tardif et finalement au lysosome.

L'endocytose régulée par les caveolae induit la dégradation des récepteurs via les

internalisations dans les lysosomes.

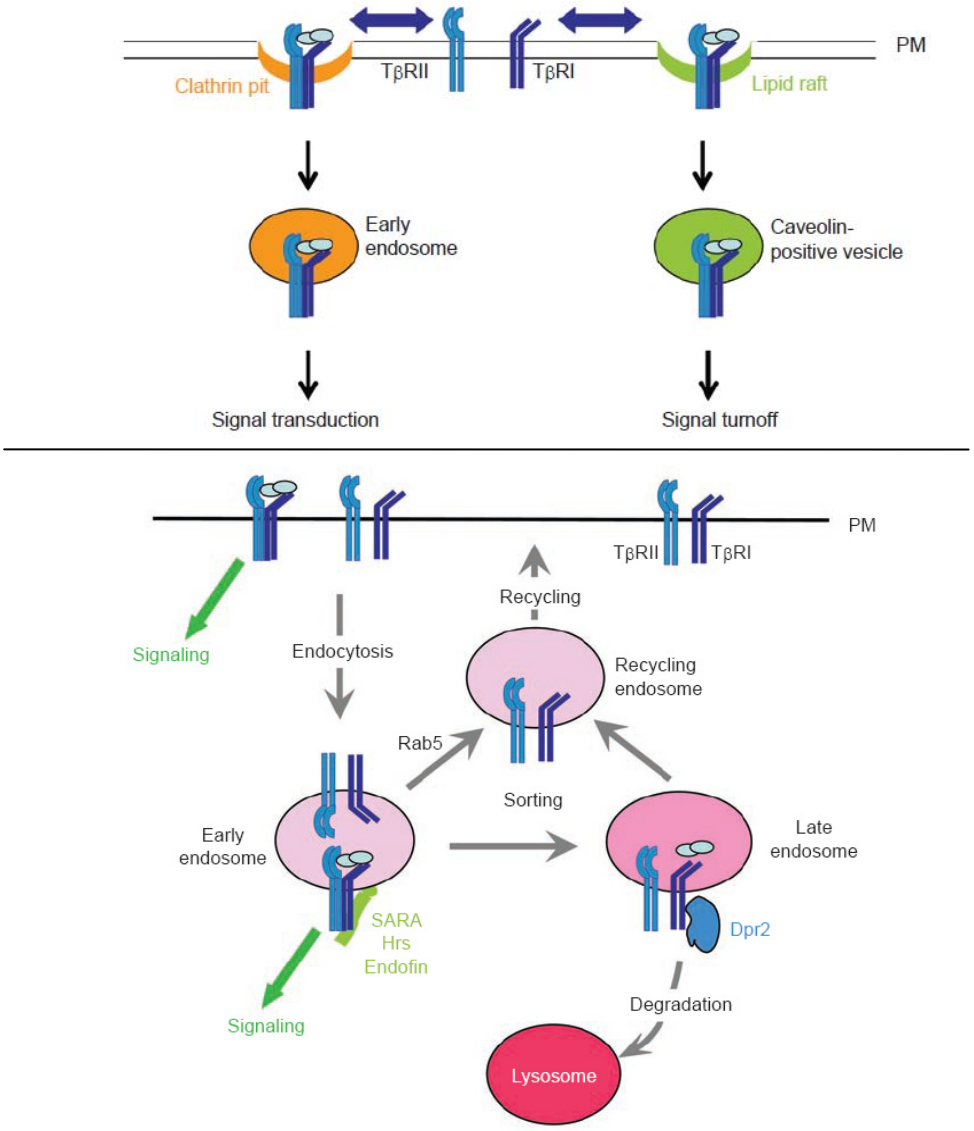


Figure I-15 : La localisation subcellulaire des récepteurs et la régulation de la voie de la signalisation de TGF-β. *[D'après Chen YG, 2009]*

Le Smads sont les seuls effecteurs intracellulaires établis de la signalisation du TGF-β. Les Smads existent sous la forme de trois sous-groupes: les R-Smads (Smad activés par récepteur), un Smad commun (Smad4 chez les vertébrés), et les I-Smads (Smads inhibiteur: Smad6/7). Les R-Smads et le Smad4 contiennent deux segments polypeptidiques conservés, N-terminal Mad-homology 1 (MH1) et C-terminal Mad-homology 2 (MH2), qui sont associés par une région de connexion variable. Les R-Smads ont dans le domaine de MH2 un motif de SXS dans lequel les deux sérines sont phosphorylées par le RI. Les I-Smads ne

possèdent pas le domaine MH1, mais ont le domaine de MH2 qui a une faible homologie avec les autres Smads. MH1 et MH2 peuvent interagir avec les facteurs de transcription spécifiques de séquences tandis que le domaine C terminal des R-Smads peut interagir avec les coactivateurs CBP (CREB-binding protéine) ou p300. Le domaine MH1 des R-Smads peut s'associer avec l'ADN, sauf pour Smad2, et le domaine MH2 régule l'oligomérisation des Smads et l'interation entre Smads et les récepteurs. La figure I-16 montre la structure et le rôle des domaines des Smads.

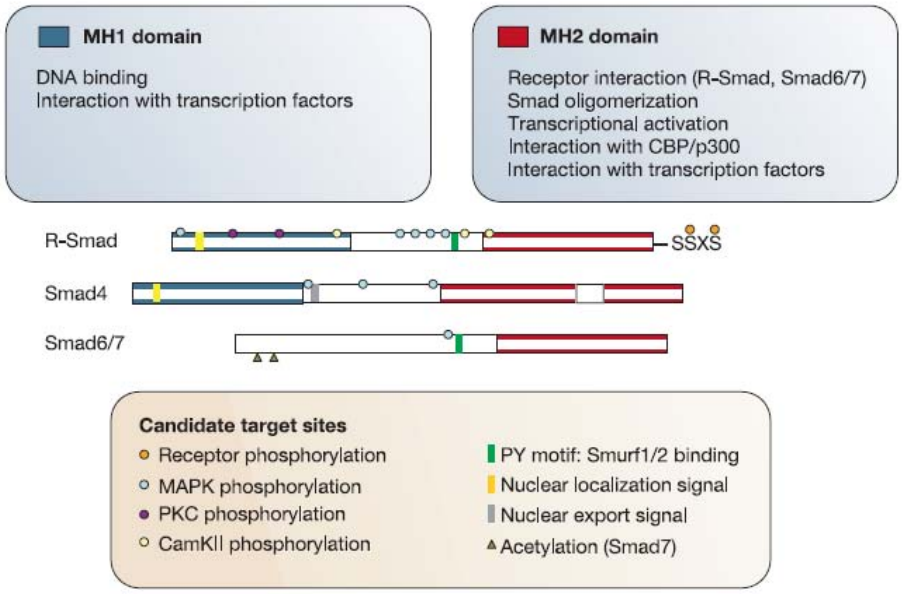


Figure I-16 : La structure et le rôle des domaines de Smads. *[D'après Derynck R et al, 2003]*

Les protéines Smads fonctionnent comme facteurs de transcription en réponse au TGF-β. Dans les séquences d'ADN des gènes cibles, les Smads activent la transcription par assemblage d'un grand complexe des nucléoprotéines, composé des segments d'ADN associés aux Smads, les facteurs de transcription associés à l'ADN (tableau I-5), et les coactivateurs transcriptionnels. R-Smads et Smad4 ont une faible capacité intrinsèque d'association avec l'ADN, et montrent des exigences des séquences moins strictes que les facteurs transcriptionnels interagissant avec les Smads, qui ont une haute affinité d'association avec une séquence spécifique d'ADN. Par conséquent, l'interaction entre la séquence des Smads et la séquence de facteurs transcriptionnels permet la régulation transcriptionnelle médiée par les Smads. Ce mécanisme peut expliquer pourquoi le TGF-β

active seulement un ensemble de promoteurs sélectionnés ayant les sites de liaison pour interagir avec les facteurs de transcription. Les Smads interagissent avec le coactivateur CBP/p300, puis le complexe augmente l'activité de transcription du facteur transcriptionnel interactif. De plus des coactivateurs de CBP ou p300, d'autres coactivateurs et corepresseurs qui interagissent avec Smads, définissent le niveau de l'activation transcriptionnelle [Massagué J, 2000; Itoh S et al, 2000 ; Moustakas A et al, 2001]. La figure I-17 montre le grand complexe des facteurs de transcription, R-Smads et coactivateurs/corepresseurs dans le noyau.

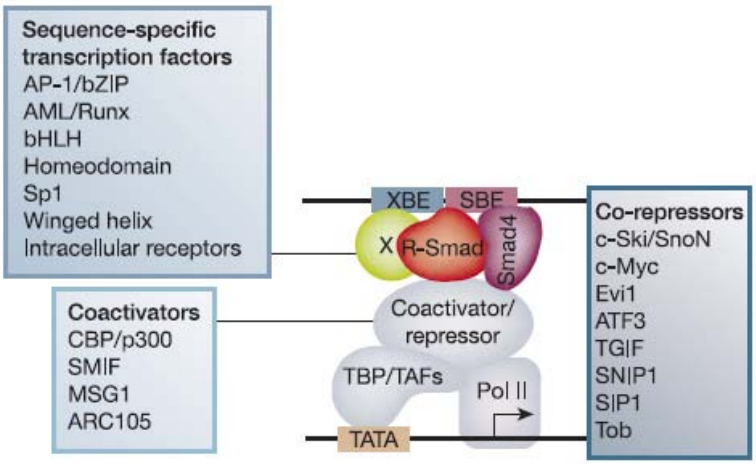


Figure I-17 : Complexe des facteurs de transcription, R-Smads et coactivateurs/corepresseurs dans le noyau. *Le complexe R-Smads/Smad4 s'associe avec les facteurs de transcription spécifiques de séquence (X) qui ont une affinité haute pour la séquence d'ADN (XBE). Le complexe R-Smads/Smad4 s'associe aussi avec la séquence d'ADN de liaison à Smad (SBE, Smad-binding DNA element) pour activer la transcription en réponse au TGF-β. Les R-Smads interagissent directement avec les coactivateurs/corepresseurs, et Smad4 sert de coactivateur de R-Smads pour stabliliser cette interaction. [D'après Derynck R et al, 2003]*

Tableau I-5 : Les facteurs de transcription associés à l'ADN et interagissant avec les Smads dans les cellules de mammifères *(liste non exhaustive). [D'après Feng XH et al, 2005]*

Facteur de transcription interagissant avec Smad	**Smads et son domaine**	**Caractéristique/mécanisme**	**Référence**
MyoD	Smad3 (MH1-connection)	Interférence avec la formation du complexe MyoD/E avec l'ADN	Li et al, 2001
c-Fos	Smad3 (MH2)	Collaboration avec les gènes cible du TGF-β et dépendants de AP-1	Zhang et al, 1998
c-Jun, JunB,JunD	Smad3 (MH1) Smad4	Activation ou inhibition de l'activité des Smads	Liberati et al, 1999 ; Zhang et al, 1998
CEBPα,β,δ	Smad3 (MH1)	Inhibition de la transduction des CEBP	Choy et al, 2003 ; Coyle-Rink et al, 2002
Récepteur de l'estrogène	Smad1/3/4 (MH2)	Inhibition des gènes cibles des Smads	Matsuda et al, 2002 ; Hayes et al, 2001 ; Kang et al, 2002
Récepteur des Glucocorticoïdes	Smad3 (MH2)	Inihibition de la transduction de Smad3	Song et la, 1999
CBFA1/ Runx2/AML	Smad1/2/3/5 (MH2)	Activation des réponses de BMP ; Régulation des réponses immunes	Hanai et al, 1999 ; Pardali et al, 2000a ; Zhang & Derynck 2000 ; Zhang et al, 2000
β-catenin	Smad1/4	Activation des gènes cibles du LEF1 dépendants de Wnt	Hu et al, 2005 ; Hussein et al, 2003 ; Lei et al, 2004
Lef1/ TCF	Smad1/2/3/4 (MH1, MH2)	Collaboration avec les Smads sur la voie de signalisation de LEF1	Hu et al, 2005 ; Labbé et al, 2000 ; Nishita et al, 2000
MEF2 (MADs box)	Smad3	Inhibition de la transcription de MEF2	Liu et al, 2004
NFκB p52	Smad3	Coactivation du site de κB	Lopez-Rovira et al, 2000

Les I-Smads, Smad6 et Smad7, inhibent la voie de signalisation de TGF-β par deux mécanismes principaux.

1) Avec les domaines MH2, Smad6/7 peuvent s'associer avec les récepteurs de type I, puis compétitivement interférer dans la phosphorylation des R-Smads [Hayashi H et al, 1997 ; Imamura T et al, 1997 ; Nakao A et al, 1997].

2) Les Smad6/7 peuvent interagir directement avec les ligases ubiquitaires de Smurf E3, mobiliser les ligases vers les récepteurs de type I, et mener à la dégradation par les enzymes protéolytiques [Ebisawa T et al, 2001 ; Kavsak P et al, 2000 ; Murakami G et al, 2003].

Par séquence, la signalisation de BMP induit une anti-réaction par l'expression de Smad6, et la signalisation de TGF-β induit une anti-réaction par l'expression de Smad7, bien que BMP et TGF-β peuvent induire l'expression de Smad6 et Smad7 individuellement. Smad6 inhibe la signalisation de BMP et TGF-β également, mais, Smad7 inhibe la signalisation du TGF-β plus efficacement que Smad6 [Miyazono K, 2000].

VI.2.1. La « navette » des Smads entre le noyau et le cytoplasme

A ce jour, il est évident que les protéines Smads peuvent faire la « navette » entre le noyau et le cytoplasme, même sans la stimulation du signal. En l'absence de stimulation du ligand, les R-Smads se localisent principalement dans le cytoplasme tandis que Smad4 se distribue dans le cytoplasme et le noyau [Inman GJ et al, 2002 ; Watanabe M et al, 2000 ; Xiao Z et al, 2001]. Après stimulation par le ligand, les R-Smads se translocalisent principalement dans le noyau, mais, n'exigent pas l'aide de Smad4, bien que Smad4 cotranslocalise avec les R-Smads dans le noyau, où les Smads ne sont pas dégradés, au contraire, ils font la navette entre le noyau et le cytoplasme plus dynamiquement. [Inman GJ et al, 2002 ; Schmierer B et al, 2005 ; Chen HB et al, 2005 ; Hill CS, 2009]. Il est suggéré que cette mobilité des Smads permet d'assurer la concentration des Smads activés dans le noyau, nécessaire à une activité « réflexe » des récepteurs [Inman GJ et al, 2002 ; Schmierer B et al, 2008]. Donc, la navette des Smads assure les cellules à manipuler la force du signal, et offre la flexibilité qui est nécessaire à changer l'intensité du signal. Figure I-18 montre le modèle de la « navette » des Smads dans les cellules avec ou sans la stimulation de TGF-β.

Les Smads peuvent s'associer avec les récepteurs de transport qui régulent l'import (les importines) ou l'export (les exportines). Pour Smad3, c'est l'importine β1 et l'exportine

4 qui sont impliquées; pour Smad4, c'est l'importine α/β1 et l'exportine 1 qui sont impliquées. De même, les Smads peuvent s'associer directement avec les nucléoporines sans avoir besoin de récepteurs de transport. Pour Smad2 et Smad3, c'est Nup214 et Nup153; pour Smad4, c'est Nup214 [Kurisaki A et al, 2001 ; 2006 ; Watanabe M et al, 2000 ; Xu L et al, 2002 ; Xiao Z et al, 2003].

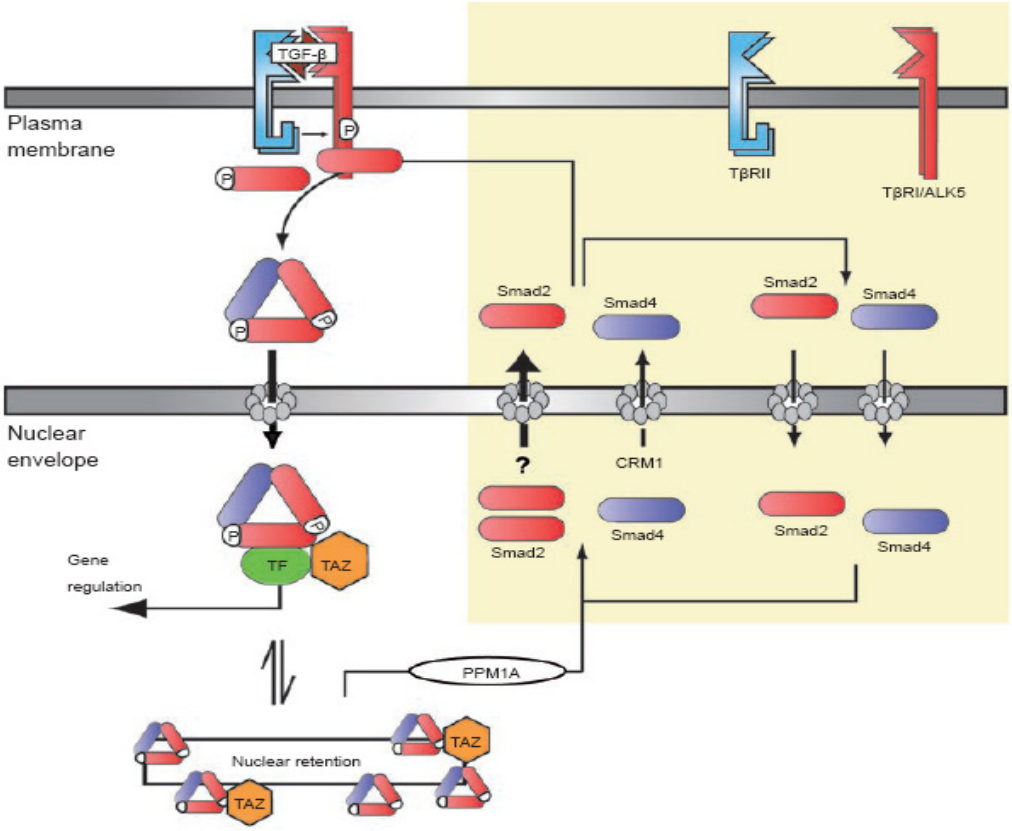


Figure I-18 : Modèle de la navette des Smads dans les cellules avec ou sans la stimulation de TGF-β. *La partie foncée représente les cellules sans stimulation. Sans stimulation, Smad2 est localisée dans le cytoplasme, car la proportion d'export est plus rapide que celle d'import. PPM1A est la phosphatase de Smad2. [D'après Hill CS, 2009]*

VI.3. La phosphorylation de Smads régulée par les voies de kinase

La phosphorylation des R-Smads est également régulée par les voies de kinases cytoplasmiques. Les sites de la phosphorylation se trouvent dans la région de connexion ou dans le domaine MH1 des R-Smads, indépendamment de la phosphorylation de MH2 SXS par RI. Les effets dépendent des types et de la physiologie des cellules [Wrighton KH et al, 2009; Feng XH et al, 2005]. Le tableau I-6 montre les kinases qui phosphorylent les Smads dans la région de connexion ou dans le domaine MH1.

Tableau I-6 : Les kinases et la phosphorylation des Smads, avec la fonction positive (+) ou négative (-).

(MAPK : mitogen-actived protein kinase ; ERK: extracellular signal-regulated protein kinase; ROCK: Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase; JNK: Jun N-terminal kinase; CDK: cyclin-dependent kinase; PKC: protein kinase C; CaMKII: Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II; GSK-3β: synthase glycogen kinase 3β; MvlLu : mink lung epithelial cells; HaCaT: the human keratinocyte; HepG2 : hepatocellular carcinoma cells; NIH-3T3: murine fibroblast cells)

Région de connexion			
Kinase	**Smads**	**Cellules**	**Réference**
Erk MAPK	Smad1 (-)	MvlLu	Kretzschmar M et al, 1997
		Xenopus embryos	Pera EM et al, 2003
	Samd 2/3 (-)	Cellules épithéliales	Kretzschmar M et al, 1999
p38 MAPK Rho/ROCK	Smad 2/3 (-)	Cellules carcinomateuses	Kamaraju AK et al, 2005
JNK	Smad3 (+)	MvlLu	Engel ME et al, 1999
	Smad2 (+)	Cellules épithéliales	Brown JD et al, 1999
CDK2/4	Smad2/3 (-)	MvlLu , HepG2, Fibroblastes embryonaires	Matsuura I et al, 2004
CaMKII	Smad2 (-)	Cellules mésangiales	Abdel-Wahab N et al, 2002
GSK-3β	Smad1 (-)	Xenopus embryos	Fuentealba LC et al, 2007
Domaine de MH1			
Erk MAPK	Smad2 (+)	MvlLu	Funaba M et al, 2002
PKC	Smad3 (-)	MvlLu, NIH-3T3	Yakymovych I et al, 2001
GSK-3β	Smad3 (-)	HaCaT, HepG2	Guo X et al, 2008

VI.4. La signalisation de TGF-β Smad-indépendante

Le TGF-β active plusieurs voies de signalisation Smad-indépendantes (Figure I-19). On y trouve la voie des MAP kinases, la voie de signalisation de Rho, et la signalisation de phosphatidylinositol-3-kinase/AKT (PI3K/AKT). Parmi celles-ci, certaines peuvent activer les protéines des Smads, mais les autres peuvent peut-être induire des réponses indépendantes de la transcription [Zhang YE, 2009].

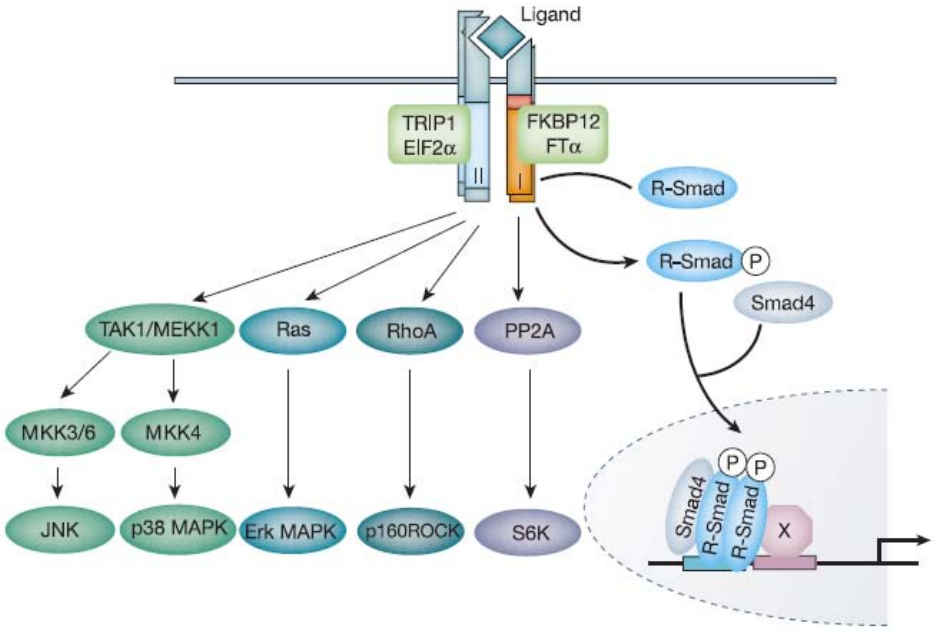


Figure I-19 : Les voies de signalisation de TGF-β Smad-indépendantes. *Seules les voies les plus caractéristiques sont montrées. [D'après Derynck R et al, 2003]*

VI.5. La relation entre la signalisation par TGF-β et le cytosquelette

Le cytosquelette est le réseau de fibres protéiques dans les cellules, comprenant le réseau d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Il maintient la morphologie cellulaire, participe au mouvement cellulaire et à la transduction de signaux. Il est associé à la régulation du cycle cellulaire et à la différenciation cellulaire.

Le TGF-β régule la dynamique du cytosquelette. Par ailleurs, les composants du cytosquelette régulent l'activation des Smads et sa durée. Ceux-ci facilitent également la navette des Smads entre le noyau et le cytoplasme [Moustakas A et al, 2005].

Le TGF-β peut activer la famille des Rho kinases, des petits GTPases, incluant RhoA, Cdc42 et Rock1, qui régulent la dynamique du réseau d'actine. De plus, il semble que RhoA peut favoriser l'activité trancriptionnelle de R-Smads, donc l'expression des gènes cibles, comme par exemples, α-SMA (actine du muscle lisse) et les tropomyosines [Edlund S et al, 2002]. Figure I-20 montre la signalisation de TGF-β sur le cytosquelette de l'actine.

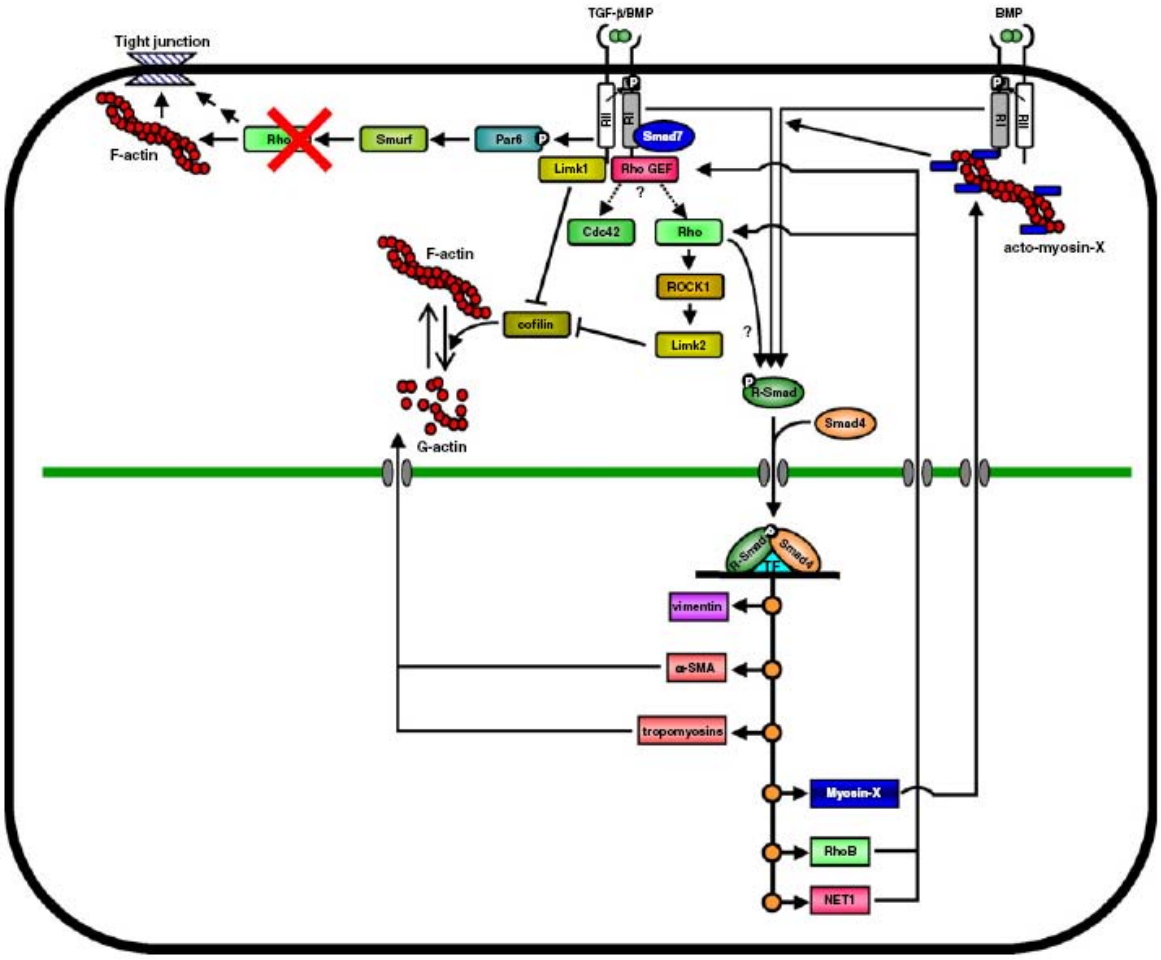


Figure I-20 : Signalisation de TGF-β sur le cytosquelette de l'actine. *[D'après Moustakas A et al, 2005]*

Les microtubules peuvent s'associer avec Smad2, Smad3 et Smad4, et les maintenir dans le cytoplasme [Dong C et al, 2000]. Le rélargage des Smads des microtubules peut être régulé par l'association compétitive de la connéxine 43 avec les microtubules [Dai P et al, 2007]. Les Smads s'associent avec des protéines motrices attachées aux microtubules, par exemple la kinésine-1 et la dyneine [Jin Q et al, 2007 ; Batut J et al, 2007]. C'est-à-dire que les microtubules peuvent aider les protéines Smads à faire la navette entre le cytoplasme et le noyau.

VI.6. Rôle des TGF-βs dans la différenciation des CSMs

Les membres de la famille de TGF-β jouent un rôle important dans la différenciation des CSMs. En fait, ils peuvent induire la différenciation des CSMs par des mécanismes paracrine ou autocrine. Les TGF-βs et les BMPs jouent des rôles différents au niveau des

voies de différenciation des CSMs (Figure I-21). Les TGF-βs activent les premiers stades de la différenciation chondroblastique et ostéoblastique, mais ils inhibent la myogenèse, l'adipogenèse, et la fin de l'étape de la différenciation ostéoblastique. Les BMPs peuvent totalement induire la différenciation ostéoblastique, mais ils inhibent l'adipogenèse et la myogenèse [Roelen BA et al, 2003 ; Derynck R et al, 2007].

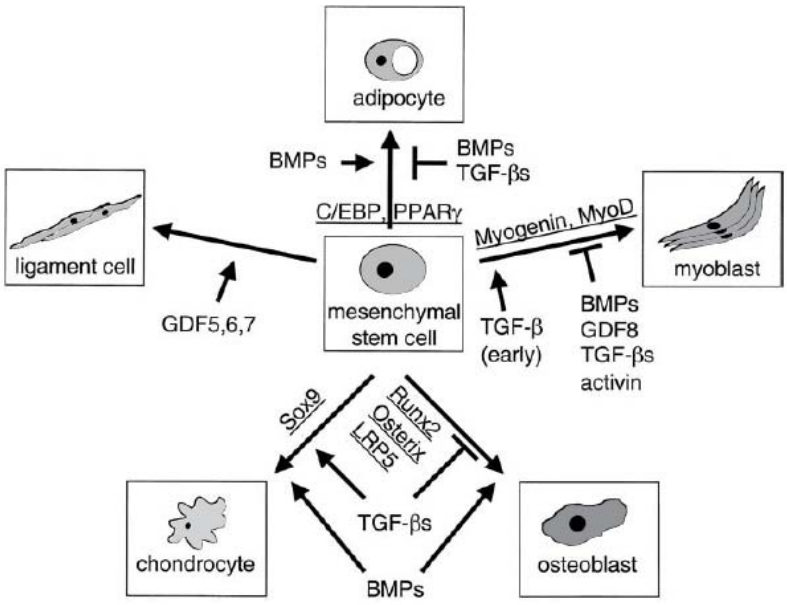


Figure I-21 : Les effets des protéines membres de la famille de TGF-β sur la différenciation des CSMs. *Les facteurs de transcription les plus importants sont présentés. [D'après Roelen BA et al, 2003]*

VI.7. Rôle de la protéine Smad3 dans la différenciation des CSMs

La protéine Smad3, non Smad2, est très importante pour l'effet inhibiteur des TGF-βs pendant la myogenèse, l'adipogenèse, et la fin de l'étape de la différenciation ostéoblastique. En effet, Smad3 peut s'associer physiquement avec les facteurs de transcription, par exemple, MyoD, C/EBPs, Runx2 et inhiber leur activité [Roelen BA et al, 2003].

Par contre, Smad3 stimule l'activité de Sox9 en s'associant avec, et joue ainsi un rôle pendant les premiers stades de la différenciation chondroblastique [Furumatsu T et al, 2005].

VII. Les contraintes mécaniques

Les contraintes mécaniques sont essentielles pour les cellules et les organismes. Les contraintes mécaniques régulent de nombreuses fonctions physiologiques, allant du sens de l'ouïe au niveau des cellules de l'oreille interne, à la détection du cisaillement des fluides

donnée par l'écoulement du sang dans l'ensemble de l'endothélium. Les signaux mécaniques modulent de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la prolifération, la différenciation, la migration, de l'expression génique, la synthèse des protéines, et l'apoptose. Les forces mécaniques influent directement sur la forme et la fonction des tissus, par exemple, les effets de la compression sur l'os et le cartilage, les tensions sur les muscles et la peau [Van Essen DC, 1997; Alenghat FJ et al, 2002].

VII.1. Réponse des cellules aux contraintes mécaniques

Comment les contraintes mécaniques peuvent-elles changer la réponse des cellules et influencer les processus physiologiques cellulaires et tissulaires?

Les cellules transforment les signaux mécaniques en signaux biochimiques, qui acheminés vers le noyau, induisent des modifications métaboliques ; phénomène connu sous le nom de mécanotransduction. Ainsi, la découverte du mécanisme par lequel les cellules vivantes ressentent la contrainte mécanique est à la base de la compréhension de leur réaction et adaptation aux environnements physiques.

VII.1.1. Le mécanisme de la mécanotransduction cellulaire

Certaines molécules et composants cellulaires mécanosensibles sont responsables de la méchanotransduction cellulaire. On peut citer, les canaux ioniques sensible aux stress, les cavéolae, les intégrines, les cadhérines, les protéines G, les myosines, les filaments du cytosquelette, les noyaux, les molécules de signalisation [Ingber DE, 2006 ; Sukharev S et al, 2004; Khan S et al, 1997] (Figure I-22).

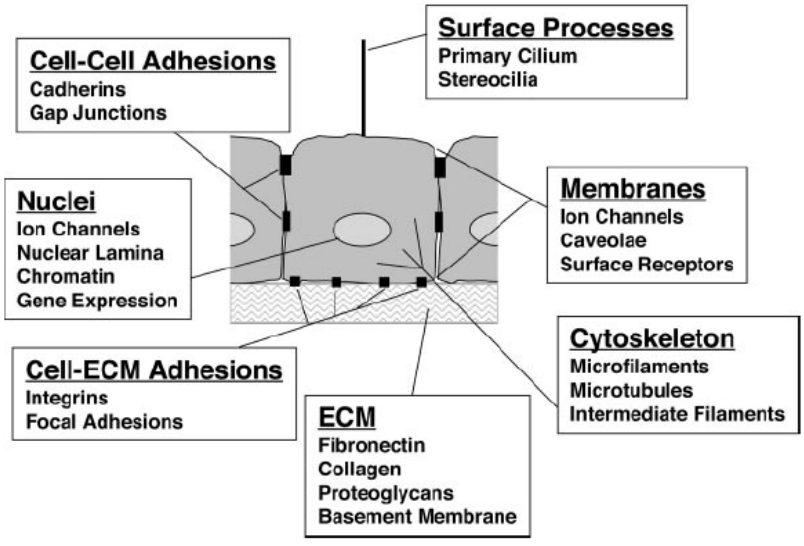


Figure I-22 : Les médiateurs de la méchanotransduction cellulaire. *[D'après Ingber DE, 2006]*

VII.1.1.1. La voie classique de mécanotransduction

Les intégrines sont les protéines transmembranaires qui font le lien entre la MEC et le cytosquelette. Les intégrines sont identifiées comme étant d'importants mécanotransducteurs des interactions cellules-matrice. En effet, elles sont capables de recevoir directement le signal de la déformation de la MEC et par la suite de transférer cette information au noyau *via* le cytosquelette [Chowdhury TT et al, 2004 ; Alenghat FJ et al, 2002]. Les intégrines s'associent avec le cytosquelette par le complexe d'adhésion focale (CAF), où se trouvent plusieurs protéines associées à l'actine, par exemple les talines, les vinculines, les paxillines et les zyxines [Geiger B et al, 2001]. Le CAF contient aussi des protéines qui interviennent dans les cascades de la signalisation biochimique, par exemple, les tyrosines kinases, les canaux ioniques et les protéines G [Miyamoto S et al, 1995]. La figure I-23 montre la voie de mécanotransduction par les intégrines.

Après les intégrines peuvent augmenter la formation du CAF, par activer la petite GTPase Rho et stimuler la kinase de Rho-associé (ROCK), afin de stabliser la ploymérization de actine-filament [Riveline D et al, 2001]. Les kinases Src peuvent activées aussi [Wang Y et al, 2005].

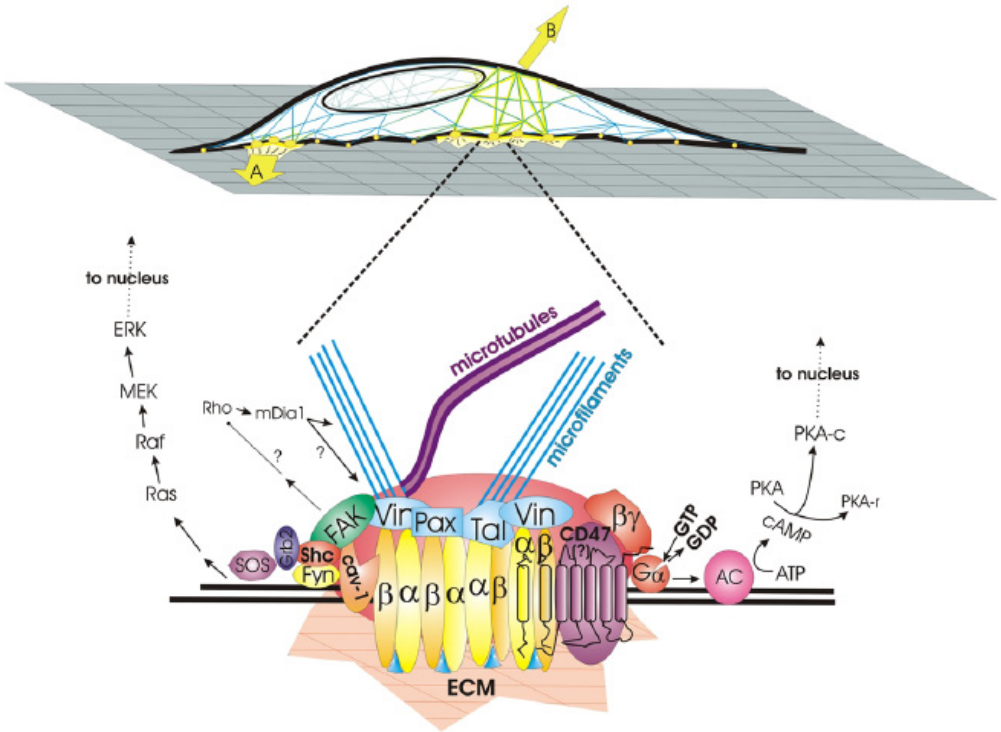


Figure I-23 : La voie de mécanotraduction par les intégrines, le complexe d'adhésion focale (CAF) et le cytosquelette. *[D'après Alenghat FJ et al, 2002]*

VII.1.1.2. Les autres voies de mécanotransduction

Les CAF contenant les intégrines ne sont pas le seul site où a lieu la conversion du signal mécanique en signal biochimique. Il existe d'autres voies de mécanotransduction, qui sont ou pas en liaison avec les intégrines et le cytosquelette.

- Les canaux ioniques sensibles au stress (en particulier Na^+, K^+ et Ca^{2+}), activés par les contraintes mécaniques, induisent le changement de la concentration ionique qui provoque une cascade de réactions cellulaires [Zhang Y et al, 2000]. Plusieurs intégrines sont colocalisées avec les canaux ioniques, le flux de Ca^{2+} par exemple peut être induit par les intégrines [Shakibaei M et al, 2003; Pommerenke H et al, 1996; Chen BM et al, 1995].
- Les cadhérines et les sélectines peuvent former des complexes de jonction intercellulaires et permettre que les signaux des contraintes mécaniques soient transmis de la surface cellulaire au cytosquelette [Yoshida M et al, 1996; Ko KS et al, 2001; Norvell SM et al, 2004].
- Les « lipids rafts », des microdomaines membranaires enrichis en cholestérol comme les cavéolae, sont importants dans la mécanotransduction. Des molécules de signalisation telles que les tyrosines kinases, ou les membres de la voie des MAPK, associées aux cavéolae sur le membrane sont activées en réponse aux contraintes [Rizzo V et al, 1998]. En conséquence, les voies de signalisation de Src, ERK et Akt-NOS sont stimulées [Czarny M et al, 2004]. De plus, la voie de signalisation des cavéolae est également associée avec les intégrines et le cytosquelette [Radel C et al, 2004].
- Les protéines G peuvent être activées directement par un changement de la fluidité membranaire induit par les contraintes mécaniques [Haidekker MA et al, 2000]. De plus, l'effet des protéines G a besoin des intégrines et le cytosquelette [Meyer CJ et al, 2000].

VII.2. Les « comportements » cellulaires et la « précontrainte » (tensegrity)

Bien qu'à ce jour, on connaisse plusieurs mécanotransducteurs, on sait peu de choses

sur la façon dont ces différentes molécules fonctionnent dans le contexte structurel de la vie des cellules, de tissus et d'organes pour induire les comportements cellulaires requis pour la mécanosensation, l'embryogenèse, et la régulation physiologique [Gieni RS et al, 2008; Ingber DE, 2006].

Des travaux récents révèlent que les organes, les tissus et les cellules sont aussi importants pour la mécanotransduction que les protéines mécanosensibles individuelles et, que le corps utilise des hiérarchies structurelles (les systèmes dans les systèmes) composées de réseaux interconnectés qui couvrent de l'échelle macrométrique à l'échelle nanométrique, afin de concentrer les contraintes sur des molécules mécanotransducteurs [Gieni RS et al, 2008; Ingber DE, 2006].

En fait, tous les organes et les tissus se trouvent sous la forme d'une structure préstressé pour qu'ils puissent répondre immédiatement aux contraintes mécaniques et changer leur rigidité qui sera directement proportionnelle à la contrainte mécanique appliquée [McMahon TA, 1984].

Par exemple, dans le système musculo-squelettique, la précontrainte résulte d'un équilibre entre les forces contractiles qui sont générées à l'intérieur du cytosquelette des cellules musculaires et la capacité de la matrice osseuse rigide à résister à ces forces [Huijing PA et al, 2005]. Les tissus musculaires et tendineux s'adaptent aux contraintes appliquées au niveau du système musculo-squelettique et se protègent contre la blessure en réaménagent, y compris par réorganisant les composants moléculaires qui composent la MEC tendue et les éléments du cytosquelette interconnecté dans les cellules adhérentes [Ralphs JR, 2002 ; Komulainen J, 1998].

D'autres organes utilisent des mécanismes différents pour générer une précontrainte stabilisée, par exemple, le poumon, le cartilage et l'os [Suki B et al, 2005 ; Quinn TM et al, 2001 ; Qin YX et al, 2003].

Le plus important, c'est qu'ils sont préstressés, les MECs qui détiennent ensemble les cellules peuvent réagir immédiatement comme un système mécanique intégré lorsque les organes sont stressés.

VII.2.1. La précontrainte cellulaire et le modèle tenségrité

Toutes les cellules vivantes génèrent une précontrainte au sein de microfilaments

contractiles dans leur cytosquelette et elles exportent cette tension à la surface membranaire [Chicurel ME et al, 1998].

Le cytosquelette lui-même est préstressé. La précontrainte produite par les microfilaments contractiles et transmise dans toute la cellule et peut être équilibrée par les microtubules qui résistent à la compression par la MEC et par les interactions entre les cellules [Kumar S et al, 2006 ; Gupton SL et al, 2002]. Cela permet aux cellules de déplacer de compression entre les microtubules et la MEC. En effet, les microtubules supportent la plupart de la précontrainte dans des cellules arrondies avec peut de points d'ancrage tandis que la MEC supporte la plupart de la précontrainte dans des cellules allongées avec beaucoup de points d'ancrage [Hu S et al, 2004].

Donc, l'interaction entre les microfilaments, les microtubules et les substrats adhésifs cellulaires peut déterminer la forme des cellules et la rigidité de la MEC [Ingber DE, 2003 ; Kumar S et al, 2006]. Plusieurs études ont été réalisées sur des cellules de l'appareil auditif. Les différentes cellules de l'appareil auditif sentent de différentes fréquences en fonction de la rigidité de MEC environnementale [Siemens J et al, 2004 ; Camalet S et al, 2000 ; Frolenkov GI et al, 1998].

Ingber a proposé un modèle de **tenségrité** (**tensegrity)** pour l'architecture cellulaire [Ingber DE et al, 1993(a), 1993(b), 1994]. Contraction de l'anglais « tensional integrity », la tenségrité est un modèle de structures qui utilisent des tensions et des compressions pour soutenir d'autres structures. C'est l'architecte Fuller qui fit pour la première fois une description de la tenségrité en 1961. C'est en 1993 qu'Ingber propose pour la première fois un modèle de tenségrité pour représenter la structure du cytosquelette. Le modèle de tenségrité cellulaire propose de considérer que toute la cellule a une structure de tenségrité pour les précontraintes. Dans ce modèle les forces de tensions sont soutenues par les microfilaments du cytosquelette et les filaments intermédiaires, et ces forces sont équilibrés par une structure d'éléments interconnectés qui résistent à la compression, notamment les microtubules internes (éléments rigides) et l'adhésion de la matrice extracellulaire. Le premier modèle de tenségrité pour la cellule proposé par Ingber en 1993 était constitué de 6 éléments rigides représentant les microtubules reliés entre eux et de 24 câbles représentant les filaments d'actine.

