



**HAL**  
open science

# Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses du sang placentaire et de la gelée de Wharton

Talar Margossian

► **To cite this version:**

Talar Margossian. Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses du sang placentaire et de la gelée de Wharton. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0030 . tel-01749561

**HAL Id: tel-01749561**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749561>**

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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

**Mention** : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par **Talar MARGOSSIAN**

**Caractérisation des Cellules Souches Mésoenchymateuses du  
sang placentaire et de la gelée de Wharton**

**Le 25 Mars 2013**

**Membres du jury :**

Rapporteurs :

M. René SANTUS

PU, Laboratoire de Photobiologie, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris

Mme Aline HAMADE

CMU, Université Libanaise, Beirut

Examineurs :

Mme Danièle BENSOUSSAN

PU-PH, UMR 7365 - CNRS-UL IMoPA et UTCT (CHU), Nancy,  
Co-Directrice de thèse

Mme Céline HUSELSTEIN

MCU-HDR, UMR 7365 - CNRS-UL IMoPA - Nancy,  
Co-Directrice de thèse

M. Jean-François STOLTZ

PU-PH, UMR 7365 - CNRS-UL IMoPA et UTCT (CHU), Nancy

M. Norman MAKDISSY

CMU, CSO, Université Libanaise, Beirut

## **Avant-propos et remerciements**

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Imagerie Vectorisation " (CeTEVI), UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA) en liaison avec l'Unité de Thérapie Cellulaire et Tissulaire (UTCT) du CHU (*Nancy*)

*A ma mère et à mon père*

*Pour leur patience, leur soutien et leur amour dans les moments  
les plus délicats*

*et tout au long de ces années, je leur dédie cette thèse*

*A LARA*

*Ma chère sœur, qui a su être une amie à tous les instants,  
m'a supportée et m'a apportée son soutien*

*A ALEXANDRE ET CHLOÉ*

*Mon adorable neveu et mon aimable nièce*

*Espérant que cette thèse puisse être à la hauteur de tout ce  
qu'ils ont fait pour moi*

## Remerciements

Pendant le déroulement de ma thèse, j'ai rencontré beaucoup de personnes agréables, j'ai appris beaucoup dans ce laboratoire, scientifiquement et humainement. Cette thèse restera dans ma mémoire comme le souvenir d'une période riche en événements. 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 remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur **Jean-François STOLTZ**, Directeur de l'équipe « Ingénierie Cellulaire et tissulaire de l'UMR CNRS 7365, qui m'a accueillie et m'a permise de réaliser ce travail dans son équipe. Je lui témoigne toute ma vive reconnaissance pour sa confiance, ses remarques et son encadrement scientifique.

Je tiens à remercier chaleureusement Madame le Professeur **Danièle BENSOUSSAN**, directrice de cette thèse, qui m'a encadrée et orientée tout au long de ces années de travail. Je la remercie pour ses conseils éclairés lors de la correction de ce manuscrit. Elle a toujours su m'épauler, et s'est toujours montrée disponible pour moi.

J'exprime ma reconnaissance et ma gratitude à Madame le Docteur **Céline HUSEILSTEIN**, co-directrice de cette thèse, qui a su guider les débuts de ce travail avec une profonde connaissance du sujet. Je la remercie plus spécialement pour les nombreuses discussions et suggestions précieuses au cours de la correction de ce manuscrit et pour ses encouragements pour rédiger mes articles.

Je souhaiterais aussi remercier Monsieur **Jacques MAGDALOU**, ancien directeur de l'UMR CNRS jusqu'à 2012, ainsi à Monsieur **Jean Yves JOUZEAU**, directeur actuel de l'UMR CNRS 7365, pour m'avoir acceptée dans l'unité de recherche et pour leurs gentilleses.

J'exprime ma gratitude et mon profond respect à Madame le Docteur **Aline Hamade**, ainsi qu'à Monsieur le Professeur **René Santus** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, ainsi qu'à le Docteur **Norman Makedissy**, qui a accepté d'évaluer mon travail.



Je tiens à remercier Madame le Docteur **Natalia De ISLA** pour ses conseils en culture cellulaire, ainsi que Monsieur le Docteur **Dominique DUMAS**, Ingénieur de Recherche, pour sa bonne humeur et son aide concernant notamment la microscopie confocale, et le Professeur **Rachid RAHOUADJ** pour ses encouragements dans mon travail au cours de ma thèse et pour son aide et ses précieux conseils.

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

A tout le personnel de laboratoire ainsi à mes collègues et en particulier **Chaza**, **Fatima**, **Hassan**, **Jessica**, **Loïc**, **Nasser**, et **Reine** pour m'avoir encouragés et supportés durant ces années.

Enfin, je tiens à remercier mes parents pour m'avoir permis de faire des études universitaires et pour leur compréhension. De même, un grand merci pour mes tantes, mon oncle et tous mes cousins pour leur soutien. Je voudrais aussi remercier de tout mon cœur mes meilleures amies, tout particulièrement, **Rosie JOUBANIAN**, **Hajare MJAHEED** et **Marita FADDOUL** pour leur encouragement et leur motivation. Merci d'avoir cru en moi à chaque seconde et de m'avoir épaulée, supportée et redressée dans les moments difficiles.

## Liste des publications, communications et posters

---

*Publications internationales avec un comité de lecture*

**Talar Margossian**, Loïc Reppel, Jean-François Stoltz, Danièle Bensoussan, Céline Huselstein. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly: Comparative phenotype analysis between tissue and *in vitro* expansion, *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2012, vol 22, Issue 4, 243-54.

*Communication dans des congrès internationaux*

**Talar Margossian**, Jean-François Stoltz, Danièle Bensoussan, Céline Huselstein. OARSI 2010, Bruxelles, Belgique, du 23-26 septembre 2011. Characterization of human Wharton's jelly stem cells during *in vitro* expansion. **Publié** dans *Osteoarthritis & Cartilage Cartilage*, 2010, 18, Suppl.2 S237.

**Talar Margossian**, Loïc Reppel, Jean-François Stoltz, Céline Huselstein, Danièle Bensoussan. Biochemical and phenotypic effects of hypoxic environment on human Wharton's jelly cells during *in vitro* expansion. The 4<sup>th</sup> China-France Biotherapy and Regenerative Medicine International Symposium, 18-19 June 2011.

Loïc Reppel., **Talar Margossian**, Philippe Moreau, Nathalie Mercier, Jean-François Stoltz, Céline Huselstein, Danièle Bensoussan. OARSI 2012, Barcelone, Espagne, du 26-29 Avril 2012. Impact of oxygen content on characteristics of mesenchymal stem cells isolated from Wharton's jelly. **Publié** dans *Osteoarthritis & Cartilage Cartilage*, 2012, 20, Suppl.1 S278.

*Communication dans des congrès nationaux*

**Talar Margossian**, Loïc Reppel, Jean-François Stoltz, Céline Huselstein, Danièle Bensoussan. In Vitro Expansion Of Mesenchymal Stem Cells From Wharton's Jelly. The first European Conference on mesenchymal stem cells, France-Toulouse 18-20 Novembre 2010.

Loïc Reppel., **Talar Margossian**, Philippe Moreau, Nathalie Mercier, Jean-François Stoltz, Céline Huselstein, Danièle Bensoussan. Prolifération et différenciation des cellules

souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton au cours de l'amplification *in vitro* et en fonction de la concentration en oxygène. 6<sup>ème</sup> congrès de la société française de Bio-ingénierie cellulaire et tissulaire, France-Reims 28-30 Octobre 2011.