VII.2.2. La morphologie cellulaire et leur destiné

Un équilibre contre la précontrainte des cellules peut décider de la forme des cellules, ensuite le changement de la forme des cellules peut contrôler la fonction cellulaire: la prolifération, la différenciation, la migration, l'apoptose, l'expression génique, le mouvement du chromosome, le remodelage de la MEC, et le développement tissulaire.

On peut prendre la cellule entière comme le mécanotransducteur, car elle intégre les signaux locaux dans son environnement avant de répondre au changement comportemental. Par exemple, pour les cellules adhésives sur le même facteur soluble, les réponses sont différentes en fonction de la forme des cellules : elles prolifèrent quand elles s'étalent sur la MEC, elles se différencient sous la forme intermédiaire, et elles se dirigent vers l'apoptose sous une forme arrondie [Singhvi R et al, 1994 ; Chen CS et al, 1997 ; Dike LE et al, 1999]. Donc, les MECs sont des conducteurs de forces, les intégrines sont des mécano-récepteurs, et les complexes d'adhésion locale sont les organelles mécanosensibles.

Les cellules changent l'intensité de forces qu'elles exportent sur la MEC pour maintenir l'homéostasie tensionelle qui est necéssaire à la préservation et la régénération de l'architecture des tissus normaux [Polte TR et al, 2004; Petroll WM et al, 2004], et la perturbation de cet équilibre peut conduire à la formation des cancers [Paszek MJ et al, 2005].

VII.2.2.1. L'élasticité de la MEC

L'elasticité des substrats de la MEC est déterminante pour la forme des cellules. Figure I-24 montre, (a) sur le gel de polyacrylamide faiblement rigide, les fibroblastes sont ronds et les molécules d'actine localisent autour de la membrane cellulaire, similaire aux cellules non-adhérentes ; (b) sur les substrats rigides, les fibroblastes s'étendent et les molécules d'actine forment des fibres de stress généralement reliant différents sites d'adhérence.

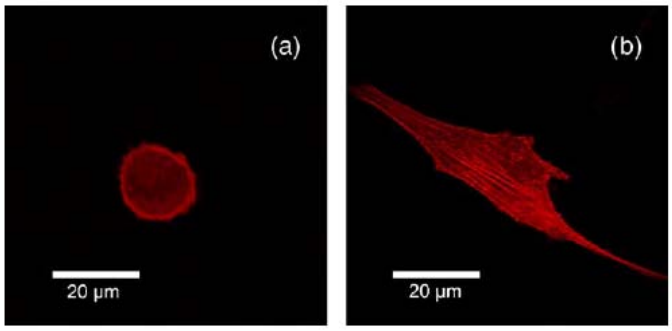


Figure I-24 : La morphologie des cellules sur des substrats élastique dépend de la rigidité du substrat. *[D'après Schwarz US et al, 2005]*

En fait, les cellules semblent être réglées mécaniquement pour se différencier sur la MEC qui ont une rigidité mécanique similaire à celle de leurs tissus naturels [Engler AJ et al, 2004 ; 2006]. Par exemples, la différenciation des CSMs en neurones, en myoblastes, ou en ostéoblastes, est contrôlée par la rigidité de la MEC qui ressemble respectivement à celle du cerveau, du muscle, ou de l'os. De plus, ce mécanisme dépend de la protéine de moteur du cytosquelette, la Myosine II non-musculaire.

Donc, pour induire la différenciation des CSMs, on peut optimiser l'élasticité de la MEC, qui nous fournit une ligne de pensée.

VII.3. Différenciation des CSMs par des contraintes mécaniques externes

Il a été démontré que différents types ou régimes (amplitude, fréquence et durée etc.) de contraintes mécaniques pouvaient induire différentes réponses cellulaires. De même, des contraintes identiques appliquées sur des cellules différentes (diverses origines ou modèles de culture) n'ont pas les mêmes effets.

Dans le cas du cartilage articulaire, la contrainte principale est la compression. Et avec la compression, les chondrocytes se déforment due à la traction passivement, c'est-à-dire, la contrainte d'étirement peut être soumise sur les chondrocytes simultanément et passivement. En fait, l'étirement peut induire l'initiation de la différenciation en ostéoblastes et chondrocytes des CSMs [Friedl G et al, 2007 ; Haasper C (b) et al, 2008].

Ici, on souligne quatre types de contrainte mécanique : la compression, l'étirement, la

pression hydrostatique et le cisaillement.

VII.3.1. La compression

Pour l'application de la compression sur les chondrocytes ou les CSMs, les cellules sont cultivées dans des biomatériaux tridimensionnels. Car cultivées en monocouche, il n'est pas possible d'appliquer la compression, en plus, les chondrocytes se dédifférencient en monocouche [Diaz-Romero J et al, 2005].

La compression est beaucoup étudiée *in vitro*. Il a été montré que la compression dynamique, de niveaux modérés (0,5-1,0 MPa) et de fréquences physiologiques (0,01-1,0 Hertz), appliquée sur des explants de cartilage peut moduler la viabilité, l'expression des gènes, et aussi la synthèse matricielle des chondrocytes [Steinmeyer J et al, 1997; Wong M et al, 1999]. D'après ces études, de nombreuses expériences, d'une durée allant de quelques heures à quelques semaines, ont été réalisées en appliquant des conditions variées de compression dynamique pour stimuler la prolifération, la différenciation ainsi que l'activité de la biosynthèse dans différentes constructions cellulaires afin de développer un tissu cartilagineux fonctionnel [Xie J et al, 2007].

La compression dynamique peut favoriser la différenciation chondrogénique des CSMs, induire une augmentation de la synthèse de la MEC. Mais la compression statique a un effet inverse. Dans le Tableau I-7 sont rassemblés les principaux résultats obtenus sur des échantillons sousmis à différents types de compression.

Tableau I-7 : Effets de la compression sur la réponse des CSMs en fonction du modèle *(liste non exhaustive). GAGs = glycosaminoglycannes*

Biosystème	Type de contrainte	Paramètres de contrainte	Réponses cellulaires	Référence
CSMs (lapin) -Agarose	Compression dynamique	0-9 KPa 0,15-0,33 Hz	GAGs↑ Collagène II↑ Sox9↑	*Huang CY et al., 2004, 2005*
CSMs (bovine) -Alginate	Compression dynamique	15% 1 Hz	col II↑, Sox9↑ agrécanne ↑	*Campbell JJ et al., 2006*

CSMs (bovine)-Agrarose	Compression dynamique	15% 1 Hz	col II↑, agrécanne ↑ GAGs↑	*Mouw JK et al., 2007*
CSMs (humaine)-PEGDA	Compression dynamique	10% 1 Hz	col II↑, Sox9↑ agrécanne ↑	*Terraciano et al., 2007*
CSMs (bovine) - Agarose	Compression dynamique	10% 0.3Hz	GAGs↑	*Mauck et al., 2007*
CSMs - alginate	Compression dynamique	10% 0,1 Hz	agrécanne ↑, cathepsine B↑, BMP-6 ↑, FGF-1↓, IL-1β↓, versican↓, col1α1↓	*Haudenschild et al., 2008*
CSMs (équine) -Agarose	Compression dynamique	7,5% 0.3Hz	GAGs↑	*Kisiday J et al., 2009*

VII.3.2. L'étirement

Pour l'application de l'étirement sur les chondrocytes ou les CSMs, les cellules peuvent être cultivées en monocouche sur des membranes flexibles. La culture en monocouche permet d'étudier les effets directs des stimuli mécaniques. Leur microenvironnement peut être entièrement contrôlé.

L'étirement entre uniaxial et biaxial sur les chondrocytes est étudié *in vitro* aussi. Il est démontré que les CSMs se différencient en lignée d'ostéoblastes avec un étirement d'amplitude faible, et elles se différencient en ligament avec un étirement d'amplitude haute [Chen YJ et al, 2008].

Dans le Tableau I-8 sont rassemblés les résultats principaux obtenus sur des cellules soumises à différents types d'étirement.

Tableau I-8 : Effets de l'étirement sur la réponse des CSMs *(liste non exhaustive). MMP=métalloprotéase , IL=interleukin*

Cellules	Type de contrainte	Paramètres de contrainte	Réponses cellulaires	Référence
CSMs	Étirement biaxial	3% 0,25 Hz	ERK/2↑, p38↑, minéralisation ↑	*Simmons et al., 2003*
ST2	Étirement biaxial	5%,10%,15% 1 Hz	Prolifération ↑ mARN : Runx2 ↑ (6h) Col I ↑ (48h) Ostéocalcine ↓ (48h)	*Koike M et al., 2005*
CSMs – collagène (3D)	Étirement uniaxial	10%,12% 1 Hz	BMP-2 ARNm↑	*Sumanasinghe et al., 2006*
CSMs	Étirement biaxial	14% 0,6 Hz	Ostéocalcine (-) ALP (-)	*Ku CH et al., 2006*
CSMs C3H10T1	Étirement biaxial	400µstrain 1 Hz	mARN : Runx2 ↑ PPARγ↓	*David et al, 2007*
C3H10T1/2	Étirement biaxial	5 Mpa 1 Hz	mARN: Agrécanne ↑ Col-II ↑	*Elder SH et al, 2008*
CSMs	Étirement uniaxial	300µstrain 1 Hz	mARN : Runx2 ↑ Sox9 ↑ c-Fos ↑	*Friedl G et al., 2007*
CSMs	Étirement	2% 1 Hz	mARN : Runx2 ↑ FosB ↑	*Haasper C (a,b) et al., 2008*
CSMs	Étirement uniaxial	10% 1 Hz	Col-I ↑, Col-III ↑	*Zhang L et al., 2008*
CSMs	Étirement biaxial	10% 1 Hz	Formation des structures multicellulaires (clusters)	*Doyle et a., 2009*

VII.3.3. La pression hydrostatique

Quand le cartilage est soumis à une charge mécanique, une première résistance à l'écoulement, peut induire une pression hydrostatique dans le tissu.

Les études récentes montrent que l'application de la pression hydrostatique intermittente sur les CSMs, peut induire la chondrogenèse des CSMs. [Miyanishi K et al,

2006 ; Sakao k et al, 2008]. Dans le Tableau I-9 sont rassemblés les principaux résultats obtenus sur des échantillons soumis à différentes conditions de pression hydrostatique.

Tableau I-9 : Effets de la pression hydrostatique sur la réponse des CSMs en fonction du modèle *(liste non exhaustive) GAG = glycosaminoglycannes*

Biosystème	Type de contrainte	Paramètres de contrainte	Réponses cellulaires	Référence
CSMs cultivées en « pellet »	Pression hydrostatique	10 Mpa 1 Hz intermittente	Protéoglycannes↑ col II↑, sox-9↑ agrécanne↑	*Miyanishi K et al., 2006*
CSMs	Pression statique Pression dynamique	23 kPa 10-36 kPa 0,25 HZ	ostéogenèse↑	*Liu et al., 2009*
CSMs	Pression hydrostatique	1-5Mpa 1 Hz intermittente	col II↑, sox-9↑ GAGs↑	*Sakao K et al., 2008*

VII.3.4. Le cisaillement

Le cisaillement, issu de l'écoulement dans le cartilage, induit par la compression, est peut-être la base des autres changements cellulaires et biochimiques [Kim YJ et al, 1994]. Les études *in vitro* ont montré également que ce cisaillement peut avoir des effets positifs mais aussi négatifs sur le métabolisme des chondrocytes.

Ce type de cisaillement a aussi des effets sur les CSMs. Grayson WL *et al*. ont constaté que l'écoulement (0,1 mL/min) peut accroître la prolifération des CSMs et l'écoulement (1,5 mL/min) peut induire la différenciation ostéogénique [Grayson WL et al, 2006]. Cependant, l'effet de l'écoulement sur la chondrogenèse des CSMs reste à exploiter.

VII.3.5. Contraintes mécaniques complexes

En fait, la charge mécanique perçue par le cartilage articulaire, *in vivo*, ne se résume pas à un seul type de contraintes simples telles que la compression, la pression hydrostatique, l'étirement ou le cisaillement. Il est donc nécessaire d'étudier la réponse

cellulaire à des contraintes mécaniques complexes se trouvant au niveau de l'articulation.

Etant donnée la dispersion des résultats de ces études, la synthèse et la détermination des paramètres optimaux s'avèrent difficile. Malgré tout, on peut en conclure que les stimuli mécaniques jouent un rôle très important dans l'ingénierie tissulaire du cartilage. Les effets cellulaires de la contrainte mécanique sont liés à sa durée, à sa fréquence et à son régime. Généralement, il semble qu'une contrainte cyclique soit plus avantageuse pour la synthèse de MEC qu'une contrainte constante. De plus, l'existence d'une interaction entre les stimuli mécaniques et d'autres facteurs tels que les facteurs de croissance, les biomatériaux etc. doit être considérée pour contrôler le développement d'un néo-cartilage.

VII.4. Application de contraintes mécaniques contrôlées

Différents types de bioréacteurs peuvent fournir des contraintes mécaniques variées telles que la compression, l'étirement, le cisaillement, pour modifier la régénération du cartilage. Dans ce cas, la magnitude, la fréquence ainsi que le mode d'application constant ou intermittent de ces contraintes sont donc bien contrôlés [Schulz RM et al, 2007 ; Laganà K et al, 2008]. L'application de forces mécaniques spécifiques fournies par les bioréacteurs sur les constructions cellulaires peut non seulement améliorer la synthèse cellulaire mais diriger également la différenciation des cellules multipotentes vers des lignées spécifiques.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

I. Culture cellulaire

Dans ce travail, deux types de cellules ont été utilisés : les CSMs et les chondrocytes.

Les CSMs représentent le modèle cellulaire principal tandis que les chondrocytes ont servi comme témoin cellulaire différencié dans certaines expériences.

I.1. Réactifs

- Alpha MEM Eagle avec EBSS (α-MEM) (réf.BE12-169F, Lonza, France)
- Dulbeco's Modified Eagle Medium-Low Glucose (1g/L) (DMEM-LG) (réf. 31885, Invitrogen, France)
- Dulbeco's Modified Eagle Medium Nut Mix F-12 (DMEM/F12) (réf. 21331, Invitrogen, France)
- DMEM sans rouge de phénol (réf. 11880, Gibco, France)
- Antibiotiques :
  - Pénicilline (réf. 15070, Invitrogen, France) utilisée à une concentration de 100 U/mL
  - Amphotéricine B (réf. 15290, Invitrogen, France) utilisée à une concentration de 2,5µg/mL
- Glutamine (réf. 25030, Invitrogen, France) utilisée à une concentration de 2mM
- Sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C (réf. 10270-106, Gibco, France)
- Solution de chlorure de sodium (NaCl, réf. 1385517, Carlo Erba Reactifs, France) 0,9% stérile
- Pronase (réf. P5147, Sigma Aldrich, France) reconstituée à 2 mg/mL dans du NaCl 0,9% additionné d'antibiotiques.
- Collagénase B (ref. 1088831, Roche Applied Science, USA) reconstituée à 1,5 mg/mL dans du DMEM sans rouge de phénol additionné d'antibiotiques
- Tampon HBSS (Hank's Balanced Salts Solution) (Réf. H2387, Sigma, France) sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} stérile
- Trypsine-EDTA à 0,05% (réf. 25300, Gibco, France) diluée dans du HBSS à 0,025%. Ceci constitue la solution de digestion.

- Phosphate Buffered Saline (PBS, réf. 14190, invitrogen, France)
- DMSO (diméthyl sulfoxyde, réf. D5879, Sigma Aldrich, France)
- Mileu de culture complet pour la culture des CSMs : α-MEM + SVF à 10%+ Glutamine + Antibiotiques
- Mileu de culture complet pour la culture des chondrocytes : DMEM/F12+ SVF à 10%+ Glutamine + Antibiotiques
- Solution de congélation des cellules : DMSO dilué à 10% (v/v) dans du SVF
- Solution de Cristal violet (réf. HT90132, Sigma Aldrich, France)

I.2. Protocoles

I.2.1. Isolement des cellules à partir des prélèvements

Les CSMs humaines sont isolées à partir de prélèvements de moelle osseuse humaine, provenant de l'Unité de Thérapie Celluaire et Tissulaire (UTCT) du CHU de Nancy. Les prélèvements sont obtenus lors de ponction de moelle osseuse de crête iliaque.

Les chondrocytes ont été isolés à partir de têtes fémorales humaines, prélevées lors des gestes chirurgicaux réalisés chez des patients ayant subi une pose de prothèse totale de hanche.

Ces prélèvements sont réalisés conformément aux procédures approuvées par l'expérimentation humaine et les comités éthiques des hôpitaux.

I.2.1.1. Isolement des CSMs et culture en monocouche

Etant donnée la diversité de conditions de culture des CSMs proposée dans la littérature, nous avons dans un premier temps, comparé différents paramètres de culture cellulaire, afin de choisir les conditions optimales nous permettant l'isolation et la culture des CSMs. Les paramètres testés sont dans le tableau II-1:

Tableau II-1 : Les paramètres de culture testés pour les CSMs *(CMN : cellules mononucléaires, CFU-Fs : clony-forming unit-fibroblasts).*

Paramètres	
Milieu de culture de base	DMEM-LG, α-MEM
Boîte de culture	75 cm^2, 25 cm^2
Densité initiale d'ensemencement	50000 CMN/cm^2, 10000 CMN/cm^2

Protocole

- 1mL de la moelle osseuse est placé dans un tube de 50 mL (réf. 227261, Dutscher, France) contenant 10 ml de milieu de culture pour CSMs, puis centrifugé à 300g pendant 10 minutes.
- Comptage des cellules au moyen d'une cellule de Thoma (voir ci-après)
- Le culot de cellules est suspendu dans le milieu de culture, puis transféré dans les boîtes de culture à la densité désirée et les cellules sont ensuite incubées en atmosphère humide à 37°C avec 5% CO_2.
- Après 72 h de culture, le milieu de culture est changé par la première fois afin d'enlever les débris cellulaires en suspension dans le milieu et les cellules non adhérées à la boîte de culture.
- Le milieu sera ensuite changé 2 fois par semaine jusqu'à l'obtention d'un tapis cellulaire à sub-confluence (90%). Ceci représente le passage 0 (P0) des CSMs

L'isolation des CSMs est possible grâce à leur faculté d'adhérence au plastique. Ainsi après 72h de culture, les CSMs auront adhéré au fond des boîtes et les autres cellules de la moelle osseuse (les globules rouges, les CSHs, *etc*.) seront éliminées par changement du milieu. Après des lavages successifs (deux fois par semaine), les éléments indésirables auront été éliminés.

I.2.1.2. Isolement des chondrocytes et culture en monocouche

Protocole

- Le cartilage hyalin des têtes fémorales est découpé en petits morceaux d'environ 1mm3, puis digéré pendant 2 heures à 37°C, 5% CO_2 dans la solution de pronase.
- Les morceaux de cartilage sont ensuite digérés pendant une nuit à 37°C, 5% CO_2 dans la solution de collagénase B.
- Le lendemain, la suspension cellulaire obtenue est centrifugée à 300g pendant 10 minutes et le culot cellulaire est suspendu dans le milieu de culture.
- Après comptage des cellules au moyen d'une cellule de Thoma (voir ci-après), elles sont transférées dans les boîtes de culture de 75 cm2 (106 cellules/ boîte) puis incubées en atmosphère humide à 37°C avec 5% CO_2.

- Après 24 h de culture, le milieu de culture est changé une première fois, il sera ensuite changé 2 fois par semaine jusqu'à l'obtention d'un tapis cellulaire à sub-confluence (90%). Ceci représente le passage 0 (P0) des chondrcytes.

I.2.2. Comptage des cellules

Le dénombrement des cellules est réalisé à l'aide d'une chambre de Thoma (réf. A4500T, Bioblock, France). On mélange 50 µL de suspension cellulaire avec 50 µL de bleu trypan. Le bleu trypan va pénétrer et donc colorer les cellules mortes en bleu. On va pouvoir compter les cellules vivantes, non colorées, à l'intérieur du quadrillage de la chambre de Thoma.

Le nombre total de cellules est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$N = n * 10^4 * fd$$

N= nombre total de cellules

n= nombre de cellules au sein de la chambre

I.2.3. Comptage des CFU-Fs

Ce type de culture permet de refléter le nombre de cellules capable de générer une colonie dans un échantillon.

Pour le comptage des CFU-Fs, les cellules sont cultivées dans des boîtes de Petri de 58 cm^2 à une densité de 7500 CMN/ cm^2 pour le passage 0 ou à une densité de1000 cellules par plaque pour les passages suivants. Le comptage des CFU-Fs dans les plaques est réalisé à l'aide d'une solution de cristal violet. Après 3 rinçages avec du PBS à 37°C, 3 mL de cristal violet sont ajoutés et les plaques sont laissées sous agitation douce pendant 15 minutes. Ensuite, les plaques sont rincées avec de l'eau distillée jusqu'à ce que le fond des plaques devienne blanc et les colonies restent violettes.

I.2.4. Passage et congélation des cellules

I.2.4.1. Passage des cellules

Lorsque les cellules de P0 sont arrivées à 90% de confluence, elles sont trypsinées et réensemensées. Elles sont alors au passage P1.

- Les cellules sont lavées 3 fois avec du tampon HBSS afin d'éliminer tout le sérum qui

est un inhibiteur de la trypsine.

- 5 mL de trypsine-EDTA sont ensuite ajoutés dans chaque boîte de 75 cm2 contenant des cellules et les boîtes sont incubées pendant 5-8 minutes à 37°C avec 5% CO_2 afin de favoriser l'action de l'enzyme et de décoller les cellules.
- 5 mL de milieu de culture sont ajoutés dans chaque boîte de culture afin d'inhiber l'action de la trypsine et les cellules en suspension sont récupérées par centrifugation à 300g pendant 10 minutes
- Enfin, les cellules sont ensemencées au premier passage (P1) avec une densité de 10000/cm2 pour les chondrocytes et 1000/cm2 pour les CSMs.

Les passages suivants (P2, P3, P4, ...) sont réalisés selon le même protocole.

I.2.4.2 Congélation des cellules

Le culot cellulaire obtenu après la digestion est suspendu à 10^6 celluls/mL dans du milieu de congélation, puis réparti dans des cryotubes (réf. C23954, Fisher, France). Après une incubation à 4°C (pendant 1h), à -20°C (pendant 30min) et ensuite à -80°C (pendant une nuit), les cellules sont définitivement conservées dans l'azote liquide.

Pour la décongélation, les cellules placées dans les cryotubes sont plongées dans un bain-marie à 37°C jusqu'à la fonte totale du contenu du cryotube. Les cellules sont ensuite lavées avec du milieu de culture pour éliminer le DMSO. Enfin, les cellules sont ensemencées dans des boîtes de culture de 25 cm² et cultivées jusqu'à sub-confluence.

I.3. Mise en condition des cellules

Les expériences ont été réalisées avec des CSMs en P4 et des chondrocytes en P2. Les cellules soumises à l'étirement sont cultivées en monocouche. Celles soumises à la compression sont cultivées dans un environnement tridimentionnel. Les cellules ont été ensemencées dans des plaques de culture à 1000 cellules/cm². Les plaques de culture utilisées dans cette étude sont :

- BioFlex six puits (Flexcell® International corporation)
- Chambre de culture lab-tek (Nalge Nunc International) coatée avec du collagène de type I (réf : C3867, Sigma, France) (6-10 µg/cm^2)

- Plaque de culture de six puits (réf. C22416, Fisher, France) coatée avec du collagène de type I (réf : C3867, Sigma, France) (6-10 µg/cm^2)

On laisse ensuite les cellules proliférer pendant 48 heures, puis le milieu de culture est remplacé par du milieu sans sérum. Après 12 heures, les cellules sont prêtes à être soumises aux stimulations mécaniques et biochimiques.



Figure II-1 : La plaque BioFlex et les chambres de lab-tek.

II. La stimulation mécanique

II.1. Les appareils de stimulation mécanique

II.1.1. L'appareil d'étirement

L'étirement dynamique est réalisé à l'aide d'un système FX-4000T (Flexcell International, USA) (Figure II-2). Une tension équibiaxiale est générée par l'application d'un vide obtenu grâce à une pompe. Ceci permet la déformation de la membrane de silicone sur laquelle sont cultivées les cellules (Figure II-3). Les membranes de silicone sont enduites du collagène de type I afin de favoriser l'adhésion des cellules. La forme du signal d'étirement, son amplitude et sa fréquence sont des paramètres pilotés par le logiciel FX-3000.



Figure II-2 : Appareil d'étirement « Flexcell Tension Plus System » (FX-4000T)

[http://www.dunnlab.de/lab_flexcell_neu.htm]

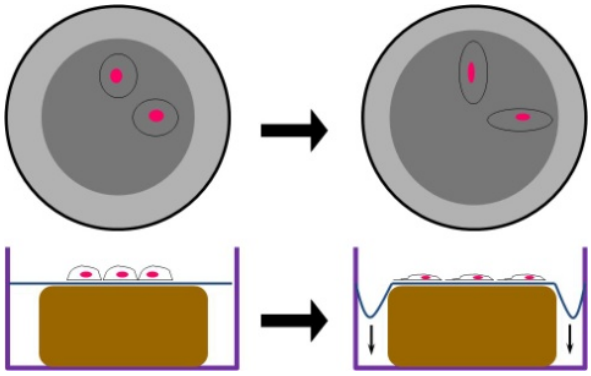


Figure II-3 : Principe d'étirement.

II.1.2. L'appareil de compression

La compression dynamique est réalisée à l'aide d'un système de FX-4000C (Flexcell International, USA) (Figure II-4A). La pression d'air, générée par un compresseur, est appliquée par le dessous du puits, dont le fond est composé d'une membrane flexible en silicone. La déformation de la membrane provoque une élévation du puits et compresse l'échantillon contre le bouchon (Figure II-4B). La forme du signal de pression, son amplitude et sa fréquence sont des paramètres pilotés par le logiciel FX-3000, comme le FX-4000T.

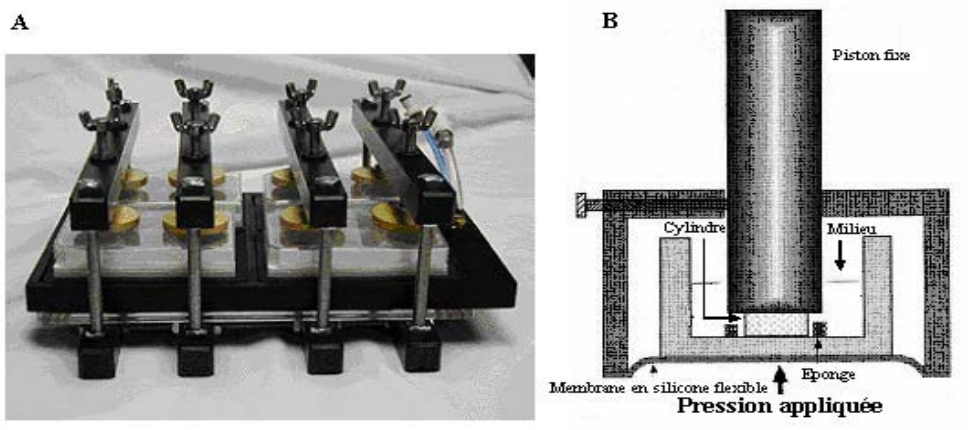


Figure II-4 : Appareil de compression et son principe.

II.2. Réactifs et matériels

✧ Milieux de différenciation :

- DMEM–High Glucose (4500mg/L) (DMEM-HG) (réf.411965,Invitrogen, France)
- ITS (Insulin, Transferrin, Selenious) (réf. 354351, BD, France) à 1%
- Pyruvate de Sodium (réf. P-5282, Sigma, France) à 100 µg/mL
- Proline (réf. P-5607, Sigma, France) à 40 µg/mL
- L-acide ascorbique 2P (réf. A-8960, Sigma, France) à 50 µg/mL
- Dexaméthasone (réf. D2915, Sigma, France) à 100 nM
- Glutamine
- Antibiotiques

✧ Solution d'alginate/HA (2%) : la poudre d'alginate, de viscosité moyenne, issue de l'algue Macrocystis Pyriferia (A-2033, Sigma-Aldrich, France), et celle d'acide hyaluronique (HA, réf. 25177, Accros, France) sont mélangées à raison de 4 parties d'alginate pour 1 de HA et stérilisées par autoclavage (121°C, 20 minutes) avant d'être dissoutes dans du NaCl 0,9%. La concentration finale d'alginate est de 16 g/L, celle d'HA est de 4 g/L.

✧ Solution de chlorure de calcium stérile ($CaCl_2$) (réf. C4901, Sigma-Aldrich, France) est à 102 mM dans de l'eau distillée.

II.3. Protocole

II.3.1. Fabrication des cylindres d'alginate/HA

Pour fabriquer des cylindres, la solution d'alginate/HA, avec ou sans cellules est injectée dans un moule inox (Figure II-5) à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille (réf. G2111/2, Terumo, Belgique). Ce moule est ensuite immergé dans une solution de $CaCl_2$ à 102 mM, pendant 15 minutes, pour la polymérisation de l'alginate/HA. Ensuite, le cylindre d'alginate/HA est libérée du moule, afin d'être lavée 3 fois dans une solution de NaCl à 0,9% pour éliminer le $CaCl_2$ résiduel. Puis, des poinçons stériles (diamètre intérieur 5 mm) (réf. 505, CSP, France) sont utilisés pour créer des petits cylindres d'alginate/HA afin de les mettre en culture dans des plaques de 6 puits. Les cylindres sont cultivés pendant 48 heures avant d'être mis dans des plaques de compression et stimulés mécaniquement.



Figure II-5 : Moule pour la création de cylindre d'alginate/HA.

II.3.2 La stimulation mécanique

Les cellules ensemencées dans les palques Bioflex ou les cylindres contenant des cellules sont mises dans les milieux de culture sans sérum pendant une nuit. Le milieu de différenciation est ajouté et les cellules sont mises tout de suite sous contrainte (étirement ou compression). A l'aide du logiciel, les différents paramètres sont contrôlés (Tableau II-2). A la fin de l'expérience, une partie des cellules sont tout de suite fixées. Les protéines ou les ARNs sont extraits des cellules et les milieux de culture sont gardés à -80°C (après centrifuger à1000g pendant 10 minutes).

Tableau II-2 : Conditions de stimulations mécaniques utilisées dans l'étude.

Contrainte	Amplitude	Fréquence	Signal	Temps (minutes)
étirement	5%	0,5 Hz et 1 Hz	sinusoïdal	10, 30, 60, 180
compression	200kPa	0,5 Hz	sinusoïdal	10, 30, 60, 180

III La stimulation biochimique

La stimulation biochimique des CSMs de des chondrocytes est effectuée avec le facteur de croissance TGF-β1.

III.1. Réactifs

- Milieu de différenciation
- TGF-β1 (réf. T7039, Sigma, France) dissout dans le milieu complémentaire de chondrogenèse à une concentration finale de 1, 5 ou 10 ng/mL.
- Inhibiteur du récepteur du TGF-β1 de type I : SB431542 (réf. S4317, Sigma, France),4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]- benzamide hydrate.

Il inhibe spécifiquement l'activité kinase du récepteur du TGF-β1. De plus, il est un inhibiteur sélectif pour ALK-4, ALK-5 et ALK-7. Il n'a aucun effet sur la voie de signalisation du BMP [Inman GJ et al, 2002].

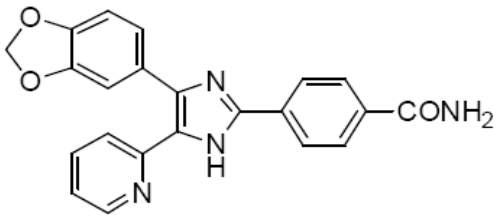


Figure II-7: La structure de l'inhibiteur du récepteur de type I.

Le SB431542 est dissout dans du DMSO à une concentration mère de 10 μg/mL. Pour choisir la concentration de travail, deux concentrations, 20 μM, 10μM ont été testées sur la cytotoxicité avec le kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity (réf: L3224, Molecular Probes, France). La concentration finale de travail choisie est de 10μM.

III.2. Protocole

Avant la stimulation biochimique, les cellules sont mises dans du milieu de culture sans sérum pendant une nuit. Le milieu de différenciation contenaut du TGF-β1 est ensuite ajouté aux cellules à raison de 2 mL par puits de plaque BioFlex ou 500 μL par puits de chambre Lab-tek. Les cellules sont ensuite incubées pendant le temps désiré en présence ou

absence de contrainte mécanique, puis elles sont tout de suite soit fixées, soit lysées pour en extraire leurs protéines.

Pour étudier l'implication du récepteur du TGF-β de type I, l'inhibiteur est ajouté 1 heure avant la stimulation mécanique ou avec du TGF-β.

IV. Cytométrie en flux

La technique de cytométrie en flux permet l'analyse rapide d'un grand nombre de particules de manière individuelle. La caractérisation des particules est réalisée à l'aide d'un appareil qui comprend, outre une source lumineuse (laser), une chambre de prélèvement et un système optique précédant des photomultiplicateurs qui convertissent des signaux lumineux en impulsions électriques analogues digitalisées, analysées et mémorisées par un ordinateur. Les particules étudiées sont propulsées dans un flux de liquide appelé "liquide de gaine". Elles sont alors entraînées une à une dans une cellule de lecture (cuvette) où elles passent dans le faisceau lumineux émis par la source. Une analyse simultanée de la lumière diffractée à 90° [FSC (fordward scatter detector)] et aux petits angles [SSC (side scatter detector)] fournit des données sur la taille et la structure des éléments étudiés. La mesure aux petits angles est principalement influencée par la taille des particules, tandis que la détection à 90° reflète plutôt la structure.

IV.1. Analyse de viabilité cellulaire, apoptose et nécrose en cytométrie en flux

La viabilité cellulaire ainsi que l'apoptose et la nécrose ont été mesurées à l'aide du Kit Vybrant / Apoptosis ^{TM}.

IV.1.1. Principe

L'apoptose est un processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. L'apoptose se distingue de la nécrose par des changements morphologiques et biochimiques caractéristiques, tels que le tassement et la fragmentation de la chromatine nucléaire, le rétrécissement du cytoplasme, et la perte d'asymétrie membranaire. Dans les cellules vivantes, la phosphatidylsérine (PS) se situe sur la surface cytoplasmique de la membrane cellulaire. Cependant, pour les cellules apoptotiques, la PS

est transférée du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmique, s'exposant ainsi à l'environnement cellulaire externe. L'anticoagulant humain, annexine V, est une protéine phospholipide-liante et Ca^{2+}-dépendante qui a une affinité élevée pour la PS. L'annexine V, marquée avec un fluorophore ou de la biotine, peut identifier les cellules apoptotiques en se liant aux PSs exposées sur le feuillet extérieur.

Contrairement à l'apoptose, pour les cellules nécrotiques, la membrane plasmique étant détruite, elle permet l'entrée de certaines molécules telles que l'iodure de propidium (IP).

Le kit Vybrant / Apoptosis ^{TM} contient de l'annexine V recombinante conjuguée au fluorochrome Alexa Fluor® 488, ainsi qu'une solution d'IP permettant de marquer l'acide nucléique des cellules nécrotiques. Ainsi, les cellules apoptotiques fixeront l'annexine V couplée à l'Alexa 488 et émettront une fluorescence verte tandis que les cellules nécrotiques fixeront l'IP et émettront une fluorescence rouge. Enfin, les cellules vivantes n'émettront aucune fluorescence. Ainsi, les trois populations cellulaires peuvent être séparées en cytométrie en flux par leur différence d'émission de fluorescence.

IV.1.2. Réactifs

Kit Vybrant/Apoptosis ^{TM} (réf. V13241, Molecular Probe, France.)

- ✧ Tampon annexine-liant 5x contient 50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12,5 mM $CaCl_2$, pH 7,4, à diluer 5 fois dans de l'eau déionisée avant utilisation ;
- ✧ Solution d'annexine V couplée au fluorochrome Alexa Fluor® 488 ;
- ✧ Solution d'iodure de Propidium (IP) à 1 mg/mL utilisée à 100 µg/mL après une dilution dans du tampon annexine-liant 1x.

IV.1.3. Protocole

- ➢ A l'issue de la stimulation mècanique ou biochimique, les cellules sont séparées des membres des plaques de BioFlex à l'aide d'un grattoir.
- ➢ Après centrifugation, les culots cellulaires sont suspendus dans 100 µL de tampon annexine-liant 1x puis 2,5 µL d'annexine V couplée au fluorochrome Alexa Fluor® 488 et 1 µL de IP (100 µg/mL) sont ajoutés à la suspension cellulaire.
- ➢ Les suspensions sont ensuite incubées pendant 15 minutes, à température ambiante et à l'abri de la lumière.

- Après cette période d'incubation, 200 µL de tampon d'annexine-liant 1x sont à nouveau ajoutés dans chaque tube.
- Après une délicate homogénéisation, les échantillons sont prêts pour le passage en cytométrie. Les cellules sont analysées en mesurant l'émission de fluorescence à 530 nm et 575 nm correspondant, respectivement, à l'émission de fluorescence de l'Alexa 488 et de l'IP.

Un contrôle négatif, cellules sans marquage, est préparé et analysé en même temps que les échantillons. Ce contrôle permet d'analyser l'auto-fluorescence des cellules. Un témoin positif de nécrose, cellules fixées avec du PAF et perméabilisées avec du Triton X-100 est également préparé.

IV.2. Analyse du cycle cellulaire en cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une méthode rapide pour mesurer la teneur des cellules en ADN, et constitue un outil commode de recherche pour suivre la régulation du cycle des cellules.

IV.2.1 Principe

Le cycle cellulaire comprend plusieurs phases (Fig. II-8). Durant la première phase (phase G1), la cellule croit et devient plus large. Il y a synthèse des protéines permettant la division. A partir d'une certaine taille, elle entre dans la deuxième phase (phase S), dans laquelle débute la synthèse de l'ADN. La cellule duplique son matériel héréditaire (réplication de l'ADN) et une copie de chacun de ses chromosomes est effectuée. Durant la phase suivante (phase G2), la cellule contrôle que la réplication de l'ADN a bien été réalisée (réparation post-réplicative) et prépare la division cellulaire. Les chromosomes sont séparés durant la mitose (phase M) et la cellule se divise en deux cellules filles (cytokénèse). A travers ce mécanisme, les deux cellules filles sont dotées des mêmes chromosomes que ceux de la cellule mère. Après la division, les cellules retournent en phase G1.

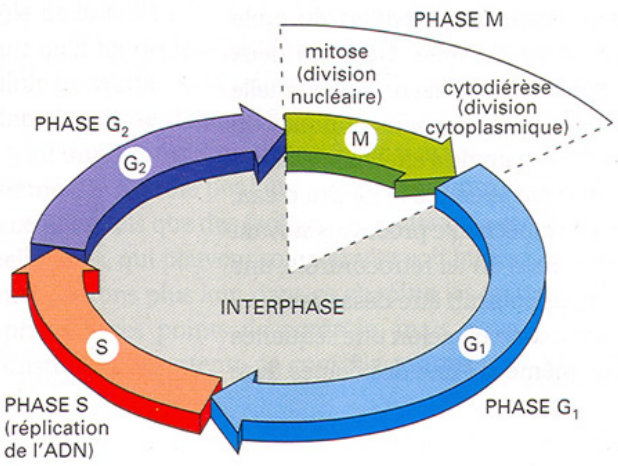


Figure II-8: Différentes phases du cycle cellulaire.

[http://www.humans.be/bio%20cell2%20cycle%20cellulaire.html]

Les méthodes d'analyse du cycle cellulaire, par cytométrie en flux, sont basées sur l'émission de la fluorescence des noyaux marqués à l'iodure de Propidium. Une population à croissance exponentielle de cellules aura une distribution de son contenu d'ADN montrant une premier pic de cellules en phase G0/G1, une vallée de cellules en phase S, et un deuxième pic contenant des cellules en phase G2/M. Les cellules de la phase G2/M contiennent deux fois plus d'ADN que les cellules de la phase G0/G1. Les cellules en phase S possèdent une teneur en ADN comprise entre 2N et 4N et correspondent à l'espace situé entre les 2 pics (Figure II-9).

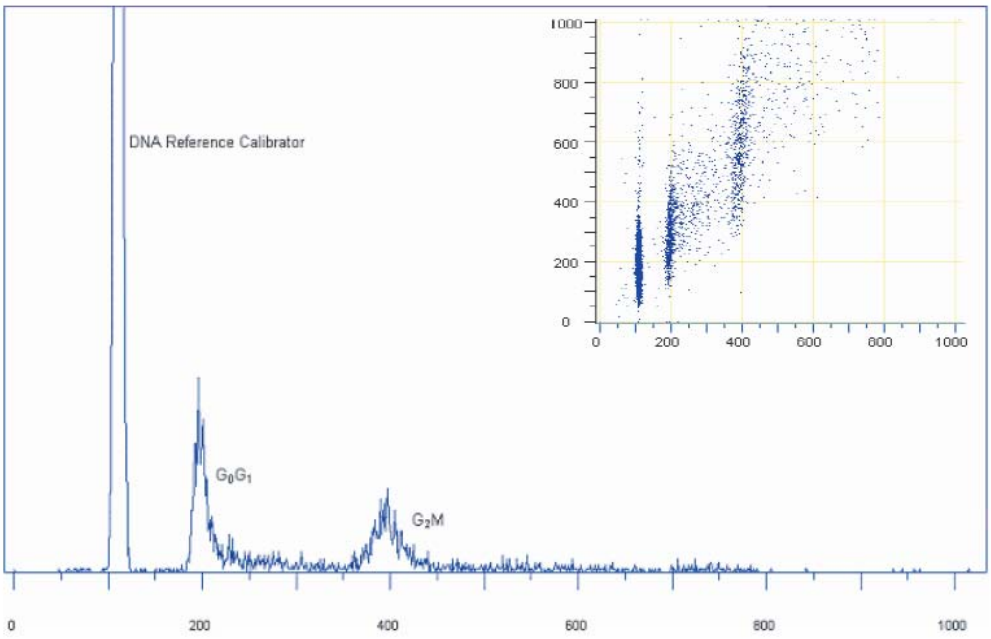


Figure II-9 : Analyse des phases du cycle cellulaire par cytométrie en flux.

IV.2.2 Réactifs

- Kit DNA Prep Reagent (réf. PN 6607055, Beckman coulter, USA) contenant:
  - ✧ DNA Prep™ LPR : détergents non ioniques, salins et stabilisateurs.
  - ✧ DNA Prep™ Stain: 50 µg/mL iodure de Propidium, RNAse [Type III-A, Bovine Pancrease (4KU/mL)], < 0,1% NaN_3.
- DMEM sans rouge de phénol (réf. 11800, Gibco, France)

IV.2.3 Protocole

A l'issue des stimulations mécaniques ou biochimiques, les cellules sont trypsinées et les culots cellulaires sont récupérés. Les culots cellulaires sont suspendus dans 25 µL de DMEM sans rouge de phénol, puis perméabilisés en ajoutant 25 µL de solution DNA prep LPR et suivi d'une agitation pendant 30 secondes au vortex. Les cellules sont ensuite marquées avec l'iodure de propidium en ajoutant 250 µL de solution DNA-Prep Stain, puis mise en agitation pendant 30 secondes. Enfin, les cellules sont analysées dans l'heure qui suit le marquage.

IV.3. Analyse de l'expression de marqueur de surface cellulaire en cytométrie en flux

Pour identifier le phénotype des CSMs, nous avons étudié l'expression de certains marqueurs de surface cellulaire par immunomarquage direct en cytométrie en flux.

IV.3.1. Marquage par immunofluorescence directe

IV.3.1.1 Principe

Les récepteurs exprimés à la surface des cellules sont reconnus spécifiquement par un anticorps directement couplé à un fluorochrome (Figure II-10).

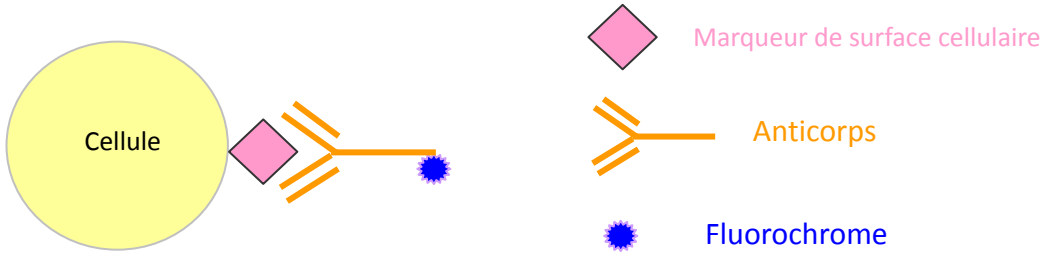


Figure II-10 : Principe du marquage par immunofluorescence directe.

IV.3.1.2 Réactifs

- DMEM sans rouge de phénol.
- Solution de blocage : albumine de sérum bovin (BSA, réf. A-9667, Sigma Aldrich, France) dissoute dans du DMEM sans rouge de phénol à 0,5% (p/v)
- Solution d'immunomarquage : anticorps dilués dans la solution de blocage afin d'obtenir une concentration finale appropriée (Tableau II-3).

Tableau II-3 : Anticorps impliqués dans les immunomarquages directs.

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Isotype	Concentration finale	Fournisseur (réf.)
Anti-CD34/PE	Humain	IgG (Souris)	2 µL / tube	BD (réf. 555822)
Anti-CD45/FITC	Humain	IgG (Souris)	5 µL / tube	Dako (réf. F0861)
Anti-CD73/PE	Humain	IgG (Souris)	2 µL / tube	BD (réf. 550257)
Anti-CD90/FITC	Humain	IgG (Souris)	2 µL / tube	BD (réf. 555595)
Anti-CD105/FITC	Humain	IgG (Souris)	5 µL / tube	Dako (réf. LS133)
Anti-CD166/FITC	Humain	IgG (Souris)	5 µL / tube	Dako (réf. LS172)
Contrôle isotipique/PE	Humain	IgG (Souris)	5 µL / tube	Dako (réf. X0928)
Contrôle isotipique/FITC	Humain	IgG (Souris)	5 µL / tube	Dako (réf. X0927)

IV.3.1.3 Protocole

Les CSMs resuspendues dans la solution de blocage, sont réparties à raison de 100 000 cellules par tube. Après 20 minutes d'incubation, elles sont lavées par centrifugation (300 g, 5 min) et les culots cellulaires sont resuspendus dans 100 µL de solution d'immunomarquage incluant soit différents anticorps, soit IgG-PE/FITC (contrôle isotipique) ou dans 100 µL de la solution de blocage (contrôle négatif). A l'issue d'une incubation pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, 0,5 mL de DMEM sans rouge de phénol sont ajoutés dans chaque tube, puis une centrifugation (300 g, 5 min) est faite afin d'éliminer les anticorps en excès. Le culot cellulaire est alors repris dans 300 µL de DMEM sans rouge de phénol avant d'être analysé en cytométrie en flux.

IV.3.1.4 Analyse des échantillons cellulaires en cytométrie en flux

Un minimum de 10000 évènements a été collecté lors de chaque analyse. La population cellulaire est repérée sur le scattogramme en fonction de la taille et de la granulosité de cellules. Une fenêtre prenant en compte uniquement cette population est dessinée afin d'éliminer les débris cellulaires, ou les doublets et triplets de cellules. Ainsi, les valeurs de SSC (Side Scatter) et de FSC (Forward Scatter) sont réglées de façon à bien visualiser la population cellulaire et les microsphères de calibration.

Sur l'histogramme de fluorescence, la tension du photomultiplicateur (PMT) est réglée de manière à ce que les cellules non marquées (le contrôle négatif qui permet de s'affranchir de l'autofluorescence des cellules) ainsi que les cellules incubées en présence d'immunoglobulines non spécifiques (le contrôle isotipique qui permet de s'affranchir de le fluorescence du marquage aspécifique) apparaissent négatives. La tension du PMT ne doit plus être touchée après ce réglage afin de ne pas faire d'erreur sur la lecture des intensités de fluorescence des échantillons analysés. L'intensité de fluorescence de la population cellulaire est mesurée automatiquement par le cytomètre et analysée à l'aide du logiciel SYSTEM II (Beckman Coulter). Les résultats obtenus par cytométrie en flux, sont exprimés soit en pourcentage de cellules positives, soit en intensité moyenne de fluorescence (IMF).

V. Analyse du métabolisme cellulaire

La mesure de l'activité métabolique des cellules a été réalisée par le test de Alamar Blue^{TM} et le comptage de cellules. L'activité métabolique a été rapportée au nombre des cellules après comptage cellulaire.

V.1. Principe

Le test Alamar Blue^{TM} (réf. BUF 012B, Serotec, France) est conçu pour mesurer quantitativement la prolifération cellulaire et la cytotoxicité de drogues sur les cellules. l'Alamar Blue^{TM} est composé d'un indicateur Rédox qui change de couleur en fonction de la réduction chimique du milieu de culture, c'est un indicateur colorimétrique sensible à l'activité métabolique cellulaire. En fait, l'Alamar Blue^{TM}, n'est pas un effet toxique cellulaire, et le test n'a pas besoin de la lyse des cellules, ce qui permet ainsi de suivre

l'évolution du signal de manière cinétique.

Des cellules saines et/ou en prolifération produisent des composés réducteurs tels que $FADH_2$, NADH, NADPH et ont une activité cytochromique maintenue qui contribue à réduire l'Alamar Blue™. Par contre, des cellules atteintes par un stimulus cytotoxique ne réduisent pas l'Alamar Blue™ et produisent des composés oxydants.

La mesure de l'activité cellulaire est donc basée sur le taux d'oxydo/réduction de l'Alamar Blue ™ déterminé par la mesure densitométrique à 570 nm (A570, absorbance du composé réduit) et à 600 nm (A600, absorbance du composé oxydé). Le pourcentage de réduction reflétant l'activité métabolique, est alors déterminé par la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction} = \frac{(A570_{\text{échantillon}} \times 117216) - (A600_{\text{échantillon}} \times 80586)}{(A600_{\text{blanc}} \times 155677) - (A570_{\text{blanc}} \times 14652)} \times 100\%$$

Le comptage des cellules nous permet de normaliser nos résultats du test Alamar Bleu en fonction de la quantité de cellules. Les résultats seront donc exprimés sous la forme de « % de réduction / cellules ».

V.2. Réactifs

- DMEM sans rouge de phénol (réf. 11880, Gibco, France).
- Alamar Blue™ (réf. DAL1100, Biosource) utilisé à 10% (v/v dans du DMEM sans rouge de phénol).
- Solution de trypsine-EDTA à 0,05% (réf. 25300, Gibco, France) diluée dans du HBSS à 0,025%.

V.3. Protocole

A la fin de la stimulation mécanique ou biochimique, les cellules sont lavées avec du DMEM sans rouge de phénol pendant 15 minutes. Puis 0,5 mL d'une solution d'Alamar Blue™ à 10% sont ajoutés dans chaque puits, y compris 2 puits sans cellulaires utilisés comme « blanc réactif». Après une incubation de 4 heures (37°C, 5% CO_2), le milieu de chaque puits est enlevé et les absorbances à 570 nm et à 600 nm sont mesurées en utilisant un spectrophotomètre (DU 640, Beckman USA).

Après le test d'Alamar Bleu, les cellules sont comptées dans chaque puits selon le protocole décrit dans I.2.2.

VI. Etude de l'expression de protéines en microscope confocal

L'expression et la localisation de protéines sont analysées en microscopie confocale à balayage laser par immunofluorescence indirecte.

VI.1. Marquage par immunofluorescence indirect

VI.1.1 Principe du marquage par immunofluorescence indirecte

Les protéines exprimées dans le cytoplasme sont reconnues spécifiquement par un anticorps (anticorps primaire). Afin de mettre en évidence la formation du complexe antigène-anticorps primaire, un deuxième anticorps est utilisé (anticorps secondaire). Ce dernier est couplé à un fluorochrome et il est dirigé spécifiquement contre la partie Fc (fragment commun) de l'anticorps primaire. (Figure II-11)

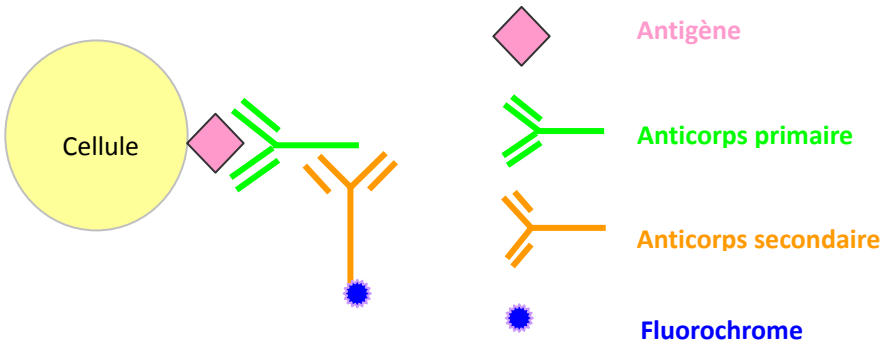


Figure II-11 : Principe du marquage par immunofluorescence indirecte.

VI.1. 2 Réactifs

- Solution de fixation : Paraformaldéhyde (PAF) (réf. P6148, Sigma) dissout dans du tampon phosphate salin (PBS, réf. 14190, invitrogen, France) à 4% (p/v)
- Solution de lavage : PBS (réf. 14190, invitrogen, France)
- Solution de perméabilisation : Triton X100 préparé dans du PBS à 0,5% (v/v).
- Solution de dilution : albumine de sérum bovin (BSA, réf. A-9667, Sigma Aldrich, France) dissoute dans 0,1% de Triton X100.
- Les anticorps primaire sont dilués à 1/50, et les anticorps secondaires sont dilués à 1/100 sont dans la solution de dilution. Les anticorps sont dans le tableau II-4.

- Réactifs pour le marquage des filaments d'actine et du noyau (tableau II-5)

Tableau II-4: Anticorps impliqués dans les immunomarquages indirects.

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Isotype	Fournisseur (réf)
Anti-phospho-Smad3	Humain	IgG (lapin)	Cell signaling (réf. 95205)
Anti-Smad2/3	Humain	IgG (souris)	BD (réf. 610842)
Anti-TGFβRII	Humain	IgG (souris)	R&D (réf. MAB241)
Anti-β-tubulin	Humain	IgG (souris)	Sigma (réf. T5201)
Alexa Fluor® 488	chèvre	IgG (lapin)	Molecular probes (réf. A11078)
Alexa Fluor® 488	lapin	IgG (chèvre)	Molecular probes (réf. A11008)
Alexa Fluor® 555	souris	IgG (chèvre)	Molecular probes (réf. A21422)

Tableau II-5 : Réactifs pour le marquage des structures cellulaires par fluorescence

Molécules	Fournisseurs (réf)
Alexa Fluor® 488 Phalloidin	Molecular probes (réf. A12379)
Hoechst 33342 BisBenzimide	Sigma (réf. B2261)

VI.1.3 Protocole

- Après fixés avec du PAF à 4%, les échantillons sont perméabilisés avec du Trixton X100 pendant 15 minutes à température ambiante.
- Après 3 lavages dans la solution de lavage, les cellules sont incubées avec l'anticorp primaire pendant 45 minutes à température ambiante.
- Après 3 lavages dans du PBS, les cellules sont incubées avec l'anticorp secondaire couplé au fluorochrome pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- Si nécessaire, le cytosquelette d'actine est marqué par incubation des cellules avec de la Phalloidin couplée soit à Alexa 488 soit à Alexa 594, dilué 1/50 dans la solution de dilution. Cette incubation est réalisée pendant 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière.
- Dans certaines expériences, les noyaux ont été marqués avec du Hoechst 33342

(dilution 1/10) pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

- A la fin des marquages, les cellules sont lavées 5 fois avant d'être observés en microscopie confocale à balayage laser.

Un contrôle négatif, c'est-à-dire les cellules incubées avec l'anticorp secondaire seulement, est préparé en même temps.

VI.2. Observation en microscopie confocale à balayage laser

VI.2. 1 Principe

VI.2.1.1 Microscopie confocale à balayage laser

Parmi les méthodes de microscopie à sectionnement optique qui permettent l'observation d'une cellule entière par coupes optiques successives horizontales selon l'axe optique vertical, la Microscopie Confocale à Balayage Laser reste la technique de référence pour visualiser des échantillons biologiques en trois dimensions fournissant des images de haute résolution, en éliminant la lumière parasite. La géométrie de l'optique confocale prouve son avantage indéniable sur la microscopie de fluorescence conventionnelle en discriminant les plans en dehors du plan focal. Le diamètre de la zone illuminée étant très petit (0,3 µm), la constitution de l'image totale de l'objet nécessite de balayer le faisceau laser point par point sur l'objet. Le balayage laser est assuré par un système constitué par deux miroirs vibrants en x et en y (miroirs galvanométriques) (Figure II-12) dont la fréquence de balayage doit permettre d'acquérir le signal de fluorescence le plus rapidement possible. Un déplacement selon l'axe optique (z) permet l'acquisition de coupes sériées. Le déplacement selon l'axe axial (z) est réalisé grâce à une platine motorisée (moteur pas à pas), faisant varier le plan de mise au point, ce qui permet d'obtenir une série de coupes optiques appelées série z (Figure VI-2). Un empilement par projection de sections optiques conduit à une image reconstruite en 3D, dont la résolution spatiale est limitée par la résolution de l'appareil (résolution maximale théorique $d = 0,61\ \lambda/NA$ avec NA l'ouverture numérique de la lentille de l'objectif et λ la longueur d'onde utilisée). L'illumination du spécimen par la lumière laser, ainsi que la détection du signal sont réduites à un point, grâce à l'utilisation de deux diaphragmes (champ et détecteur) de faible diamètre ("pinholes"). Ils sont situés dans les plans confocaux, c'est-à-dire qu'ils sont tous

deux conjugués au plan de mise au point dans l'objet. Les diaphragmes ont pour but d'exclure physiquement le signal lumineux provenant des plans adjacents au plan focal. Seule la lumière d'émission de fluorescence provenant du plan focal est collectée au niveau du détecteur (photomultiplicateur) pour constituer l'image (Figure II-13). L'ouverture du diaphragme va conditionner en grande partie la qualité optique de l'image.

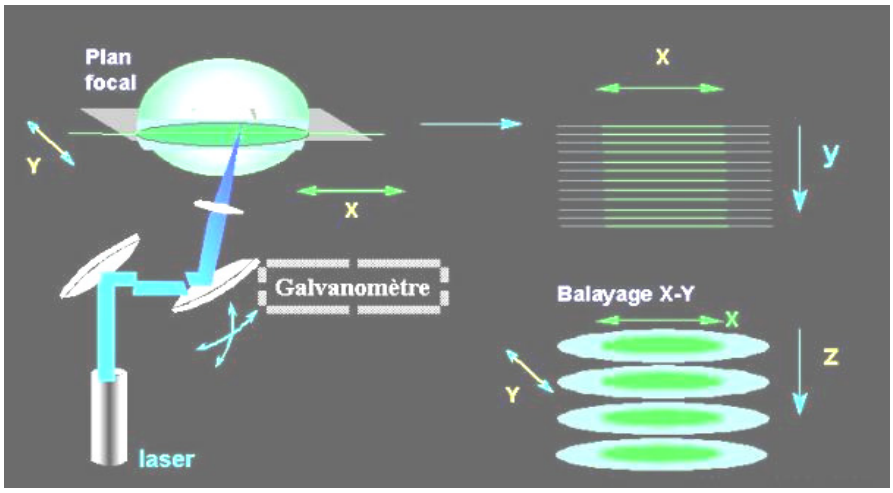


Figure II-12: Acquisition de l'image en microscopie confocale. Déplacement dans les axes x, y et z.

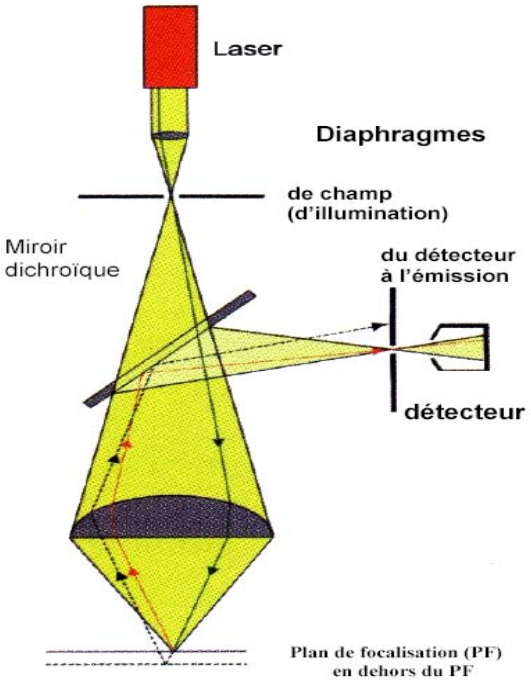


Figure II-13 : Géométrie de l'optique confocale à balayage laser.

VI.2.1.2. Microscopie mulitiphoton (excitation biphotonique)

Les aberrations chromatiques en imagerie 3D de sondes fluorescentes excitées dans l'UV ont motivé le développement d'autres techniques en microscopie, en particulier celles utilisant les propriétés non linéaires de la lumière (mode multiphoton). A la différence du mode d'excitation conventionnel en fluorescence monophotonique, le phénomène **Multiphoton**, provient de l'absorption successive de deux photons qui combinent leur énergie et entraîne la transition produisant l'état excité du fluorophore (Figure II-14). La probabilité d'absorption de deux photons est reliée au carré de l'intensité de la lumière instantanée. Ce processus multiphoton est rendu possible par une intensité très élevée combinée à une concentration temporelle d'un flash laser très court (ps ou fs) à très haute fréquence (environ 80 MHz). Cette potentialité est apportée par des équipements spécialisés comme des oscillateurs (Tsunami, Spectra Physics ; Verdi 900, Coherent) pompés à l'aide de lasers solides de pompe générant un très bref, mais très intense, flash.

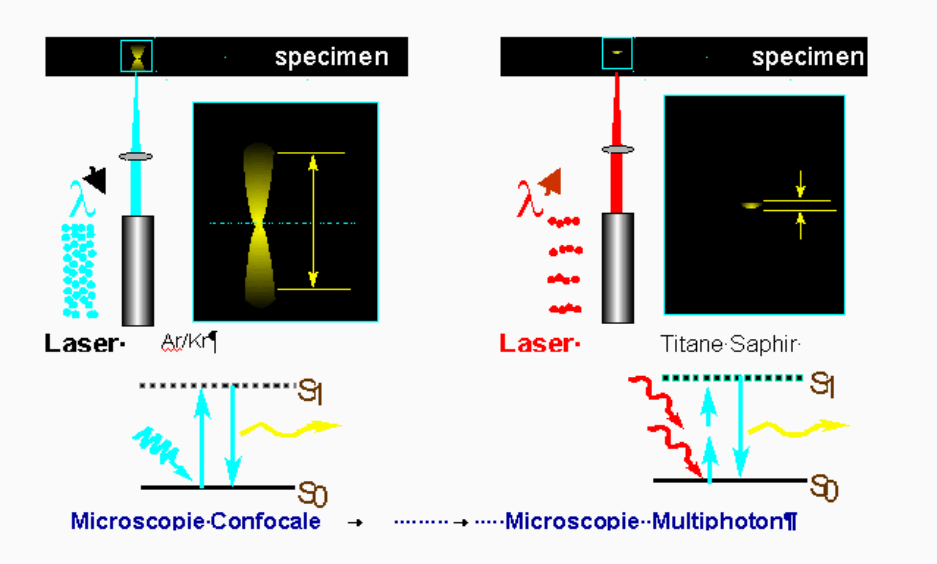


Figure II-14 : Principe de l'illumination laser en mode Multiphoton.

En comparaison à la microscopie confocale monophoton, le phénomène multiphoton appliqué à la microscopie confocale (excitation au niveau du plan focal de l'objet) apporte des performances très nettement améliorées:

- la photodégradation et la génération de produits phototoxiques en dehors du plan focal sont absentes,

- compatibilité pour l'observation dans le temps sur le vivant (physiologie),
- détermination aisée des temps de vie de fluorescence (durée de vie),
- profondeur d'analyse augmentée en termes d'épaisseur d'échantillons (intérêt pour l'analyse des tissus épais et diffusants),
- l'efficacité de collection de la lumière de fluorescence est optimisée, ouvrant la voie à la quantification du signal de fluorescence de manière plus précise.

Le plateau d'imagerie de notre laboratoire est équipé d'une chaîne laser qui combine un laser de pompe solide à un oscillateur d'impulsions. Ce dernier assure la génération d'impulsions brèves (femtoseconde) pulsée à haute fréquence (de l'ordre de 80 MHz) avec la génération du phénomène de double-photon (multiphoton) au niveau du plan focal.

VI.2.2. Protocole

L'observation de l'expression des protéines est réalisée à l'aide d'un microscope confocal Leica TCS SP2-AOBS (Leica Microsystems, Germany) (Figure II-15) équipée d'un filtre opto-acoustique accordable, de laser solides argon (457nm, 476nm, 488nm, 514nm), de laser hélium-néon (543nm et 633nm) et d'un oscillateur femtoseconde VERDI (600-1100nm), avec un objectif (x40/1,4 ; à immersion à eau). Des images de haute résolution (512 x 512 pixels) sont obtenues, avec une taille de voxel : 250nm x 250nm x 400nm et un critère Rayleigh de 1.

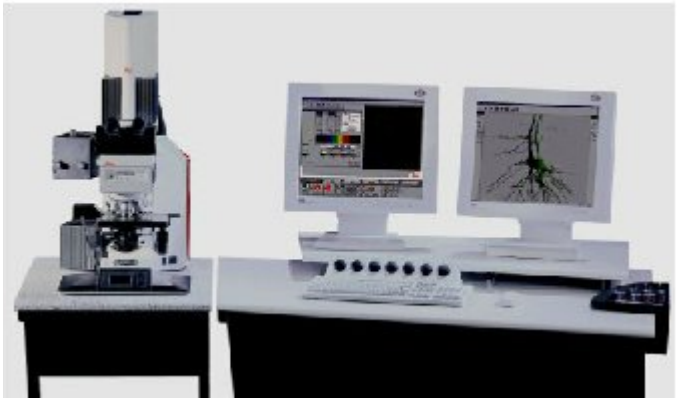


Figure II-15: Microscope à optique confocale Leica TSC SP2-AOBS.

VI.3. Analyse de la densité de fluorescence

La densité de fluorescence dans les noyaux est analysée à l'aide d'un logiciel de

traitement d'image (ImageJ). 100 cellules sont utilisées pour chaque condition d'expérience. Les images obtenues par transmission sont utilisées pour délimiter les noyaux et l'intensité moyenne de fluorescence est alors mesurée à ces endroits.

VII. Etude de l'expression des protéines par Immuno-empreinte (Western blot)

VII.1. Principe

La technique permet l'identification de protéines spécifiques et leur quantification dans un échantillon biologique. Après la séparation des protéines dans un gel en fonction de leur taille moléculaire, celles-ci sont transférées depuis le gel sur une membrane où elles sont exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. L'anticorps fixé sera mise en évidence à l'aide d'un marqueur, souvent l'enzyme HRP par une technique de colorimétrie, chimiluminescence, etc. Il est possible grâce à cette technique de détecter la présence d'une protéine dans un échantillon biologique, d'évaluer sa taille, et sa concentration.

VII.2. Réactifs

- Tampons : (Tableau II-6)

Tableau II-6 : Composition des différents tampons

Tampon de lyse (pH=7,5)	**Tampon de migration** (pH=8,3)	**Tampon de transfert** (pH=8,3)
- 50 mM de Tris-Cl - 150 mM de NaCl - 1 % de Nonidet P-40 (v/v) - 0,5 % de Sodium deoxicholate (p/v) - 0,1 % de Dodécyl sulfate de sodium (SDS) - 1% de cocktail de protéases inhibitrices	- 25 mM de Tris - 192 mM de Glycine - 0,1 % SDS	- 25 mM de Tris - 192 mM de Glycine - 0,05 % SDS - 20 % de Méthanol

Tampon de rinçage (pH=7,5)	**Tampon de blocage** (pH=7,5)	**Tampon de charge**
- 10 mM de Tris - 100 mM de NaCl - 0,1 % de Tween 20	- 10 mM de Tris - 100 mM de NaCl - 0,1 % de Tween 20 - 5 % de lait écrémé en poudre	- β-mercaptoéthanol (β-ME) (Biorad, ref : 161-0710) - tampon de charge simple (Biorad, ref : 161-0737) ⇨ au 1 : 19

- Bio-Rad D_C Protein Assay Reagent : Reagent A (réf. 500-0113), Reagent S (réf. 500-0115), Reagent B (réf. 500-0114)
- bis acrylamide à 30%
- Tris-HCl à 1,5M, pH = 8,8 (Biorad, ref : 161-0798)
- Tris-HCl à 1M, pH = 6,8 (Biorad, ref : 161-0799)
- SDS (dodécyl sulfate de sodium) reconstitué à10% dans de l'eau distillée
- APS (persulfate d'ammonium) reconstitué à10% dans de l'eau distillée
- TEMED (ref : 161-0800, Biorad)
- Precision Plus Protein™ Standards Kaleidoscope™, ref : 161-0375
- Ponceau S solution (ref： P-7170, Sigma, France)
- Anticorp primaire (tableau II-7)
- Anticorp secondaire (tableau II-8)
- Kit de détection: "ECL plus" western blot detection (Amersham, réf. RNP2132)

Tableau II-7 : Anticorps primaires impliqués dans les immunomarquages

Anticorps	**spécificité de l'espèce**	**Isotye**	**Dilution**	**Fournisseur (réf.)**
Anti-phospho-Smad3	Humain	IgG (lapin)	1/1000	Cell Signaling (réf. 95205)
Anti-Smad2/3	Humain	IgG (souris)	1/1000	BD (réf. 610842)
Anti-GAPDH	Humain	IgG (lapin)	1/5000	Santa Cruz (réf. sc-25778)

Tableau II-8 : Anticorps secondaires impliqués dans les immunomarquages

Anticorps	**Dilution**	**Fournisseur (réf.)**
goat anti-mouse IgG-HRP conjugate	1/13000	Biorad (réf. 170-6516)
Goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate	1/13000	Biorad (réf. 170-6515)

VII.3. Protocole

VII.3.1. Extraction et préparation des protéines des cellules

VII.3.1.1. Lyse des cellules

Séparées de leur milieu de culture, les cellules sont rincées trois fois avec du DMEM sans rouge de phénol à 37°C. Après aspiration de tout l'excès de DMEM, les étapes suivantes sont réalisées à 4°C. 50 µL de tampon de lyse sont ajoutés dans chaque puits d'une plaque 6 puits. Aussitôt les cellules sont grattées et transférées dans des microtubes, puis incubées 10 à 15min. Pendant la lyse, les tubes sont vortexés 3 fois. Les lysats cellulaires sont centrifugés ensuite à 15700 g pendant 20 minutes. Le surnageant contenant les protéines totales est récupéré.

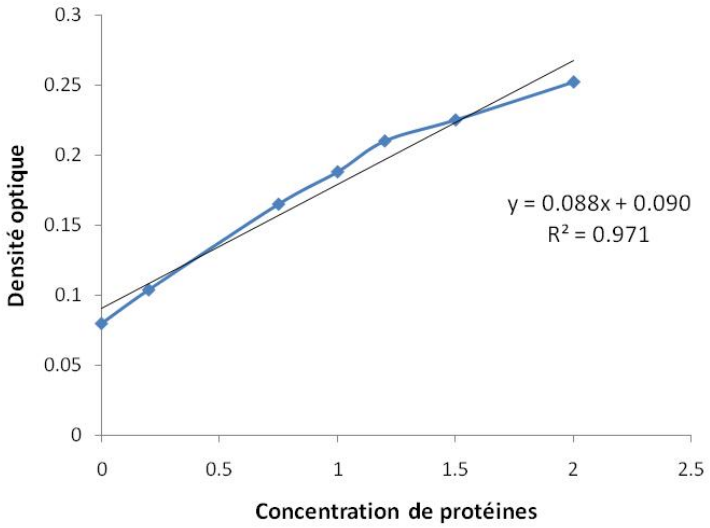
VII.3.1.3 Dosage des protéines

La concentration des protéines est déterminée grâce une réaction colorimétrique qui consiste en premier lieu à préparer une gamme étalon de sérum albumine bovine (BSA) dans le tampon de lyse aux concentrations suivantes : 0 / 0,2 / 0,75 / 1 / 1,25 / 2 mg/mL (Tableau II-9). Un mélange de réactifs S et A dans un rapport 1 / 50 est préparé pour obtenir une solution A'. Les échantillons ainsi que la gamme d'albumine sont dilués 5 fois dans la solution A'. Ensuite, la solution B est ajoutée afin d'offrir une dilution de 40 fois. Enfin l'absorbance est mesurée à 750 nm après 15 minutes d'incubation à l'abri de la lumière avec un densitomètre (Bio-rad, Model 680 microplate reader) en utilisant le logiciel Microplate manager.

Tableau II-9 : Préparation de la gamme étalon des protéines

Protéines (mg/mL)	**0**	**0,2**	**0,75**	**1**	**1,25**	**1,5**	**2**
Tampon de lyse (µL)	100	90	62,5	50	37,5	25	0
Quantité de BSA (µL)	0	10	37,5	50	62,5	75	100

Gamme étalon :



VII.3.1.4 Préparation des échantillons

Une fois la concentration de protéine calculée, 20µg de protéines sont mélangées avec le même volume de tampon de charge, ensuite les échantillons sont portés 100°C pendant 5 minutes. Enfin, les protéines sont mises dans la glace puis congelées rapidement.

VII.3.2. Electrophorèse des protéines

VII.3.2.1 Principe

Le SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Après avoir bouilli dans du SDS, toutes les protéines ont presque le même rapport taille, et leur vitesse de migration dans un champ électrique ne dépend alors que de leur poids moléculaire.

VII.3.2.2 Protocole

- Préparation du gel de séparation à 10% *(pour deux plaques de 0,75mm d'épaisseur)*
    - 3,3 mL de bis acrylamide à 30%
    - 2,5 mL de Tris-HCl à 1,5M, pH = 8,8
    - 4 mL d'eau distillée (ddH_2O)
    - 0,1 mL de SDS à 10%
    - 0,1 mL de APS à 10%
    - 4 µL de TEMED (c'est un catalyseur, il va donc accélérer la polymérisation

du gel)

Le mélange est homogénéisé doucement pour éviter la formation des bulles. A l'aide d'une micropipette, le gel est injecté entre les plaques jusqu'au ¾ de la hauteur. On complète par de l'eau pour homogénéiser le gel de part et obtenir une ligne plane avec le gel. Environ 40-45 minutes après la polymérisation du gel, l'eau est éliminée puis les plaques sont essuyées doucement.

- Préparation du gel de concentration à 5% *(pour deux plaques de 0,75 mm d'épaisseur)*

- 0,83 mL de bis acrylamide à 30%
- 0,63 mL de Tris-HCl à 1M, pH = 6,8
- 0,05 mL de SDS à 10%
- 0,06 mL de APS à 10%
- 5 µL de TEMED

Le mélange est homogénéisé doucement pour éviter la formation des bulles. A l'aide d'une micropipette, le gel est injecté entre les plaques, et un peigne est ensuite placé entre les plaques pour permettre la formation des puits pour le dépôt des protéines.

- Dépôts des protéines : Après la polymérisation du gel, les protéines sont déposées dans les puits. Un puits sera réservé au marqueur de taille qui permet de déterminer le poids des protéines.

- Migration : La migration dans le gel de concentration s'effectue à 80V pendant environ 30 minutes. Ensuite, la migration dans le gel de séparation est effectuée à 100V pendant environ 1h30.

VII.3.3 Transfert

VII.3.3.1 Principe

Après être séparées par migration dans SDS-PAGE, les protéines contenues dans le gel sont transférées vers un support solide, qui peut se combiner fortement avec les protéines et qui ne présente pas d'immunoréactivité. De plus, les protéines conservent leur activité

antigènique. Dans notre étude, les membranes PVDF ont été utilisées.

VII.3.3.2 Protocole

A la fin de la migration, des membranes de PVDF et des buvards sont coupés selon la taille du gel. Les membranes sont ensuite humidifiées dans du méthanol pendant 2 à 3 minutes, et des mousses ainsi que des buvards dans le tampon de transfert. Parallèlement, le gel est déposé dans le tampon de transfert pendant 2 à 3 minutes pour obtenir équilibre. Le « sandwich » est préparé ensuite (Figure II-16) selon un schéma précis dans une petite bassine remplie de tampon de transfert. Il est important dans cette étape de s'assurer qu'il n'y ait pas de formation de bulles qui empêcheraient le transfert de façon homogènr. Le transfert est effectué à 100V pendant 90 minutes à une température de 4°C.

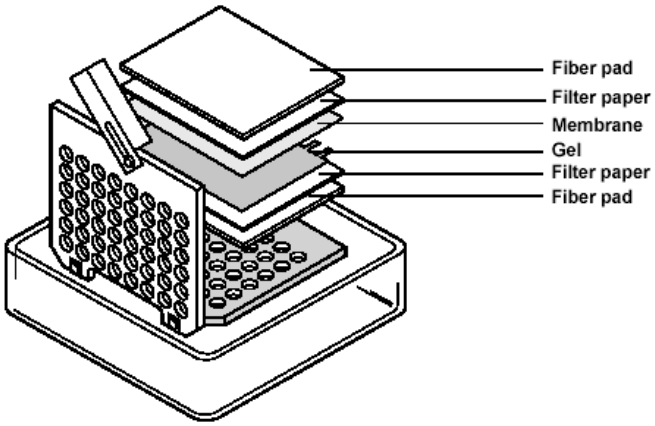


Figure II-16: Le montage de transfert des protéines du gel vers la membrane PVDF. *Le gel et la membrane sont placés entre deux papiers filtres qui sont eux-mêmes placés entre deux mousses. Le tout est mis à l'intérieur d'une cassette soigneusement fermée et plongée dans le tampon de transfert.*

VII.3.4. Coloration au rouge ponceau

VII.3.4.1 Protocole

Une fois le transfert terminé, la membrane est déposé dans la solution Ponceau S (0,1% Ponceau S (w/v), 5% acide acétique (v/v)) pendant environ 30 secondes, puis dans du méthanol pur. Ceci permet de mettre en évidence les protéines et de confirmer le transfert. La membrane est ensuite rincé dans du tampon de transfert afin d'éliminer les

traces de Ponceau.

VII.3.5. Blocage de la membrane

La membrane est déposée dans du tampon de blocage, sous légère agitation, soit à température ambiante pendant 2 ou 3 heures, soit à 4°C pendant toute une nuit.

VII.3.6 Immunomarquage

VII.3.6.1 Incubation avec l'anticorps primaire

Les anticorps primaires (Tableau II-7) sont dilués à différentes concentrations selon leur spécificité, dans du tampon d'incubation (tampon de rinçage, 5% de BSA (p/v)). La membrane est incubée avec l'anticorps primaire à 4°C pendant toute la nuit, sous agitation douce. L'incubation terminée, la membrane sera lavée 10 à 15 minutes trois fois, dans du tampon de rinçage sous agitation forte.

VII.3.6.2 Incubation avec l'anticorps secondaire

Les anticorps secondaires (Tableau II-8) utilisés dans cette étude sont des anticorps couplés à l'enzyme HRP, possédant une activité péroxydase. Les anticorps sont dilués dans du tampon d'incubation selon la concentration optimale. La membrane est incubée avec l'anticorps secondaire pendant environ 1 heure sous agitation. Après l'incubation, la membrane sera lavée 10 à 15 minutes trois fois, dans du tampon de rinçage sous agitation forte.

VII.3.7. Révélation par chimiluminescence

VII.3.7.1. Principe

La luminescence est définie comme étant l'émission de lumière résultant d'une dissipation d'énergie à partir d'une substance à l'état excité. Enhanced chimiluminescence ou ECL est considérée comme l'une des méthodes de détection les plus sensibles pour l'analyse du western blot. Dans la chimiluminescence, l'excitation d'une substance est due à une réaction chimique. L'HRP (Hydrogène Peroxyde) couplé à l'AC secondaire, catalyse l'oxydation du luminol (composant du kit de détection) dans des conditions alcalines. Le luminol à l'état excité, retourne à l'état fondamental en émettant une lumière qui est détectée grâce à un appareil de luminescence LAS4000 (Luminescence analyser System) et

les bandes obtenues sont analysées par le logiciel « Multi Gauge » qui évalue le taux relatif de marquage de la protéine et quantifie les résultats en terme de densité optique.

VII.3.7.2. Protocole

Les membranes sont incubées pendant 5 minutes à l'abri de la lumière avec un mélange des deux réactifs du kit ECL plus dans un rapport de 1/40, à raison de 125 µL/cm^2. Après élimination de l'excès de solution, les membranes sont enveloppées dans un film plastique transparent, ensuite placées dans l'enceinte de l'appareil LAS4000. Plusieurs essais de temps de révélation nous ont amenés à le fixer à 20 secondes, car c'est le temps nécessaire pour l'apparition des bandes sans qu'il y ait saturation. Enfin, la mesure de la densité optique des bandes a été faite avec le logiciel « Multi Gauge ».

VIII. Etude de l'expression de gènes par RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

VIII.1. Principe

La technique de PCR permet l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. La technique de RT-PCR quant à elle, permet l'amplification d'un fragment d'ADN qui est complémentaire à une molécule d'ARN donnée. Pour cela il est nécessaire d'extraire les ARNs messagers (ARNm) des cellules et de rétro transcrire les ARN en ADNc. Ces ADNc vont servir de matrice à la technique de PCR pour connaître l'expression des gènes à étudier à l'aide d'amorces spécifiques. La réaction de PCR se déroule en trois étapes : dénaturation, hydridation et élongation (Figure II-17). Grâce à l'utilisation des enzymes thermorésistances et à des cycles de température, cette technique permettra l'amplification d'un fragment d'ADNc choisi.

VIII.2. Réactifs

- RNeasy® mini kit (réf. 74104, Qiagen, France)
- Ethanol absolu (réf.32221, Sigma, France) utilisé à 75% (v/v dans de l'eau sans nucléase)
- iScript™ cDNA Synthesis Kit (réf. 170-8891, Bio-Rad, France).

- Eau DEPC (réf. 750024, Invitrogen, France)
- Solution de dNTP Mix10mM (réf. 18427-013, Invitrogen, France).
- Taq DNA Polymérase (réf. 10966-034, Invitrogen, France)
- Tampon de PCR 10x (sans $MgCl_2$) (réf. y02028, Invitrogen, France)
- Solution de $MgCl_2$ 10mM (réf. y02018, Invitrogen, France)
- Amorces des gènes (Tableau VIII-1) : (MWG-Biotech AG France)
- Tampon de charge 5x : Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, glycérol 25% (p/v), EDTA 5 mM, bleu de bromophénol 0.2% (p/v), Xylène Cyanol FF 0.2% (p/v) (réf, 161-0767, Bio-Rad, France)
- Agarose (réf. H070928, Euromedex, France) utilisé à 1,2% (dans un tampon d'électrophorèse TEB 0,5x)
- Tampon d'électrophorèse TEB 10x : acide borique 0,89 M, EDTA 20 mM, Tris 0,89 M (réf. 161-0733, Bio-Rad, France) utilisé à une concentration de travail de TEB 0,5x (v/v dans l'eau distillée)
- Bromure d'éthidium (réf. E-8751, Sigma, France) utilisé à 0,5µg/mL dans de l'eau
- Marqueur de taille d'ADN de 100pb (réf. 15628-019, Invitrogen, France)

Tableua II-10: Amorces et conditions de PCR des gènes *(GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; Tm : température de renaturation ; bp : base pair)*

Nom d'amorce	**Séquence (5'-3')**	**Tm (°C)**	**Produit prévu (bp)**
GAPDH	Reverse : AGAGGCAGGGATGATGTTCTGG Forward : AATCCCATCACCATCTTCCAGG	60	417bp
Sox9	Reverse : TCGCTTCAGGTCAGCCTTGC Forward : CCGATCTGAAGAAGGAGAGCGA	55	590bp
Collgène II	Reverse : AGTTTCAGGTCTCTGCAGGT Forward : AACTGGCAAGCAAGGAGACA	60	621bp

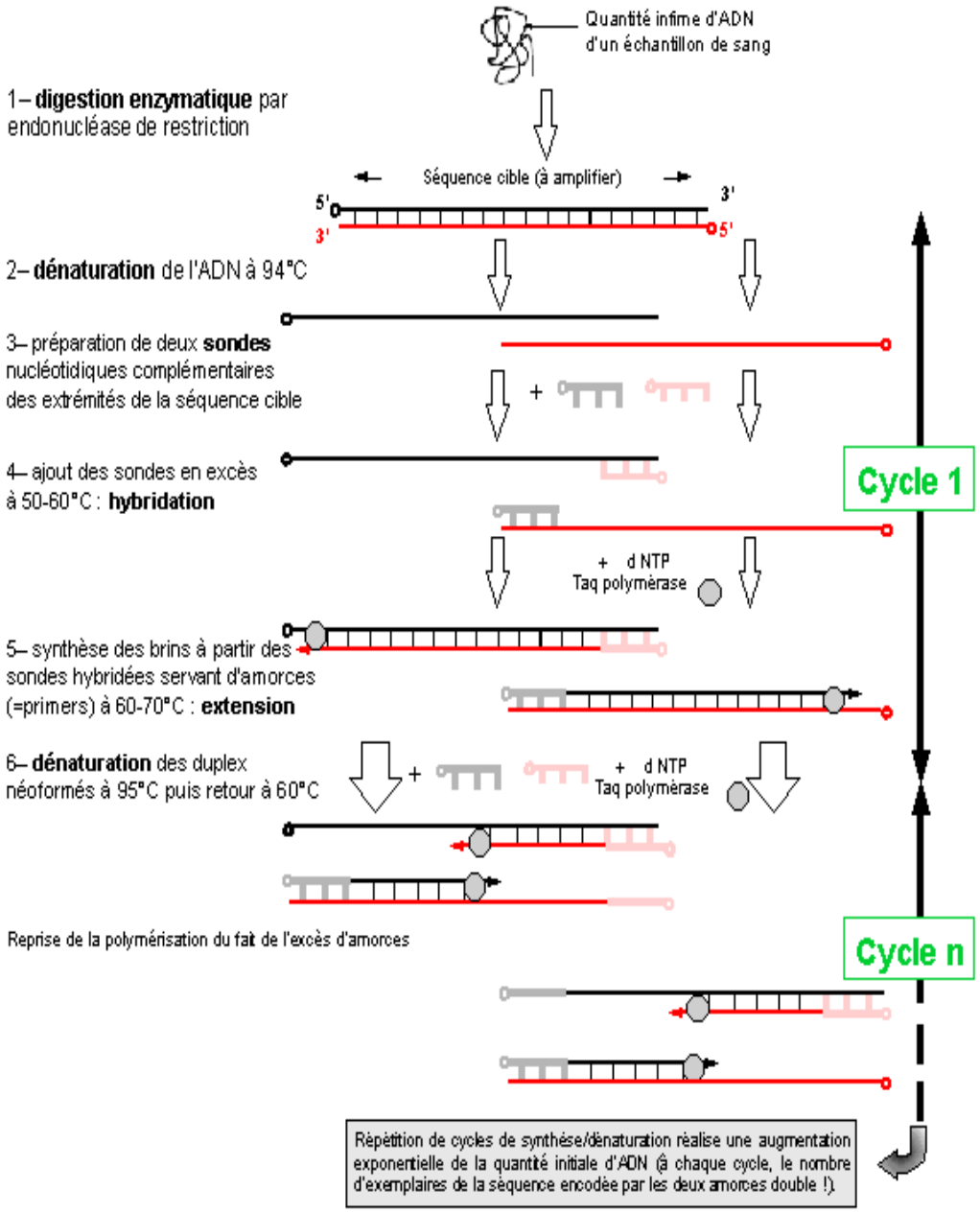


Figure II-17 : Principe de la technique de PCR. *(Les brins d'ADN complémentaires sont dénaturés à 95°C puis les amorces spécifiques se fixent sur les brins et enfin la polymérase synthétise les brins complémentaires à l'aide des oligonucléotides présents dans le milieu réactionnel.)*

[http://www.inrp.fr/Acces/biotic/biomol/techgen/html/schempcr.htm]

VIII.3. Protocole

VIII.3.1. Extraction des ARN totaux des cellules

Après les expériences de stimulations mécanique et biochimique, les cellules sont

rincées avec du tampon PBS à 37°C, puis, l'extraction d'ARN s'effectue selon les recommandations du kit d'extraction des ARNs, RNeasy mini kit. Le dosage des ARNs est réalisé par spectropotomètre (Thermo Scientific nanodrop 1000, USA), par la lecture de la DO aux longueurs d'onde de 260nm et 280nm. La longueur d'onde à 260 nm permet de détecter les acides nucléiques et la longueur d'onde à 280 nm permet de détecter les protéines. Le rapport DO260/DO280 permet de déterminer la qualité dans l'échantillon. Puis la concentration en ARN de l'échantillon est déterminée de la manière suivante : [ARN] µg/mL=DO_{260} x Dilution x 40.