Loïc Reppel., **Talar Margossian**, Philippe Moreau, Nathalie Mercier, Jean-François Stoltz, Céline Huselstein, Danièle Bensoussan. Influence de la teneur en oxygène sur les caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton. 7<sup>ème</sup> Journée Claude Huriot de la Recherche Biomédicale, France-Nancy 02 Mars 2012.

## Sommaire

---

---

Liste des publications, communications et posters.....	9
Sommaire.....	12
Liste des abréviations .....	16
Listes des illustrations.....	19
Liste des tableaux .....	23
Introduction Générale .....	25
Chapitre 1. État de l’art.....	28
I. Les Cellules Souches .....	29
A. Cellules souches totipotentes .....	32
B. Cellules souches pluripotente .....	32
C. Cellules souches multipotentes.....	35
II. Cellules souches mésenchymateuses.....	40
A. Propriétés biologiques.....	40
B. Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses .....	44
C. Origine tissulaire de cellules souches mésenchymateuses.....	46
III. Intérêt des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton en médecine régénératrice.....	51
A. Définition.....	51
IV. Thérapie cellulaire.....	60
A. CSM et essais cliniques (D’après Thèse Loïc 2011).....	60
CSM du cordon ombilical et applications cliniques .....	67
B. Ingénierie tissulaire .....	68
Chapitre 2. Matériels et Méthodes .....	76
I. Culture primaire des cellules souches mésenchymateuses .....	77
A. Origine des prélèvements .....	77
B. Extraction et amplification des cellules mononucléées du sang placentaire.....	78
C. Extraction et amplification des cellules souches mésenchymateuses.....	80

---

II. Prolifération et activité métabolique .....	84
A. Matériel et réactifs .....	84
B. Temps de doublement .....	84
C. Activité métabolique .....	85
III. Marquage par immunofluorescence .....	86
A. Principe .....	86
B. Matériel et réactifs .....	87
C. Marquage du collagène de types I, II ou X dans la gelée de Wharton .....	89
D. Marquage des clusters de différenciation exprimés par des CSM dans la Gelée de Wharton.....	89
E. Marquage des clusters de différenciation exprimés par des CSM en culture en monocouche.....	90
F. Marquage du cytosquelette .....	90
IV. Observation de la fluorescence au microscope confocal à balayage laser .....	91
A. Principe de la microscopie monophotonique .....	91
B. Principe de la microscopie multiphotonique .....	92
V. Analyse par cytométrie en flux.....	92
A. Principe.....	92
B. Matériel et réactifs .....	93
C. Analyse des échantillons par cytométrie en flux.....	93
VI. Différenciation des CSM en trois lignées cellulaires .....	94
A. Différenciation ostéocytaire.....	94
B. Différenciation adipocytaire.....	94
C. Différenciation chondrocytaire .....	95
VII. Analyse de la synthèse matricielle par histologie et différenciation des CSM dans différents tissus mésodermiques .....	96
A. Principe.....	96
B. Matériel et réactifs .....	97

---

VIII. Analyse Statistique .....	99
Chapitre 3. Résultats.....	100
I. Isolement des cellules souches mésenchymateuse du sang placentaire .....	101
II. Caractérisation des cellules souches de la gelée de Wharton .....	103
A. Identification des CSM et de leur environnement dans la Gelée de Wharton .....	103
B. Détection <i>in situ</i> des marqueurs mésenchymateux dans le tissu de la gelée de Wharton et la région périvasculaire du cordon ombilical.....	107
III. Isolement des cellules souches mésenchymateuses par méthode mécanique ou enzymatique.....	109
A. Comportement des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton après digestion enzymatique .....	109
B. Influence de la technique d'isolement sur le comportement des CSM .....	112
IV. Influence de l'amplification et de la concentration en oxygène sur le comportement des CSM de la gelée de Wharton .....	115
A. Influence de l'expansion des CSM et/ou de la concentration en oxygène sur leur morphologie et leur prolifération .....	115
B. Influence de l'expansion des CSM et/ou de la concentration en oxygène sur le phénotype des cellules.....	118
C. Influence de l'expansion des CSM et/ou de la concentration en oxygène sur le potentiel de différenciation des cellules.....	123
Chapitre 4. Discussion .....	128
Méthode Enzymatique.....	134
Chapitre 5. Conclusions et Perspectives.....	143
Annexe.....	147
Références Bibliographiques.....	154



## Liste des abréviations

---

---

$\alpha$ -MEM :	Alpha Modified Eagle Medium
AC :	Anticorps
CD :	Cluster Différenciation
CSE :	Cellules Souches Embryonnaires (Embryonic Stem Cells)
CFU-F :	Colony Forming Unit-Fibroblasts
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMF :	Cytométrie en Flux
CSH :	Cellules Souches Hématopoïétiques
CSM :	Cellules Souches Mésenchymateuses
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO :	Diméthyl Sulfoxyde
FITC :	Fluorescéine Iso Thiocyanate
FSC :	Forward Scatter
GAG :	Glycosaminoglycannes
GW :	Gelée de Wharton
HBSS :	Hank's Balanced Salt Solution
HES :	Hematoxyline-Eosine-Safran
HIF-1 :	Hypoxia Inductible Factor-1
HLA :	Human Leucocyte Antigen
IF :	Intensité de Fluorescence
MAPCs :	Multipotent Adult Progenitor Cells
MEC :	Matrice Extracellulaire
Min :	Minute
mL :	Millilitre
MO :	Moelle Osseuse

OARSI :	Osteoarthritis Research Society International
P :	Passage
PAF :	Paraformaldéhyde
PBS :	Phosphate Buffer Saline
PE :	Phycoérythrine
PMT :	Photomultiplicateur
SEM :	Standard Error of the Mean
SSC :	Side Scatter
SVF :	Sérum de Veau Fœtal