VIII.3.2. Rétrotranscription des ARNm (RT)

L'ADNc est obtenu à partir de 100 fg jusqu'à 1µg d'ARN par transcription inverse en utilisant des amorces de polydT se fixant sur la séquence poly-Adénylée des ARNm. La RT est réalisée dans un mélange final de 20 µL (Tableau II-11).

Tableau II- 11 : Composants de la réaction de rétrotranscription.

Composant	Volume par réaction
iScript Reaction Mix 5x	4µL
iScript Reverse Transcriptase	1µL
eau sans nucléase	XµL
Gabarit d'ARN	XµL
Volume total	20µL

Le mélange complet de la réaction est incubé 5 minutes à 25°C, puis 30 minutes à 42°C. Après une incubation de 5 minutes à 85°C, il est maintenu à 4°C. La réaction est exécutée dans un MyCycler™ (Bio-Rad, USA). Les ADNc peuvent être gardés à -80°C jusqu'à la réalisation de PCR.

VIII.3.3. Réaction de PCR

La phase d'amplification est réalisée dans un mélange final de 50 µL (Tableau II-12)

Tableau II-12 : Composants de la phase d'amplification.

Composant	Volume par réaction
Tampon de PCR10x	5µL
$MgCl_2$ 50mM	1,5µL
dNTPs Mix 10 mM	1µL
amorce de forward 10µM	1µL
amorce de reverse 10µM	1µL
Taq Polymérase	0,4µL
ADNc	2µL
eau de DEPC	38,1µL
Volume total	50µl

Après une étape de dénaturation à 94°C pendant 3 minutes, l'amplification jusqu'à saturation de l'ADNc se fait selon 30 cycles dans le MyCycler. Le schéma d'un cycle est le suivant :

- 30 secondes de dénaturation à 94°C
- 60 secondes d'hybridation des amorces à 58°C
- 60 secondes d'élongation à 72°C

Ce cycle est répété 35 fois, puis les échantillons sont soumis à 10 minutes d'élongation à 72°C. Ensuite ils sont maintenus à 4°C. Les ADN peuvent être gardés à -80°C jusqu'à la réalisation de l'électrophorèse.

VIII.3.4. Electrophorèse des produits d'ADNs

VIII.3.4.1 Préparation du gel

1,2 g d'agarose sont dissous dans 100 mL de tampon d'électrophorèse TEB 0.5x, puis le tout est chauffé jusqu'à ce que la solution devienne transparente. Ensuite, on laisse reposer la solution de gel jusqu'à l'obtention d'une température environ de 60°C. La solution gel est alors transférée dans une cuve dans laquelle est placé un peigne. Lorsque le gel est polymérisé, le peigne est retiré formant ainsi des puits pour déposer les échantillons d'ADN.

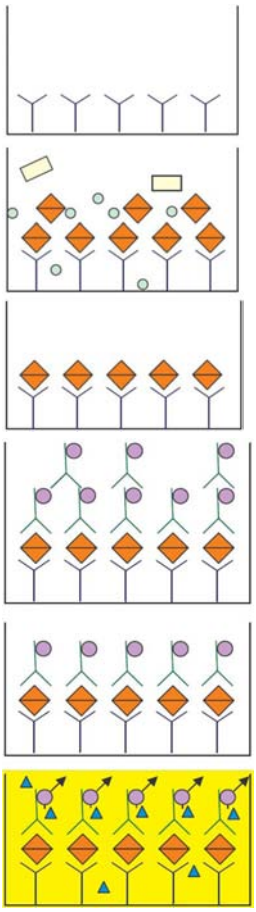
VIII.3.4.2 Migration

8 µL d'échantillon d'ADN sont mélangés avec 2 µL de tampon de charge 5x, 0,8µL de marqueur de taille avec 0,2µL de tampon de charge 5x, sont déposés parallelement, puis déposés dans les puits de gel. La migration est réalisée à un voltage constant de 100V pendant 45 minutes environ dans du tampon TEB 0.5x Puis le gel est coloré au bromure d'éthidium pendant 30 min. Les fragments d'ADN amplifiés sont visualisés sous rayonnement ultra-violet (Bio-Rad gel doc 1000, USA) et photographiés. La taille des fragments est comparée à un marqueur de taille. L'analyse densitométrique est alors réalisée avec le logiciel d'image *Quantity One* (BioRad, USA).

IX. Etude de la concentration de TGFβ-1 dans le milieu de culture par ELISA

IX.1 Le principe d'ELISA

La technique d'ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) est une technique immuno-enzymique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps. Parmi les différents types d'ELISA, on y trouve la technique ELISA sandwich. Elle utilise un premier anticorps spécifique de la protéine recherchée qui est immobilisé sur un support plastique et qui va capter la protéine recherchée. Dans un deuxième temps, un deuxième anticorps spécifique, couplé à une enzyme (un conjugué), est fixé sur la protéine d'intérêt. Le système est ensuite révélé par l'addition d'un substrat qui se colore (Figure II-18).



1) Fixation les anticorps sur les microplaques

2) Incubation de la plaque avec l'échantillon

3) Lavage : 4 fois avec un tampon de lavage

4) Détection : incubation avec les anticorps conjugué à l'enzyme

5) Lavage: 4 fois avec du tampon de lavage

6) Révélation (addition du substrat) : une réaction colorée indique la présence d'un échantillon positif

Figure II-18 : Principe et étapes principales d'ELISA. *(: anticorps de capture, : antigène specifique recherché, : substrat de l'enzyme, : anticorps conjugué à l'enzyme, : antigènes quelconques présents dans l'échantillon)*

[http://www.mercier-groupe.com/Images/Labo/ELISA.pdf]

IX.2. Réactifs

- Immunoassay kit : BIOSOURCE, Réf : KAC1688/KAC1689
  - ✧ Microplaque de 96 puits, fixée avec l'anticorp de TGFβ-1
  - ✧ Tampon d'extraction
  - ✧ Tampon de dilution
  - ✧ Anti- TGFβ-1 conjuguée à la biotine
  - ✧ Streptavidine-Peroxydase (HRP)
  - ✧ Chromogène stabilisé
  - ✧ Tampon de lavage
  - ✧ Tampon de stop
  - ✧ Couverture de plaque

IX.3. Protocole

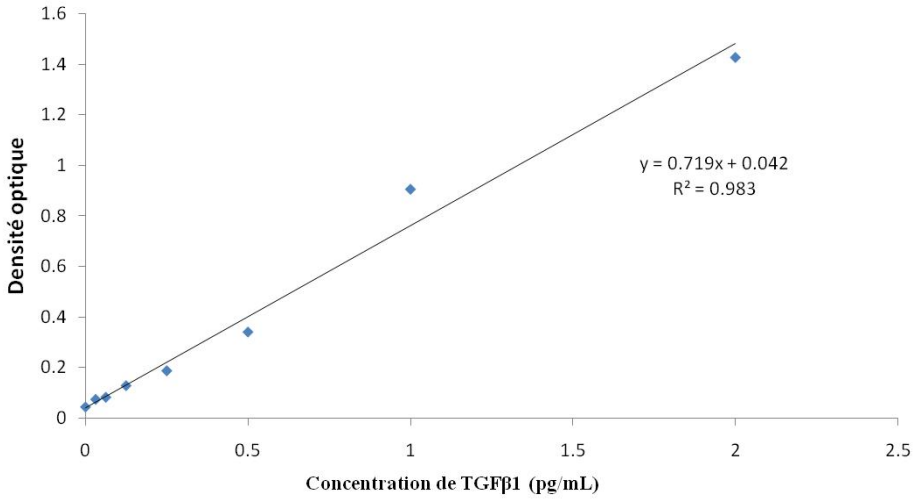
Les milieux de culture sont récupérés après chaque expérience. Ils sont soit utilisés immédiatement, soit gardés à -80°C.

Pour le dosage du TGFβ-1, les milieux sont traités d'abord avec du tampon d'extraction pendant 30 minutes à 4°C afin de libérer le TGFβ-1 du complexe latent.

Ensuite, selon les recommandations du kit, les molécules de TGFβ-1 sont capturées par les anticorps anti-TGFβ-1 présentes sur la microplaque. Après lavages, des anticorps anti- TGFβ-1 conjugués à l'enzyme HRP sont ajoutés. La concentration de TGFβ-1 est déterminée grâce une réaction colorimétrique. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 450 nm avec un lecteur de plaques (Bio-Rad, Model 680 microplate reader) en utilisant le logiciel Microplate manager.

La concentration de TGFβ-1 est déterminée grâce à une gamme étalon de TGFβ-1 réalisée aux concentrations suivantes : 0 / 31,2 / 62,5 / 125 / 250 / 500 / 1000 / 2000 pg/mL. Pour chaque échantillon, le dosage a été réalisé en double.

Gamme étalon :

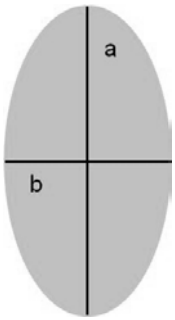


X. Etude de l'élongation des cellules par microscope optique

Après application de l'étirement sur les cellules, nous avons évalué l'indice d'élongation des cellules à l'aide d'un logiciel de traitement d'image (ImageJ).

L'indice d'élongation est le rapport entre le petit et le grand axe de la cellule.

Lorsqu'il est compris entre 0 et 0,5, la cellule est allongée, et lorsqu'il est compris entre 0,5 et 1, la cellule est arrondie.



I = b/a

0<I<0.5 ➔ cellules allongées

0,5<I<1 ➔ cellules arrondies

Figure II-19 : Méthode d'analyse de l'indice d'élongation des cellules.

Cette analyse repose sur 100 cellules. Toutes les cellules de chaque image sont prises en compte. Les images sont acquises à la fin de l'étirement. Les valeurs ainsi obtenues sont exploitées à l'aide d'un logiciel (Microcal Origin 6.0) où les résultats sont exprimés sous forme des histogrammes représentant l'indice d'élongation des cellules en fonction du nombre d'événements.

XI. Analyse statistique

Toutes les données sont présentées en moyenne ±*erreur standard de la moyenne*. Les différences statistiques entre les groupes d'expériences ont été analysées par une analyse de variance de l'ANOVA à une direction à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, USA). Un test T de *Turky* a été effectué et les valeurs *p* inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Partie I : Optimisation des conditions de culture pour l'isolement et l'expansion des CSMs

Les CSMs humaines représentent une source des cellules souches adultes pour l'ingénierie cellulaire et tissulaire. Comme nous l'avons mentionné précédemment, il existe différentes sources de CSMs, parmi lesquelles la moelle osseuse. Etant donné le faible nombre des CSMs contenues dans la moelle osseuse, l'expansion *in vitro* est une étape préalable indispensable à leur utilisation en recherche. Ainsi, la définition des conditions de culture est une phase importante qui permet d'assurer un taux d'expansion optimal ainsi que le maintien du potentiel de différenciation des CSMs. En effet, plusieurs études ont montré la sensibilité des CSMs à la densité d'ensemencement, au nombre de passages, au milieu de culture et aux facteurs de croissance [Sotiropoulou PA et al, 2008 ; Pountos I et al, 2007 ; Yokoyama M et al, 2008].

Cette première partie du travail a donc consisté en l'optimisation des conditions d'isolement et d'expansion (milieu, densité d'ensemencement et surface) des CSMs en l'absence de facteurs de croissance exogènes autres que ceux apportés par le sérum de veau fœtal. Pour cela, la morphologie cellulaire, la capacité de formation des colonies et la prolifération cellulaire ont été étudiées. Une fois les conditions optimales pour l'isolement et l'expansion définies, nous avons confirmé le phénotype des CSMs.

I.1. Caractérisation morphologique des CSMs

La morphologie des CSMs a été étudiée en microscopie optique à contraste de phase. Les cellules ont été observées dans les différentes conditions de culture. Les CSMs montrent une forme axiale ou une morphologie semblable aux fibroblastes (Figure III-1). Après 3 jours de culture, les CSMs humaines ont adhéré à la surface du plastique, et se présentent sous la forme d'une petite population de cellules isolées. Six jours après l'ensemencement initial, les cellules ressemblent à de longues cellules fibroblastiques et commencent à former des colonies. Après 21 jours de culture on observe, en fonction du prélèvement et des conditions de culture, soit de grandes colonies de cellules fusiformes semblables aux fibroblastes, soit des petites colonies de cellules plus larges et aplaties. Au

centre des colonies, les cellules sont confluentes, plus on s'éloigne du centre, plus les cellules s'isolent. Les observations montrent que les cellules des petites colonies sont moins confluentes que celles des grandes. Les images au microscope optique montrent que la morphologie des CSMs et des colonies est influencée par les conditions de culture (Figure III-2). Les colonies observées dans du milieu α-MEM sont plus grandes et plus confluentes que celles observées dans du milieu DMEM-LG.

Deux types majoritaires des cellules ont été identifiés. Les cellules de type I sont des cellules fusiformes à prolifération rapide tandis que les cellules de type II sont des cellules larges à prolifération beaucoup plus lente. Le nombre des cellules de type II augmente au cours de passages. Les résultats montrent un nombre plus important des cellules de type II dans le milieu DMEM-LG que dans le milieu αMEM (Figure III-1). Ces cellules se situent principalement à l'extérieur des colonies.

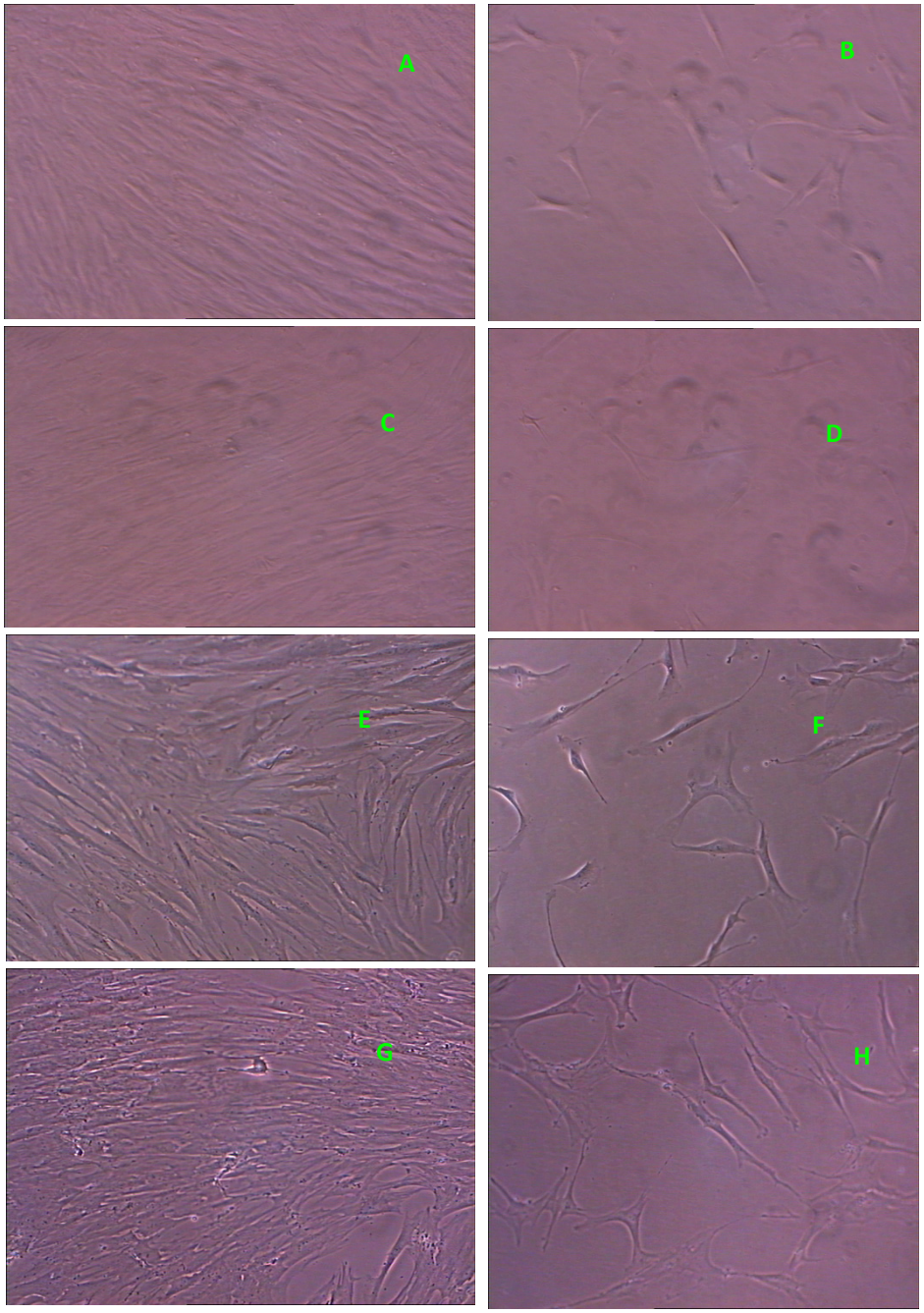


Figure III-1 : Morphologie des cellules dans les milieux α-MEM (A, B, C, D), et DMEM-LG (E, F, G, H) (microscope optique).

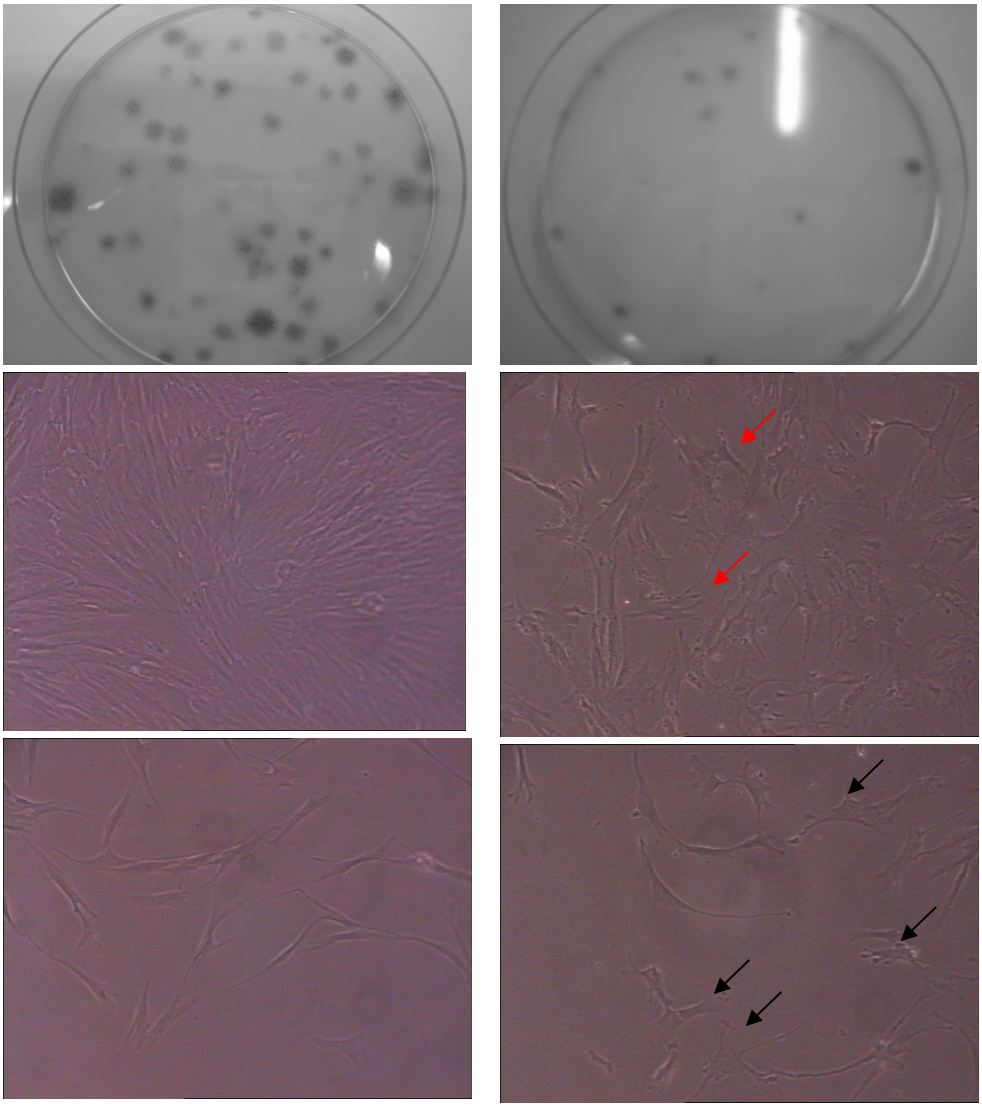


Figure III-2 : Morphologie des cellules dans les colonies obtenues dans α-MEM (gauche) ou DMEM-LG (droite). *(flèches rouges : espaces intercellulaires, flèches noires : larges cellules)*

Tableau III-1 : Caractéristiques des cellules selon les conditions de culture initiales.

Conditions de culture			Résultats		
Milieux	Flacons de culture	Densité (CMN/cm2)	Colonies	Cellules de type I	Cellules de type II
α-MEM	25 cm^2	50 000	Très grandes	+++	+/-
α-MEM	25 cm^2	10 000	Très grandes	+++	+/-
D-MEM	25 cm^2	50 000	Grands	++	+
D-MEM	25 cm^2	10 000	Petites	+	++
α-MEM	75 cm^2	50 000	Moyennes	++	+
α-MEM	75 cm^2	10 000	Petites	+	++

I.2. Formation de colonies (CFU-Fs)

La capacité à former des colonies (CFU-Fs) est une des caractéristiques des cellules souches. En effet toutes les cellules d'une colonie sont issues d'une seule cellule et forment ainsi un clone. De ce fait, la qualité de l'échantillon sera déterminée entre autre, par le nombre de colonies obtenues en culture dite clonogénique. Nous avons d'abord dénombré les colonies obtenues à partir de culture dans de l'αMEM et du DMEM-LG de CMNs provenant des différents prélèvements de moelle osseuse. Les résultats montrent que le nombre de colonies obtenu dans de l'αMEM est supérieur à celui obtenu dans du DMEM-LG avec un ratio égal à 2,46 ± 0,12.

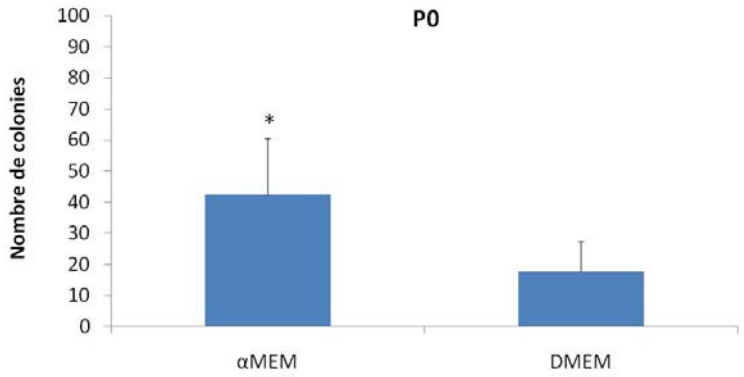


Figure III-3 : Effet du milieu de culture sur le nombre de colonies de CSMs en P0 (*p<0,05) (n = 4).

Le test CFU-F lors des passages suivants nous permet de confirmer le choix des conditions de culture initiales. Pour chaque condition nous avons réalisé des essais clonogéniques avec 1000 cellules par boîte de Petri en conservant le milieu de culture initial. La figure III-2 montre que les cellules cultivées dans du αMEM continuent à produire plus de colonies que celles cultivées dans du DMEM-LG, tant au passage 1 qu'au passage 2. La comparaison de l'effet de la densité initiale d'ensemencement montre qu'à 50000 CMN / cm^2 on obtient un nombre de colonies plus important. De plus, la surface des boîtes de culture dans lesquelles ont été réalisées les cultures ne semble pas influencer la qualité des cellules. Cependant, à partir de P2, le nombre des colonies ne varie pas en fonction des conditions de culture.

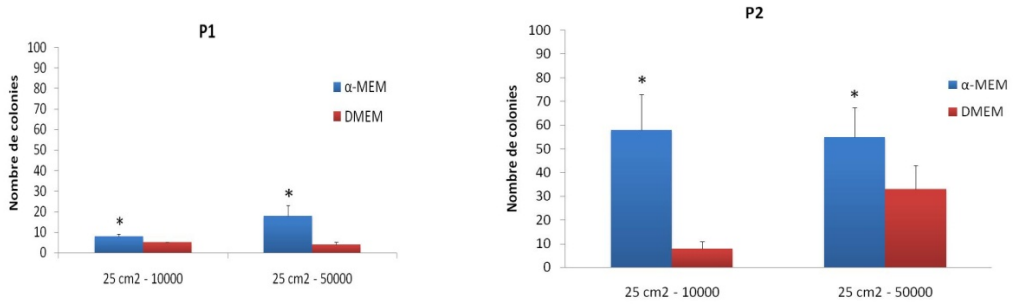
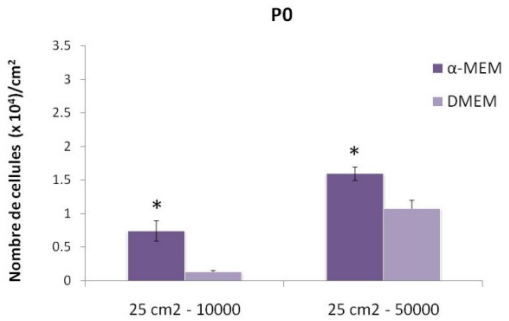


Figure III-4 : Effet des conditions de culture sur le nombre de colonies de CSMs en P1 et P2 (*p<0,05) (n = 4).

I.3. Prolifération cellulaire

Dans un premier temps on recherche le rendement de CSM par rapport au nombre de CMN initial. On cultive pendant 21 jours les CMN dans les différentes conditions citées précédemment. Les cellules sont trypsinées et comptées. Les résultats sont présentés sur la figure III-1. Le rendement est optimum en milieu αMEM dans des boîtes de 25 cm^2. De plus, la densité d'ensemencement de 10000 cellules/ cm^2 favorise la prolifération.

Dans un deuxième temps on utilise pour comparer les conditions de culture l'indice PD (*population doubling*) qui reflète la capacité de prolifération, plus les cellules prolifèrent, plus le PD est élevé. Cet indice est calculé sur les cellules en passage P1 et P2 selon la formule **PD= (log Nf/Ni) / log 2**, où Nf est le nombre de cellules final et Ni le nombre de cellules initial. Les résultats montrent que le PD est le plus élevé pour les cultures dans du milieu αMEM. De plus, c'est avec une densité de départ de 50000 CMN/cm^2 à P0 que l'on obtient le PD le plus élevé lors des passages P1 et P2.



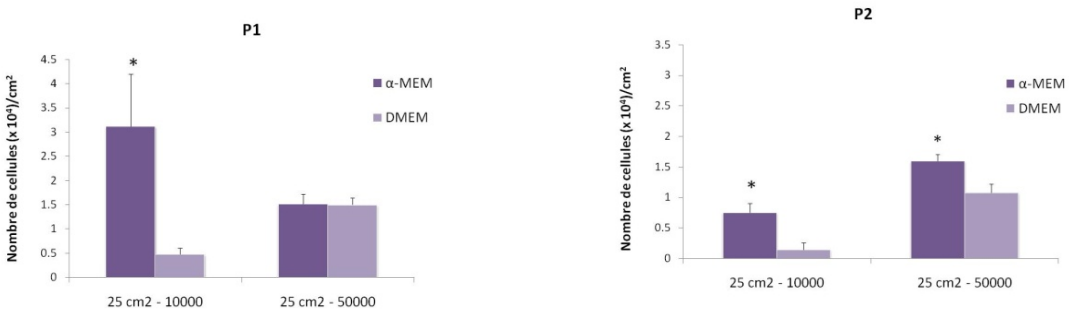


Figure III-5 : Etude de l'effet du milieu de culture sur le nombre des cellules de P0, P1 et P2 (*p<0,05) (n = 4).

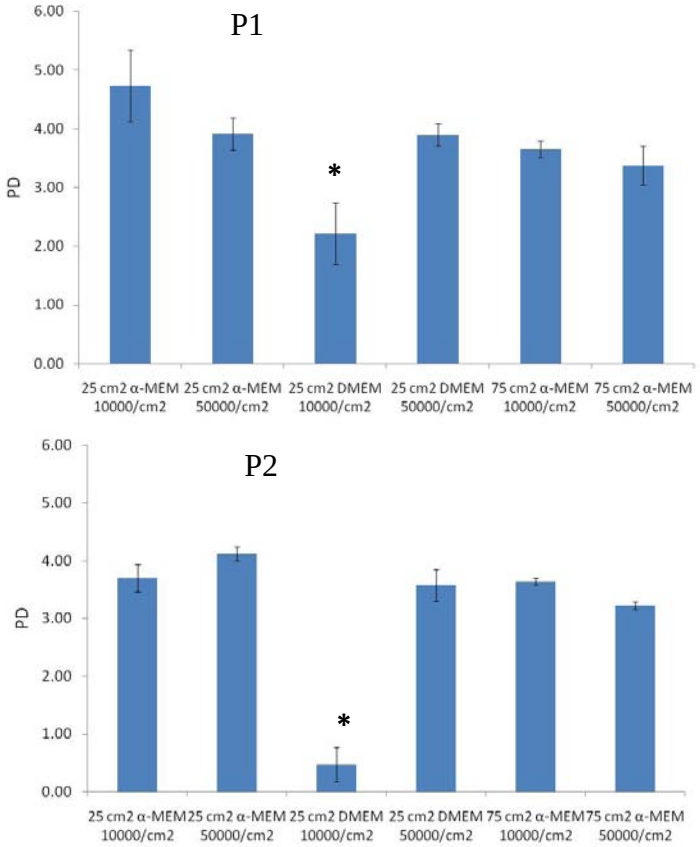


Figure III-6 : Etude du « *population doubling* » (PD) des cellules en P1 et P2 (*p<0,05) (n = 3).

I.4. Caractérisation phénotypique des cellules

Nous avons analysé, par cytométrie en flux, le phénotype des cellules avec des marqueurs de surface caractéristiques des CSMs et des CSHs. C'est ainsi que nous avons étudié en parallèle l'expression des molécules CD34, CD45, CD105, CD73, CD90 et CD166 à la surface de nos cellules.

Nos résultats montrent que les cellules n'expriment pas les récepteurs CD34 et CD45, molécules caractérisant les CSHs. En revanche, les cellules expriment les récepteurs CD90,

CD105, CD73 et CD166, qui sont caractéristiques des CSMs.

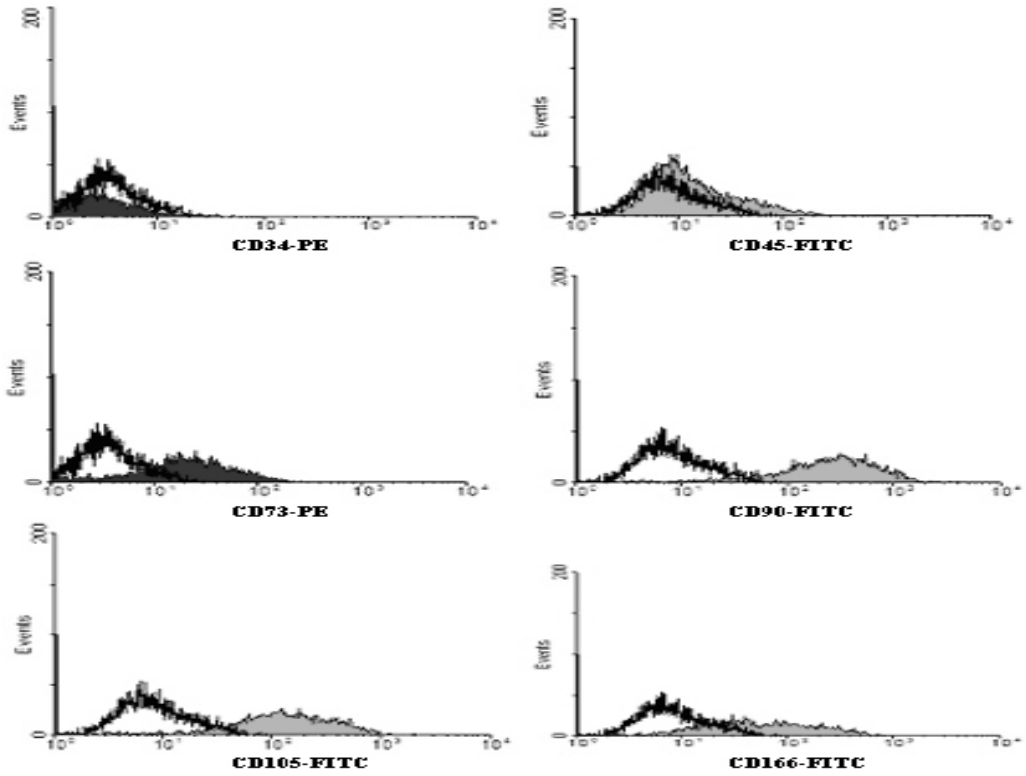


Figure III-7 : Expression des marqueurs CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 et CD166 à la surface de CSMs humaines.

Les CSMs ont été marquées avec des anticorps monoclonaux spécifiques des marqueurs étudiés.

☐ : *cellules marquées avec un anticorps isotopyque,*

■ : *cellules marquées avec les anticorps monoclonaux spécifiques du marqueurs de surface étudiés et couplés à un fluorochrome (PE ou FITC).*

I.5. Discussion :

Par leur facilité d'obtention et de manipulation, et grâce à leurs propriétés de différenciation, les CSMs constituent aujourd'hui un outil très intéressant en ingénierie tissulaire. Les CSMs sont généralement issues de la moelle osseuse par aspiration au niveau de la crête iliaque [Digirolamo CM et al, 1999] mais aussi du tibia ou du fémur [Murphy JM et al, 2002]. Comme les CSMs représentent une faible fraction des cellules mononucléaires totales de la moelle, l'isolement et l'expansion cellulaire sont des étapes essentielles pour en obtenir une quantité suffisante. Cependant, une diminution de la capacité de prolifération et différenciation des CSMs, après un certain nombre de passages, a déjà été montrée [Paniushin OV et al, 2006]. Pour ces raisons, cette partie du travail avait comme objectif d'optimiser l'isolement et l'expansion cellulaire en monocouche des CSMs. La capacité d'expansion des CSMs dépend d'une part des caractéristiques du donneur telles que l'âge, le sexe ou l'état de santé et d'autre part, des conditions de culture, notamment, de la composition du milieu et de la densité d'ensemencement.

L'addition de facteurs de croissance dans le milieu de culture favorise la prolifération des CSMs. Le bFGF est le facteur de croissance le plus utilisé dans la culture de CSMs. Plusieurs études ont prouvé son effet bénéfique sur la capacité de prolifération et différenciation des CSMs [Hori Y et al, 2004]. Cependant, il a été montré que l'addition de bFGF dans le milieu de culture induit une altération de certaines propriétés des CSMs. Une induction des molécules HLA-DR et une augmentation de molécules HLA de classe I ont été observées sur des CSMs cultivées en présence de bFGF [Solchaga LA et al, 2005]. Par ailleurs, la diminution de l'expression du récepteur de l'acide hyaluronique, le CD44, a été montrée [Sotiropoulou PA et al, 2008]. Enfin, la culture des CSMs en présence du bFGF favoriserait le potentiel de différentiation de ces cellules vers les phénotypes ostéoarticulaires [Ponta H et al, 2003]. Nous avons alors dans ce travail, choisi de cultiver les cellules en absence du facteur de croissance bFGF.

Le choix du milieu de culture est un élément crucial pour l'obtention de CSMs de bonne qualité. Différents milieux de culture ont été utilisés jusqu'ici par différentes équipes.

Les milieux les plus employés sont l'α-MEM ou le DMEM à faible teneur en glucose et contenant du sérum de veau fœtal à des concentrations de 10 ou 20%. Le milieu de base aussi bien que le sérum sont déterminants pour l'expansion des CSMs. Sotiropoulou *et coll* ont comparé l'impact de 8 milieux de culture différents sur la prolifération des CSMs [Sotiropoulou PA et al, 2008]. Les résultats obtenus sont très variables selon les différents milieux avec un meilleur résultat pour le milieu α-MEM. Ceci a été confirmé par des autres études comparatives. Nos résultats sont en accord avec ces études et montrent un taux de prolifération des cellules supérieur dans de l'α-MEM.

Peu d'études montrent l'effet de la densité d'ensemencement des CMNs pour l'isolement des CSMs. Nos résultats montrent que la densité initiale d'ensemencement des CMNs a un impact sur le taux de prolifération dans les premiers passages d'expansion et sur la qualité des cellules.

Cependant, plusieurs études ont montré que la densité d'ensemencement est un paramètre critique afin d'assurer un taux d'expansion optimal ainsi qu'un maintien du potentiel de différenciation des CSMs. Des faibles densités d'ensemencement favorisent le taux d'expansion des cellules. Il faut donc définir un compromis qui est fonction de la quantité de cellules nécessaires pour l'étude, du volume du prélèvement et des impératifs techniques. En effet, plus les surfaces de culture sont importantes, plus les temps de manipulation sont longs et plus les risques d'incidents (contamination, perte de produit, etc.) augmentent.

L'origine et la concentration de sérum sont également des paramètres importants pour l'expansion des CSMs [Pountos I et al, 2007]. Les milieux utilisés le plus souvent aujourd'hui contiennent du sérum de veau fœtal (SVF). Pourtant, le SVF est un sérum d'origine animale, et peut être source de contaminations. Donc, des travaux ont été réalisés afin de comparer le SVF avec le sérum autologue humain. Un certain nombre d'études suggère que le sérum autologue est inférieur ou équivalent du sérum d'animal, mais peuvent soutenir l'expansion de CSMs [Koller MR et al, 1998 ; Lin HT et al, 2005 ; Schecroun N et al, 2004 ; Stute N et al, 2004 ; Yamamoto N et al, 2003]. D'autre part, plusieurs études ont suggéré que le sérum autologue est supérieur au SVF [Hankey DP et al,

2001 ; Kobayashi T et al, 2005 ; Kocaoemer A et al, 2007 ; McAlinden MG et al, 2000 ; Shahdadfar A et al, 2005]. En ce qui concerne la concentration de SVF, Yokoyama M *et al* ont montré que les CSMs peuvent conserver leur capacité de différenciation chondrocytaire quand elles sont en culture *in vitro* avec du SVF à 10% mais pas lorsque la concentration en SVF est de 0.1% ou 1% [Yokoyama M et al, 2008].

Etant donné que les propriétés d'adhésion au plastique ne sont pas suffisantes pour caractériser les cellules souches mésenchymateuses, une étude phénotypique est réalisée par cytométrie en flux. A ce jour aucun marqueur spécifique des CSMs n'a été identifié et leur caractérisation est réalisée par l'absence et la présence des certains récepteurs. Nos résultats montrent que les cellules, cultivées en monocouche, possèdent un phénotype $CD34^-$, $CD45^-$, $CD73^+$, $CD90^+$, $CD105^+$ et $CD166^+$. Il apparaît ainsi que les récepteurs spécifiques des cellules hématopoïétiques (CD34 et CD45) sont absents de la surface des cellules cultivées. En revanche, les cellules expriment les récepteurs CD73, CD90 et CD105. Même si certains de ces marqueurs sont également exprimés à la surface d'autres types cellulaires, comme le CD105 exprimé à la surface des cellules endothéliales [Cheiftz S et al, 1992], ces 3 marqueurs exprimés conjointement permettent d'identifier les CSMs [Alsalameh S et al, 2004]. Enfin, les cellules cultivées expriment également le récepteur CD166. Ce marqueur est décrit pour être présent à la surface des CSMs indifférenciés et pour disparaître lorsque les cellules s'engagent dans la voie ostéogénique [Bruder SP et al, 1992]. Ainsi, l'absence de CD34 et CD45 et l'expression conjointe des récepteurs CD73, CD90, CD105 et CD166 permet de confirmer que les cellules adhérentes cultivées sont bien des CSMs non différenciées.

En conclusion, cette première partie du travail nous a permis d'optimiser les conditions de culture pour isoler et amplifier les cellules souches mésenchymateuses dans la suite de nos travaux. Ainsi, nous avons mis en évidence l'importance du milieu de culture, de la densité initiale d'ensemencement et de la surface de culture dans l'isolement et l'expansion des CSMs. Les conditions choisies sont présentées dans le tableau III-2.

Tableau III-2 : Conditions de culture choisies pour les experiences.

Paramètres	Conditions choisies
Milieu de culture	α-MEM, 10% SVF
Boîtes de culture	25 cm^2 P0, P1, P2, puis 75 cm^2
Densité d'ensemencement pour l'isolement	50000 CMNs/cm^2
Densité d'ensemencement pour la culture	1000 cellules/cm^2
Passage d'utilisation des cellules	P4

Partie II : Etude de l'effet du TGF-β1 sur les CSMs et les chondrocytes

Les CSMs issues de la moelle osseuse peuvent se différencier en plusieurs types de cellules : ostéocytes, chondrocytes, cellules musculaires, adipocytes. Les facteurs de croissance membres de la famille du TGFβ jouent un rôle déterminant sur l'orientation de la différenciation des CSMs. Les membres de la famille du TGFβ comprennent les TGFβs, les BMPs et les activines. Les TGFβs ont une grande importance dans la chondrogenèse. En effet, les TGFβs activent les premiers stades de la différenciation en chondrocyte et ostéocyte, tandis qu'ils inhibent la myogenèse, l'adipogenèse, et la fin de l'étape de la différenciation ostéoblastique [Roelen BA et al, 2003].

Les protéines TGFβs transmettent le signal à l'intérieur de la cellule à travers un complexe de récepteurs de "type I" et de "type II" (RI et RII) à la surface cellulaire. Ensuite, les protéines des R-Smads (Smad2/3) sont phosphorylées et s'associent avec Co-Smad (Smad4), puis, ce complexe trimérique translocalise dans le noyau, où les protéines Smads fonctionnent comme facteurs de transcription [Ross S et al, 2008].

Pendant la différenciation des CSMs en chondrocytes, la protéine Smad3, et non la Smad2, joue un rôle assez important [Yang X et al, 2001]. De plus, Smad3 peut s'associer avec Sox9 et stimuler son activité de transcription [Furumatsu T et al, 2005].

Dans cette partie du travail, nous avons étudié l'effet du TGF-β1 sur la prolifération et la différenciation initiale des CSMs humaines, par l'indice du métabolisme cellulaire, la viabilité cellulaire, le cycle cellulaire, l'expression de la phosphorylation de la protéine Smad3 et l'expression des gènes des facteurs de transcription Sox9, Runx2 et PPARγ.

II.1. Effet du TGF-β1 sur la viabilité cellulaire

Afin d'étudier l'effet de différentes concentrations en TGF-β1 sur la viabilité des cellules, le kit Vybrant / Apoptosis a été utilisé. Il permet de déterminer le pourcentage des cellules vivantes, en apoptose ou en nécrose, présentes dans un échantillon. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure III-8. On peut constater que les 5 concentrations de TGF-β1 utilisées n'affectent pas la viabilité des cellules. En effet on observe que, aussi bien dans le témoin (0 ng/mL) que dans les échantillons incubés avec du TGF-β1, le pourcentage de cellules vivantes avoisine le 100%.

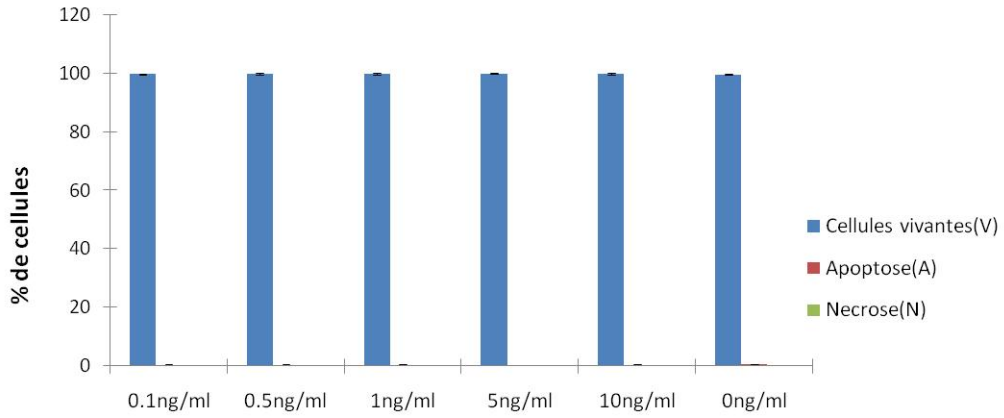


Figure III-8 : Etude de la viabilité des CSMs soumises à différentes concentrations de TGF-β1 à l'aide du kit Vybrant / Apoptosis ™ (n=3).