## Listes des illustrations

---

FIGURE 1: HIERARCHIE DE LA PLURIPOTENCE DES CELLULES SOUCHES (SIEVEKING 2009). .....	29
FIGURE 2: AUTO-RENOUVELLEMENT ET DIFFERENCIATION D'UNE CELLULE SOUCHE (PEARSON 2009).....	30
FIGURE 3: EXEMPLE DU LIGNAGE CELLULAIRE DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES (METCALF 2007). 37	
<b>FIGURE 4: MODELE DE LA NICHE DES CSM (KOLF 2007).</b> .....	42
FIGURE 5: DIFFERENCIATION MULTIPOTENTE DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES PROVENANT DE DIFFERENTES SOURCES (ZHANG 2009). .....	48
FIGURE 6: SCHEMA D'UN CORDON OMBILICAL HUMAIN .....	50
FIGURE 7: COMPARAISON DES PROPRIETES DES CSM DE LA MOELLE OSSEUSE ET DE LA GELEE DE WHARTON (D'APRES (ROUAS-FREISS 1997; STENDERUP 2003; CARLIN 2006)).....	53
FIGURE 8: NOMBRE D'ESSAIS CLINIQUES UTILISANT DES CSM EN FONCTION DES INDICATIONS THERAPEUTIQUES. (N=NOMBRE D'ESSAIS EN COURS) (SOURCE : <a href="http://clinicaltrials.gov">HTTP://CLINICALTRIALS.GOV</a> ). .....	61
FIGURE 9: MODES D'UTILISATIONS CLINIQUES DES CSM. ....	62
FIGURE 10 : ISOLEMENT DE LA GELEE DE WHARTON A PARTIR DU CORDON OMBILICAL HUMAIN. ....	82
FIGURE 11 : PRINCIPE DE L'IMMUNO-FLUORESCENCE INDIRECTE. ....	86
FIGURE 12 : PRINCIPE DE L'IMMUNO-FLUORESCENCE DIRECTE.....	87
FIGURE 13: COMPARAISON DE LA DUREE DE CULTURE AU COURS DE L'EXPANSION EN MONOCOUCHE DES CSM ISSUES DE SANG PLACENTAIRE ET MAINTENUES EN CULTURE PAR LA METHODE « OPTIMISEE » ET LA METHODE « COATEE ». ....	102
FIGURE 14 : MORPHOLOGIE DES CSM OBTENUES PAR LA METHODE COATEE AU COURS DU P1 (A) ET DU P2 (B).102	
FIGURE 15 : MORPHOLOGIE DES CSM OBTENUES PAR LA METHODE « OPTIMISEE » AU COURS DU P2. ....	103
FIGURE 16 : OBSERVATION DES CELLULES DANS LA GELEE DE WHARTON PROCHE DES ARTERES (A ET D), DE LA VEINE (B ET E) ET DE L'EPITHELIUM (C ET F).....	104
FIGURE 17 : OBSERVATION DES GLYCOSAMINOGLYCANNES ET DES COLLAGENES TOTAUX PRESENTS DANS LE CORDON OMBILICAL. ....	105
FIGURE 18: MORPHOLOGIE DES CSM PRESENTES AU CENTRE DE LA MATRICE OMBILICALE (A-B) ET AU NIVEAU DE L'ESPACE PERIVASCULAIRE (C-D). ....	105
<b>FIGURE 19 : EXCITATION DE TYPE MULTIPHOTON AVEC DETECTION DE SIGNAL SHG PROVENANT DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE PRESENTE DANS LA GELEE DE WHARTON (A). B : <math>\lambda_{\text{EXCITATION}} = 820\text{NM} / \lambda_{\text{EMISSION}} = 410\text{NM}</math>.</b> .....	106
FIGURE 20 : EXPRESSION DU COLLAGENE DE TYPE I DANS LA GELEE DE WHARTON. ....	106
FIGURE 21: EXPRESSION <i>IN SITU</i> DES PRINCIPAUX MARQUEURS MESENCHYMATEUX A LA SURFACE DES CELLULES COMPOSANT LA GELEE DE WHARTON ET LA REGION PERIVASCULAIRE. ....	108
FIGURE 22: NOMBRE DE CELLULES OBTENUES A PARTIR DE LA DIGESTION ENZYMATIQUE D'UN CENTIMETRE DE CORDON OMBILICAL DEPOURVU DES VAISSEAUX ET DE L'EPITHELIUM. ....	110
FIGURE 23: COMPARAISON DE L'ACTIVITE METABOLIQUE <i>IN VITRO</i> APRES ISOLEMENT PAR METHODE ENZYMATIQUE AU COURS DE LA CULTURE EN P0 ET P1.....	110
FIGURE 24: EXPRESSION DES MARQUEURS HEMATOPOÏETIQUES CD34 ET CD45 ET DU COMPLEXE D'HISTOCOMPATIBILITE HLA-DR A LA SURFACE DE CSM ISSUES DE LA GELEE DE WHARTON PAR DIGESTION ENZYMATIQUE.....	111

FIGURE 25: ANALYSE PHENOTYPIQUE DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES DERIVEES DE LA GELEE DE WHARTON APRES DIGESTION ENZYMATIQUE ET CULTIVEES EN MONOCOUCHE (P0 ET P1) .....	111
FIGURE 26: COMPARAISON DE L'ACTIVITE METABOLIQUE DES CSM OBTENUES PAR DIGESTION ENZYMATIQUE OU VIA LA METHODE MECANIQUE AU COURS DE CINQ PREMIERS JOURS DE LA CULTURE EN MONOCOUCHE (P1). .....	112
FIGURE 27: COMPARAISON DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS HEMATOPOÏETIQUES CD34 ET CD45 ET DU COMPLEXE D'HISTOCOMPATIBILITE HLA-DR A LA SURFACE DE CSMs ISSUES DE LA GELEE DE WHARTON PAR DIGESTION ENZYMATIQUE OU LA METHODE MECANIQUE ET CULTIVEES EN P0 ET P1 .....	113
FIGURE 28: COMPARAISON DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS DE SURFACE DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES OBTENUES A PARTIR DE LA METHODE ENZYMATIQUE ET LA METHODE MECANIQUE. ....	114
FIGURE 29: OBSERVATION, EN MICROSCOPIE OPTIQUE, DE LA MORPHOLOGIE DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES CULTIVEES, DURANT 7 PASSAGES, DANS DEUX CONDITIONS DE CULTURE DIFFERENTES (NORMOXIE ET HYPOXIE). ....	116
FIGURE 30: INFLUENCE DE L'EXPANSION EN MONOCOUCHE SUR LE TEMPS DE CULTURE DES CSM (FIG. A ET B) ET LE NOMBRE DE DOUBLEMENT DE POPULATION (FIG. C ET D) .....	117
FIGURE 31: POTENTIEL DE PROLIFERATION DES CSM CULTIVEES EN PRESENCE OU ABSENCE D'OXYGENE EXPRIME PAR LE NOMBRE CUMULE DE DOUBLEMENT DE POPULATION (FIG. A) ET LE DOUBLEMENT DE POPULATION (FIG. B). ....	118
FIGURE 32: EXPRESSION DES MARQUEURS HEMATOPOÏETIQUES CD34 ET CD45 AINSI QUE DU COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE DE CLASSE II (HLA-DR) A LA SURFACE DE CSM ISSUES DE LA GELEE DE WHARTON ET CULTIVEES DURANT 7 PASSAGES SOIT EN PRESENCE D'OXYGENE (NOTE « N ») OU EN HYPOXIE (NOTE « H »).....	119
FIGURE 33: EXPRESSION DES MARQUEURS CARACTERISANT LE PHENOTYPE MESENCHYMATEUX DES CELLULES STROMALES ISSUES DE LA GELEE DE WHARTON ET CULTIVEES DURANT 7 PASSAGES EN PRESENCE D'OXYGENE.....	120
FIGURE 34: EXPRESSION DES MARQUEURS CARACTERISANT LE PHENOTYPE MESENCHYMATEUX DES CELLULES STROMALES ISSUES DE LA GELEE DE WHARTON ET CULTIVEES DURANT 7 PASSAGES EN ABSENCE D'OXYGENE. .....	121
FIGURE 35: COMPARAISON DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS DE SURFACE DES CSM APRES EXPANSION EN MONOCOUCHE EN PRESENCE OU ABSENCE D'OXYGENE.....	122
FIGURE 36: EVALUATION DES DEPOTS DE MINERALISATION CALCIQUE APRES 21 JOURS DE DIFFERENCIATION OSTEOCYTAIRE (CULTURE EN MONOCOUCHE), APRES COLORATION PAR LE ROUGE ALIZARINE.....	124
FIGURE 37: EVOLUTION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DES CSM APRES 28 JOURS DE DIFFERENCIATION PAR COLORATION A L'HES. ....	125
FIGURE 38: EVALUATION DE LA SYNTHESE MATRICIELLE (SYNTHESE COLLAGENIQUE : FIG. A-H ET SYNTHESE DES PROTEOGLYCANNES : FIG. I-P) APRES 28 JOURS DE DIFFERENCIATION CHONDROCYTAIRE EN PRESENCE OU ABSENCE D'OXYGENE (CULTURE EN PELLET). ....	126
FIGURE 39: DIFFERENTES CONCENTRATION D'IBMX D'INDOMETHACINE ET D'INSULINE POUR LA DETECTION DES VACUOLES LIPIDIQUES DANS LES CSM AVANT LA COLORATION AVEC DE L'HUILE ROUGE O.....	127