II.2. Effet du TGF-β1 sur le métabolisme des CSMs

L'analyse du métabolisme cellulaire après incubation avec du TGF-β1 a été réalisée par une méthode colorimétrique, l'Alamar Blue. Le métabolisme est alors présenté sous la forme de pourcentage de réduction par cellule. Plus sa valeur est élevée, plus le métabolisme cellulaire est important. La figure III-9 montre les résultats obtenus. On peut constater que l'addition de TGF-β1 dans le milieu de culture diminue le métabolisme des cellules par rapport au milieu sans facteur de croissance. Cette diminution est moins importante à une concentration de 5 ng/mL et plus importante à une concentration de 10 ng/mL.

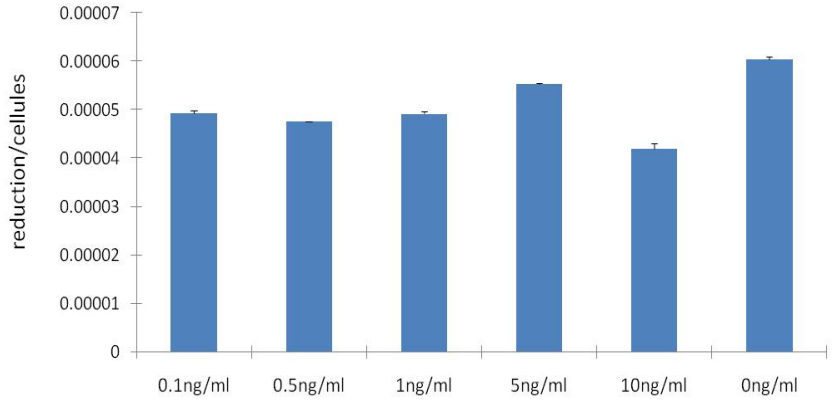


Figure III-9 : Etude du métabolisme des CSMs soumises aux différentes concentrations de TGF-β1 en utilisant l'Alamar Blue (n=3).

II.3. L'effet du TGF-β1 sur le cycle cellulaire des CSMs

L'étude de l'effet du TGF-β1 sur le cycle cellulaire a été effectuée par cytométrie en flux. Deux concentrations de TGF-β1 ont été testées, 5ng/mL et 10 ng/mL, auxquelles s'est ajouté un contrôle sans facteur de croissance. Les cellules ont été cultivées en plaques de 6 puits pendant un jour et trois jours. Il semble qu'après 1 jour de culture, la population cellulaire en phase S augmente pour les deux concentrations en TGF-β1. Par contre, au bout de 3 jours, elle diminue aux deux concentrations (Fig III-10 et Fig III-11).

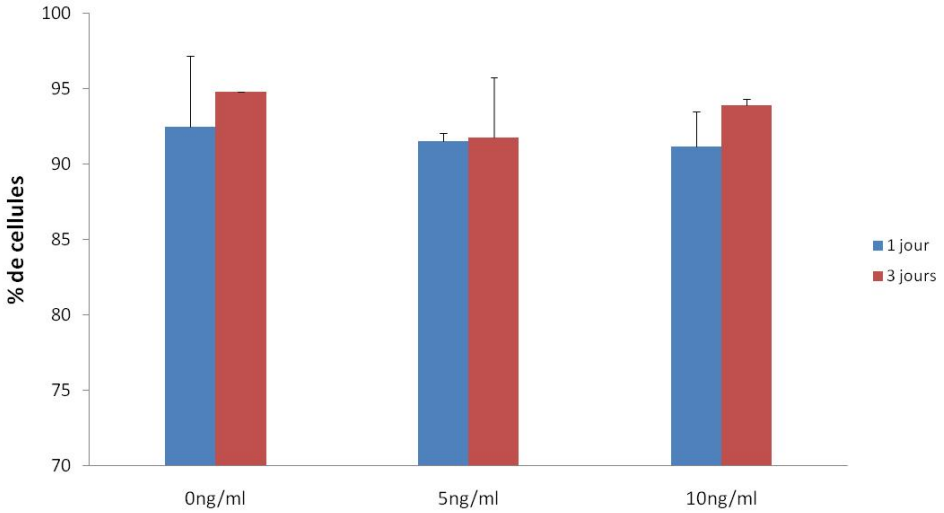


Figure III-10 : Analyse la phase de G1 du cycle cellulaire des CSMs (n=3).

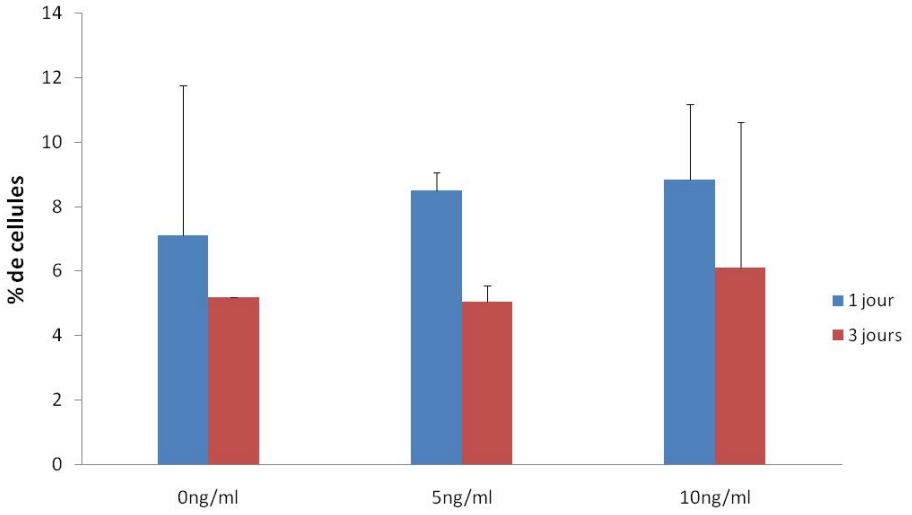


Figure III-11 : Analyse la phase de S du cycle cellulaire des CSMs (n=3).

II.4. Etude de l'effet du TGF-β1 sur la phosphorylation de Smad3 (Smad3p) dans les CSMs et les chondrocytes

Dans la littérature, il est rapporté que plusieurs concentrations en TGF-β1 (1, 2, 5, 10 ou 12,5 ng/mL) ont été étudiées, et ceci sur différents types de cellules : musculaires lisses, fibroblastes, CSMs du lapin ou bovines, etc [Seay U et al, 2005; Palmer G et al, 2000; Watanabe H et al, 2001]. Dans notre étude, trois concentrations en TGF-β1 ont été utilisées : 1, 5 et 10 ng/mL afin d'analyser la réponse des CSMs à ce facteur de croissance. Les cellules ont été incubées pendant une heure avec les différentes concentrations en TGF-β1. Après ce temps, soit les cellules ont été fixées soit leurs protéines ont été extraites.

La quantification des protéines Smad3 phosphorylées a été réalisée par western blot. Les résultats montrent que la présence du TGF-β1 induit une augmentation de pSmad3, avec un effet dose-dépendant (Figure III-12). Le maximum est obtenu à une concentration de 5 ng/mL, tandis qu'à 1ng/mL ou à 10 ng/mL l'effet est moins important.

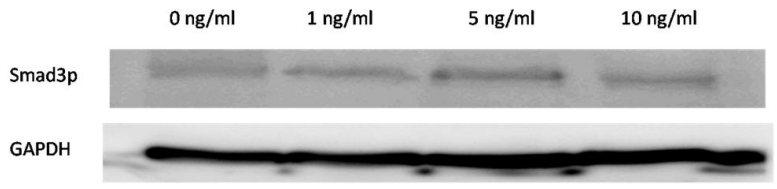


Figure III-12: Expression de Smad3p dans les CSMs soumises aux différentes concentrations de TGF-β1 pendant 1 heure par western-blot (image représentative de 3 expériences).

Afin d'étudier la localisation cellulaire des protéines pSmad3, les cellules ont été observées en microscopie de fluorescence après immunomarquage. Les images montrent qu'en l'absence de TGF-β1 le nombre de protéines pSmad3 est faible. De plus leur localisation est diffuse dans toute la cellule. L'addition du TGF-β1 dans le milieu de culture entraîne d'une part l'augmentation des protéines pSmad3 et d'autre part leur translocation nucléaire. Cet effet semble être dépendant de la dose avec cependant un maximum à 5 ng/mL.

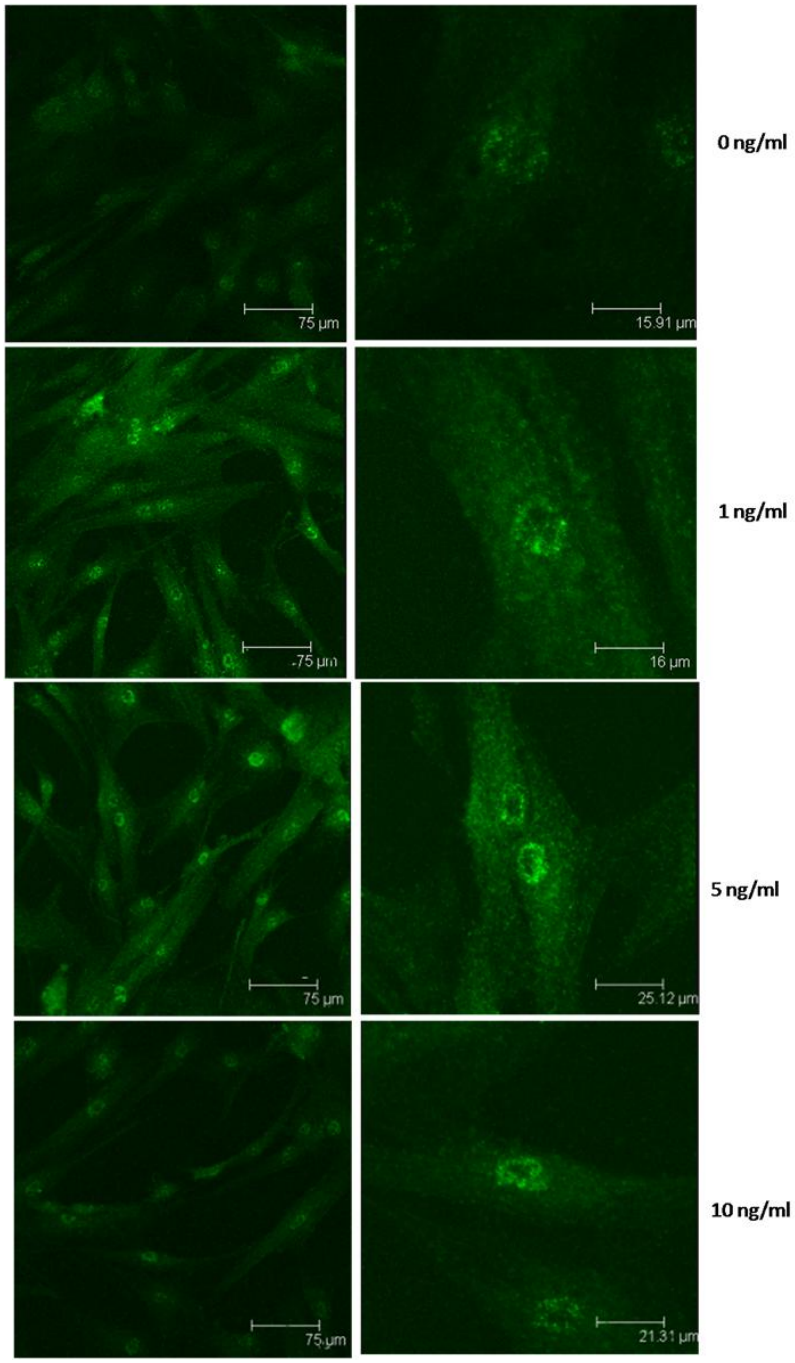


Figure III-13 : Localisation de Smad3p dans les CSMs soumises aux différentes concentrations en TGF-β1 pendant 1 heure (Microscope confocal Leica, objectif 40x).

Une étude quantitative a été réalisée par la mesure de l'intensité de fluorescence dans les noyaux des cellules dans les différentes conditions de culture à l'aide du logiciel Image J. Les résultats, présentés sur la figure III-13 confirment l'effet du TGF-β1 sur la translocation nucléaire des protéines Smad3 après phosphorylation. Dans nos conditions de culture, cet effet est maximum à une concentration de 5 ng/mL.

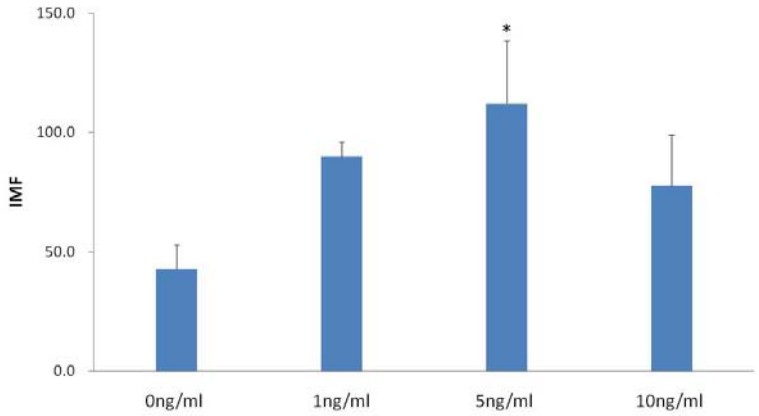


Figure III-14 : Analyse de l'intensité de fluorescence dans les noyaux des CSMs par le logiciel ImageJ (IMF : intensité moyenne de fluorescence ; *p<0,05, N=10).

Des résultats similaires ont été trouvés dans les chondrocytes (figure III-15 et III-16), utilisés comme modèle de cellules différentiées. La présence du TGF-β1 induit une augmentation de Samd3p ainsi que sa translocation nucléaire. Cet effet est plus important à une concentration de 5 ng/mL.

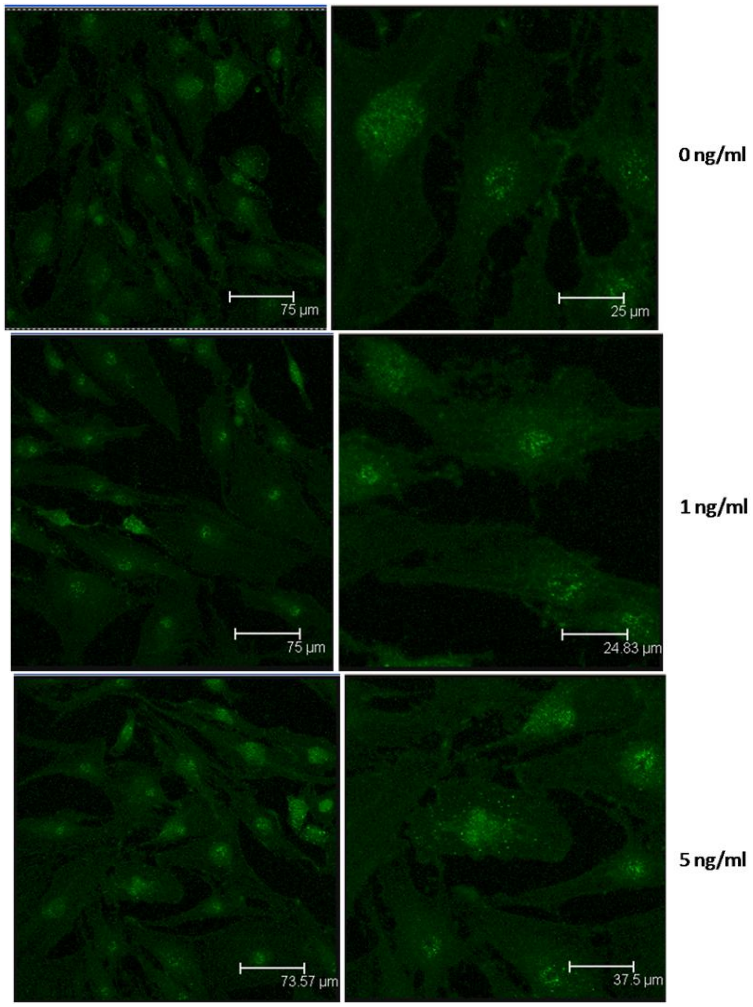


Figure III-15 : Localisation de Smad3p dans les chondrocytes soumis aux différentes concentrations en TGF-β1 pendant 1 heure (Microscope confocal Leica, objectif 40x).

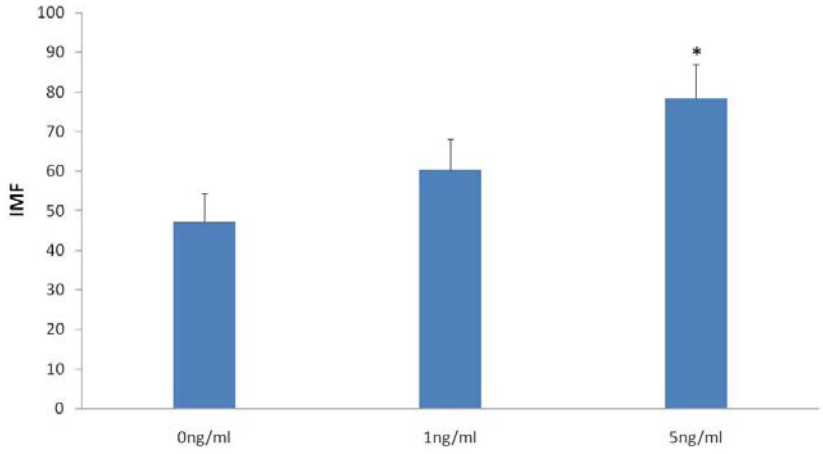


Figure III-16 : Analyse de l'intensité de fluorescence dans les noyaux des chondrocytes par le logiciel ImageJ (IMF : intensité moyenne de fluorescence ; *p<0,05, N=10).

II.5. Effet du TGF-β1 sur l'expression des gènes de Sox9, Runx2 et PPARγ dans les CSMs par RT-PCR.

Le facteur de transcription Sox9 est nécessaire à la différenciation des CSMs en chondrocytes, tandis que les facteurs Runx2 et PPARγ sont importants respectivement pour l'ostéogenèse et l'adipogenèse respectivement. Dans nos expériences, nous avons étudié l'effet du TGF-β1 sur l'expression des gènes de Sox9, RunX2 et PPARγ dans les CSMs. Deux temps d'incubation ont été choisis : 30 minutes et 1 heure. L'addition du TGF-β1 augmente l'expression de Sox9, avec un effet plus important à 1 heure (Figure III-17 et III-18). Les résultats montrent également une diminution de l'expression des gènes de PPARγ et Runx2 après stimulation avec du TGF-β1 (Figure III-19).

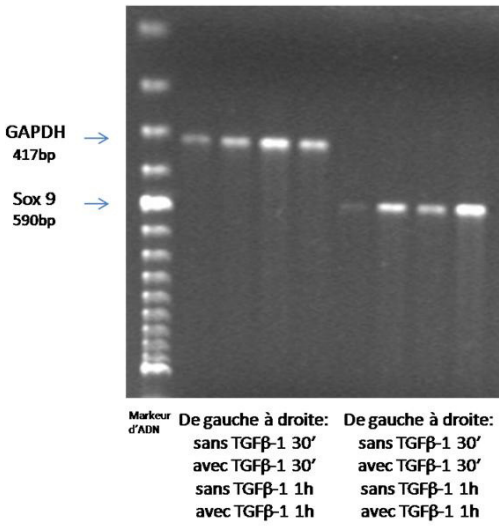


Figure III-17 : Image de l'électrophorèse des ADNs (Sox9).

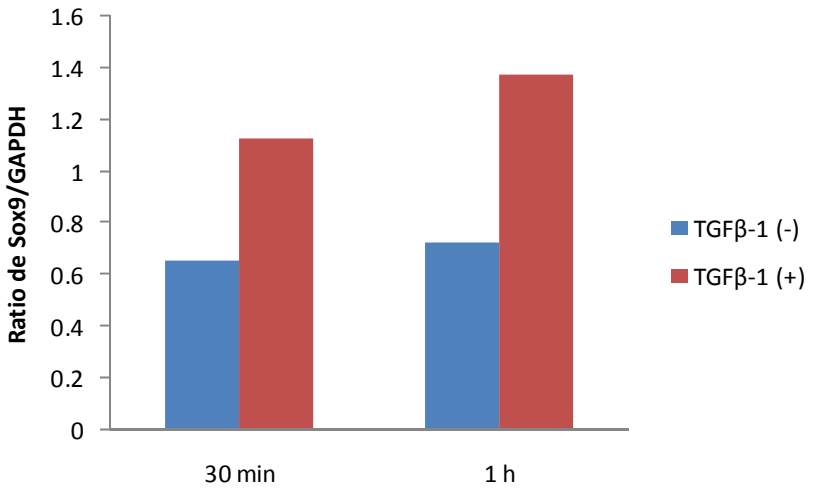


Figure III-18 : Analyse de la densité de bandes d'ADN avec le logiciel QuantityOne.

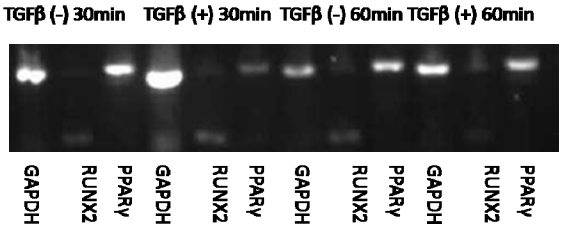


Figure III-19 : Image de l'électrophorèse des ADNs (Runx2, PPARγ).

II.6. Discussion

Les TGFβs jouent un rôle important dans la différenciation des CSMs en chondrocytes, rôle qui dépend du stade de différenciation des cellules. Les études montrent qu'ils activent les premiers stades de la différenciation chondroblastique, mais inhibent la maturation des chondrocytes. *In vivo*, au sein du cartilage, les TGFβs interviennent de façon importante dans l'homéostasie du tissu au niveau de l'anabolisme. De plus, il a été montré que le TGF-β1 accélère la migration et la différenciation des chondrocytes ensemencés dans des biomatériaux [Khoshfetrat AB et al, 2008]. Nous avons, dans cette deuxième partie du travail, étudié le comportement des cellules en présence du TGFβ. Notre étude a d'abord porté sur l'influence du facteur de croissance sur la viabilité et le métabolisme cellulaire. Ceci nous a permis de contrôler nos conditions de travail. Puis, nous avons étudié l'effet du facteur de croissance sur la phosphorylation de la protéine Smad3 et sur l'expression du gène codant pour la protéine Sox9, facteur de transcription majeur de la chondrogenèse.

L'addition du facteur de croissance dans le milieu de culture, quelque soit la concentration, n'as pas d'effet sur la viabilité cellulaire. En effet, un pourcentage de cellules vivantes qui avoisine 100% a été constaté. Cependant, une diminution du métabolisme des cellules en présence du TGF-β1 a été observée pour toutes les concentrations utilisées, avec un effet maximum à 10 ng/mL. Par ailleurs, le TGF-β1 intervient sur la prolifération des cellules. Après un jour de culture, le TGF-β1 induit une augmentation de la prolifération. Par contre, au bout de 3 jours, quand les CSMs commencent à se différencier, leur prolifération est diminuée. On peut faire l'hypothèse que la prolifération et la différenciation des CSMs sont antagonistes. Ces résultats sont en accord avec ceux de Plasilova M *et al.* qui ont trouvé que les CSMs ne peuvent pas proliférer et se différencier simultanément [Plasilova M et al, 2009].

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet du TGF-β1 sur la phosphorylation des protéines Smad3. Il a été montré que cette protéine est phosphorylée dans les premières étapes de la chondrogenèse, puis elle active Sox9, un facteur de transcription nécessaire à cette différentiation. De plus, la protéine Smad3 a un rôle déterminant pendant l'inhibition

de la différenciation hypertrophique des chondrocytes. En absence de Smad3, les chondrocytes se différencient anormalement et ceci conduit au développement de l'ostéo-arthrite [Yang X et al, 2001]. Même si le mécanisme de l'effet des TGFβs sur la chondrogenèse des CSMs reste obscur, il est de plus en plus évident que l'effet du TGF-β1 sur les différents stades de différenciation a un effet dépendant du temps. Plusieurs études ont montré que le TGF-β1 peut activer rapidement la voie de signalisation des Smads dans différentes types cellulaires [Seay U et al, 2005; Palmer G et al, 2000; Watanabe H et al, 2001;]. En effet, la phosphorylation des R-Smads est augmentée après 30 minutes de traitement des cellules avec du TGF-β1, atteint son niveau maximum à 1 heure, puis diminue après 3 heures. Par ailleurs, Worster AA *et al* ont trouvé que l'effet de TGF-β1 sur les CSMs est dépendant de la concentration. Ils ont comparé trois concentrations de TGF-β1 (1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL) sur la différenciation des CSMs en chondrocytes pendant 4 jours. La concentration de 5 ng/mL optimise la différenciation des CSMs et l'expression des gènes de Collagène I et Collagène II [Worster AA et al, 2000]. Khoshfetrat AB *et al*. ont également trouvé que la concentration de 5 ng/mL favorise la migration et la différenciation des chondrocytes encapsulés dans des hydrogels [Khoshfetrat AB et al, 2008].

Dans notre étude, nous avons confirmé que **le TGF-β1 a une action dépendante de la concentration** sur les deux types cellulaires utilisés, CSMs et chondrocytes. Dans notre modèle de culture, **la phosphorylation des protéines Smad3 augmente avec une concentration de 1ng/mL, atteint son niveau maximal à 5 ng/mL puis diminue à 10 ng/mL**, tout en restant inférieur au témoin sans TGF-β1. Cette phosphorylation des protéines Smad3 est accompagnée d'une translocation nucléaire observée par microscopie de fluorescence.

Dans un troisième temps, l'effet du TGF-β1 sur l'expression des gènes de Sox9, de RunX2 et de PPARγ a été analysé. Nous avons réalisé ces expériences avec une concentration de TGF-β1 de 5 ng/mL. Selon les résultats de RT-PCR, **l'expression de Sox9 dans les CSMs est augmentée en présence de TGF-β1,** de façon plus importante après 1 heure d'incubation qu'après 30 minutes. De plus, **l'augmentation de l'expression de Sox9 induite par le TGF-β1 coïncide avec la phosphorylation de Smad3 dans le temps**. Selon la littérature, les deux facteurs de transcription, aussi bien Sox9 que Smad3 interviennent dans les premiers stades de la chondrogenèse [Yang X et al, 2001 ; Furumatsu T et al, 2005].

On peut donc émettre une hypothèse selon laquelle **Smad3p qui se translocalise dans le noyau activerait l'expression de Sox9.** Ensuite, Smad3p et Sox9 forment un complexe de transcription qui s'associe à la région d'enhancer du gène de Collagène II et active l'expression de son ARNm.

En conclusion, on peut retenir les points suivants de cette partie:

1. **Le TGF-β1 augmente la phosphorylation de la protéine Smad3 dans les CSMs et les chondrocytes après 1h de stimulation.**
2. **L'effet du TGF-β1 sur la phosphorylation de Smad3 est dépendant de la concentration, avec un effet maximum à 5ng/mL.**
3. **Le TGF-β1 augmente l'expression du gène du facteur de transcription Sox9.**

Partie III: Etude de l'effet d'une contrainte d'étirement sur les CSMs et les chondrocytes

Le rôle des contraintes mécaniques dans le développement et l'entretien des tissus biologiques est bien documenté, y compris plusieurs phénomènes régulés par les contraintes mécaniques, tels que le remodelage osseux et la plasticité des cellules musculaires lisses. Pendant la prolifération et la différenciation des CSMs de la moelle osseuse, la stimulation biomécanique joue un rôle aussi important que les facteurs biochimiques [Mouw JK et al, 2007; Huang CY et al, 2004 ; 2005].

Sous contraintes contrôlées, les CSMs peuvent se différencier en chondrocytes et synthétiser les composants de la matrice extracellulaire. Toutefois, les forces sont souvent extrêmement complexes et difficiles à suivre et à contrôler *in vivo*. Pour mieux étudier les effets des contraintes mécaniques sur les cellules, nous avons travaillé *in vitro* et utilisé le système « Flexcell Tension plus » qui permet l'application d'une contrainte d'étirement biaxiale sur les cellules adhérentes sur des membranes de silicone élastiques.

Nous avons tout d'abord étudié l'effet de l'étirement sur la viabilité et la prolifération des CSMs. Nous avons ensuite étudié l'effet des contraintes sur la phosphorylation de la protéine Smad3 et l'expression des gènes des facteurs de transcription Sox9, Runx2 et PPARγ. De plus, nous avons analysé différentes hypothèses concernant le mécanisme d'action des contraintes dans notre modèle d'étude.

III.1. L'effet de l'étirement sur la viabilité des CSMs et des chondrocytes.

L'effet de l'étirement sur la viabilité des cellules a été réalisé en utilisant le kit Vybrant / Apoptosis ™. Tout d'abord, nous avons comparé la viabilité des cellules cultivées sur les plaques BioFlex avec celle des cellules cultivées dans des supports de culture classiques, dans notre cas, des plaques de culture à 6 puits coatées avec du collagène de type I. Après 24hs de culture, le pourcentage de cellules vivantes diminue dans les plaques BioFlex (80 %), par rapport aux plaques témoin (90%) (Figure III-20). La diminution de la viabilité est accompagnée d'une augmentation de l'apoptose. Après 48hs de culture, on observe que le pourcentage des cellules en apoptose diminue et les cellules présentes sur la membrane sont vivantes.

En présence d'étirement, la viabilité cellulaire diminue faiblement mais le nombre des cellules en apoptose augmente (Figure III-21). Il semble donc que la viabilité des cellules est diminuée avec la contrainte d'étirement. Cependant, le pourcentage des cellules vivantes reste toujours supérieur à 80%.

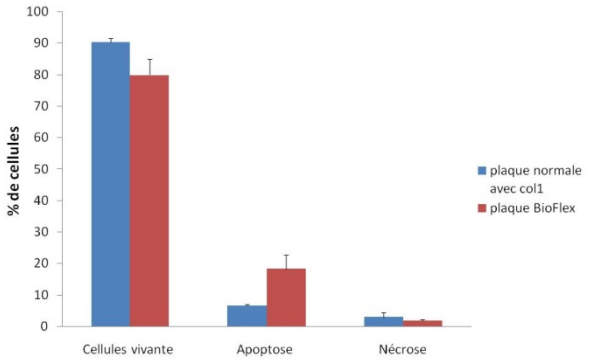


Figure III-20 : Viabilité des CSMs cultivées dans une plaque six puits coatée avec du collagène de type I ou dans une plaque BioFlex en utilisant le kit Vybrant / Apoptosis ™.

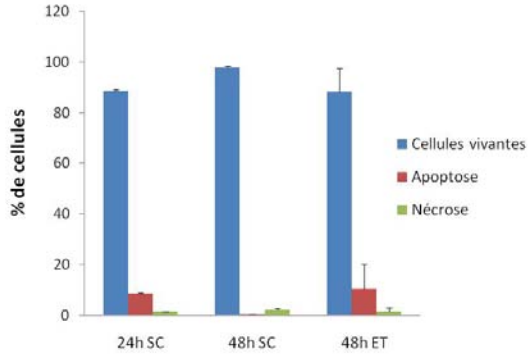


Figure III-21 : Viabilité des CSMs avec ou sans étirement en utilisant le kit Vybrant / Apoptosis ™ (SC: sans contrainte ; ET: étirement).

Des résultats similaires ont été observés sur des chondrocytes cultivés dans des plaques Bioflex et soumis ou non à une contrainte d'étirement (Figure III-22). La viabilité des cellules est diminuée avec la contrainte d'étirement tandis qu'une augmentation de l'apoptose est observée. Comme pour les CSMs, le pourcentage des cellules vivantes reste toujours supérieur à 80%.

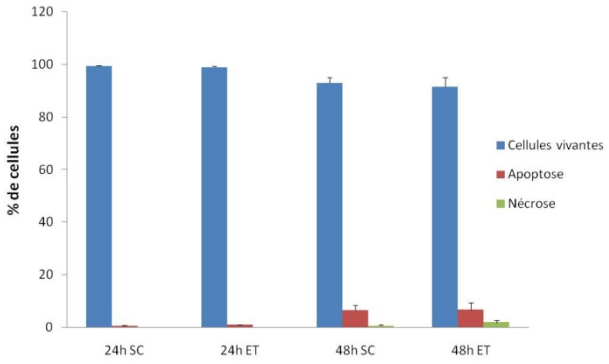


Figure III-22 : Viabilité des chondrocytes avec ou sans étirement en utilisant le kit Vybrant / Apoptosis ™ (SC: sans contrainte ; ET: étirement).

III.2. L'effet de l'étirement sur la prolifération des CSMs et des chondrocytes.

L'analyse de la prolifération a été réalisée par la mesure des équivalentes de réduction dans le milieu de culture. Pour cela nous avons utilisé le réactif Alamar blue qui peut changer de couleur en fonction de l'état d'oxydo-réduction du milieu de culture. Tout

d'abord, nous avons comparé la prolifération des cellules cultivées sur les plaques Bioflex à celle des cellules cultivées dans des supports de culture classiques, dans notre cas des plaques de culture à 6 puits coatés avec du collagène de type I. Après 24hs de culture, une prolifération plus importante a été observée sur les membranes de silicone que sur les surfaces plastiques (Figure III-23). Nous avons ensuite analysé l'effet de l'étirement sur la prolifération des cellules (CSMs et chondrocytes) pendant 24 heures et 48 heures. Selon les résultats, il semble que le métabolisme cellulaire (CSMs et chondrocytes) est moins important avec l'étirement que en l'absence de contrainte (Figure III-24, III-25).

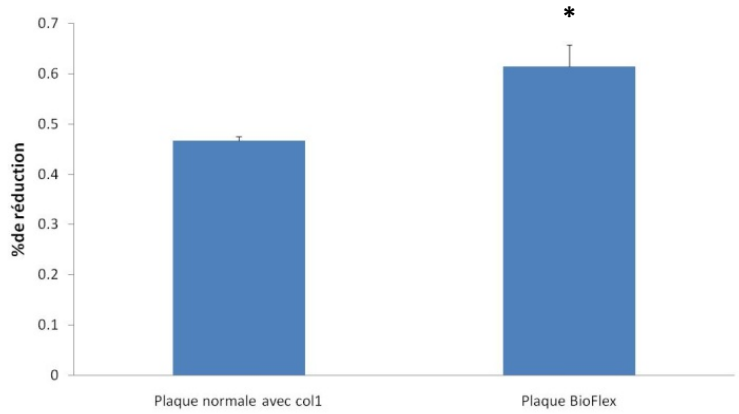


Figure III-23 : Etude de la prolifération des CSMs cultivées dans une plaque six puits coatée avec du collagène de type I ou dans une plaque BioFlex en utilisant l'Alamar Blue (*p<0,05).

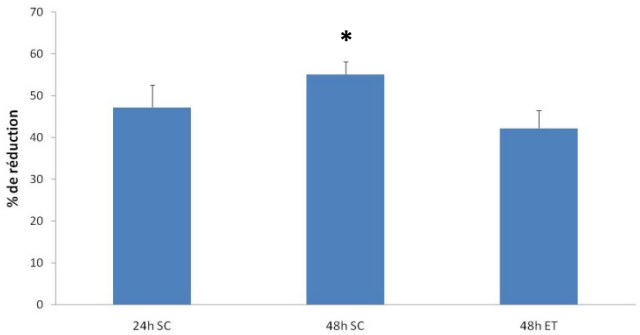


Figure III-24 : Etude de la prolifération des CSMs avec ou sans étirement en utilisant l'Alamar Blue. (SC: sans contrainte ; ET: étirement ; *p<0,05)

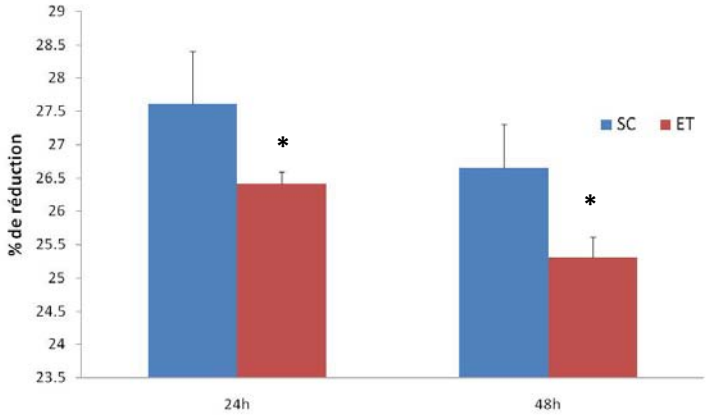


Figure III-25 : Etude de la prolifération des chondrocytes avec ou sans étirement en utilisant l'Alamar Blue. (SC: sans contrainte ; ET: étirement ; *p<0,05)

III.3. L'effet de l'étirement équiaxial sur la phosphorylation de protéines Smad3 (Smad3p)

III.3.1. L'effet de l'étirement en fonction du temps

Dans un premier temps nous avons analysé l'effet de l'étirement sur les cellules en fonction du temps. Pour cela, les cellules ont été cultivées sur des membranes de silicone coatées avec du collagène de type I pendant 48 heures, puis soumises à une contrainte d'étirement biaxial a une amplitude de 5 % et une fréquence de 0,5 Hz. Les expériences ont été réalisées à des temps de stimulations courts (10, 30, 60 et 180 minutes) qui nous permettent d'analyser des phénomènes de mécanotransduction impliquant des phénomènes de phosphorylation des protéines. Les Figures III-26 et III-27 montrent les résultats obtenus par western blot. On peut constater dans notre modèle d'étude, que l'application d'une contrainte mécanique d'étirement induit une augmentation de Sma3p à des temps courts. Cependant, le taux d'expression de Smad2/3 ne présente pas de changements.

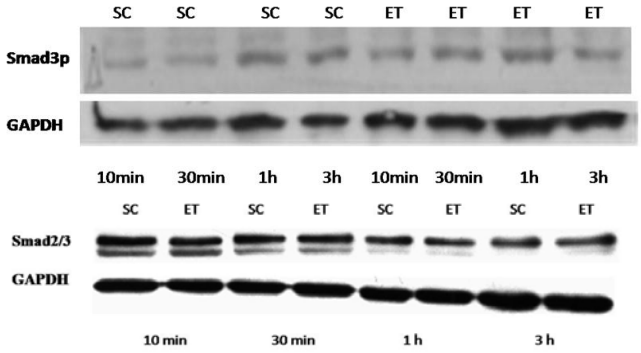


Figure III-26: Expression de Smad3p et Smad2/3 dans les CSMs soumises ou non à un étirement pendant 10min, 30min, 1h et 3h. Analyse réalisé par western-blot (SC: sans contrainte ; ET: étirement).

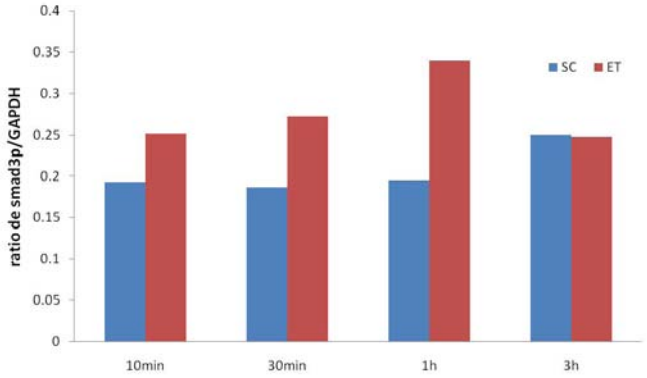


Figure III-27: Expression relative de Smad3p dans les CSMs pendant 10min, 30min, 1h et 3h par le logiciel QuantityOne (SC: sans contrainte ; ET: étirement) (BioRad, USA).

Puis, nous avons fait un ratio de l'expression de Smad3p avec contrainte d'étirement et sans contrainte (Figure III-28). Nous avons trouvé un ratio significativement supérieur après 1h d'étirement comparé aux autres temps.

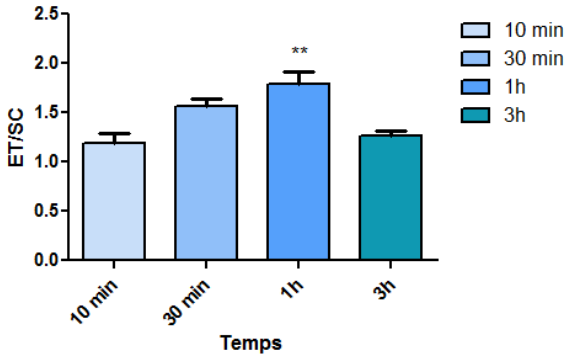


Figure III-28: Ratio de l'expression de Smad3p avec contrainte d'étirement et sans contrainte dans les CSMs (SC: sans contrainte ; ET: étirement ; N=5, **p<0,05).

Pour analyser la localisation de Smad3p dans la cellule, nous avons utilisé l'immunofluorescence indirecte en microscopie confocale. Les résultats d'immunofluorescence indirecte montrent que la densité de fluorescence dans les noyaux des cellules soumises à l'étirement est plus importante que dans les cellules non exposées à la contrainte. Ceci indique que la protéine Smad3 se localise dans le noyau après l'application de la contrainte d'étirement. Le niveau de Smad3 nucléaire est maximum entre 30 minutes et 1 heure, puis diminue à 3 heures.

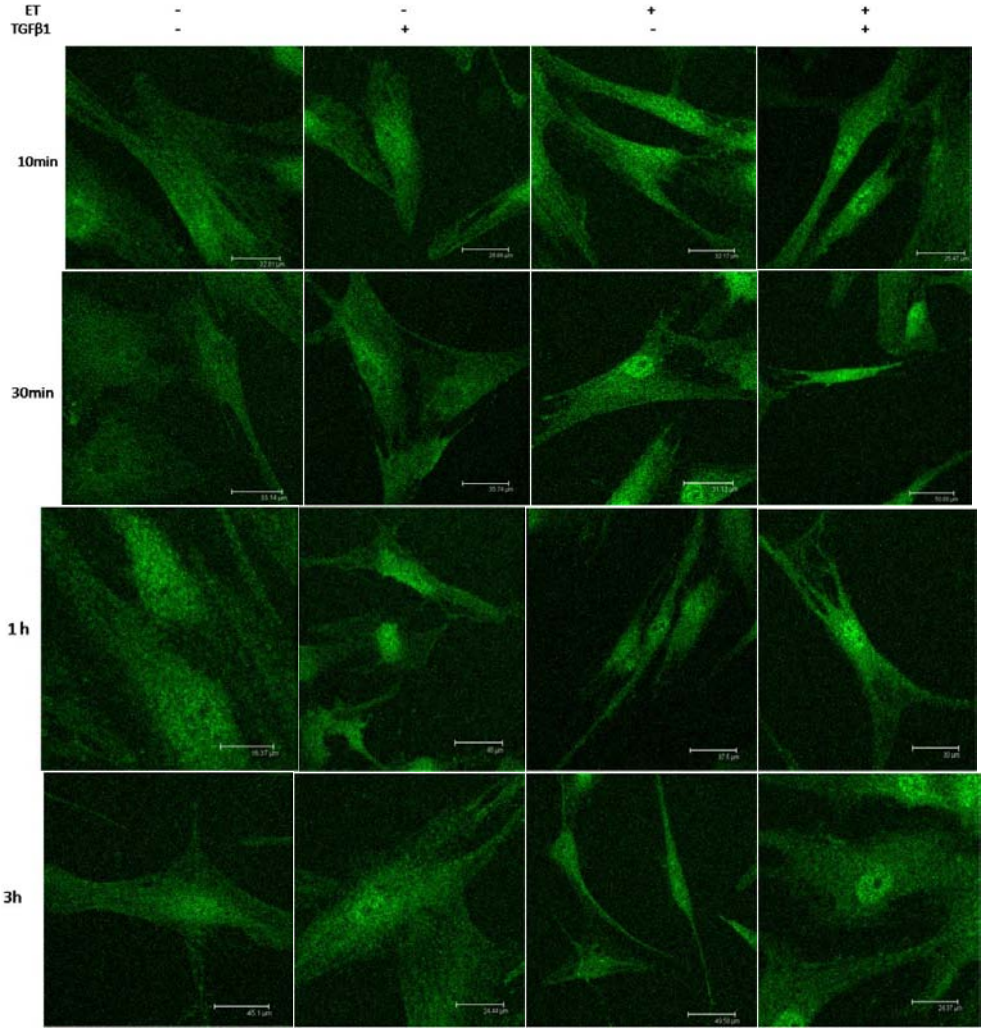


Figure III-29 : Expression de Smad3p dans les CSMs avec ou sans étirement, en présence ou absence de TGF-β1 pendant 10min, 30min, 1h et 3h (SC: sans contrainte ; ET: étirement) (Microscope confocal Leica, objectif 40x).