FIGURE 40: IMAGES APRES DIFFERENCIATION EN ADIPOCYTES DES CSM HUMAINES (P5) AVEC DE L'HUILE ROUGE

O..... 127

---

## Liste des tableaux

---



---

TABLEAU I : EXEMPLE DE VOIES DE DIFFERENCIATION EXPLOREES A L'AIDE DES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRE HUMAINES.....	33
TABLEAU II: MARQUEURS DES CSM HUMAINES DE LA MOELLE OSSEUSE (PONTIKOGLOU 2011). ....	47
TABLEAU III: RESUME DES ETUDES CLINIQUES DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES IMPLIQUEES DANS LE TRAITEMENT DE LA GvHD. ....	63
TABLEAU IV: ESSAIS CLINIQUES EFFECTUES A L'HEURE ACTUELLE AVEC LES CSM EN POUR LES TRAITEMENTS DES MALADIES CARDIAQUES. ....	66
TABLEAU V: ENSEMBLE DES ESSAIS CLINIQUES, EN COURS DE REALISATION, UTILISANT DES CSM DANS LE TRAITEMENT DE LESIONS CARTILAGINEUSES.....	72
TABLEAU VI: COMPOSITION DE DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE POUR DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES PROVENANT DU SANG PLACENTAIRE. ....	79
TABLEAU VIII : ANTICORPS IMPLIQUES DANS UN IMMUNOMARQUAGE INDIRECT.....	88
TABLEAU IX : ANTICORPS UTILISES DANS UN IMMUNOMARQUAGE DIRECT.....	88
TABLEAU VII : COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE UTILISES POUR INDUIRE LA DIFFERENCIATION DES CSM EN CHONDROCYTES (MILIEU II), OSTEOCYTES (MILIEU III) ET ADIPOCYTES (MILIEU IV).....	96
TABLEAU X: CARACTERISTIQUES DES PRELEVEMENTS DE SANG PLACENTAIRE OBTENUS. ....	101
TABLEAU XI: ETUDES DU NOMBRE DE CELLULES NUCLEEES OBTENUES A PARTIR DE CORDONS OMBILICAUX.....	134

## **Introduction Générale**

---

La médecine régénérative a pour objectif de remplacer des cellules déficientes (Thérapie Cellulaire) ou de reconstituer des tissus ou des organes altérés (Ingénierie Tissulaire). Le développement de cette nouvelle médecine est fondé sur la compréhension des processus biologiques impliqués dans le fonctionnement des cellules et des tissus. Pour mener à bien ces objectifs, un type de cellules suscite de grands espoirs : les cellules souches. Trois importantes caractéristiques les différencient des autres types de cellules : (i) ce sont des cellules indifférenciées ; (ii) elles sont capables de s'auto-renouveler au travers de nombreuses divisions cellulaires et (iii) dans certaines conditions, elles peuvent se transformer en cellules spécialisées c'est-à-dire s'engager dans une voie de différenciation.

Parmi ces cellules souches, les cellules souches dites mésenchymateuses (CSM) font l'objet de nombreuses études depuis plusieurs décennies. Ce sont des cellules d'origine mésodermique mais qui peuvent par sécrétions de cytokines ou de facteurs de croissances créer un micro-environnement permettant également la régénération de tissus non mésodermiques. Présentes dans de multiples tissus dont la moelle osseuse ou le tissu adipeux, elles sont actuellement utilisées, chez l'Homme, dans de nombreux essais cliniques. En effet, plus de 60 % des applications cliniques en cours d'évaluation dans le monde concernent des greffes allogéniques de cellules souches adultes. L'inconvénient dans leur utilisation réside dans leur mode d'obtention. Celle-ci reste difficile puisqu'invasive pour les patients et ne permet, par prélèvement, que la préparation d'une ou deux doses thérapeutiques. De plus, il a été signalé que les CSM issues de tissus adultes pouvaient entrer en sénescence et commencer à perdre leurs caractéristiques de cellules souches à partir du moment où la culture cellulaire *in vitro* commençait (Bonab 2006). En tenant compte de ce fait, les CSM ne devraient être utilisées à des fins cliniques qu'à un passage précoce de la culture, ce qui peut restreindre sévèrement le processus de développement du produit. Récemment, il a été rapporté que les tissus fœtaux tels que le sang placentaire, le placenta mais aussi la matrice ombilicale (appelée gelée de Wharton) contenaient des cellules stromales possédant un phénotype proche des CSM issues de la moelle osseuse. De plus, ces cellules foetales seraient à l'origine d'épiblaste embryonnaire ce qui leur conférerait des propriétés situées entre les cellules souches embryonnaires et les cellules souches adultes. Elles seraient donc plus primitives que les CSM provenant d'autres sources adultes (Bongso 2008).

Le présent travail aura pour objectif de caractériser sur le plan phénotypique ainsi que sur leur potentiel de différenciation deux sources de CSM d'origine fœtale : le sang placentaire et la gelée de Wharton. La première partie du travail sera consacrée aux CSM issues du **sang placentaire**. Nous avons comparé deux méthodes d'isolement et de culture. La

seconde partie du travail sera consacrée aux CSM issues de **la gelée de Wharton**. Dans un premier temps, une caractérisation de ces cellules maintenues dans leur environnement physiologique sera évaluée par immunofluorescence et histologie. Ces techniques nous permettront non seulement de visualiser les composants de la matrice ombilicale (vaisseaux : artères et veine) mais aussi le phénotype des cellules *in situ*.

D'autre part, une étude sur l'influence de la méthode d'isolement de ces cellules a été évaluée en se basant sur deux protocoles d'extraction des CSM : une méthode dite « mécanique », et une méthode « enzymatique ». L'impact de la méthode d'isolement a été analysé sur l'expression des clusters de différenciation à la surface des CSM ainsi que sur l'activité métabolique des cellules au cours des 5 premiers jours de culture en P0 et P1.

Par ailleurs, au cours de l'amplification des CSM issues de la gelée de Wharton (CSM-GW), nous avons étudié l'effet de la concentration d'oxygène sur l'expansion, l'immunophénotypage et la différenciation des cellules. Pour cela, deux conditions de culture (Normoxie (21% O<sub>2</sub>), et Hypoxie (5% O<sub>2</sub>)) ont été utilisées lors de l'expansion des cellules en monocouche ainsi que lors de leur différenciation. A l'issue de l'expansion en monocouche (de P0 à P7), des études sur le comportement des CSM provenant de la gelée de Wharton par rapport à la morphologie, leur cinétique de croissance, et leur expression phénotypique ont été réalisées. A la fin de chaque passage, le potentiel de différenciation (chondrogénique, ostéogénique et adipogénique) a été évalué en utilisant des milieux d'induction spécifiques.

## Chapitre 1. État de l'art

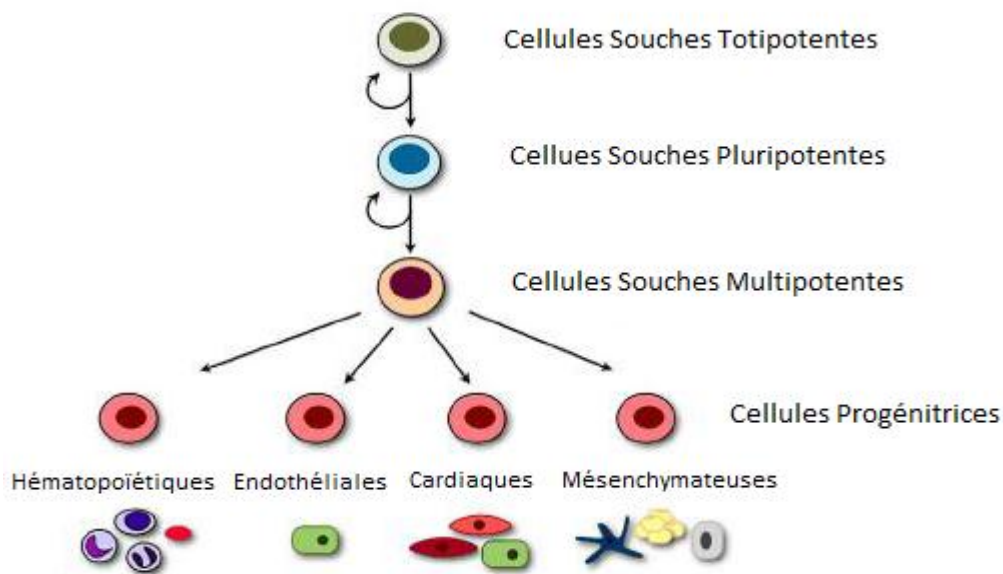
---

## I. Les Cellules Souches

Le terme de « *stem cell* », traduit de l'anglais par celui de « cellule souche » (CS), est apparu des 1883 (Rey 2003). Les cellules souches sont aujourd'hui associées à l'idée de médecine régénératrice capable de traiter des pathologies graves et de régénérer des tissus. Cependant plusieurs questions se posent :

- ❖ Éthiques sur les limites et les possibilités des techniques médicales
- ❖ Philosophiques et juridiques sur le début de la vie
- ❖ Sociologiques sur les conséquences des techniques médicales modernes dans une société vieillissante

Les cellules souches peuvent être classées selon leur maturité en trois types cellulaires : Cellules souches embryonnaires, cellules souches fœtales et cellules souches adultes. D'autre part elles peuvent être également classées selon leurs capacités à s'auto-renouveler et à produire des cellules différenciées en quatre grandes catégories de cellules (Figure 1) : les cellules totipotentes qui peuvent en théorie donner naissance à tous les tissus de cellule et donc assurer le développement d'un organisme entier ; les cellules pluripotentes peuvent se différencier en tout type de cellules de l'organisme sauf les cellules extra-embryonnaires comme le placenta ; les cellules multipotentes spécifiquement dévolues à une fonction. Enfin les cellules souches unipotentes ne peuvent donner qu'un seul type de cellule ; Leurs capacités d'auto-renouvellement sont plus limitées.

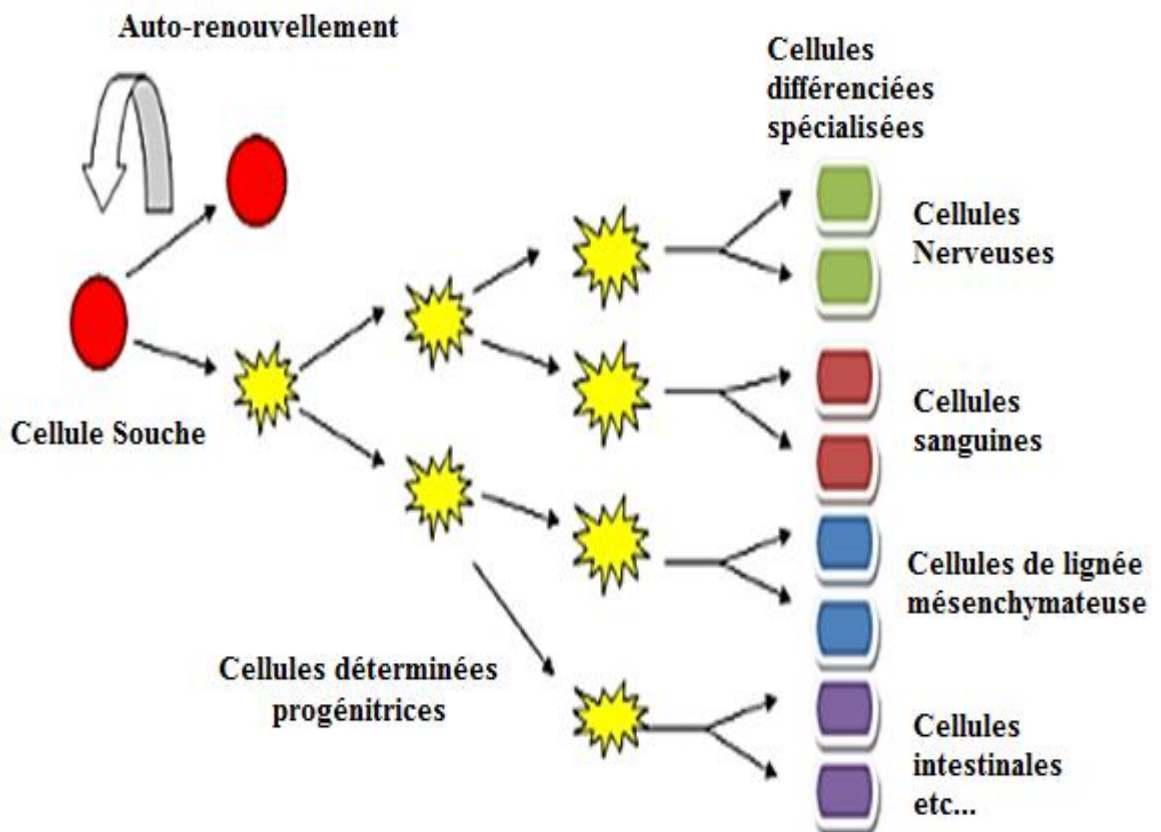


**Figure 1:** Hiérarchie de la pluripotence des cellules souches (Sieveking 2009).

Les cellules souches (CS) possèdent des potentiels de prolifération et de différenciation importants, mais variable selon le type. Elles se définissent par leur aptitude à se différencier vers des types cellulaires davantage spécialisés et leur capacité d'auto-renouvellement à l'identique. Leur degré de plasticité est aussi d'importance, et elles possèdent une **capacité unique** à protéger les télomères de leurs chromosomes.

➤ *Auto renouvellement*

L'auto-renouvellement (Figure 2) est la capacité d'une cellule souche de subir des divisions **symétriques** au travers desquelles la population originelle de cellules souches est maintenue. Les divisions symétriques impliquent que les cellules filles conservent les caractéristiques de la cellule souche mère (Ulloa-Montoya 2005). Cette propriété confère donc à ces cellules un potentiel prolifératif illimité. D'autre part une cellule souche peut subir aussi une division en donnant une cellule souche et une cellule progénitrice (division **asymétrique**). Cette cellule progénitrice produira un nombre défini de cellules qui se différencieront en cellules spécialisées.



**Figure 2:** Auto-renouvellement et différenciation d'une cellule souche (Pearson 2009).

➤ *Leur degré de plasticité*

C'est leur pouvoir de différenciation en cellules matures, spécialisées et fonctionnelles constituant le tissu hôte. Elles peuvent ainsi acquérir les caractéristiques de différentes lignées cellulaires suivant l'environnement dans lequel elles se trouvent.

Ces deux propriétés font des cellules souches des éléments indispensables à l'organisme puisqu'elles assurent le renouvellement des tissus en remplaçant des cellules mortes naturellement ou après lésion. Elles permettent ainsi aux organes de continuer à fonctionner de façon normale pendant toute la vie de l'organisme.