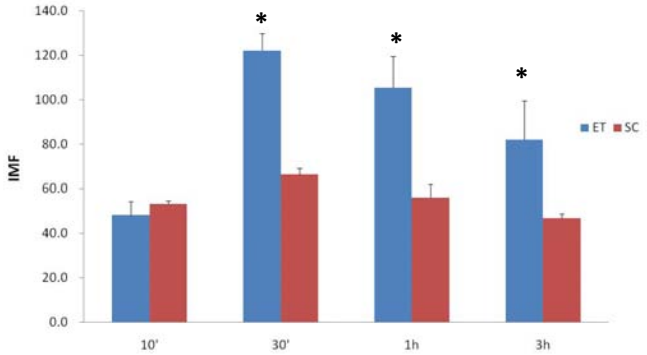


Figure III-30: Analyse l'intensité de fluorescence dans les noyaux des CSMs pendant 10min, 30min, 1h et 3h par le logiciel ImageJ (SC: sans contrainte ; ET: étirement ; *P<0,05, N=10).

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'étirement sur les chondrocytes humains, utilisés comme un contrôle des cellules différenciées. Selon les résultats de western-blot, nous avons trouvé que la phosphorylation de Smad3 est plus importante sous étirement que sans contrainte. L'augmentation est plus conséquente pour les CSMs. Elle atteint son niveau maximum à 1 heure puis diminue à 3 heures (Figure III-31, Figure III-32). Pour localiser la protéine Smad3, nous avons ensuite fait une étude en microscopie confocale. La densité de fluorescence dans les noyaux est un indice de la phosphorylation de Smad3.

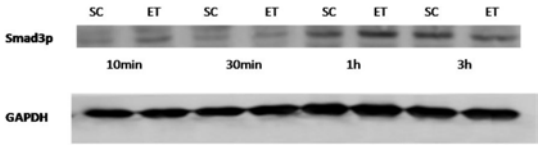


Figure III-31: Expression de Smad3p dans les chondrocytes avec ou sans étirement pendant 10min, 30min, 1h et 3h par western-blot (SC: sans contrainte ; ET: étirement).

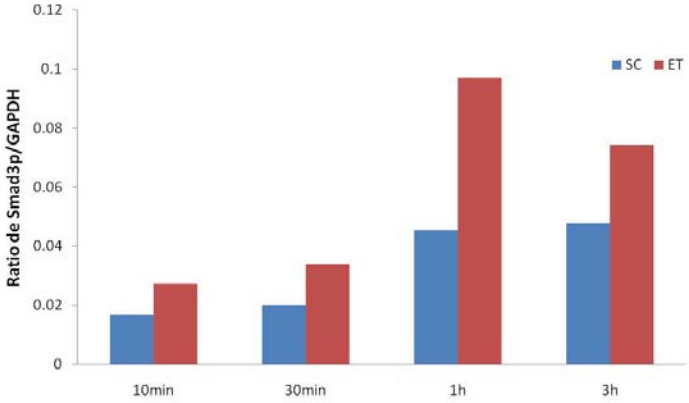


Figure III-32: Expression relative de Smad3p dans les chondrocytes avec ou sans étirement pendant 10min, 30min, 1h et 3h par le logiciel QuantityOne (BioRad, USA). (SC: sans contrainte ; ET: étirement)

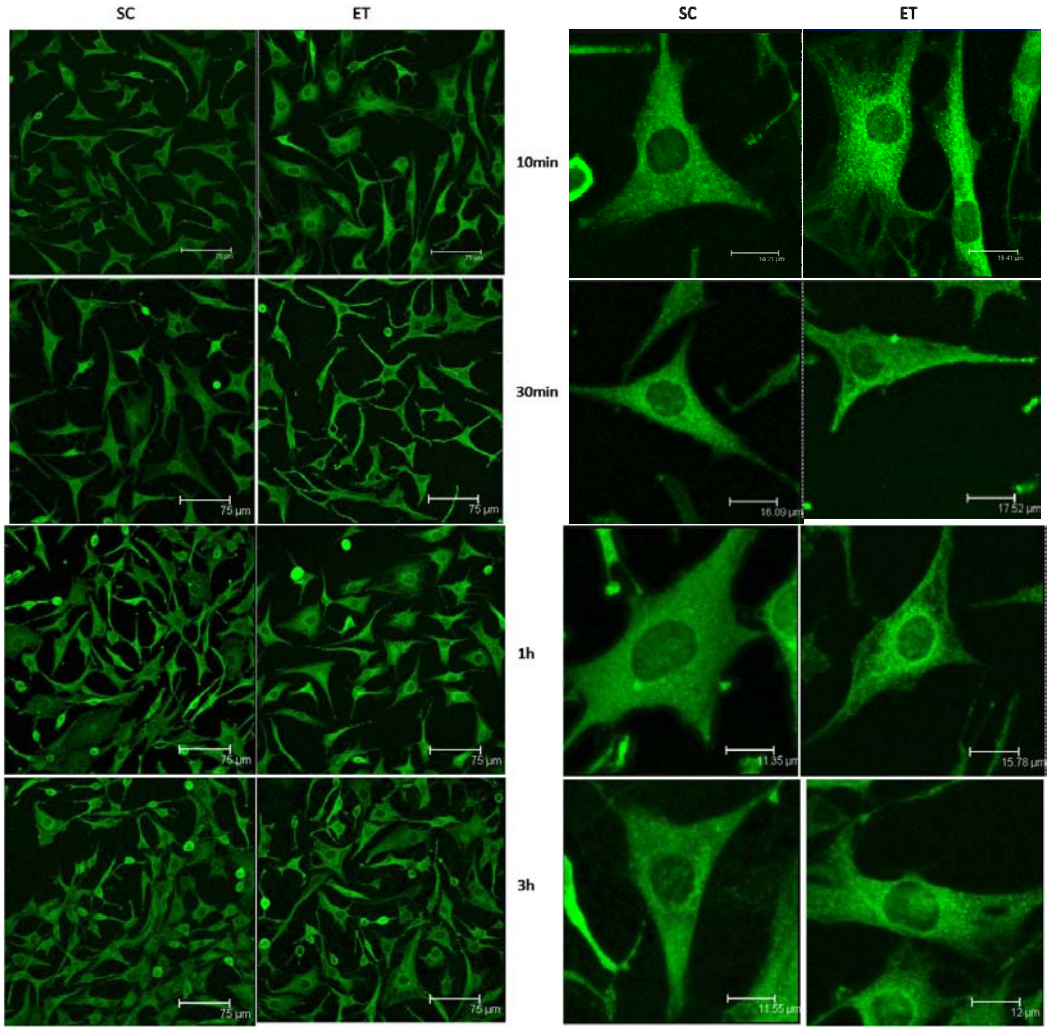


Figure III-33 : Expression de Smad2/3 des chondrocytes avec ou sans étirement pendant 10min, 30min, 1h et 3h (SC: sans contrainte ; ET: étirement) (Microscope confocal Leica, objectif 40x).

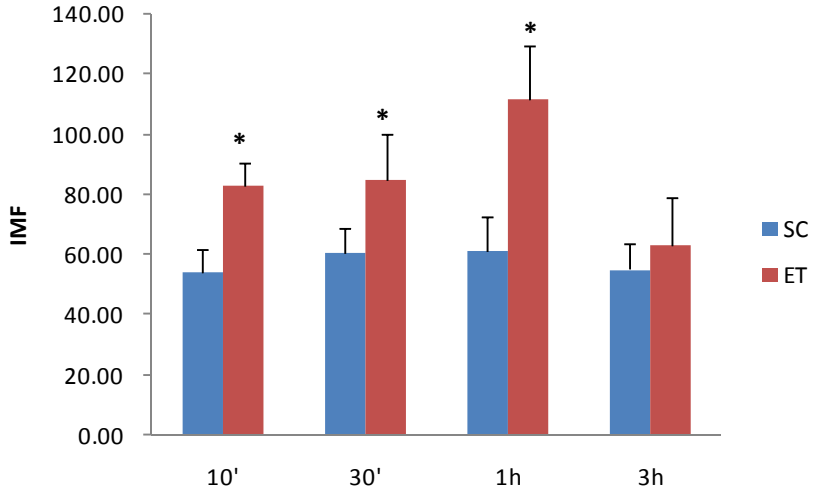


Figure III-34 : Analyse de l'intensité de fluorescence dans les noyaux des chondrocytes pendant 10min, 30min, 1h et 3h par le logiciel ImageJ (SC: sans contrainte ; ET: étirement ; IMF : intensité moyenne de fluorescence ; *p<0,05, N=10).

Ces études, tant pour les CSMs que pour les chondrocytes montrent un effet de l'étirement sur la phosphorylation de Smad3 qui est dépendant du temps.

III.3.2. Effet de l'interaction de l'étirement et du TGF-β1 sur la phosphorylation de Smad3

Pour étudier s'il existe une synergie entre l'effet d'étirement et celui du TGF-β1 sur les CSMs, nous avons soumis les cellules à une contrainte d'étirement (5%, 0,5 Hz) en absence ou présence du TGF-β1 à une concentration de 5 ng/mL pendant 10 min, 30 min, 1h et 3h.

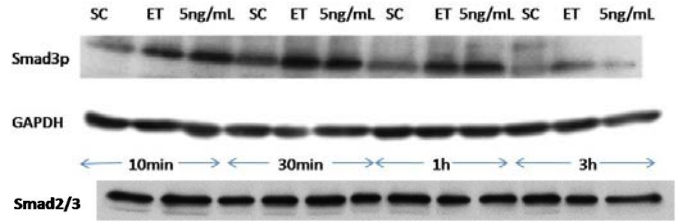


Figure III-35: Expression de Smad3p dans les CSMs avec étirement, ou avec 5 ng/mL de TGF-β1 pendant 10min, 30min, 1h et 3h par western-blot. (SC: sans contrainte ; ET: étirement)

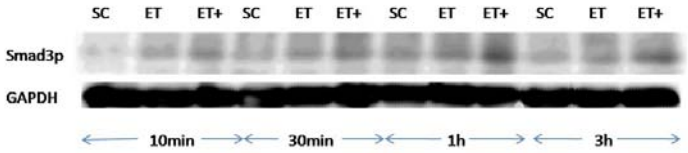


Figure III-36: Expression de Smad3p dans les CSMs avec étirement, avec ou sans TGF-β1 pendant 10min, 30min, 1h et 3h par western-blot. (SC: sans contrainte ; ET: étirement ; ET+ : étirement+5 ng/mL de TGF-β1)

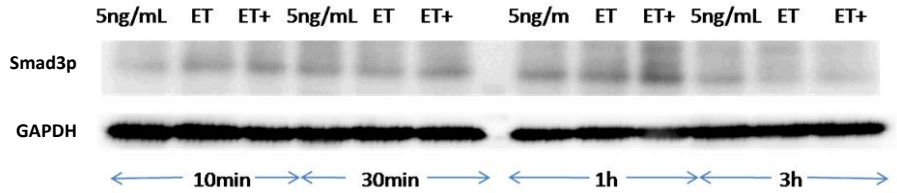


Figure III-37: Expression de Smad3p dans les CSMs avec TGF-β1, avec étirement, et avec étirement plus TGF-β1 pendant 10min, 30min, 1h et 3h par western-blott. (ET: étirement ; ET+ : étirement+5 ng/mL de TGF-β1)

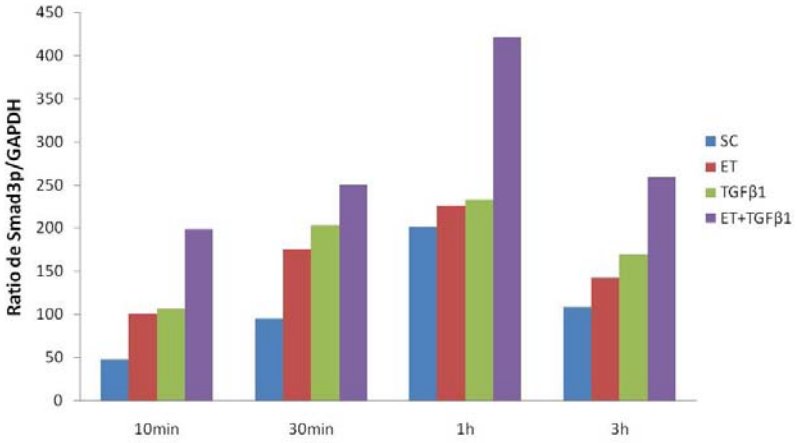


Figure III-38: Expression relative de Smad3p des CSMs avec TGF-β1, avec étirement, et avec TGF-β1 plus étirement pendant 10min, 30min, 1h et 3h. (SC: sans contrainte ; ET: étirement)

Selon les résultats de western blot (Figure III-35, III-36, III-37, III-38) et d'immunofluorescence indirecte (les images en microscope confocal sont dans le figure III-29) nous avons pu montrer que la phosphorylation de Smad3 augmente sous contrainte d'étirement. La quantité de protéine Smad3 phosphorylée dans les noyaux des cellules après contrainte d'étirement est égale à celle trouvée après stimulation avec du TGF-β. Nous avons également observé un effet synergique entre le TGF-β1 et la contrainte d'étirement sur la phosphorylation de Smad3. Cet effet apparaît dépendant du temps, comme pour le TGFβ1 seul ou la contrainte d'étirement seule. Ces résultats correspondent à ce qui a été rapporté dans la littérature pour une contrainte mécanique de compression [Mouw JK et al, 2007].

III.3.3. Effet de la fréquence d'application de l'étirement sur la phosphorylation des protéines Smad3

Nous avons comparé les deux fréquences d'étirement : 0,5 Hz et 1 Hz, sur les CSMs, pendant 30 minutes et 1 heure.

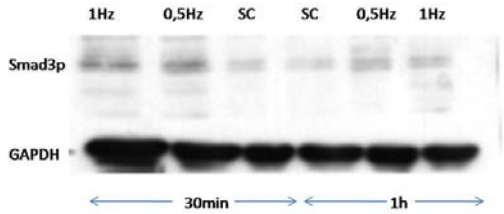


Figure III-39: Expression de Smad3p dans les CSMs avec deux fréquences d'étirement pendant 30min et 1h par western-blot. (SC: sans contrainte)

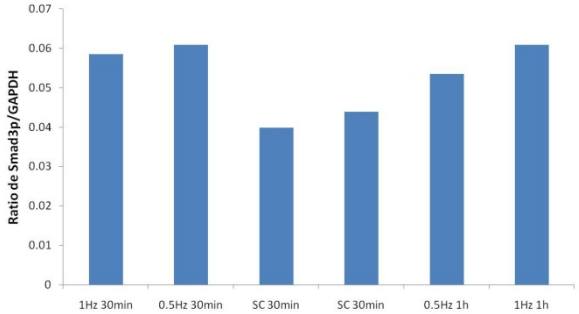


Figure III-40: Expression relative de Smad3p dans les CSMs avec deux fréquences d'étirement pendant 30min et 1h par le logiciel Multi Gauge (Fujifilm, Japon) (SC: sans contrainte)

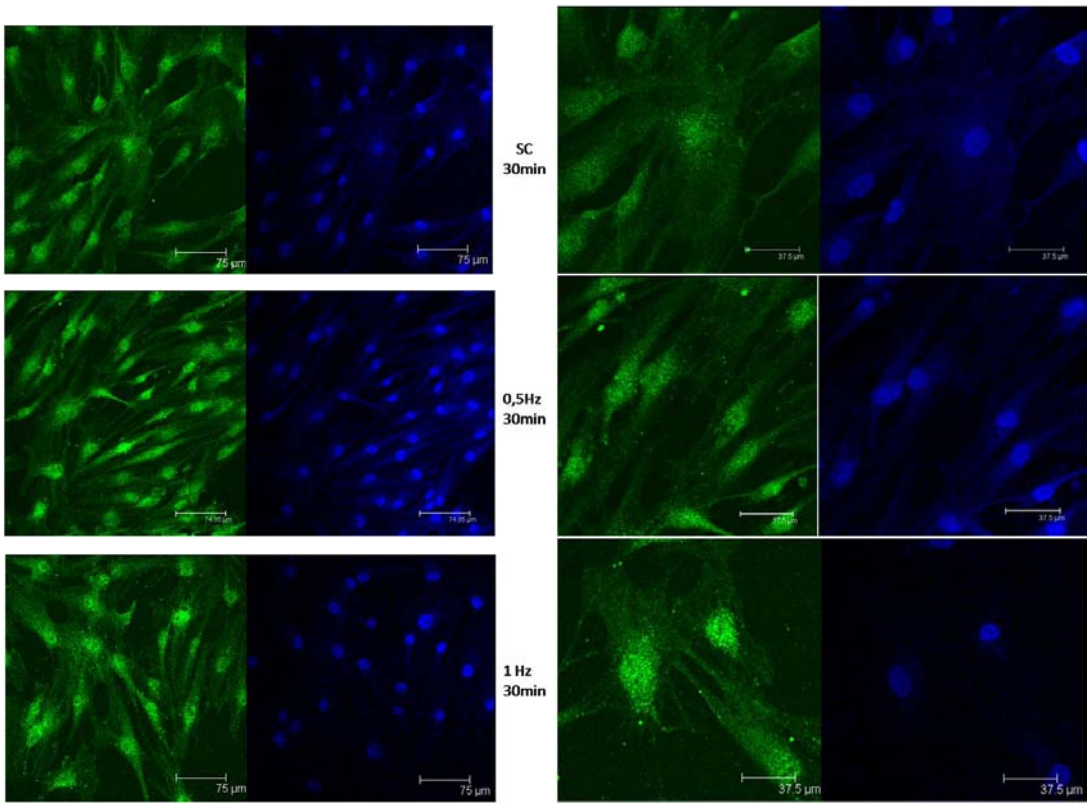


Figure III-41 : Expression de Smad3p dans les CSMs avec deux fréquences d'étirement pendant 30min (SC: sans contrainte ; vert : Smad3p, bleu : noyau) (Microscope confocal Leica, objectif 40x).

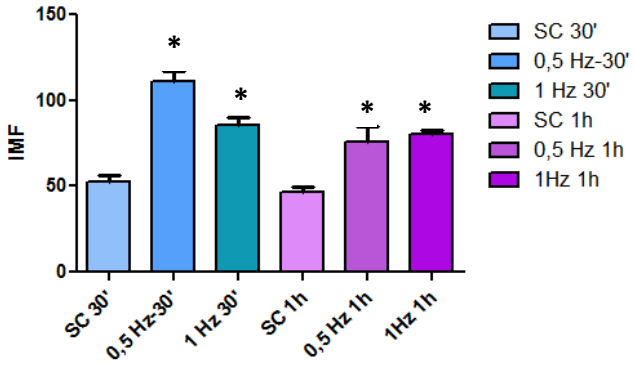


Figure III-42 : Analyse de l'intensité de fluorescence dans les noyaux des CSMs avec deux fréquences d'étirement pendant 30min et 1h par le logiciel ImageJ (SC: sans contrainte ; *p<0,05, N=10).

L'analyse des résultats de la phosphorylation de Smad3 montre que Smad3p augmente significativement sous contrainte d'étirement à une fréquence de 0,5 Hz et 1 Hz à 30 minutes et à 1 heure. De plus, on observe que Smad3p se translocalise dans les noyaux. Aucune différence significative entre les deux fréquences n'a pu être mise en évidence. Toutefois, il semble qu'une fréquence de 0,5 Hz donne des résultats légèrement supérieurs.

III.4. Effet de l'étirement sur l'expression des gènes Sox9, Runx2, PPARγ et du Collagène II dans les CSMs.

Nous avons montré, dans la deuxième partie des résultats, que la stimulation des CSMs avec le TGFβ-1 entraînait une augmentation de l'expression du gène de Sox9. Cet effet était plus important après une heure de stimulation qu'après 30 minutes. C'est pourquoi nous avons choisi, dans cette partie de notre étude, de soumettre les cellules à une contrainte d'étirement d'une heure et à deux fréquences : 0,5 Hz et 1 Hz.

Les résultats montrent que l'expression de Sox9 augmente sous contrainte d'étirement par rapport à sans contrainte. De plus, il semble qu'avec la fréquence de 0,5 Hz, l'expression de Sox9 est plus forte qu'avec une fréquence d' 1 Hz. Les résultats montrent également une diminution de l'expression des gènes de PPARγ après stimulation sous contrainte d'étirement. Ces résultats montrent que la contrainte d'étirement peut exercer un effet sur l'activité des facteurs de transcription impliqués dans la voie de signalisation du

TGFβ. L'effet observé diffère légèrement entre les deux fréquences appliquées, la fréquence de 0,5 Hz étant plus proche des conditions physiologiques.

L'analyse des résultats montre également qu'il n'y pas d'expression du gène du Collagène II. On peut supposer que le temps de la contrainte d'étirement sur les CSMs est insuffisant pour activer le gène de Collagène II.

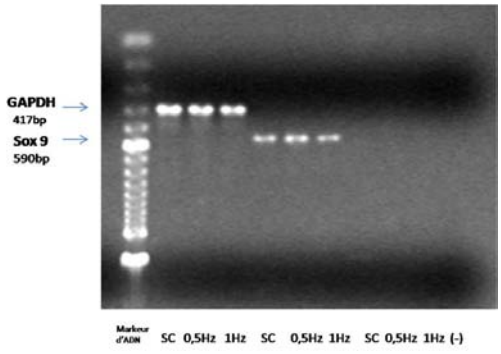


Figure III-43 : Image de l'électrophorèse des ADNs (Sox9, Col II). (-): contrôle négatif.

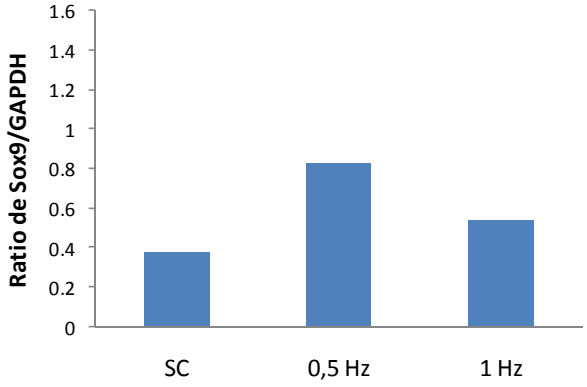


Figure III-44: Analyse de la densité optique des bandes avec le logiciel d'image Quantity One.

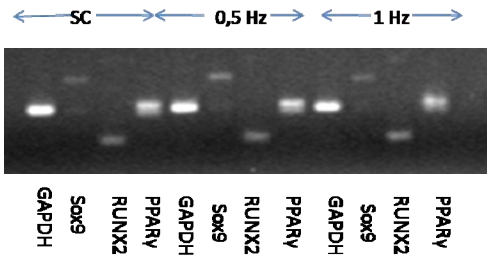


Figure III-45 : Image de l'électrophorèse des ADNs (Sox9, Runx2, PPARγ).

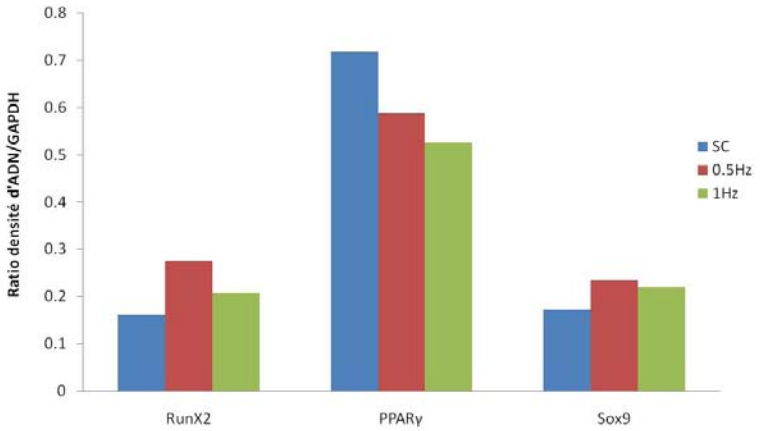


Figure III-46: Analyse de la densité optique des bandes avec le logiciel d'image Quantity One.

III.5. Vers un mécanisme de mécanotransduction conduisant à la phosphorylation de Samd3

III.5.1. Implication du récepteur du TGFβ

L'activation des récepteurs du TGF-β de type I (RI) et type II (RII) à la surface cellulaire initie non seulement la transduction de signal, mais aussi entraîne l'internalisation des récepteurs. Après application de la contrainte d'étirement sur les CSMs, et afin de visualiser les récepteurs, les cellules sont perméabilisées ou non afin d'étudier la localisation du récepteur du TGF RII. En l'absence de perméabilisation, seules les protéines membranaires sont détectées. Après perméabilisation, les protéines cytoplasmiques sont également détectées.

Les résultats montrent la présence d'une plus grande quantité de RII après perméabilisation, traduisant une localisation cytoplasmique. La quantité de RII détectée après perméabilisation semble plus importante après stimulation avec une contrainte d'étirement (Figure III-47). Ceci pourrait indiquer que la contrainte mécanique favoriserait l'internalisation des récepteurs.

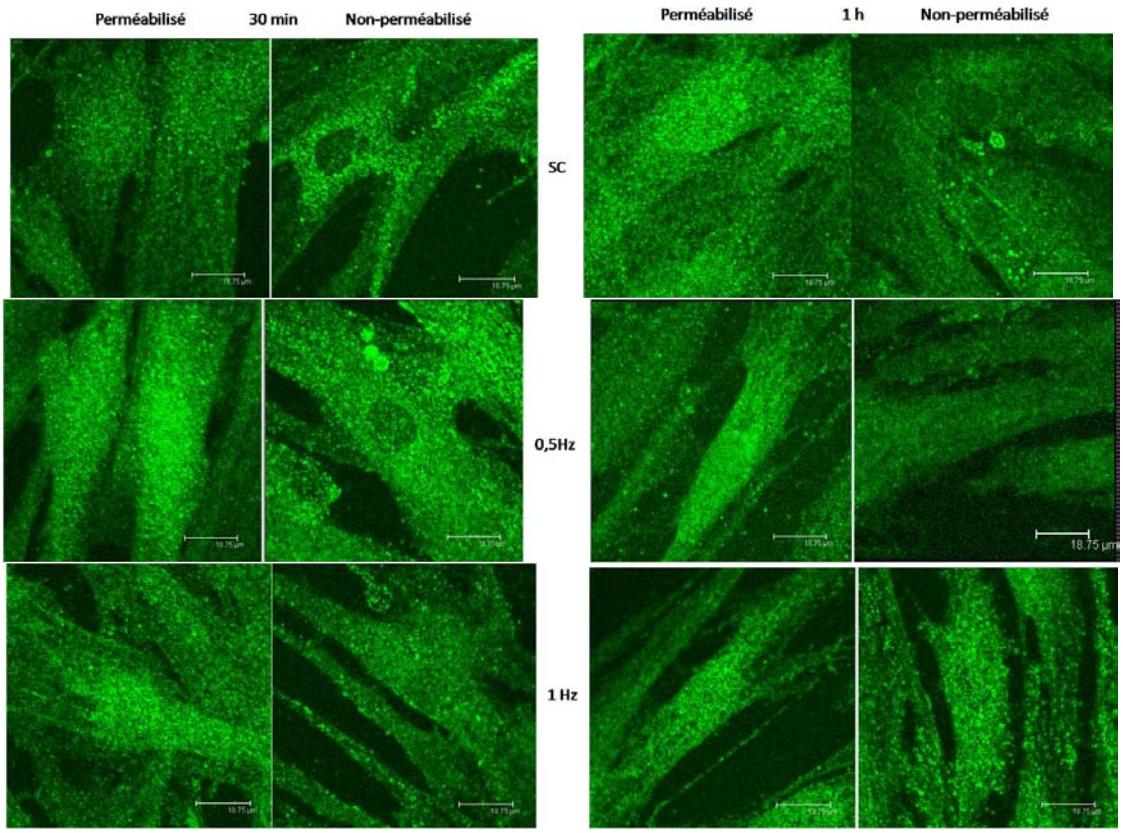


Figure III-47 : Expression de RII dans les CSMs avec deux fréquences d'étirement pendant 30min et 1h (SC: sans contrainte) (Microscope confocal Leica, objectif 40x).

Afin de confirmer l'implication des récepteurs du TGF-β dans l'activation de la phosphorylation de Smad3 par la contrainte d'étirement, nous avons utilisé un inhibiteur du RI, le SB431542. Les résultats obtenus par western blot montrent une legère diminution de Sma3p quand les cellules sont traitées avec l'inhibiteur et soumises à la contrainte d'étirement (Figure III-48 et III-49). Ceci pourrait indiquer une participation mineure du recepteur RI dans ce mécanisme d'action. D'autres voies pourraient être impliquées dans la phosphorylation de Smad3. Cependant, ces résultats restent à confirmer.

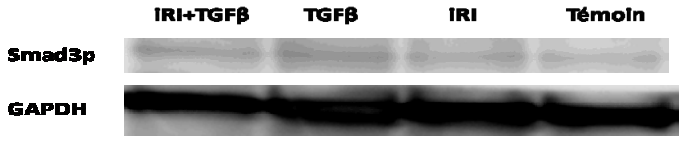


Figure III-48 : Expression de la phosphorylation de Smad3 par western-blot. (iRI : inhibiteur du RI ; Témoin : étirement)

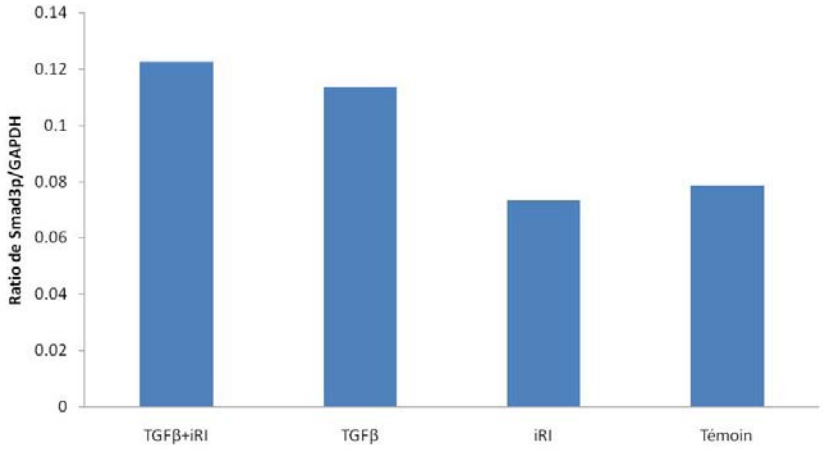


Figure III-49 : Analyse de l'expression de la phosphorylation de Smad3 par western-blot. (iRI : inhibiteur du RI ; Témoin : étirement)

III.5.2. Activation du TGFβ latent par la contrainte mécanique

Le TGF-β est synthétisé sous la forme d'un complexe latent lié à des protéines LAP. Ce complexe latent est sécrété par toutes les cellules et se trouve soit en circulation soit lié à la matrice extracellulaire via des glycoprotéines appelées LTBP. Plusieurs mécanismes interviennent dans l'activation du TGF-β latent. Le rôle des contraintes mécaniques dans ce phénomène a déjà été décrit [Wells RG et al, 2008 ; Wipff PJ et al, 2007]. Notre hypothèse est que la contrainte d'étirement entraînerait une libération du TGF-β du complexe latent et puis une augmentation de Smad3p.

Koli K *et al*, en travaillant avec des CSMs, on trouvé que la quantité de TGFβ-1 activé augmente parallèlement à l'augmentation de la synthèse de la MEC au cours de temps, car l'expression de LTBP augmente au cours de temps [Koli K et al, 2008]. Nous avons donc cultivé les cellules pendant 1 jour, 2 jours et 5 jours avant de les soumettre à la contrainte d'étirement puis nous avons pu observer :

- Une augmentation de l'expression de la LTBP au cours de temps (Figure III-50), comme décrit par Koli *et al*, traduisant une augmentation de la synthèse du la MEC et la présence du TGFβ latent.

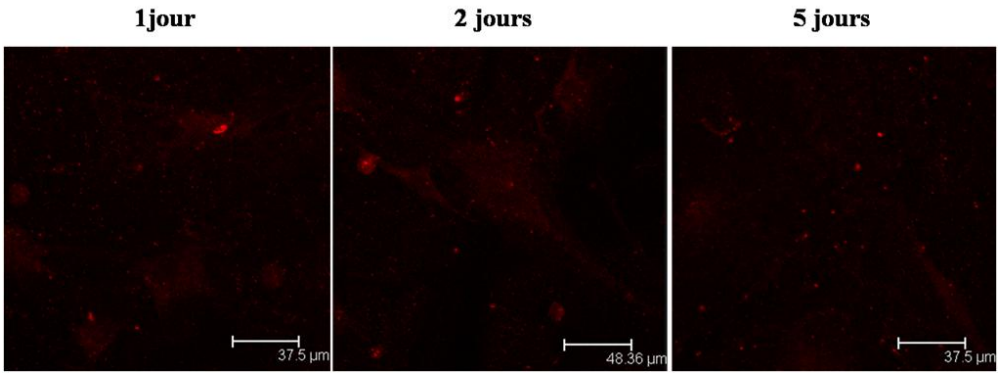


Figure III-50: Expression de LTBP-1 dans la matrice extracellulaire des CSMs pendant 1 jour, 2 jours et 5 jours par immunofluorescence. (Les points rouges représentent l'expression de LTBP-1)

- Une augmentation significative du TGFβ dosé par ELISA dans les surnageants du milieu de culture refléant le TGFβ total (libre et latent, complexé à la LTBP) après application d'une contrainte d'étirement de 0,5 Hz pendant 30 minutes et 1heure (Figure III-51)

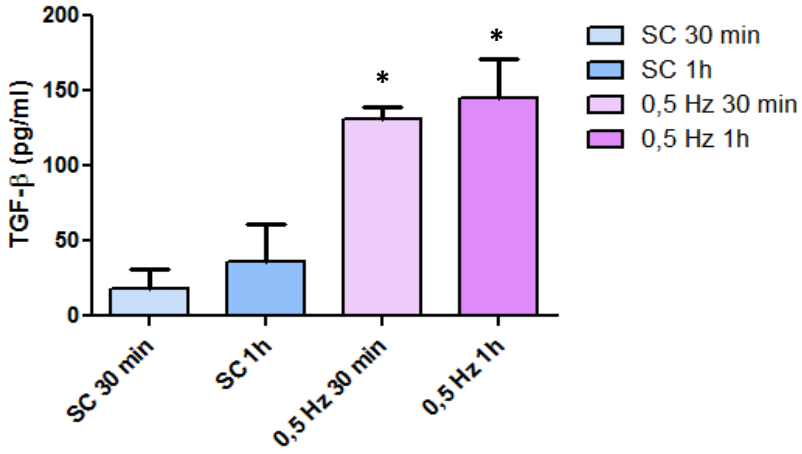


Figure III-51 : Analyse de la concentration de TGFβ-1 dans le surnageant de milieu de culture des CSMs avec ou sans contrainte d'étirement pendant 30min ou 1h par ELISA. (SC: sans contrainte ; *p<0,05)

- Une augmentation de la phosphorylation de Smad3 après application de la contrainte d'étirement. Cependant, aucune différence n'est observé entre les différents temps de culture (1, 3 et 5 jours). (Figure III-52 et III-53)

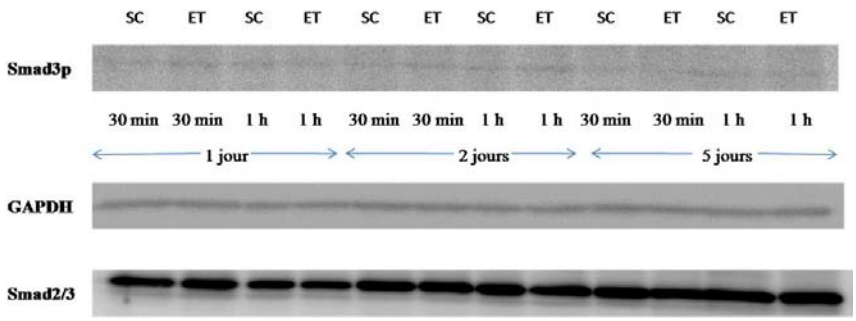


Figure III-52: Expression de Smad3p et Smad2/3 dans les CSMs après 1 jour, 2 jours et 5 jours de prolifération, par western-blot, avec ou sans contrainte d'étirement pendant 30min ou 1h . (ET : étirement ; SC : sans contrainte)

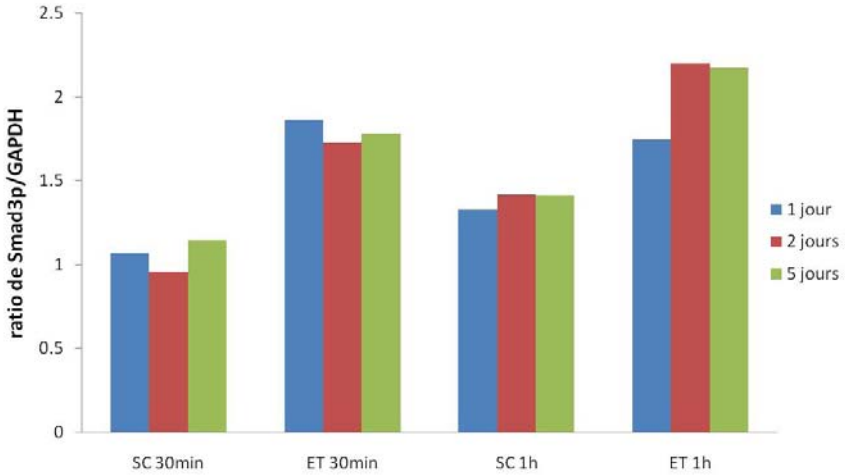


Figure III-53: Analyse de l'expression relative de Smad3p dans les CSMs avec ou sans l'étirement pendant 30min, 1h de 1 jour, 2 jours et 5 jours par le logiciel Multi Gauge (Fujifilm, Japon). (ET: étirement; SC : sans contrainte)

L'ensemble de ces résultats montre que bien que l'expression de la LTBP augmente au cours du temps et que la quantité de Smad3p augmente après une contrainte d'étirement. Cependant, l'augmentation du temps de culture de 1 à 5 jours ne permet pas d'accroître la phosphorylation de Smad3. Deux hypothèses peuvent alors être émises : soit l'effet du TGFβ sur la phosphorylation de Smad3 est maximum dès J1 et on assiste à un phénomène de saturation, soit le TGFβ détecté n'a pas d'incidence majeure sur la phosphorylation de Smad3 et d'autres facteurs doivent être recherchés. La première hypothèse semble peu probable car les concentrations de TGFβ retrouvées dans les surnageants de culture sont très inférieures à celles que nous avions utilisées précédemment pour la stimulation des CSMs (paragraphe II-4, Figures III-12 et III-13)

Ces résultats ne nous premettent pas de montrer que le lien entre la contrainte mécanique d'étirement et la phosphorylation de Smad3 repose sur le TGFβ.

III.5.3. Implication du cytosquelette

III.5.3.1. L'effet de l'étirement sur la morphologie des CSMs

La morphologie des CSMs a été étudiée après l'application d'étirement pendant 10min, 30min, 1h et 3h. Les zones centrales des puits ont été étudiées afin de s'assurer que les cellules sont sousmises à une contrainte équibiaxiale homogène [Huang J et al, 2007]. Les images des cellules sont traitées avec un logiciel de traitement d'image (ImageJ), et les valeurs obtenues sont exploitées à l'aide d'un logiciel statistique (Microcal Origin 6.0).

L'indice de forme est le rapport entre le petit et le grand axe de la cellule. Lorsqu'il est compris entre 0 et 0,5, la cellule est allongée, et lorsqu'il est compris entre 0,5 et 1, la cellule est arrondie. Les résultats montrent que les CSMs cultivées sur les membranes de silicone sont des cellules allongées, il apparaît que l'indice de forme diminue après application de la contrainte d'étirement, le maximum de cellules présentent un indice de forme compris entre 0,1 et 0,15 après 30 minutes de contrainte d'étirement. En conséquence, les cellules prennent une forme beaucoup plus allongée après 30 minutes d'application d'une contrainte d'étirement et conservent cette forme au moins jusqu'à 3 heures (Figure III-54 et III-55).

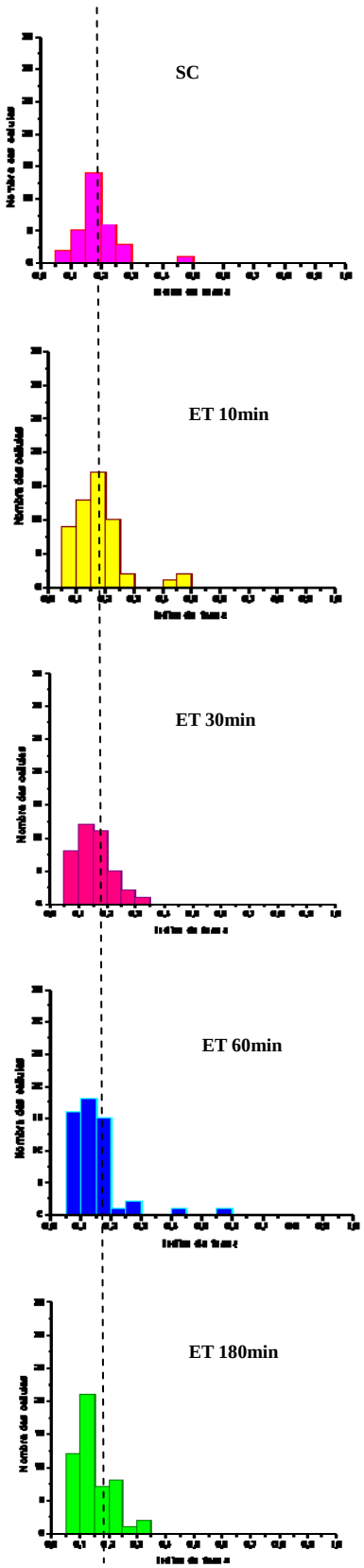


Figure III-54 : Histogrammes de distribution de l'indice de forme des CSMs soumises ou non à une contrainte d'étirement pendant 10min, 30min, 1h et 3h. Analyse avec le logiciel de traitement d'image (ImageJ) et le logiciel statistique (Microcal Origin 6.0).

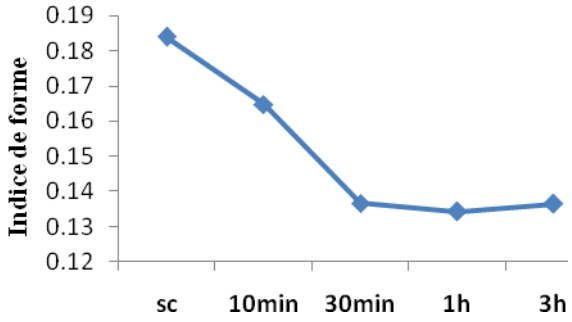
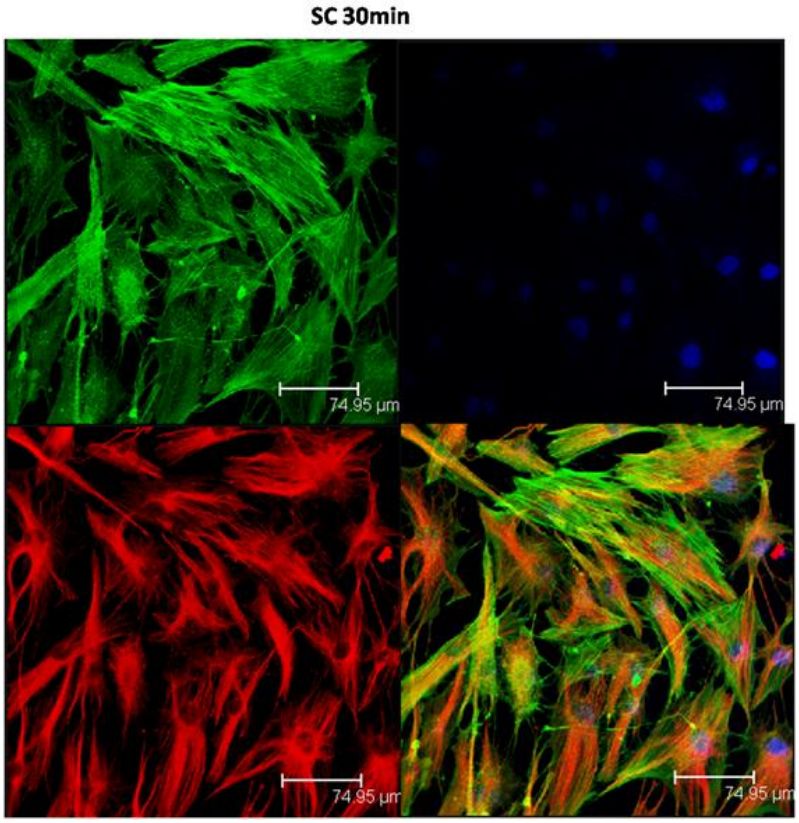


Figure III-55 : Variation de l'indice de forme (médium) des CSM soumises ou non à une contrainte d'étirement pendant 10min, 30min, 1h et 3h (SC : sans contrainte).

La Figure III-56 présente des images des composants du cytosquelette, les filaments d'actine en vert et les microtubules en rouge, dans les cellules soumisses ou pas à une contrainte d'étirement. Nous n'avons pas observé des changements au niveau des filaments d'actine dans les différentes conditions analysées. Par contre, une diminution de l'intensité de fluorescence des microtubules, ainsi qu'un changement de leur morphologie a été observée après stimulation mécanique.