Ainsi, au cours du développement, ces cellules conduisent aux différents tissus qui constitueront l'organisme et, chez l'adulte, elles permettent le renouvellement naturel des tissus et contribuent à leur réparation en cas de lésion (Smith 2006).

➤ *Protection des télomères*

La télomérase est une enzyme qui évite qu'à chaque division cellulaire, le télomère, correspondant à l'extrémité du chromosome ne soit pas répliqué et soit alors perdu. Cela permet donc de maintenir le génome au complet (Asahara 2000).

L'activité télomérasique n'est pas détectée dans la plupart des cellules somatiques, à l'exception de certaines cellules souches adultes pluripotentes, les cellules en prolifération dans les tissus de renouvellement, et les cellules germinales mâles (Wright 1996). Toutefois, l'activité télomérasique est presque universelle dans les lignées de cellules cancéreuses, et se retrouve dans environ 85-90% des tumeurs primaires (Kim 1994). Cette activité compense le raccourcissement des télomères progressivement au cours de la réplication cellulaire en synthétisant de nouvelles répétitions d'ADN télomérique aux extrémités chromosomiques (Collins 2002). Les composants essentiels de cette enzyme sont la transcriptase inverse catalytique appelée hTERT (Transcriptase inverse de la télomérase humaine) (Harrington 1997; Nakamura 1997), et une association d'une matrice-ARN appelée hTR ou hTERC (ARN télomérase humaine) (Feng 1995; Harrington 1997; Meyerson 1997; Nakamura 1997). hTR est exprimée d'une manière ubiquitaire dans toutes les cellules humaines. Par contre, l'activité télomérasique est limitée par l'expression de hTERT, qui se trouve uniquement dans les cellules ayant une activité télomérasique détectable (Takakura 1998; Ducrest 2002).

Les cellules souches normales sont généralement au repos ou à croissance très lente, et possèdent relativement des télomères longs par rapport à d'autres cellules somatiques différenciées. Par contre, les cellules souches cancéreuses possèdent des courts télomères (Shay 2011).



L'activation de la télomérase est associée avec le développement du cancer (Janknecht 2004).

## A. Cellules souches totipotentes

---

### 1. Définition

---

Les CS totipotentes sont les seules cellules à pouvoir conduire au développement d'un organisme entier, car elles sont capables de participer à la formation de tous les tissus d'un individu adulte, ainsi qu'aux cellules du placenta. Elles sont issues des premières divisions de l'œuf fécondé jusqu'au stade de la morula (4ème jour suivant la fécondation chez la femme) où l'embryon est constitué de 8 à 16 cellules (Smith 2006). Cependant, l'utilisation expérimentale et le transfert en clinique de ces cellules posent plusieurs problèmes (Puceat 2007), premièrement d'ordre éthique (McLaren 2001) et deuxièmement dû à leur fort pouvoir mitogène et tumorigène (Yamamoto 2006).

## B. Cellules souches pluripotente

---

### 1. Définition et différents types

---

Les CS pluripotentes peuvent conduire, par différenciation, à l'ensemble des tissus qui constituent un organisme et qui sont issus des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme). Ces cellules ne permettent pas de conduire aux annexes embryonnaires (ne peuvent pas reproduire un être humain entier). La principale source de ces cellules est l'embryon de cinq à sept jours. Elles correspondent, en réalité, aux cellules de la masse interne. Pour ces raisons, ces cellules souches sont souvent appelées cellules souches embryonnaires. Il existe deux sources de CS pluripotentes humaines physiologiques : les cellules souches embryonnaires (CSE) (Thomson 1998; Klimanskaya 2006; Zhang 2006) et les cellules germinales embryonnaires (Shablott 1998).

### 2. Les cellules souches embryonnaires humaines

---

A l'état indifférencié ces cellules sont théoriquement dotées d'une capacité d'auto-renouvellement illimité. La dérivation de CSE murines a été décrite par deux groupes en 1981 (Evans 1981; Martin 1981) et ce n'est qu'en 1998 que, pour la première fois, l'équipe de J. Thomson réussit à isoler, à multiplier et à maintenir en culture à l'état indifférencié des CSEh (Thomson 1998). L'établissement de lignées de CSEh est désormais réalisé de nombreux croissant de laboratoires à travers le monde. Elles sont dérivées des cellules de la masse cellulaire interne d'un blastocyste de fécondation *in vitro*. Elles peuvent conserver un

caryotype normal et leur pluripotence après plus de 300 passages (Odorico 2001; Reyftmann 2004), et ont montré une aptitude à se différencier en de multiple types cellulaires (Schuldiner 2000; Odorico 2001), notamment musculaire (Rohwedel 1994), chondrogénique (Kramer 2000), endothélial (James 2010) ou cardiomycocytaire, neuronales, hépatocytaires et cellules pancréatiques (Carpenter 2003; D'Amour 2006; Roy 2006; Levenberg 2007; Lu 2007; Blancas 2008; Nury 2009) (Tableau I).

Les cellules souches embryonnaires présentent donc un intérêt en médecine régénératrice et notamment dans le traitement des pathologies cardiaques, neuronales, hépatiques, sanguines et du diabète de type I. cependant l'utilisation expérimentale et le transfert en clinique de ces cellules posent plusieurs problèmes (Puceat 2008). Le premier d'ordre éthique, est celui de l'utilisation d'embryons humains dans la recherche expérimentale (McLaren 2001). Le deuxième, lié à leur fort pouvoir mitogène et tumorigène ce qui en limite aujourd'hui l'utilisation clinique (Yamamoto 2006).

**Tableau I :** Exemple de voies de différenciation explorées à l'aide des cellules souches embryonnaire humaines.

Feuillet	Type cellulaire	Références
<b>Ectoderme</b>	Progéniteurs rétinien	(Idelson 2009; Meyer 2009)
	Neurones	(Dhara 2008; Valensi-Kurtz 2010)
	Astrocytes	(Lee 2006; Hu 2009)
	Oligodendrocytes	(Hu 2009)
	Motoneurones	(Hu 2009; Wada 2009)
	Kératinocytes	(Guenou 2009)
<b>Mésoderme</b>	Cellules hématopoïétiques	(Kaufman 2009)
	Cellules endothéliales	(James 2010)
	Cellules mésenchymateuses	(Barberi 2005; Olivier 2006; Barberi 2007; Mateizel 2008; Mahmood 2010)
	Adipocytes	(Taura and Noguchi 2009)
	Chondrocytes	(Bigdeli 2009; Toh 2010)
	Ostéocytes	(Bielby 2004; Karner 2007; Tremoleda 2008)
	Cardiomyocytes	(Vidarsson 2010)
	Muscle lisse	(Kurpinski 2010)
	Muscle squelettique	(Chan 2006; Barberi 2007; Stavropoulos 2009)
<b>Endoderme</b>	Hépatocytes	(Soderdahl 2007; Agarwal 2008; Hay 2008; Brolen 2010)
	Cellules pancréatiques $\beta$	(Trounson 2006; Van Hoof 2009)
<b>Extra-embryonnaire</b>	Cellules trophoblastiques	(Xu 2002; Gerami-Naini 2004; Pera 2004)
	Cellules de l'endoderme primitif	(Ek 2007; Soderdahl 2007)
	Cellules germinales	(Clark 2004; Richards 2010)

### 3. *Les cellules souches pluripotentes induites: les iPS*

La reprogrammation des cellules somatiques représente un moyen intéressant pour obtenir des cellules souches pluripotentes. En 2006, la mise au point des premières cellules iPS (*induced pluripotent stem cells*, iPSCs) par l'équipe Shinya Yamanaka a été effectuée. Ils ont pu obtenir des iPS à partir de la peau, du cœur, des cellules neuronales. Les iPSCs ont marqué un tournant dans la recherche relative aux CS pluripotentes. Ces cellules ont été obtenues par reprogrammation de cellules somatiques suite à la surexpression, par transduction virale, de 4 facteurs de transcription essentiels à l'état d'indifférenciation et de pluripotence : Oct3/4 (Pou5f1), Klf4, Sox2 et c-Myc (Takahashi 2006; Yu 2007). Les iPS possèdent une forte capacité de prolifération et de différenciation similaire à ceux des CSE (Itoh 2011).