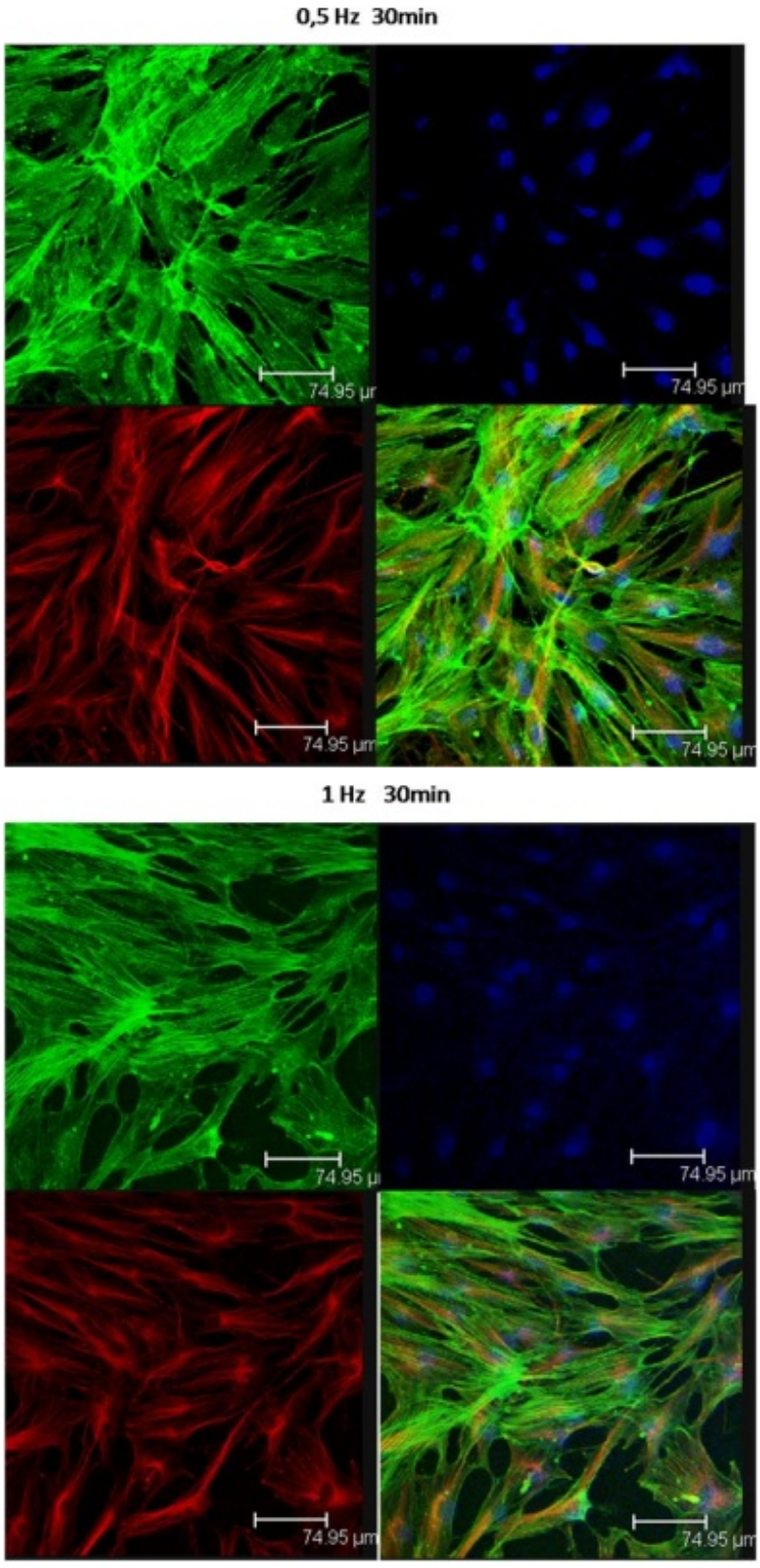


Figure III-56 : Images du cytosquelette des CSMs (vert: microfilaments; rouge: microtubules; bleu: noyau) sans et après application d'une contrainte d'étirement de fréquences 0,5Hz ou 1Hz pendant 30min (SC: sans contrainte) (Microscope confocal Leica, objectif 40x).

Pour les résultats du cytosquelette, on ne montre que les trois images ici. En fait, on n'a pas trouvé la différence de l'expression des microfilaments, ni microtubules, avec ou sans étirement. Par contre, on a trouvé la différence de leurs orientations et leurs distributions dans les CSMs (résultats non montrés) avec ou sans étirement. Pour confirmer ce qu'on a trouvé, il faudra les analyser avec un programme numérique.

III.6. Discussion

L'idée d'étudier l'effet de l'étirement cyclique équibiaxial, comme une forme de distorsion de stress, sur le chondroinduction est venue d'une étude réalisée par He *et al*. [He Y et al, 2004], dans laquelle il est rapporté que les fibroblastes du ligament répondent aux deux différentes stimulations mécaniques-l'étirement et la compression, par la synthèse mais aussi la dégradation de la matrice extracellulaire. Dans l'étude de Elder SH *et al*, la contrainte d'étirement cyclique biaxial (1 Hz et 15 %) est appliquée sur les CSMs pendant 3 jours, 3 heures par jour. Après l'étirement, l'expression des gènes d'aggrécanne et collagène de type II est augmenté significativement [Elder SH et al, 2008].

Dans la première partie de ce travail sur l'étude bibliographique, nous avions rappelé que la voie de différenciation des CSMs dépendait de l'élasticité de la MEC et de la rigidité de la surface d'adhésion des cellules, le cytosquelette jouant un rôle très important [Engler AJ et al, 2004 ; 2006 ; Patwari P et al, 2008]. Peut-être les membranes flexibles peuvent garder les cellules moins préstressées, augmenter la densité des cellules, qui est vers la différenciation des CSMs en chondrocytes.

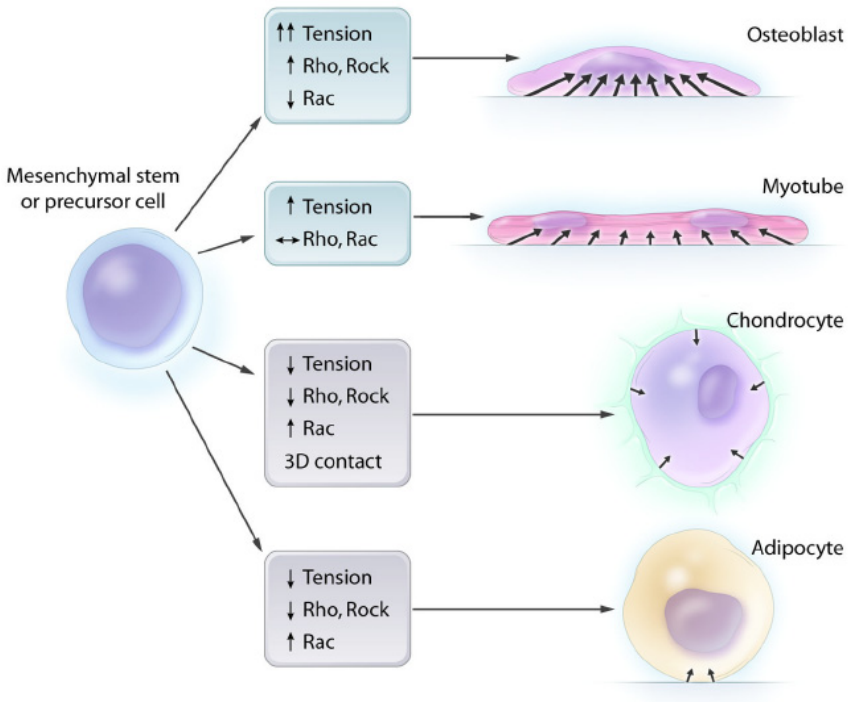


Figure III-57 : Voies de différenciation des CSMs et infuence du cytosquelette *in vitro*. [*D'après Patwari P et al, 2008*]

Selon les résultats de nos expériences, les cellules prolifèrent mieux sur les membranes flexibles que les surfaces plastiques.

L'application de la contrainte d'étirement dans un modèle en 3D étant très difficile àréaliser, la stimulation d'étirement peut être utilisée comme un facteur induisant la différenciation des CSMs, avant de soumettre les CSMs à la compression en 3D. En effet, on suppose que **la stimulation d'étirement équibiaxial cyclique joue un rôle pendant la différenciation initiale des CSMs en chondrocytes**.

Dans nos expériences, nous avons étudié l'effet de l'étirement équibiaxial cyclique sur la transduction du signal des CSMs. Comme nous avons déjà étudié la voie de la signalisation de TGFβ, nous avons dans un premier temps voulu voir si l'étirement agit sur les CSMs via la même voie de signalisation que le TGFβ. Nos résultats montrent que l'effet d'étirement (0,5Hz, 5%) sur les deux types de cellules (CSMs et chondrocytes) exerce un effet similaire à celui du TGF-β1. La phosphorylation de Smad3 augmente avec l'étirement et Smad3p se translocalise dans les noyaux après contrainte d'étirement comparé à sans contrainte, et elle atteint son niveau maximum à 30 minutes ou à 1 heure, puis diminue à 3 heures. Deux fréquences d'étirement : 0,5 Hz et 1 Hz, ont été testées et exercent pratiquement le même effet sur la phosphorylation de Smad3 des CSMs, 0,5 Hz est un peu mieux que 1 Hz. Ensuite la comparaison de l'effet de l'étirement et du TGF-β1 sur les CSMs, a permis de montrer que l'effet d'étirement est un peu moins que celui de TGF-β1 sur la phosphorylation de Smad3. Toutefois, nous avons pu montrer qu'il existait un effet synergique sur la phosphorylation de Smad3 entre la contrainte d'étirement et l'ajout du TGF-β1 dans les CSMs. Ces résultats correspondent aux études dans lesquelles les facteurs biochimiques jouent un rôle synergique avec les facteurs biomécaniques sur la chondrogenèse des CSMs [Mouw JK et al, 2007].

Nous avons étudié l'effet de l'étirement sur l'expression des gènes qui sont en aval de la voie de signalisation, Sox9 et Collagène de type II. Le gène de Sox9 est activé avec ou sans traitement d'étirement pendant 1 heure, de plus, l'effet de l'étirement est plus important que sans contrainte. Un effet plus important est observé à 0,5 Hz qu'à 1 Hz. Toutefois, l'effet est inférieur à celui observé après TGF-β1 (Figure III-58).

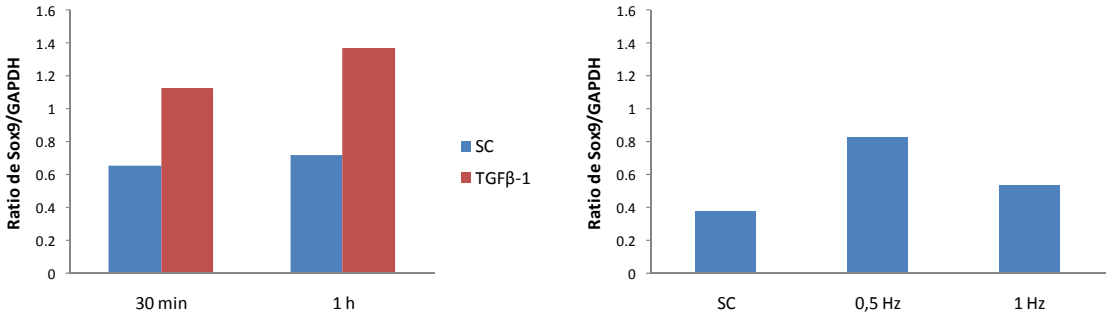


Figure III-58 : Comparaison de l'expression de gène de Sox9 sous l'effet de TGF-β1 et d'étirement.

La contrainte d'étirement exerçant les mêmes effets que TGF-β1, notamment sur la phosphorylation de Smad3, on peut légitimement se demander si la voie de signalisation empruntée est la même. Récemment, des études ont démontré que le TGF-β pouvait être activé dans la matrice extracellulaire (MEC) lorsque les cellules se contractaient et que la MEC était résistante (Figure III-59 A) ; l'absence de résistance la MEC, et même si les cellules sont contractées, le TGF-β ne peut pas être activé [Wells RG et al, 2008 ; Wipff PJ et al, 2007]. On peut imaginer que l'étirement peut induire la sécrétion de TGF-β1, qui est activé dans la MEC?

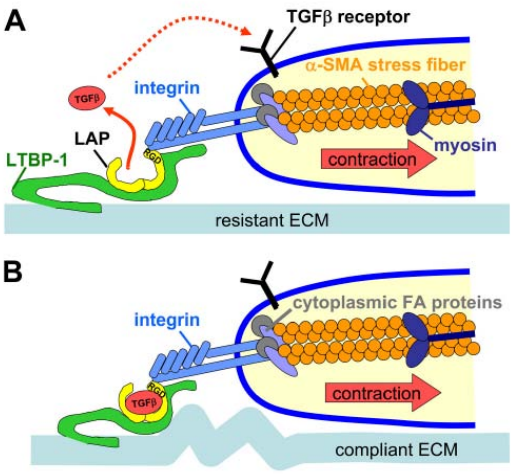


Figure III-59 : Schéma de l'activation de TGFβ dans la matrice extracellulaire. [*D'après Wipff PJ et al, 2007*]

Cependant nos résultats ne nous permettent pas de montrer que le lien entre la contrainte mécanique d'étirement et la phosphorylation de Smad3 repose sur le TGFβ.

CHAPITRE IV : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En ingénierie tissulaire, la combinaison d'un support tridimensionnel, de cellules et de facteurs de différenciation (biochimique et biomécanique) qui permette d'améliorer la fonctionnalité du tissu néoformé. Les CSMs représentent une source cellulaire alternative pour l'ingénierie tissulaire du cartilage grâce à leur facilité d'obtention, leur capacité de prolifération et leur potentiel de différenciation en chondrocytes. De nombreux facteurs mécaniques et biochimiques, ainsi que leur mode de culture (2D ou 3D) dans des biomatériaux peuvent intervenir dans les processus de la chondrogenèse.

L'objet de notre travail était de définir les premières étapes dans la reconstruction d'un biocartilage :

- isolement et expansion des CSMs à partir de la moelle osseuse,
- définition des stimulations biochimiques et biomécaniques, étude la voie de signalisation de TGFβ.

Dans la première partie, nous avons optimisé les conditions de culture cellulaire *in vitro* pour l'isolement et l'expansion des CSM humaines à partir de la moelle osseuse. La figure IV-1 montre une stratégie classique d'ingénierie tissulaire, et les deux premières étapes correspondent à la première partie de nos études.

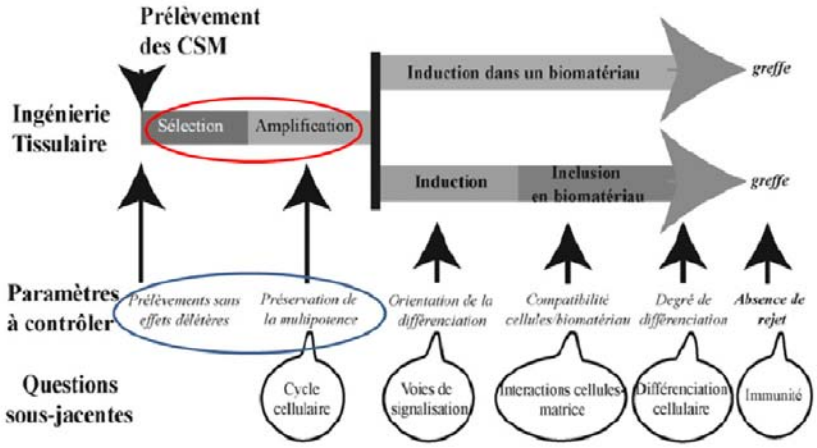


Figure IV-1 : Etapes impliquées dans l'ingénierie du cartilage [*D'après Freyria AM et al, 2008***].**

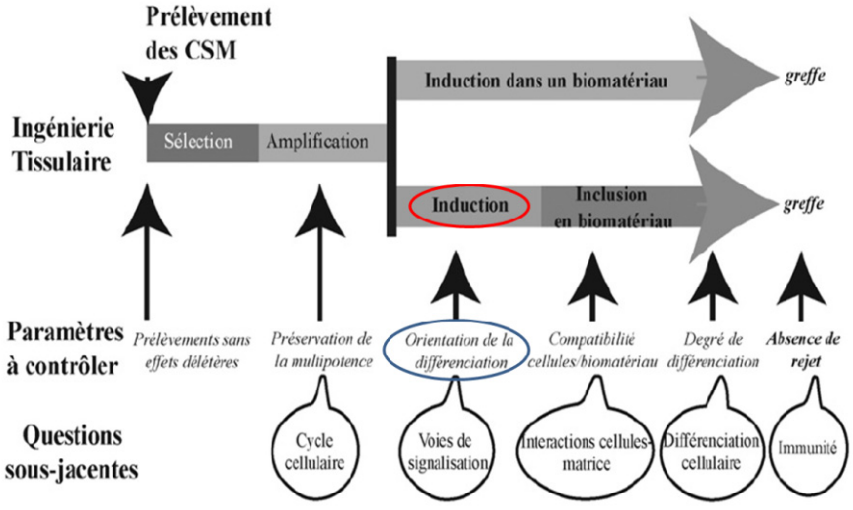
Nos résultats montrent que **le milieu de culture de α-MEM favorise la prolifération** des CSMs par rapport au milieu DMEM. Les cultures dans ce milieu nous ont permis

d'obtenir des **cellules de meilleure qualité**. Nous avons montré également que **la densité initiale d'ensemencement des cellules mononucléaires** (CMNs) de la moelle osseuse **influence le taux de prolifération dans l'expansion initiale ainsi que la qualité des CSMs obtenues**. Les conditions choisies sont présentées dans le tableau.

Tableau IV-1 : Conditions de culture choisies pour les expériences.

Paramètres	*Conditions choisies*
Milieu de culture	α-MEM, 10% SVF
Boîtes de culture	25 cm^2 P0, P1, P2, puis 75 cm^2
Densité d'ensemencement pour l'isolement	50000 CMNs/cm^2
Densité d'ensemencement pour la culture	1000 cellules/cm^2
Passage d'utilisation des cellules	P4

Dans cette stratégie classique d'ingénierie tissulaire, la troisième étape correspond à l'induction de la différenciation. Cette étape a été étudiée dans les deuxième et troisième parties de nos études. Nous avons identifié les facteurs d'induction suivants un facteur biochimique (TGF-β1) et un facteur biomécanique (étirement équibiaxial), sur la voie de la signalisation de TGFβ.



Dans la deuxième partie, nous avons étudié l'effet de TGF-β1 sur la phosphorylation de Smad3 (Smad3p) par western blot ainsi que sa localisation dans les CSMs et les

chondrocytes par immunofluorescence. L'effet du TGF-β1 sur l'expression des gènes des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des CSMs, Sox9, Runx2 et PPARγ a également été analysé.

Les résultats obtenus dans cette partie montrent que :

1. Le TGFβ1 augmente la phosphorylation de la protéine Smad3 dans les CSMs et les chondrocytes après 1h de stimulation.
2. L'effet du TGFβ1 sur la phosphorylation de Smad3 est dépendant de la concentration, avec un maximum à 5ng/mL.
3. Le TGFβ1 induit une translocation nucléaire de la protéine Smad3 dans les CSMs et les chondrocytes après 1h de stimulation. On observe un maximum à 5 ng/mL.
4. Le TGFβ1 augmente l'expression du gène du facteur de transcription Sox9.

Dans la troisième partie, nous avons étudié l'effet de l'étirement équibiaxial sur la voie de signalisation de TGF-β. Pour cela nous avons analysé la phosphorylation et la localisation de la protéine Smad3 dans les CSMs et les chondrocytes, en fonction du temps et de la fréquence de stimulation. De plus, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre l'étirement équibiaxial et le TGF-β1. Nous avons également étudié l'expression des gènes des facteurs de transcription Sox9, Runx2 et PPARγ après stimulation mécanique des cellules. Enfin, pour essayer de comprendre le mécanisme conduisant à la phosphorylation de Smad3 dans les cellules après stimulation mécanique, nous avons étudié l'effet de l'étirement sur la localisation du récepteur du TGF-β de type II, l'activation de TGF-β1 latent, la morphologie et le cytosquelette cellulaire.

Les résultats obtenus dans cette partie montrent que :

1. L'étirement augmente la phosphorylation de Smad3 dans les CSMs, avec un effet dépendant du temps, mais indépendant de la fréquence.
2. Il y a un effet synergique entre l'étirement et le TGF-β1.
3. L'étirement augmente l'expression de l'ARNm du facteur de transcription Sox9, avec un effet dépendant de la fréquence.

En conclusion, nous avons confirmé que l'étirement équibiaxial peut activer la voie de

signalisation du TGF-β. Ceci permettra l'engagement des CSMs vers une lignée chondrocytaire.

Mais le mécanisme avec lequel l'étirement équibiaxial active la phosphorylation de la protéine Smad3 reste inexpliqué. En fonction de la voie de signalisation de TGF-β, nous avons émis trois hypothèses :

1. Les récepteurs de TGF-β de type I et type II (RI et RII) sont activés avec l'étirement,
2. Le TGF-β1 synthétisé et stocké dans la MEC sous la forme latent, est activé par l'étirement.
3. L'effet de l'étirement passe par le cytosquelette (microfilaments, microtubules), qui ensuite active la voie de signalisation de TGF-β.

Selon nos résultats, il semble que les deux premières hypothèses ont une mineure participation à l'activation de la voie de signalisation de TGF-β. Par contre, il faudra confirmer la participation des microtubules dans cette voie. En effet, différentes études ont montré que la participation des microtubules dans la mécanotransduction des cellules soumises à une contrainte d'étirement [Putnam AJ et al, 1998; 2003]. Pour cela, nous pouvons utiliser des inhibiteurs de l'état de polymérisation des microtubules.

De plus, il serait intéressant d'étudier l'effet d'une autre contrainte mécanique, la compression sur les CSMs. Une étude préliminaire a été conduite sur l'effet du TGF-β1 et la compression sur la phosphorylation de Smad3 dans les CSMs ou le cytosquelette des CSMs ensemencés dans un biomatériau tridimensionnel (hydrogel d'alginate/HA). Nous avons observé que le TGF-β1 augmente la phosphorylation de Smad3 dans les CSMs en 3D (Figure IV-2). Par contre, l'expression du cytosquelette des CSMs diminue après la stimulation de compression ou de TGF-β1 (Figure IV-3 et IV-4).

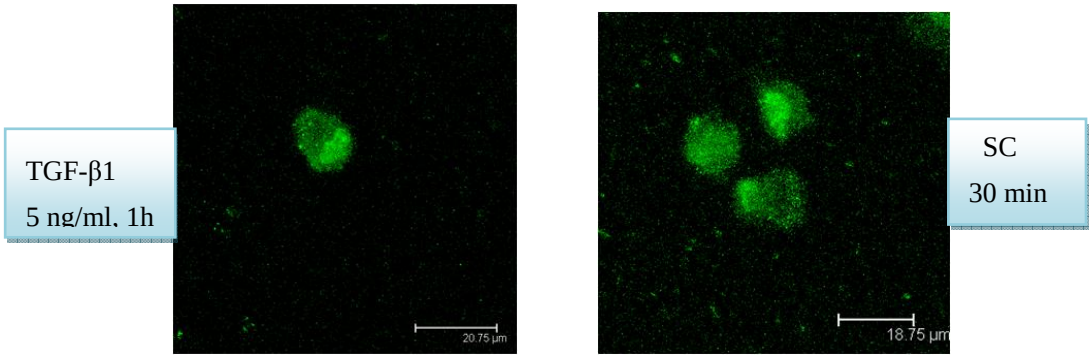


Figure IV-2: Expression de Smad3 dans les CSMs après stimulation avec TGF-β1 ou pas.

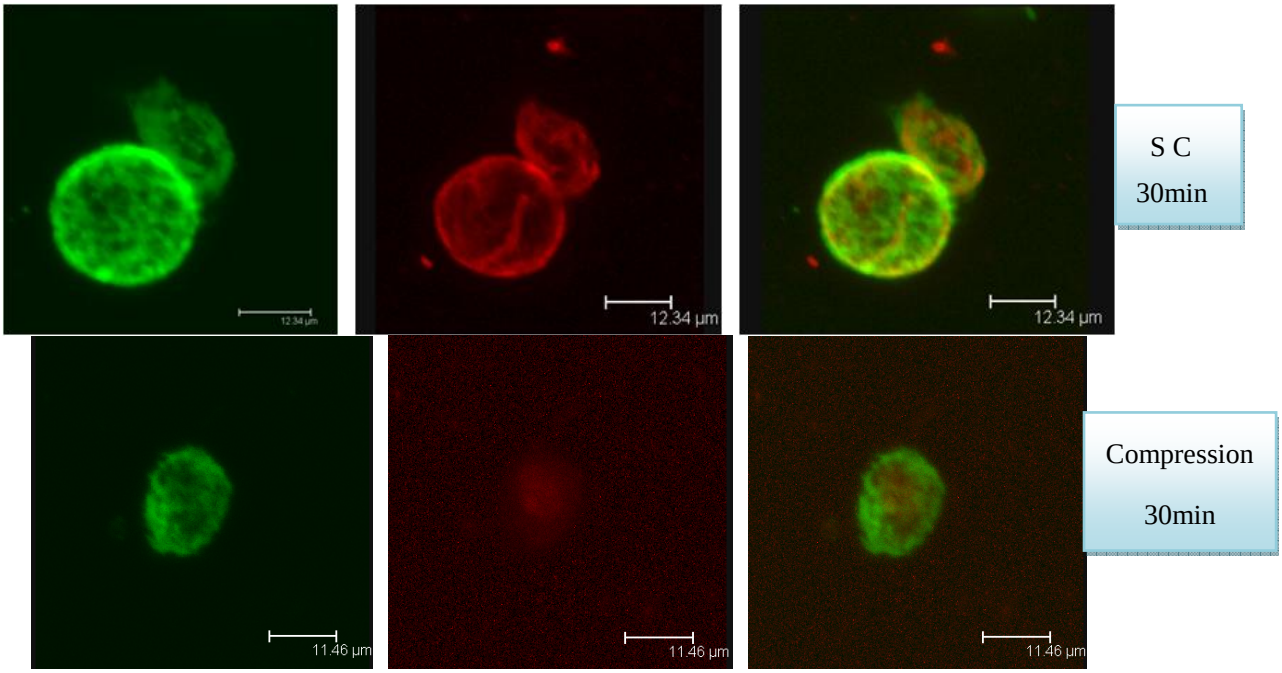


Figure IV-3: Expression du cytosquelette des CSMs avec ou san une contrainte de compression (vert : microfilament ; rouge : microtubule ; SC : sans contrainte)

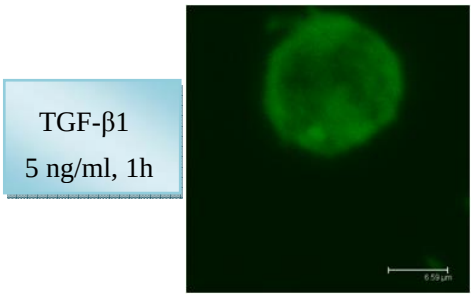


Figure IV-4: Expression du cytosquelette des CSMs après stimulation avec TGF-β1 (vert : microfilament)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdel-Wahab N, Wicks SJ, Mason RM, Chantry A. Decorin suppresses transforming growth factor-β-induced expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human mesangial cells through a mechanism that involves Ca^{2+}-dependent phosphorylation of Smad2 at serine-240. Biochem J, 2002, 362: 643-649.

Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrugghe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. Genes Dev, 2002, 16: 2813-2828

Alenghat FJ, Ingber DE. Mechanotransduction: All Signals Point to Cytoskeleton, Matrix, and Integrins. Sci STKE, 2002, pe6.

Almeida-Porada G, Porada CD, Tran N, Zanjani ED. Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. Blood, 2000, 95: 3620-3627.

Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. Arthritis Rheum, 2004, 50: 1522-1532.

Andersson S, Nilsson B, Hessel T, Saraste M, Noren A, Stevens-Andersson A, Rydholm D. Degenerative joint disease in ballet dancers. Clin Orthop, 1989; 238 : 233-236.

Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFβ activation. J Cell Sci, 2003, 116: 217-224.

Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—similarities to astrocyte grafts. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 3908-3913.

Bader DL and Kempson GE. The short-term compressive properties of mature human articular cartilage. Biomed Mater Eng. 1994; 4 : 245-256.

Barbero A, Ploegert S, Heberer M, Martin I. Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. Arthritis Rheum, 2003, 48: 1315-1325.

Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. Exp Cell Res, 2001, 268:189-200.

Bartholomew A, Sturgeon C, Stiatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S,Hardy W ,Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. Exp Hematol, 2002, 30: 42-48.

Bartmann C, Rohde E, Schallmoser K, Pürstner P, Lanzer G, Linkesch W, Strunk D. Two steps to functional mesenchymal stromal cells for clinical application. Transplantation and cellular engineering, 2007, 47: 1426-1435.

Battula VL, Bareiss PM, Treml S, Conrad S, Albert I, Hojak S, Abele H, Schewe B, Just L, Skutella T, Bühring HJ.. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. Differentiation, 2007, 75: 279-291.

Batut J, Howell M，Hill CS. Kinesin-mediated transport of Smad2 is required for signaling in response to TGFβ ligands. Dev Cell, 2007, 12: 261-274.

Bhatia R, Hare JM. Mesenchymal stem cells: future source for reparative medicine. Congest Heart Fail, 2005, 11: 87-91.

Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrugghe B. Sox9 is required for cartilage formation. Nat Genet, 1999, 22:85-89.

Bialek P, Kern B, Yang X, Schrock M, Sosic D, Hong N, Wu H, Yu K, Ornitz DM, Olson EN, Justice MJ, Karsenty G. A twistcode determines the onset of osteoblast differentiation. Dev Cell, 2004, 6: 423-435.

Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. J Clin Invest, 2000, 105: 1663-1668.

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: Nature,

biology, and potential applications. Stem Cells, 2001, 19: 180-192.

Bianco P, Robey PG. Marrow stromal stem cells. J Clin Invest, 2000, 105: 1663-1668.

Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. Nature, 2001, 414: 118-121.

Biedack K, Kern S, Kluter H, Eicher H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Stem Cells, 2004, 22: 625-634.

Bliddal H, Christensen R. The management of osteoarthritis in the obese patient: practical considerations and guidelines for therapy. Obes Rev, 2006, 7 : 323-331.

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med, 1994, 331 : 889-895.

Brittberg M, Peterson L, Sjogren-Jansson E, Tallheden T, Lindahl A. Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. J Bone Joint Surg Am, 2003, Suppl 3:109-115.

Brouard N, Chapel A, Thierry D, Charbord P, Péault B. Transplantation of gene-modified human bone marrow stromal cells into mouse-human bone chimeras. J Hematother. Stem cell Res, 2000, 9: 175-181.

Brown JD, DiChiara MR, Anderson KR, Gimbrone MA Jr, Topper JN. MEKK-1, a component of the stress (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase) pathway, can selectively activate Smad2-mediated transcriptional activation in endothelial cells. J Biol Chem, 1999, 274: 8797-805.

Buckwalter JA, Rosenberg LC. Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. Electron Microsc Rev, 1998, 1: 87-112.

Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinsky AJ, Hunziker EB. Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte / agarose culture. J Cell Sci, 1995, 108: 1497-1508.

Camalet S, Duke T, Julicher F, Prost J. Auditory sensitivity provided by self-tuned critical oscillations of hair cells. Proc. Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 3183-3188

Campbell JJ, Lee DA, Bader DL. Dynamic compressive strain influences chondrogenic gene expression in human mesenchymal stem cells. Biorheology, 2006, 43: 455-470.

Campioni D, Lanza F, Moretti S , Dominici M, Punturieri M, Pauli S, Hofmann T, Horwitz E, Castoldi GL. Functional and immunophenotypic characteristics of isolated CD105(+) and fibroblast(+) stromal cells from AML: implications for their plasticity along endothelial lineage. Cytotherapy, 2003, 5: 66-79.

Caneva L, Soligo D, Cattoretti G, Deharven E, Deliliers GL. Immunoelectron microscopy characterization of human bone-marrow stromal cells with Anti-Ngfr antibodies. Blood Cells Mol Dis, 1995, 21: 73-85.

Caplan AL, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J Cell Biochem, 2006, 98: 1076-1084.

Caplan AL. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. J Pathol, 2009, 217: 318-324.

Carlo-Stella C, Mangoni L, Rizzoli V. Biology and clinical applications of long-term bone marrow cultures. Int J Artif Organs, 1993, 16: 76-79.

Carver SE, Heath CA. Increasing extracellular matrix production in regenerating cartilage with intermittent physiological pressure. Biotechnol Bioeng, 1999, 62 : 166-174.

Cassiede P, Dennis JE, Ma F, Caplan AI. Osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cells exposed to TGF-β1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro. J Bone Miner Res, 1996, 11:1264-1273.

Cattoretti G, Schiro R, Orazi A, Soligo D, Colombo MP. Bone marrow stroma in humans - Anti-nerve growth-factor receptor antibodies selectively stain reticular cells In vivo and In vitro. Blood, 1993, 81: 1726-1738.

Cheifetz S, Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J, Letarte M. Endoglin is a

component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. J Biol Chem, 1992, 267:19027-19030.

Chen BM, Grinnell AD. Integrins and modulation of transmitter release from motor nerve terminals by stretch. Science, 1995, 269: 1578-1580.

Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides G M, Ingber DE. Geometric control of cell life and death. Science, 1997, 276:1425-1428

Chen HB, Rud JG, Lin K, Xu L. Nuclear Targeting of Transforming Growth Factor-β-activated Smad Complexes. J Biol Chem, 2005, 280: 21329-21336.

Chen YG. Endocytic regulation of TGF-β signaling. Cell Research, 2009, 19: 58-70.

Chen YJ, Huang CH, Lee IC, Lee YT, Chen MH, Young TH. Effects of cyclic mechanical stretching on the mRNA expression of tendon/ligament-related and osteoblast-specific genes in human mesenchymal stem cells. Connect Tissue Res, 2008, 49: 7-14.

Cheng SL, Shao JS, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. J Biol Chem, 2003, 278: 45969-45977.

Chicurel ME, Chen CS, Ingber DE. Cellular control lies in the balance of forces. Current Opinion in Cell Biology, 1998, 10: 232-239.

Ching CT, Chow DH, Yao FY, Holmes AD. Changes in nuclear composition following cyclic compression of the intervertebral disc in an in vivo rat-tail model. Med Eng Phys, 2004, 26: 587-594.

Chowdhury TT, Bader DL, Lee DA. Dynamic compression counteracts IL-1beta induced iNOS and COX-2 activity by human chondrocytes cultured in agarose constructs. Biorheology, 2006,43 : 413-429.

Chowdhury TT, Salter DM, Bader DL, Lee DA. Integrin-mediated mechanotransduction processes in TGFbeta-stimulated monolayer-expanded chondrocytes. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 318: 873-881.

Colter DC, Class R, Digirolamo Cm, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 3213-3218.

Conery AR, Cao Y, Thompson EA, Townsend CM, Ko TC, Luo K. Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-β induced apoptosis. Nat Cell Biol, 2004, 6: 366-372.

Cornwall MW. Biomechanics of noncontractile tissues. Phys Ther, 1984, 64: 1869-1873.

Coulombel L. Adult stem cells: seing is not being. Med Sci, 2003, 19: 683-694.

Coulombel L. Adult stem cells: their scientific interest and therapeutic future. Gynécologie Obstétrique & Fertilité, 2007, 35: 806-810.

Coulombel L. Adult stem cells: who are they, what do they do? Acad Natl Med, 2005, 189: 589-602.

Coulombel L. Identification of hematopoietic stem–progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. Oncogene, 2004, 23: 7210-7222.

Cremer MA, Rosloniec EF, Kang AH. The cartilage collagens: a review of their structure, organisation, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. J Mol Med, 1998, 76: 275-288.

cytoskeleton regulate cell growth, migration, and tissue pattern during morphogenesis. Int Rev Cytol, 1994, 150:173-224.

Czarny M, Schnitzer JE. Neutral sphingomyelinase inhibitor scyphostatin prevents and ceramide mimics mechanotransduction in vascular endothelium. Am J Physiol, 2004, 287: H1344-H1352

Dai P, Nakagami T, Tanaka H, Hitomi T, TakamatsuT. Cx43 mediates TGF-β signaling through competitive Smads binding to microtubules. Mol Biol Cell, 2007, 18: 2264-2273.

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P ,Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells

from adult human synovial membrane. Arthritis Rheum, 2001, 44: 1928-1942.

de Crombrugghe B, Lefebvre V, Nakashima K Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. Curr Opin Cell Biol, 2001, 13:721-727.

De Lise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. Osteoarthritis Cartilage, 2000, 8 : 309-334.

Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. Exp Hematol, 2000, 28: 875-884.

Demarteau O, Wendt D, Braccini A, Jakob M, Schäfer D, Heberer M, Martin I. Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 310: 580-588.

Deng W, Han Q, Liao L, Li C, Ge W, Zhao Z, You S, Deng H, Murad F, Zhao RC. Engrafted bone marrow-derived flk-/+ msenchymal stem cells regenerate skin tissue. Tissue Eng, 2005, 11: 110-119.

Derubeis AR, Mastrogiacomo M Canceda R,Quarto R.Osteogenic potential of rat spleen stromal cells. Eur J Cell Biol, 2003, 82: 175-181.

Derynck R, Akhurst RJ. Diferentiation plasticity regulated by TGF-β familly proteins in development and disease. Nature, 2007, 9: 1000-1004.

Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-β family signalling. Nature, 2003, 425: 577-584.

Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL. Distinct endocytic pathways regulate TGF-β receptor signaling and turnover. Nat Cell Biol, 2003, 5: 410-21.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P ,Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. Blood, 2002, 99: 3838-3843.

Diaz-Romero J, Gaillard JP, Grogan SP, Nesic D, Trub T, Mainil-Varlet P.

Immunophenotypic analysis of human articular chondrocytes: changes in surface markers associated with cell expansion in monolayer culture. J Cell Physiol, 2005, 3:731-742.

Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. Br J Haematol, 1999, 107: 275-281.

Dike LE, Chen CS, Mrksich M, Tien J, Whitesides GM, Ingber DE. Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1999, 35: 441-448.

Doherty MJ, Canfield AE. Gene expression during vascular pericyte differentiation. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1999, 9: 1-17.

Dong C, Li Z, Alvarez R Jr, Feng XH, Goldschmidt-Clermont PJ. Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity. Mol Cell, 2000, 5:27-34

D'Souza AL, Masuda K, Otten LM, Nishida Y, Knudson W, Thonar EJ. Differential effects of interleukin-1 on hyaluronan and proteoglycan metabolism in two compartments of the matrix formed by articular chondrocytes maintained in alginate. Arch Biochem Biophys, 2000, 374: 59-65.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell, 1997, 89: 747-754.

Eames BF, de la Fuente L, Helms JA. Molecular ontogeny of the skeleton. Birth Defects Res C Embryo Today, 2003, 69: 93-101.

Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, Miyazono K. Smurf1 interacts with transforming growth factor-β type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. J Biol Chem, 2001, 276:12477-12480.

Edlund S, Landström M, Heldin CH, Aspenström P. Transforming growth factor-b-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA.

Mol Biol Cell, 2002, 13: 902-914.

Elder SH,Shim JW, Borazjani A, Robertson HM, Smith KE, Warnock JN. Influence of hydrostatic and distortional stress on chondroinduction. Biorheology, 2008, 45: 479-486.

Engel ME, McDonnell MA, Law BK, Moses HL. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-β-mediated transcription. J Biol Chem, 1999, 274: 37413-23740.

Engler AJ, Griffin MA, Sen S, Bonnemann CG, Sweeney HL, Discher DE. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. J Cell Biol, 2004, 166: 877-887.

Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. Cell, 2006, 126: 677-689.

Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nomura S, Himeno M, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T. Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. J Biol Chem, 2000, 275: 8695-8702.

Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progegenitor cells in human umbilical cord blood. Br J Haematol, 2000, 109: 235-242.

Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in TGF-β signaling through smads. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005, 21: 659-693

Fickert S, Fiedler J, Brenner RE. Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting. Ostheoarthr cartil, 2003, 11: 790-800.

Fraser JK, Schreiber RE, Zuk P, Hedrick MH. Adult stem cell therapy for the heart. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36: 658-66.

Freyria AM, Courtes S, Mallein-Gerin F. Differentiation of adult human mesenchymal stem cells: Chondrogenic effect of BMP-2. Pathol Biol, 2008, 56: 326-333.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kine, 1970, 3: 393-403.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. Cell Tissue Kinet, 1987, 20: 263-272.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol, 1976, 4: 267-274.

Friedenstein AJ, Ivanov-Smolenski AA, Chajlakjan RK, Gorskaya UF, Kuralesova AI, Latzinik NW, Gerasimow UW. Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants. Exp Hematol, 1978, 6:440-444.

Friedl G, Schmidt H, Rehak I, Kostner G, Schauenstein K, Windhager R. Undifferentiated human mesenchymal stem cells (hMSCs) are highly sensitive to mechanical strain: transcriptionally controlled early osteo-chondrogenic response in vitro. Osteoarthritis Cartilage, 2007, 11:1293-1300.

Frolenkov GI, Atzor M, Kalinec F, Mammano F, Kachar B. The membrane-based mechanism of cell motility in cochlear outer hair cells. Mol Biol Cell, 1998, 9: 1961-1968.

Fuentealba LC, Eivers E, Ikeda A, Hurtado C, Kuroda H, Pera EM, De Robertis EM. Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. Cell, 2007, 131: 980-993.

Fujisawa T, Hattori T, Takahashi K, Kuboki T, Yamashita A, Takigawa M. Cyclic mechanical stress induces extracellular matrix degradation in cultured chondrocytes via gene expression of matrix metalloproteinases and interleukin-1. J Biochem, 1999, 125: 966-975.

Fukumoto T, Sperling JW , Sanyal A,Fitzsimmons JS, Reinholz GG, Conover CA, O'Driscol SW.Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor- betal on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. Osteoarthr

Cartil, 2003, 11: 55-64.

Funaba M, Zimmerman CM, Mathews LS. Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. J Biol Chem, 2002, 277: 41361-41368.

Furumatsu T, Tsuda M, Taniguchi N, Tajima Y, Asahara H. Smad3 Induces Chondrogenesis through the Activation of SOX9 via CREB-binding Protein/p300 Recruitment. J Biol Chem, 2005, 280: 8343-8350.

Furumatsu T, Tsuda M, Yoshida K, Taniguchi N, Ito T, Hashimoto M, Ito T, Asahara H. Sox9 and p300 cooperatively regulate chromatin-mediated transcription. J Biol Chem, 2005, 280: 35203-35208.

Galois L, FreyriaAM, Herbage D, Mainard D. Cartilage tissue engineering: state-of-the-art and future approaches. Pathol Biol, 2005, 53: 590-598.

Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada K M. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix–cytoskeleton crosstalk. Mol Cell Biol, 2001, 2: 793-805

Ghivizzani SC, Oligino TJ, Robbins PD, Evans CH. Cartilage injury and repair. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2000, 11: 289-307.

Gieni RS, Hendzel MJ. Mechanotransduction From the ECM to the Genome: Are the Pieces now in Place? J Cell Biochem, 2008, 104:1964-1987.

Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. J Cell Biochem, 2006, 97: 33-44.

Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. Biol Blood Marrow Transplant, 2001, 7: 581-588.

Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-β. Pharmacology & Therapeutics, 2003: 257-265.

Grassel S, Ahmed N. Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on

chondrogenic differentiation. Front Biosci, 2007, 12: 4946-4956.

Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. J Cell Physiol, 2006, 207: 331-339.

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG,Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells(DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 13625-13630.

Gualandris A, Annes JP, Arese M, Noguera I, Jurukovski V, Rifkin DB. The latent transforming growth factor β-binding protein-1 promotes in vitro differentiation of embryonic stem cells into endothelium. Mol Biol Cell, 2000, 11: 4295-4308.

Guo X, Ramirez A, Waddell DS, Li Z, Liu X, Wang XF. Axin and GSK3β control Smad3 protein stability and modulate TGFβ signaling. Genes Dev, 2008, 22: 106-120.

Gupton SL, Salmon WC, Waterman-Storer CM. Converging populations of f-actin promote breakage of associated microtubules to spatially regulate microtubule turnover in migrating cells. Curr Biol, 2002, 12: 1891-1899.

Gutierrez S, Javed A, Tennant DK, van Rees M, Montecino M, Stein GS, Stein JL, Lian JB. CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) beta and delta activate osteocalcin gene transcription and synergize with Runx2 at the C/EBP element to regulate bone-specifi c expression. J Biol Chem, 2002, 277: 1316-1323.

Haasper C (a), Drescher M, Hesse E, Krettek C, Zeichen J, Jagodzinski M. Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells (hBMSC) by cyclic longitudinal mechanical strain and dexamethasone. Z Orthop Unfall, 2008, 146: 636-643.