Un an plus tard, la génération d'iPSCs à partir de cellules humaines a été décrite par les équipes de S. Yamanaka et de J. Thomson (Takahashi 2007; Yu 2007). Depuis, les travaux sur ces cellules se sont considérablement développés. En effet, les iPSCs ouvrent des perspectives immenses et, *a priori*, plus vastes que les CSEh dans le domaine de la thérapeutique :

- dans le domaine de la thérapie cellulaire, en offrant la possibilité de générer des CS à partir de n'importe quelles cellules de patient tout en s'affranchissant des considérations éthiques liées à la recherche sur l'embryon et à l'utilisation de cellules qui en sont issues
- dans le domaine de la modélisation pathologique où les iPSCs permettraient de modéliser toutes les maladies, sans restriction.

Deux théories, les modèles stochastiques et de l'élite, ont été proposées concernant le mécanisme de génération de cellules iPS. Le modèle d'élite propose que la génération de cellules iPS ne se produit qu'à partir d'un sous-ensemble de cellules (Yamanaka 2009). D'autre part, le modèle stochastique prétend que chaque type de cellule a le potentiel pour être reprogrammé pour devenir une cellule iPS en introduisant des facteurs tels que Oct3/4 (Pou5f1), Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog et Lin28 (Takahashi 2007). Ce modèle est aujourd'hui largement accepté.

En fait la quantité, l'équilibre, la continuité et la répression de l'expression des quatre premiers facteurs affectent sur la reprogrammation des iPS. Klf4 est exprimé dans les fibroblastes, mais son expression endogène n'est pas suffisante pour la production de ces cellules. Le c-Myc est également exprimé dans les fibroblastes, mais son expression ectopique

améliore considérablement l'efficacité de la production des iPS (Nakagawa 2008; Wernig 2008). L'induction des iPS peuvent aussi dépendre de l'équilibre stœchiométrique de ces quatre facteurs. Par exemple, l'excès Oct3/4 (Niwa 2000) et Sox2 (Kopp 2008) seraient préjudiciables au maintien de la pluripotence. En fait, dans les cellules souches neurales qui expriment le gène endogène Sox2, l'efficacité de la production des iPS est plus élevée avec l'expression ectopique de trois facteurs dépourvus de Sox2 qu'avec la combinaison des quatre facteurs (Eminli 2008). L'équilibre entre c-Myc et Klf4 peut aussi être cruciale pour prévenir l'apoptose et la sénescence causées par la surexpression de ces gènes liée à la tumeur (Rowland 2006). Intéressant de noter que les iPS dérivées des cellules humaines normales et de souris montrent une élongation progressive des télomères au cours des passages en culture, ce qui indique que l'élongation des télomères peut se produire après la programmation (Marion 2009; Mathew 2010; Yehezkel 2011).

A l'heure actuelle, des efforts particuliers sont portés sur l'optimisation des protocoles d'obtention des iPSCs, afin de n'induire qu'une expression transitoire des gènes de reprogrammation et de réduire au maximum les perturbations génétiques et épigénétiques, ainsi que sur la caractérisation des cellules reprogrammées.

En 2012, le prix Nobel en médecine reconnaît deux scientifiques, John B. Gurdon et Shinya Yamanaka, qui ont découvert que les cellules souches adultes ou spécialisées peuvent être reprogrammées pour devenir des cellules immatures capable de se développer dans tous le corps humain.

## C. Cellules souches multipotentes

---

### 1. Définition et différent types

---

Les CS multipotentes, présentes chez l'embryon ainsi que chez l'adulte, ont un potentiel de différenciation plus réduit que les CS pluripotentes. Il s'agit des cellules souches fœtales, de nouveaux-nés ou adultes. Ces cellules sont engagées dans les voies de différenciation mais gardent la capacité de s'auto-renouveler. En effet, les cellules souches multipotentes ne sont pas totalement immatures, elles sont dites « déterminées » pour donner différents types de cellules différenciées et fonctionnelles. Leur plasticité est donc plus limitée que celle des cellules souches embryonnaires. Elles sont capables de conduire à plusieurs types cellulaires, au moins quatre (Young 2004), mais sont déjà engagées dans un programme de différenciation tissulaire spécifique. C'est le cas des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse qui peuvent générer toutes les cellules de la lignée sanguine (globules

rouges, polynucléaires, lymphocytes T ou B, macrophages) mais qui ne peuvent se différencier naturellement en cellules nerveuses par exemple (Smith 2006).

## 2. *Les cellules souches fœtales*

Les cellules souches multipotentes peuvent être extraites du tissu fœtal, recueilli après interruption de grossesse. Ainsi, des cellules souches neurales peuvent être isolées à partir du tissu neural fœtal puis les multiplier en culture, bien qu'elles aient une durée de vie limitée. D'autre part des cellules germinales primitives pluripotentes peuvent être obtenues à partir des fœtus avortés. En 1998, John Gearhart à l'Hôpital John Hopkins de Baltimore (Etats-Unis) a obtenu des cellules germinales embryonnaires pluripotentes (cellules GE) isolées à partir des cellules destinées à produire les gonades (ovaire ou testicule), cellules germinales primitives du fœtus de 5 à 9 semaines ayant fait l'objet d'un avortement thérapeutique, avec l'accord des parents (Smith 2006).