Haasper C (b), Jagodzinski M, Drescher M, Meller R, Wehmeier M, Krettek C, Hesse E. Cyclic strain induces FosB and initiates osteogenic differentiation of mesenchymal cells. Exp Toxicol Pathol, 2008, 59: 355-363.

Haidekker MA, L'Heureux N, Frangos JA. Fluid shear stress increases membrane fluidity in endothelial cells: a study with DCVJ fluorescence. Am J Physiol, 2000, 278:

H1401-H1406.

Hall AC, Urban JP, Gehl KA. The effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in articular cartilage. J Orthop Res, 1991, 9: 1-10.

Hall BK. A role for epithelial-mesenchymal interactions in tail growth/morphogenesis and chondrogenesis in embryonic mice. Cells Tissues Organs, 2000, 166 : 6-14.

Han CM, Wang SY, Lai PP, Cen HH. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate into epidermal-like cells in vitro. Differentiation, 2007, 75: 292-298.

Hankey DP, McCabe RE, Doherty MJ, Nolan PC, McAlinden MG, Nelson J, Wilson DJ. Enhancement of human osteoblast proliferation and phenotypic expression when cultured in human serum. Acta Orthop Scand, 2001, 72: 395-403.

Hasler EM, Herzog W, Wu JZ, Müller W, Wyss U. Articular cartilage biomechanics: theoretical models, material properties, and biosynthetic response. Crit Rev Biomed Eng, 1999, 27 : 415-488.

Hata K, Nishimura R, Ueda M, Ikeda F, Matsubara T, Ichida F, Hisada K, Nokubi T, Yamaguchi A, Yoneda T. A CCAAT/enhancer binding protein beta isoform, liver-enriched inhibitory protein, regulates commitment of osteoblasts and adipocytes. Mol Cell Biol, 2005, 25: 1971-1979.

Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA Jr, Wrana JL, Falb D. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFβ receptor and functions as an antagonist of the TGFβ signaling. Cell, 1997, 89: 1165-1173.

Hayes DW, Brower R, John KJ. Articular cartilage. Anatomy, injury, and repair. Clin Podiatr Med Surg, 2001, 18 : 35-53.

He Y, Macarak EJ, Korostoff JM, Howard PS. Compression and tension: differential effects on matrix accumulation by periodontal ligament fibroblasts in vitro. Connect Tissue Res, 2004, 45: 28-39.

Heath CA, Magari SR. Mini-review: mechanical factors affecting cartilage regeneration in vitro. Biotech Bioeng, 1996, 50:430-437

Hill CS. Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins. Cell Research, 2009, 19: 36-46.

Honda K, Ohno S, Tanimoto K, Ijuin C, Tanaka N, Doi T, Kato Y, Tanne K. The effects of high magnitude cyclic tensile load on cartilage matrix metabolism in cultured chondrocytes. Eur J Cell Biol, 2000, 79: 601-609.

Hori Y, Inoue S, Hirani Y , Tabata Y. Effect of culture substrates and fibroblast growth factor addition on the proliferation and differentiation of rat bone marrow stromal cells. Tissue Eng, 2004, 10: 995-1005.

Hu S, Chen J, Wang N. Cell spreading controls balance of prestress by microtubules and extracellular matrix. Front Biosci, 2004, 9: 2177-2182.

Hu Y, Liao L, Wang Q, Ma L, Ma G, Jiang X, Zhao RC. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. J Lab Clin Med, 2003, 141: 342-349.

Huang CY, Hagar KL, Frost LE, Sun Y, Cheung HS. Effects of cyclic compressive loading on chondrogenesis of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells. Stem Cells, 2004, 22: 313-323.

Huang CY, Reuben PM, Cheung HS. Temporal expression patterns and corresponding protein inductions of early responsive genes in rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells under cyclic compressive loading. Stem Cells, 2005, 23:1113-1121.

Huang J, Ballou LR, Hasty KA. Cyclic equibiaxial tensile strain induces both anabolic and catabolic responses in articular chondrocytes. Gene, 2007, 404: 101-109.

Hui JH, Ouyang HW, Hutmacher, DW, Goh JC, and Lee EH. Mesenchymal stem cells in musculoskeletal tissue engineering: a review of recent advances in National University of Singapore. Ann Acad Med Singapore, 2005, 34: 206-212.

Huijing PA, Jaspers RT. Adaptation of muscle size and myofascial force transmission: a review and some new experimental results. Scand J Med Sci Sports, 2005, 15: 349-380.

Hunter CJ, Mouw JK, Levenston ME. Dynamic compression of chondrocyte seeded fibrin gels: effects on matrix accumulation and mechanical stiffness. Osteoarthritis Cartilage, 2004, 12: 117-130.

Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. Cytotherapy, 2004, 6: 543-553.

Ikenoue T, Trindade MC, Lee MS, Lin EY, Schurman DJ, Goodman SB, Smith RL. Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro. J Orthop Res, 2003, 21: 110-116.

Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, Miyazono K. Smad6 inhibits signaling by the TGF-β superfamily. Nature, 1997, 389: 622-626.

In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Class FH, Willemze R, Fibbe WE, Kanhai HH. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. Blood, 2003, 102:1548-1549.

Ingber DE, Dike L, Hansen L, Karp S, Liley H, Maniotis A, McNamee H, Mooney D, PIopper G, Sims J et al. Cellular tensegrity: exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration, and tissue pattern during morphogenesis. Int Rev Cytol, 1994, 150:173-224.

Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. FASEB J, 2006, 20: 811-827

Ingber DE (a). Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. J Cell Sci, 2003, 116:1157-1173.

Ingber DE (b). Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. J Cell Sci, 2003, 116: 1397-1408.

Inman GJ, Nicolas FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Rrith AD, Laping NJ, Hill CS. SB-431542 Is a Potent and Specific Inhibitor of Transforming Growth Factor-β

Superfamily Type I Activin Receptor-Like Kinase (ALK) Receptors ALK4, ALK5, and ALK7. Mol Pharmacol, 2002, 62: 65-74.

Inman GJ, Nicolas FJ, Hill CS. Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-β receptor activity. Mol Cell, 2002, 10: 283-294.

Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor-β family members through Smad proteins. Eur J Biochem, 2000, 267: 6954-6967.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature, 2002, 418: 41-49.

JiangY, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. Exp Hematol, 2002, 30: 896-904.

Jin Q, Ding W, Mulder KM. Requirement for the dynein light chain km23-1 in a Smad2-dependent transforming growth factor-β signaling pathway. J Biol Chem, 2007, 282: 19122-19132.

Jinnin M, Ihn H, Tamaki K. Characterization of SIS3, a Novel Specific Inhibitor of Smad3, and Its Effect on Transforming Growth Factor-β1-Induced Extracellular Matrix Expression. Mol Pharmacol, 2006, 69:597-607.

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Exp Cell Res, 1998, 238:265-272.

Jones EA, English A, Kinsey SE, Straszynski L, Emery P, Ponchel F, McGonagle D. Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow. Cytometry Part B: Clin Cytometry, 2006, 70B: 391-399.

Jorgensen C, Gordeladze J, Noel D. Tissue engineering through autologous mesenchymal

stem cells. Curr Opin Biotechnol, 2004, 15:406-410.

Kamaraju AK, Roberts AB. Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. J Biol Chem, 2005; 280:1024-1036.

Karsenty G. The complexities of skeletal biology. Nature, 2003, 423: 316-318.

Kassem M, Dristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2004, 95: 209-214.

Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, Glass DA, Hartmann C, Li L, Hwang TH, Brayton CF, Lang RA, Karsenty G, Chan L. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice defi cient in Lrp5, a Wnt coreceptor. J Cell Biol, 2002, 157: 303-314.

Katz AJ,tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC, Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. Stem Cells, 2005, 23: 412-423.

Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF β receptor for degradation. Mol Cell, 2000, 6:1365-1375.

Kawakami Y, Tsuda M, Takahashi S, Taniguchi N, Esteban CR, Zemmyo M, Furumatsu T, Lotz M, Belmonte JC, Asahara H. Transcriptional coactivator PGC-1alpha regulates chondrogenesis via association with Sox9. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102: 2414-2419.

Kawasaki K, Ochi M, Uchio Y, Adachi N, Matsusaki M. Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels. J Cell Physiol, 1999, 179: 142-148.

Kerin A, Patwari P, Kuettner K, Cole A, Grodzinsky A. Molecular basis of osteoarthritis: biomechanical aspects. Cell Mol Life Sci, 2002, 59: 27-35.

Kerr CL, Gearhart JD, Elliott AM, Donovan PJ. Embryonic germ cells: when germ cells become stem cells. Semin Reprod Med, 2006, 24: 304-313.

Khan S, Sheetz MP. Force effects on biochemical kinetics. Annu Rev Biochem, 1997, 66: 785-805

Khoshfetrat AB, Kino-oka M, Takezawa Y, Sato Y, Yamamoto T, Sugawara K, Taya M. Effect of transforming growth factor-beta1 on morphological characteristics relating to migration and differentiation of rabbit chondrocytes cultured in collagen gels. J Biosci Bioeng, 2008, 106:547-53.

Kim YJ, Sah RL, Grodzinsky AJ, Plaas AH, Sandy JD. Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior: physical stimuli. Arch Biochem Biophys, 1994, 311: 1-12.

Kisiday JD, Frisbie DD, McIlwraith W, Grodzinsky A. Dynamic compression stimulates proteoglycan synthesis by mesenchymal stem cells in the absence of chondrogenic cytokines. Tissue Eng Part A, 2009 Feb 25. [Epub ahead of print].

Kisiday JD, Jin M, DiMicco MA, Kurz B, Grodzinsky AJ. Effects of dynamic compressive loading on chondrocyte biosynthesis in self-assembling peptide scaffolds. J Biomech, 2004, 37: 595-604.

Ko KS, Arora PD, McCulloch CA. Cadherins mediate intercellular mechanical signaling in fibroblasts by activation of stretch-sensitive calcium-permeable channels. J Biol Chem, 2001, 276:35967-35977.

Kobayashi T, Watanabe H, Yanagawa T, Tsutsumi S, Kayakabe M, Shinozaki T, Higuchi H, Takagishi K. Motility and growth of human bone-marrow mesenchymal stem cells during ex vivo expansion in autologous serum. J Bone Joint Surg Br, 2005, 87: 1426-1433.

Kocaoemer A, Kern S, Kluter H, Bieback K. Human AB Serum and Thrombin-Activated Platelet-Rich Plasma Are Suitable Alternatives to Fetal Calf Serum for the Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. Stem Cells, 2007, 25:1270-1278.

Koike M, Shimokawa H, Kanno Z, Ohya K, Soma K. Effects of mechanical strain on

proliferation and differentiation of bone marrow stromal cell line ST2. J Bone Miner Metab, 2005, 23: 219-225.

Koli K, Ryynänen MJ, Keski-Oja J. Latent TGF-β binding proteins (LTBPs)-1 and -3 coordinate proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Bone, 2008, 43: 679-688.

Koller MR, Maher RJ, Manchel I, Oxender M, Smith AK. Alternatives to animal sera for human bone marrow cell expansion: human serum and serum-free media. J Hematother, 1998, 7:413-423.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. Cell, 1997, 89: 755-764.

Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. J Cell Biochem, 2006, 99: 1233-1239.

Komulainen J, Takala TE, Kuipers H, Hesselink MK. The disruption of myofibre structures in rat skeletal muscle after forced lengthening contractions. Pfluegers Arch, 1998, 436: 735-741.

Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cellsmigrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 10711-10716.

Korhonen RK, Laasanen MS, Töyräs J, Lappalainen R, Helminen HJ, Jurvelin JS. Fibril reinforced poroelastic model predicts specifically mechanical behavior of normal, proteoglycan depleted and collagen degraded articular cartilage. J Biomech, 2003, 36: 1373-1379.

Kortesidis A, Zannettino A, Isenmann S, Shi ST, Lapidot T, Gronthos S. Stromalderived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. Blood, 2005, 105: 3793-3801.

Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naïve and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. Blood, 2003, 101: 3722-3729.

Kretzschmar M, Doody J, Massagu´e J. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-β family mediator Smad1. Nature, 1997, 389: 618-622.

Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, Massagu´e J. A mechanism of repression of TGFβ/Smad signaling by oncogenic Ras. Genes Dev, 1999, 13: 804-816.

Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. Nature, 2003, 423:332-336.

Ku CH, Johnson PH, Batten P, Sarathchandra P, Chambers RC, Taylor PM, Yacoub MH, Chester AH. Collagen synthesis by mesenchymal stem cells and aortic valve interstitial cells in response to mechanical stretch. Cardiovasc Res, 2006, 71:548-556.

Kujala UM, Kettunen J, Paananen H, Aalto T, Battié MC, Impivaara O, Videman T, Sarna S. Knee osteoarthritis in former runners, soccer players, weight lifters, and shooters. Arthritis Rheum, 1995; 38: 539-546.

Kumar S, Maxwell, I. Z, Heisterkamp, A, Polte, T. R, Lele,T, Salanga, M, Mazur, E, and Ingber, D. E. Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization and extracellular matrix mechanics. J Biophys, 2006, 10:3762-3773.

Kurisaki A, Kose S, Yoneda Y, Heldin CH, Moustakas A. Transforming growth factor-β induces nuclear import of Smad3 in an importin-beta1 and Ran-dependent manner. Mol Biol Cell, 2001, 12:1079-1091.

Kurisaki A, Kurisaki K, Kowanetz M, Sugino H, Yoneda Y, Heldin CH, Moustakas A. The mechanism of nuclear export of Smad3 involves exportin 4 and Ran. Mol Cell Biol, 2006, 26:1318-1332.

Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem

cells. J Cell Biol, 2001, 153: 1133-1140.

Laganà K, Moretti M, Dubini G, Raimondi MT. A new bioreactor for the controlled application of complex mechanical stimuli for cartilage tissue engineering. Proc Inst Mech Eng, 2008, 222:705-715.

Le blanc k, Tammik L, Sundberg B Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. Scand J Immunol, 2003, 57: 11-20.

Lee CR, Grad S, Maclean JJ, Iatridis JC, Alini M. Effect of mechanical loading on mRNA levels of common endogenous controls in articular chondrocytes and intervertebral disk. Anal Biochem, 2005, 341: 372-375.

Lee CR, Grodzinsky AJ, Spector M. Biosynthetic response of passaged chondrocytes in a type II collagen scaffold to mechanical compression. J Biomed Mater Res, 2003, 64A: 560-569.

Lee DA, Knight MM, Bolton JF, Idowu BD, Kayser MV, Bader DL. Chondrocyte deformation within compressed agarose constructs at the cellular and sub-cellular levels. J Biomech, 2000, 33: 81-95.

Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrugghe B. SOX9 is a potent activator of the chondrocytespecific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. Mol Cell Biol, 1997, 17: 2336-2346.

Lefebvre V, Li P, de Crombrugghe B. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. EMBO J, 1998, 17: 5718-5733.

Leo AJ, Grande DA. Mesenchymal stem cells in tissue engineering. Cells Tissues Organs, 2006, 183: 112-122.

Levy MM, Joyner CJ, Virdi AS, Reed A, Triffitt JT, Simpson AH, Kenwright J, Stein H, Francis MJ. Osteoprogenitor cells of mature human skeletal muscle tissue: an in vitro study.

Bone, 2001, 29: 317-322.

Lin HT, Tarng YW, Chen YC, Kao CL, Hsu CJ, Shyr YM, Ku HH, Chiou SH. Using human plasma supplemented medium to cultivate human bone marrow-derived mesenchymal stem cell and evaluation of its multiple-lineage potential. Transplant Proc, 2005, 37: 4504-4505.

Lindenhayn K, Perka C, Spitzer R, Heilmann H, Pommerening K, Mennicke J, Sittinger M. Retention of hyaluronic acid in alginate beads: aspects for in vitro cartilage engineering. J Biomed Mater Res, 1999, 44: 149-155.

Liu CJ, Zhang Y, Xu K, Parsons D, Alfonso D, Di Cesare PE. Transcriptional activation of cartilage oligomeric matrix protein by Sox9, Sox5, and Sox6 transcription factors and CBP/p300 coactivators. Front Biosci, 2007, 12: 3899-3910.

Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. Tissue Eng, 1998, 4: 415-428.

Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. Arthritis Res, 2000, 2: 477-488.

Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin MJ, Dennis J, Haynesworth SE, Koc ON. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. Bone Marrow Transplant, 2004, 33: 597-604.

Majumdar MK, Wang E, Morris EA. BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. J Cell Physiol, 2001, 189: 275-284.

Massagué J. How cells read TGF-β signals. Nature Rev Mol Cell Biol, 2000, 1: 169-178.

Matsuura I, Denissova NG, Wang G, He D, Long J, Liu F. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. Nature, 2004, 430: 226-231.

Mauck RL, Wang CC, Oswald ES, Ateshian GA, Hung CT. The role of cell seeding density and nutrient supply for articular cartilage tissue engineering with deformational loading.

Osteoarthritis Cartilage, 2003, 11: 879-890.

McAlinden MG, Wilson DJ. Comparison of cancellous bone-derived cell proliferation in autologous human and fetal bovine serum. Cell Transplant, 2000, 9: 445-451.

McDowall S, Argentaro A, Ranganathan S, Weller P, Mertin S, Mansour S, Tolmie J, Harley V. Functional and structural studies of wild type SOX9 and mutations causing campomelic dysplasia. J Biol Chem, 1999, 274: 24023-24030.

McMahon TA. In Muscles, Reflexes, and Locomotion. Princeton University Press, 1984, Princeton, New Jersey.

Meyer CJ, Alenghat FJ, Rim P, Fong JH, Fabry B, Ingber DE. Mechanical control of cyclic AMP signaling and gene transcription through integrins. Nat Cell Biol, 2000, 2: 666-668.

Minas T, Nehrer S. Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. Orthopedics, 1997, 20:525-538.

Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. Exp Biol Med, 2001, 226: 507-520.

Miura M, Gronthos S,Zhao M, Lu B, Fisher LW,Robey PG, Shi S. Shed: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc natl Acad Sci USA, 2003, 100: 5807-5812.

Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD, Akiyama SK, Yamada KM. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. J Cell Biol, 1995, 131:791-805.

Miyanishi K, Trindade MC, Lindsey DP, Beaupré GS, Carter DR, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL. Dose- and time-dependent effects of cyclic hydrostatic pressure on transforming growth factor-beta3-induced chondrogenesis by adult human mesenchymal stem cells in vitro. Tissue Eng, 2006, 12:2253-2262.

Miyazono K. Positive and negative regulation of TGF-β signaling. J Cell Sci, 2000, 113:1101-1109.

Mizuno S, Tateishi T, Ushida T, Glowacki J. Hydrostatic fluid pressure enhances matrix synthesis and accumulation by bovine chondrocytes in three-dimensional culture. J Cell Physiol, 2002, 193: 319-327.

Molloy AP, Martin FT, Dwyer RM, Griffin TP, Murphy M, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ. Mesenchymal stem cell secretion of chemokines during differentiation into osteoblasts, and their potential role in mediating interactions with breast cancer cells. Int J Cancer, 2009, 124: 326-332.

Morrison RF, Farmer SR. Insights into the transcriptional control of adipocyte differentiation. J Cell Biochem Suppl, 1999, 32-33:59-67.

Moustakas A, Heldin CH. Dynamic control of TGF-β signaling and its links to the cytoskeleton. FEBS, 2008: 1-15.

Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-β signal transduction. J Cell Sci, 2001, 114, 4359-4369.

Mouw JK, Connelly JT, Wilson CG, Michael KE, Levenston ME. Dynamic compression regulates the expression and synthesis of chondrocyte-specific matrix molecules in bone marrow stromal cells. Stem Cells, 2007, 25: 655-663.

Mow VC, Fithian DC, Kelly MA. Fundamentals of articular cartilage and meniscus biomechanics. In: Articular cartilage and knee joint function: basic science and arthroscopy. Ed: Ewing JW Raven, New York,1990:1-18.

Muir H, Hardingham TE. Cartilage matrix biochemistry. Textbook of Rheumatic Disease, 1986: 177-198.

Murakami G,Watabe T, Takaoka K, Miyazono K, Imamura T. Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. Mol Biol Cell, 2003, 14: 2809-2817.

Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis.

Arthritis Rheum, 2002, 46:704-713.

Nakao A, Afrakhte M, Morén A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, ten Dijke P. Identification of Smad7,a TGFβ-inducible antagonist of TGF-β signalling. Nature, 1997, 389: 631-635.

Naumann A, Dennis JE, Awadallah A, Carrino DA, Mansour JM, Kastenbauer E, Caplan AI. Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. J Histochem Cytochem, 2002, 50: 1049-1058.

Nishimura R, Hata K, Ikeda F, Shimoyama A, Matsubara T, Wada M, Amano K,Yoneda T. Signal transduction and transcriptional regulation during mesenchymal cell differentiation. J Bone Miner Metab, 2008, 26: 203-212.

Noël D, Djouad F, Jorgense C. Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair. Curr Opin Investig Drugs, 2002, 3: 1000-1004.

Norvell SM, Alvarez M, Bidwell JP, Pavalko FM. Fluid shear stress induces beta-catenin signaling in osteoblasts. Calcif Tissue Int, 2004, 75: 396-404

Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson DG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. J orthop Res, 2002, 20: 1060-1069.

Ostendorp RA, Reisbach G, Spitzer E, Thalmeier K, Dienemann H, Mergenthaler HG, Dörmer P. VLA-4 and VCAM-1 are the principal adhesion molecules involved in the interaction between blast colony-forming cells and bone marrow stromal cells. Br J Haematol, 1995, 91: 275-284.

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. Cell, 1997, 89:765-771.

Palmer G, Guicheux J, Bonjour JP, Caverzasio J. Transforming growth factor-beta

stimulates inorganic phosphate transport and expression of the type III phosphate transporter Glvr-1 in chondrogenic ATDC5 cells. Endocrinology, 2000, 6: 2236-2243.

Pan Q, Wu Y, Lin T, Yao H, Yang Z, Gao G, Song E, Shen H. Bone morphogenetic protein-2 induces chromatin remodeling and modification at the proximal promoter of Sox9 gene. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 379: 356-361.

Paniushin OV, Domaratskaia EI, Starostin VI. Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential. Izv Akad Nauk Ser Biol, 2006, 1:6-25.

Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg, G. I, Gefen, A, Reinhart-King, C. A, Margulies, S. S,Dembo, M, Boettiger, D, Hammer, D. A, and Weaver, V. M. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. Cancer Cell, 2005, 8: 241-254

Patwari P, Lee RT. Mechanical Control of Tissue Morphogenesis. Circ Res, 2008, 103: 234-243.

Paunescu V, Deak E, Herman D, Siska IR, Tanasie G, Bunu C, Anghel S, Tatu CA, Oprea TI, Henschler R, Ruster B, Bistrian R, Seifried E. In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. J Cell Mol Med, 2007, 11: 502-508.

Pera EM, Ikeda A, Eivers E, De Robertis EM. Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction. Genes Dev, 2003, 17:3023-28

Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 4857-4861.

Petroll WM, Vishwanath, M, and Ma, L. Corneal fibroblasts respond rapidly to changes in local mechanical stress. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45: 3466-3474

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 1999, 284: 143-147.

Plasilova M, Schonmyer B, Fernandez J, Clavin N, Soares M, Mehrara BJ. Accelerating stem cell proliferation by down-regulation of cell cycle regulator p21. Plast Reconstr Surg, 2009, 2 Suppl: 149S-157S.

Polte TR, Eichler GS, Wang N, Ingber DE. Extracellular matrix controls myosin light chain phosphorylation and cell contractility through modulation of cell shape and cytoskeletal prestress. Am J Physiol, 2004, 286: C518-C528.

Pommerenke H, Schreiber E, Durr F, Nebe B, Hahnel C, Moller W, Rychly J. Stimulation of integrin receptors using a magnetic drag force device induces an intracellular free calcium response. Eur J Cell Biol, 1996, 70:157-164.

Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion to signaling regulators. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4: 33-45.

Pountos I, Corscadden D, Emery P, Giannoudis PV. Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application. Injury Int J Care Injured, 2007, 38: S23-S33.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science, 1997, 276: 71-71.

Putnam AJ, Cunningham JJ, Dennis RG, Linderman JJ, Mooney DJ. Microtubule assembly is regulated by externally applied strain in cultured smooth muscle cells. J Cell Sci, 1998, 111:3379-3387.

Putnam AJ, Cunningham JJ, Pillemer BB, Mooney DJ. External mechanical strain regulates membrane targeting of Rho GTPases by controlling microtubule assembly. Am J Physiol Cell Physiol, 2003, 284:C627-639.

Qin YX, Kaplan T, Saldanha A, Rubin C. Fluid pressure gradients, arising from oscillations in intramedullary pressure, is correlated with the formation of bone and inhibition of intracortical porosity. J Biomech, 2003, 36: 1427-1437.

Quinn TM, Dierickx P, Grodzinsky AJ. Glycosaminoglycan network geometry may

contribute to anisotropic hydraulic permeability in cartilage under compression. J Biomech, 2004, 34:1483-1490.

Radel C, Rizzo V. Integrin mechanotransduction stimulates caveolin-1 phosphorylation and recruitment of Csk to mediate actin reorganization. Am J Physiol, 2004: 288, H936–H945.

Ralphs JR, Waggett AD, Benjamin M. Actin stress fibres and cell-cell adhesion molecules in tendons: organisation in vivo and response to mechanical loading of tendon cells in vitro. Matrix Biol, 2002, 21:67-74.

Remy I, Montmarquette A, Michnick SW. PKB/Akt modulates TGF-β signaling through a direct interaction with Smad3. Nat Cell Biol, 2004, 6:358-365.

Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. Blood, 2001, 98: 2615–2625.

Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC, Riggs BL. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. J Bone Miner Res, 1996, 11: 312-324.

Risbud MV, Shapiro IM. Stem cells in craniofacial and dental tissue engineering. Orthod Craniofac Res, 2005, 8: 54-59.

Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky AD. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by anmDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. J Cell Biol, 2001, 153:1175–1186.

Rizzo V, Sung A, Oh P, Schnitzer JE. Rapid mechanotransduction in situ at the luminal cell surface of vascular endothelium and its caveolae. J Biol Chem, 1998, 273: 26323–26329.

Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-β. Miner Electrolyte Metab, 1998, 24: 111-119.

Roberts I. Mesenchymal stem cells. Vox Sang, 2004, 87: 38-41.

Roelen BAJ, Dijke PE. Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGFβ familly members. J Orthop Sci, 2003, 8: 740-748.

Romanov YA, Svintsitskaya Va, Smirnov VN. Searching for alternative sources of posnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells, 2003, 21: 105-110.

Rosada C, Justesen J, Melsvik D, Ebbesen P, Kassem M. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. Calcif Tissue int, 2003, 72: 135-142.

Ross S, Hill CS. How the Smads regulate transcription. Int J Biochem Cell Biol, 2008; 40: 383-408.

Roughley PJ. The structure and function of cartilage proteoglycans. Eur Cell Mater. 2006, 12: 92-101.

Sabatini F, Petecchia L, Tavian M, Jodon de Villeroché V, Rossi GA, Brouty-Boyé D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. Lab Invest, 2005, 85: 962-971.

Sakao K, Takahashi KA, Arai Y, Inoue A, Tonomura H, Saito M, Yamamoto T, Kanamura N, Imanishi J, Mazda O, Kubo T. Induction of chondrogenic phenotype in synovium-derived progenitor cells by intermittent hydrostatic pressure. Osteoarthritis Cartilage, 2008, 16: 805-814.

Sandell LJ. In situ expression of collagen and proteoglycan genes in notochord and during skeletal development and growth. Microsc Res Tech, 1994, 28 : 470-482.

Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. Stem Cells, 2005, 23: 220-229.

Schecroun N, Delloye Ch. In vitro growth and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells supported by autologous plasma. Bone, 2004, 35: 517-524.

Schinagl RM, Gurskis D, Chen AC, Sah RL. Depth-dependent confined compression

modulus of full-thickness bovine articular cartilage. J Orthop Res, 1997; 15: 499-506.

Schmierer B, Hill CS. Kinetic Analysis of Smad Nucleocytoplasmic Shuttling Reveals a Mechanism for Transforming Growth Factor-β-Dependent Nuclear Accumulation of Smads. Mol Biol Cell, 2005, 25:9845-9858.

Schmierer B, Tournier AL, Bates PA, Hill CS. Mathematical modeling identifies Smad nucleocytoplasmic shuttling as a dynamic signal-interpreting system. Proc Natl Acad Sci USA , 2008, 105: 6608-6613.

Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells, 1978, 4: 7-25.

Schulz RM, Bader A. Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. Eur Biophys J, 2007, 36:539-568.

Schwarz US, Bischofs IB. Physical determinants of cell organization in soft media. Medical Engineering & Physics, 2005, 27: 763-772.

Seay U, Sedding D, Krick S, Hecker M, Seeger W, Eickelberg O. Transforming growth factor-beta-dependent growth inhibition in primary vascular smooth muscle cells is p38-dependent. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 315:1005-12.

Sekiya I, Colter DC, Prockop DJ. BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 284: 411-418.

Seo BM,Miura M,Sonovama W,Coppe C,Stanyon R,Shi S.Recovery of stem cells from cryopreserved peridiontal ligament. J Dent Res, 2005, 84: 907-912.

Setton LA, Mow VC, Müller FJ, Pita JC, Howell DS. Mechanical behavior and biochemical composition of canine knee cartilage following periods of joint disuse and disuse with remobilization. Osteoarthritis Cartilage, 1997, 5: 1-16.

Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. Stem Cells, 2005,

23:1357-1366.

Shakibaei M, and Mobasheri, A. Beta1-integrins colocalize with Na, K-ATPase, epithelial sodium channels (ENaC) and voltage activated calcium channels (VACC) in mechanoreceptor complexes of mouse limb-bud chondrocytes. Histopathol, 2003, 18: 343-335.

Shelton JC, Bader DL, Lee DA. Mechanical conditioning influences the metabolic response of cell-seeded constructs. Cells Tissues Organs, 2003, 175:140-150.

Shen G, Darendeliler MA. The adaptive remodeling of condylar cartilage:a transition from chondrogenesis to osteogenesis. J Dent Res. 2005, 84:691-699.

Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. J Bone Mineral Res, 2003, 18: 696-704.

Shi Y, Massagu´e J. Mechanisms of TGF-β signaling from cell membrane to the nucleus. Cell, 2003, 113: 685-700.

Shlopov BV, Lie WR, Mainardi CL, Cole AA, Chubinskaya S, Hasty KA. Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. Arthritis Rheum, 1997, 40: 2065-2074.

Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells. Archives Med Res, 2003, 34:565-557.

Siemens J, Lillo C, Dumont, RA, Reynolds A, Williams DS, Gillespie PG, Muller U. Cadherin 23 is a component of the tip link in hair-cell stereocilia. Nature, 2004, 428: 950-955.

Simmons EJ, Bertone AJ, Weisbrode SE. Instability-induced osteoarthritis in the metacarpophalangeal joint of horses. Am J Vet Res, 1999,60:7-13.

Simmons PJ, Masinovsky B, Longenecker BM, Berenson R, Torokstorb B, Gallatin WM. Vascular cell-adhesion molecule-1 expressed by bone-marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. Blood, 1992, 80: 388-95.

Singhvi R, Kumar A, Lopez GP, Stephanopoulos GN, Wang DI, Whitesides GM, Ingber DE. Engineering cell shape and function. Science, 1994, 264:696-698.

Smith RL, Donlon BS, Gupta MK, Mohtai M, Das P, Carter DR, Cooke J, Gibbons G, Hutchinson N, Schurman DJ. Effects of fluid-induced shear on articular chondrocyte morphology and metabolism in vitro. J Orthop Res, 1995, 13: 824-831.

Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrugghe B, Lefebvre V. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. Dev Cell, 2001, 1:277-290.

Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. J Cell Physiol, 2005, 203:398-409.

Sotiropoulou PA, Perez SA, Slagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. Stem Cells, 2008, 24: 462-471.

Spiegelman BM. PPAR-gamma in monocytes: less pain, any gain? Cell, 1998, 93:153-155.

Steinert AF, Ghivizzani SC, Tuan RS, Evan CH, Nöth U. Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage, Arthritis Res Ther, 2007, 9: 213.

Steinmeyer J, Ackermann B, Raiss RX. Intermittent cyclic loading of cartilage explants modulates fibronectin metabolism. Osteoarthritis Cartilage, 1997, 5: 331-341.

St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. Genes Dev, 1999, 13: 2072-2086.

Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. Exp Hematol, 2004, 32: 1212-1225.

Sukharev S, Corey DP. Mechanosensitive channels: multiplicity of families and gating

paradigms. Sci. STKE, 2004, re4.

Suki B, Ito S, Stamenovic D, Lutchen KR, Ingenito EP. Biomechanics of the lung parenchyma: critical roles of collagen and mechanical forces. J Appl Physiol, 2005, 98: 1892-1899.

Sumanasinghe RD, Pfeiler TW, Monteiro-Riviere NA, Loboa EG. Expression of proinflammatory cytokines by human mesenchymal stem cells in response to cyclic tensile strain. J Cell Physiol, 2009, 219:77-83.

Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi BI, Nagasawa T. Cellular niches controlling B lymphocyte behaviour within bone marrow during development. Immunity, 2004, 20: 707-718.

Tong ZC, Yang Z, Tong ZQ, Wang KZ, Yang TM, Shi ZL, Li Y, Guo X. Study of inducing bone marrow-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes in vitro. Zhongguo Gu Shang, 2008, 21: 362-364.

Toyoda T, Seedhom BB, Kirkham J, Bonass WA. Upregulation of aggrecan and type II collagen mRNA expression in bovine chondrocytes by the application of hydrostatic pressure. Biorheology, 2003, 40:79-85.

Tropel P, Noel D, Plater N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. Exp Cell Res, 2004, 295: 395-406.

Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. Hum reprod, 2004, 19: 1450-1456.

Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. Transplantation, 2003, 75: 389-397.

Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue

engineering. Arthritis Res Ther, 2003, 5: 32-45.

Tuan RS. Biology of developmental and regenerative skeletogenesis. Clin Orthop Relat Res, 2004, 427: S105-117.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol, 2008: 726-736

Ueta C, Iwamoto M, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Enomoto-Iwamoto M, Ohmori T, Enomoto H, Nakata K, Takada K, Kurisu K, Komori T. Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. J Cell Biol, 2001, 153: 87-100.

Urban JP. The chondrocyte: a cell under pressure. Br J Rheumatol, 1994, 33: 901-908.

Van de Breevaart Bravenboer J, In der Maur CD, Bos PK, Feenstra L, Verhaar JA, Weinans H, van Osch GJ. Improved cartilage integration and interfacial strength after enzymatic treatment in a cartilage transplantation model. Arthritis Res Ther, 2004, 6: R469-476.

Van Essen DC. A tension-based theory of morphogenesis end compact wiring in the central nervous system. Nature, 1997, 385:313-318.

Verfaillie CM. Stem cell research: future implications for internal medicine. Acta Clin Belg, 2005, 60: 277-283.

Villemure I, Chung MA, Seck CS, Kimm MH, Matyas JR, Duncan NA. Static compressive loading reduces the mRNA expression of type II and X collagen in rat growth-plate chondrocytes during postnatal growth. Connect Tissue Res, 2005, 46: 211-219.

Wada MR, Inagawa-Ogashiwa M, Shimizu S, Yasumoto S, Hashimoto N. Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. Development, 2002, 129: 2987-2995.

Waddell DS, Liberati NT, Guo X, Frederick JP, Wang XF. Casein kinase Iε plays a functional role in the transforming growth factor-β signaling pathway. J Biol Chem, 2004, 279: 29236-29246.

Waldman SD, Spiteri CG, Grynpas MD, Pilliar RM, Kandel RA. Long-term intermittent compressive stimulation improves the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. Tissue Eng, 2004, 10: 1323-1331.

Wang CC, Deng JM, Ateshian GA, Hung CT. An automated approach for direct measurement of two-dimensional strain distributions within articular cartilage under unconfined compression. J Biomech Eng, 2002, 124: 557-567.

Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM,Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cells, 2004, 22: 1330-1337.

Wang QW, Chen ZL, Piao YJ. Mesenchymal stem cells differentiate into tenocytes by bone morphogenetic protein (BMP) 12 gene transfer. J Biosci Bioeng, 2005, 100: 418-422.

Wang Y, Botvinick EL, Zhao, Y, Berns, M. W, Usami, S, Tsien, R. Y, and Chien, S. Visualizing the mechanical activation of Src. Nature, 2005, 434: 1040-1045.

Warejcka DJ,Harvey R,Taylor BJ, Young HE, Lucas PA.A population of cells isolated from rat heart capable of differentiating into several mesodermal phenotypes. J Surg Res, 1996, 62: 233-242.

Watanabe H, de Caestecker MP, Yamada Y. Transcriptional cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways regulates transforming growth factor-beta-induced aggrecan gene expression in chondrogenic ATDC5 cells. J Biol Chem, 2001, 17: 14466-14473.

Watanabe M, Masuyama N, Fukuda M, Nishida E. Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. EMBO Rep, 2000, 1: 176-182.

Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001, 17: 387-403.

Wells RG, Discher DE. Matrix elasticity, cytoskeletal tension, and TGF-β: the insoluble and soluble meet. Sci Signal, 2008, 1, pe 13.

Wickham MQ, Erichkson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F. Multipotent stromail cells Derived from the infrapatellar fat pad of the knee. Clin orthop relat res, 2003, 412: 196-212.

Wilkins RJ, Hall AC. Control of matrix synthesis in isolated bovine chondrocytes by extracellular and intracellular pH. J Cell Physiol, 1995, 164: 474-481.

Wipff PJ, Rifkin DB, Meister JJ, Hinz B. Myofibroblast contraction activates latent TGF-β1from the extracellular matrix. J Cell Bio, 2007, 179:1311-1323.

Wong M, Siegrist M, Cao X. Cyclic compression of articular cartilage explants is associated with progressive consolidation and altered expression pattern of extracellular matrix proteins. Matrix Biol, 1999, 18: 391-399.

Worster AA, Nixon AJ, Brower-Toland BD, Williams J. Effect of transforming growth factor beta1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells. Am J Vet Res, 2000, 61:1003-1010.

Wrighton KH, Lin X, Feng XH. Phospho-control of TGF-β superfamily signaling. Cell Research, 200, 19: 8-20.

Xiao Z, Latek R, Lodish HF. An extended bipartite nuclear localization signal in Smad4 is required for its nuclear import and transcriptional activity. Oncogene, 2003, 22:1057-1069.

Xiao Z, Watson N, Rodriguez C, Lodish HF. Nucleocytoplasmic shuttling of Smad1 conferred by its nuclear localization and nuclear export signals. J Biol Chem, 2001, 276: 39404-39410.

Xie J, Han Z, Kim SH, Kim YH, Matsuda T. Mechanical loading-dependence of mRNA expressions of extracellular matrices of chondrocytes inoculated into elastomeric microporous poly (L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold. Tissue Eng, 2006, 12: 1811-1820.

Xu L, Kang Y, Col S, Massagué J. Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFβ signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. Mol Cell, 2002, 10: 271-282.

Yakymovych I, ten Dijke P, Heldin CH, Souchelnytskyi S. Regulation of Smad signaling by protein kinase C. FASEB J, 2001, 15: 553-555.

Yamamoto N, Isobe M, Negishi A, Yoshimasu H, Shimokawa H, Ohya K, Amagasa T, Kasugai S. Effects of autologous serum on osteoblastic differentiation in human bone marrow cells. J Med Dent Sci, 2003, 50: 63-69.

Yang X, Chen L, Xu XL, Li CL, Huang CF, Deng CX. TGF-β/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. J Cell Bio, 2001, 153: 35-46.

Yen BL, Huang HI, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M, Shun CT, Yen ML, Lee MC, Chen YC. Isolation of multipotent cells from human term placenta. Stem Cells, 2005, 23: 3-9.

Yokoyama M, Miwa H, Maeda S, Wakitani S, Takagi M. Influence of Fetal Calf Serum on Differentiation of Mesenchymal Stem Cells to Chondrocytes during Expansion. J Bioscience and Bioengineering, 2008, 106: 46-50.

Yoshida M, Westlin WF, Wang N, Ingber DE, Rosenzweig A, Resnick N, Gimbrone MA. Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton. J Cell Biol, 1996, 133: 445-455.

Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. Anat Rec, 2001, 264: 51-62.

Zhang L, Gardiner BS, Smith DW, Pivonka P, Grodzinsky A. The effect of cyclic deformation and solute binding on solute transport in cartilage. Arch Biochem Biophys, 2007, 457: 47-56.

Zhang L, Tran N, Chen HQ, Wang X. Cyclic stretching promotes collagen synthesis and affects F-actin distribution in rat mesenchymal stem cells. Biomed Mater Eng, 2008, 18: 205-210.

Zhang Y, Gao F, Popov VL, Wen JW, Hamill OP. Mechanically gated channel activity in cytoskeletondeficient plasma membrane blebs and vesicles from Xenopus oocytes. J Physiol, 2000, 523: 117-130.

Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-β signaling. Cell Research, 2009, 19: 128-139.

Zhu S, Wang W, Clarke DC, Liu X. Activation of Mps1 promotes transforming growth factor-beta-independent Smad signaling. J Biol Chem, 2007, 282: 18327-18338.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte D, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benheim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell, 2002, 13: 4279-4295.

RESUME

Mécanotransduction et cellules souches mésenchymateuses humaines: étude de l'effet d'une contrainte d'étirement équibiaxial sur la voie de TGF-β.

Le TGF-β (Transforming growth factor-β) joue un rôle très important dans la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMs) en chondrocytes. La contrainte mécanique joue un rôle important aussi dans la différenciation des CSMs, mais, le mécanisme de mécanotransduction reste obscur. Le but de nos travaux a été de définir l'effet; a des temps courts de l'étirement équibiaxial (0,5 Hz ou 1 Hz, 5%) sur les CSMs. Dans un premier temps, nous avons étudié les conditions de culture pour l'isolement et l'expansion des CSMs, et nous avons choisi les conditions de culture optimales pour ces CSMs. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet du TGF-β1 sur les CSMs et les chondrocytes. Nous avons trouvé que la phosphorylation de Smad3 est augmentée après 1 heur de stimulation avec du TGF-β1, mais diminuée après 3 heures: Au même temps, Smad3p s'est translocalisée dans le noyau. C'est un effet dépendant de la concentration. L'expression du gène de Sox9 est augmentée également après stimulation avec du TGF-β1. Dans un troisième temps, nous avons étudié l'effet de la contrainte d'étirement sur les CSMs et les chondrocytes. Nous avons trouvé que la contrainte d'étirement avait le même effet que le TGF-β1 sur la phosphorylation de Smad3 et l'expression du gène de Sox9. En plus, avec l'étirement, le TGF-β1 latent est activé, le RII est internalisé et les CSMs sont plus alongées. De plus, il y avait un effet synergique entre l'étirement et le TGF-β1. En conclusion, la contrainte d'étirement active la différenciation des CSMs par l'activation de la voie du TGF-β. Il semble que le mécanisme de mécanotransduction est contrôlé par plusieurs facteurs.

Mots Clés : Cellules souches mésenchymateuses, Transforming growth factor-β, Contrainte d'étirement, Mécanotransduction, Différenciation, Smad3, Sox9.

ABSTRACT

Mechanotransduction and human mesenchymal stem cells: study of the effect of a equibiaxial strain on the TGF-β pathway.

Transforming growth factor-β (TGF-β) is a key factor for chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs). Mechanical loading has also been shown to be important in MSC differentiation, but mechanisms by which mechanotransduction occurs remain largely elusive. The aim of our work was to define the short-time effect of cyclic tensile strain (CTS, 0.5 Hz or 1 Hz, 5% equibiaxial strain) on the hMSCs. Firstly, we investigated the culture parameters for the isolation of hMSCs and by which the initial expansion was influenced. We chose the opitimal culture conditions for hMSCs. Secondly, we studied the effect of TGF-β1 on the hMSCs and chondrocytes. We found that Smad3 phosphorylation (Smad3p) was increased after 1 hour by the stimulation of TGF-β1, but decreased after 3 hours, Smad3p translocation to the nucleus was observed too, and the effect was dose-dependent. At the same time, TGF-β1 increased the expression of the gene of Sox9. Finally, we studied the effect of CTS on the hMSCs and chondrocytes. Results showed that CTS had the same effect that TGF-β1 on the Smad3 phosphorylation and the expression of the gene of Sox9: CTS increases the latent TGF-β1 in the medium, increases the internalisation of the type II TGF-β receptor and changes the form of hMSCs. Moreover a synergy effect between CTS and TGF-β1 was observed. We conclude that CTS could stimulate MSC differentiation by the activation of endogenous TGF-β signaling pathway. It seems that the mechanisms of mechanotransduction are controlled by multiple factors.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Transforming growth factor-β, mechanical loading, Mechanotransduction, Differentiation, Smad3, Sox9.