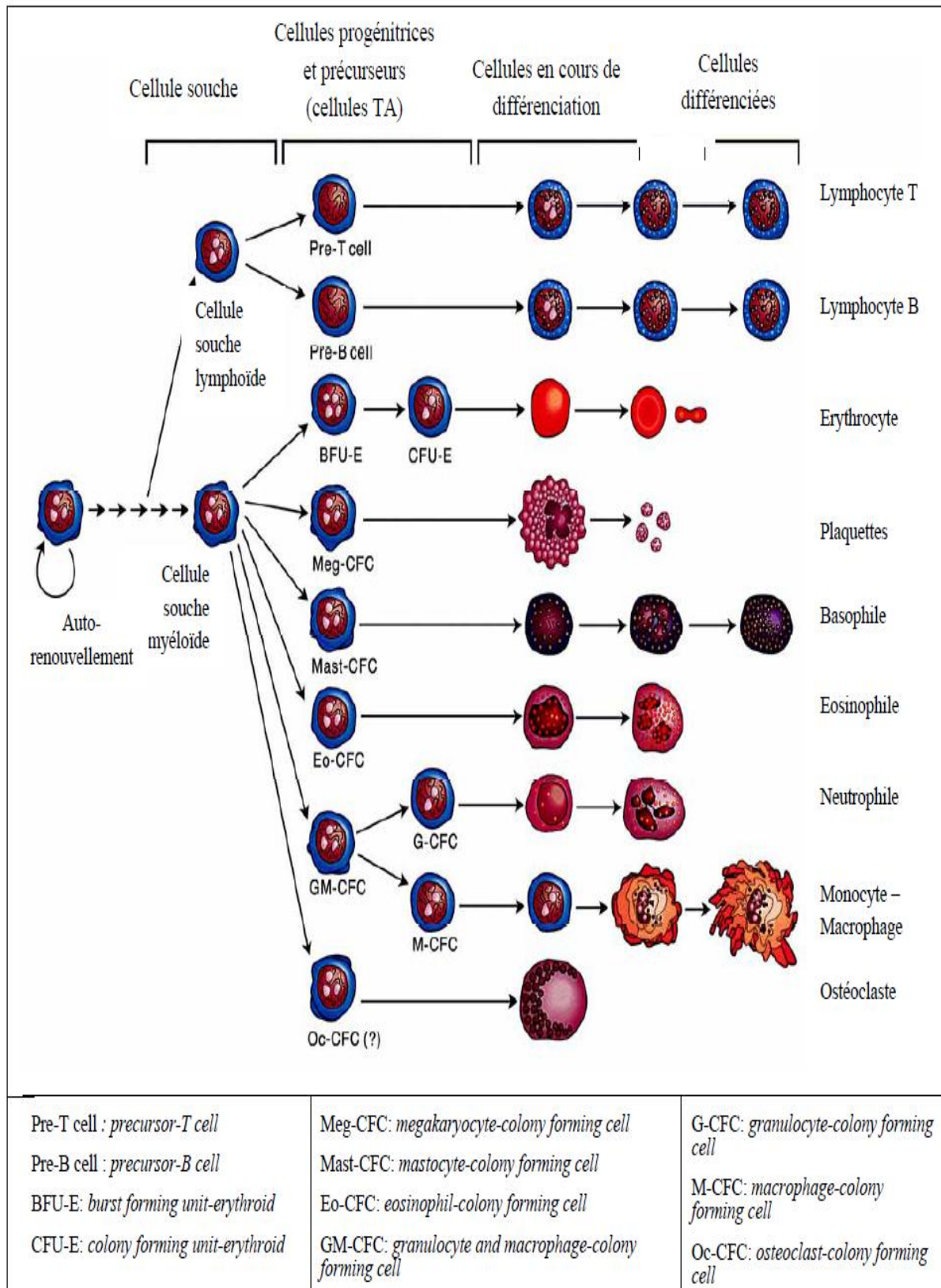
Le prélèvement de cellules souches sur des fœtus issus d'avortements soulève lui aussi des problèmes éthiques et légaux. En effet l'isolement et la culture de cellules GE semblent plus difficiles et moins reproductibles que ceux des CSE. De plus, elles présentent une forte tendance à la différenciation spontanée (Turnpenny 2003). Cependant, même si leur utilisation en médecine régénérative semble prometteuse, elle pose, au même titre que les cellules souches embryonnaires, de nombreux problèmes.

## 3. *Les cellules souches hématopoïétiques*

Toutes les cellules du sang dérivent d'un type cellulaire appelé cellule souche hématopoïétique (CSH).

L'étude des CSH est difficile, en raison de leur rareté, mais aussi parce qu'elles sont difficiles à cultiver *in vitro*. Il en résulte que peu d'informations sont disposées sur la façon dont leur prolifération et leur différenciation sont régulées. En raison de leur capacité à s'auto-renouveler, les CSH sont maintenues à des niveaux stables tout au long de la vie adulte.

La différenciation des CSH a lieu dans la moelle osseuse qui devient le site majeur de l'hématopoïèse. Les CSH sont très peu nombreuses; elles ne représentent qu'un très faible pourcentage des cellules médullaires (de 0,01 à 0,05 %) (Dexter 1987). Ces cellules peuvent conduire à des globules rouges, des plaquettes, des lymphocytes T ou B et à des macrophages (Larsson 2005) (Figure 3).



**Figure 3:** Exemple du lignage cellulaire des Cellules Souches Hématopoïétiques (Metcalf 2007).

#### 4. *Les cellules souches adultes*

Par opposition aux cellules souches pluripotentes qui peuvent conduire à l'ensemble des tissus qui constituent un organisme, il existe dans l'organisme différentes sources de cellules souches permettant de renouveler ou de réparer des tissus âgés ou endommagés : ce sont les cellules souches multipotentes. Elles se trouvent dans la plupart des tissus du corps humain, comme pancréas, tissus adipeux, placenta et muscle squelettique (Crisan 2008), mais sont particulièrement nombreuses dans la moelle osseuse et le cordon ombilical (Lee 2004; Jeong 2005; Prat-Vidal 2007). Parmi ces cellules, par exemple : les cellules de la crête neurale qui peuvent notamment se différencier en mélanocytes, en neurones et en cellules gliales du système nerveux périphérique (Knecht 2002). Il est important de souligner que des cellules souches adultes ont également pu être isolées à partir de la cornée (Yoshida 2006), de la rétine (Tropepe 2000), du foie (Walkup 2006), de la pulpe dentaire (Gronthos 2000), du rein (Sagrinati 2008), et du cœur (Beltrami 2003; Barile 2007).

Les études pré-cliniques ou cliniques utilisant la greffe de cellules souches adultes sont de plus en plus fréquentes, du fait que l'utilisation des cellules souches embryonnaires est très délicate d'un point de vue éthique mais aussi du fait de leur pouvoir tumorigène et immunogène. En effet, même si leur capacité de différenciation est plus restreinte par rapport aux cellules souches embryonnaires, les cellules souches adultes présentent de nombreux avantages : elles peuvent provenir du patient lui-même évitant ainsi les rejets d'ordre immunologique (greffe autologue, greffon contre l'hôte ou GvHD), leur utilisation génère moins de problèmes éthiques et elles ont déjà donné de nombreux résultats très concluants.

#### *Cellules souches adultes et homéostasie tissulaire*

Trois mécanismes permettent de conserver l'homéostasie d'un tissu : la prolifération, la différenciation et la migration cellulaires. Ces processus cellulaires maintiennent l'intégrité physiologique des tissus, assurent le remplacement des cellules mortes par apoptose (« naturellement ») ou par nécrose (après une lésion) et préservent ainsi la fonction de l'organe.

Cependant il faut distinguer deux types de tissus :

- Les tissus à renouvellement rapide. En effet, dans l'organisme il existe plusieurs tissus à renouvellement rapide, il s'agit des épithélia (comme l'épithélium de la peau ou de l'intestin) et du tissu sanguin. La présence de ces tissus, renouvelés très fréquemment (1 à 2 mois), fournit la preuve de l'existence de cellules souches « actives » qui fonctionnent en permanence

pour renouveler l'ensemble des cellules résidentes mortes au cours de la vie d'un individu.

- Les tissus quiescents à renouvellement lent : tels que les muscles ou le foie, des cellules souches de « réserve » sont également présentes mais elles ne s'activent que lors de lésions tissulaires.

### 5. *Les cellules progénitrices multipotentes adultes (MAPCs)*

Les MAPCs appartiennent à la famille des cellules souches mésenchymateuse (CSM) et sont cultivés à partir de la moelle osseuse (Jiang and Jahagirdar 2002; Aggarwal 2005; Mays 2007). En 2002, le groupe Verfaillie décrit les cellules progénitrices adultes multipotentes appelés (MAPCs) qui pourraient proliférer sans sénescence et pourraient, au niveau de la cellule, se différencier *in vitro* en différentes lignées cellulaires (Jiang and Jahagirdar 2002). Même si ces cellules possèdent des propriétés identiques aux CSM de la moelle osseuse comme l'adhérence au plastique au cours de l'expansion, des différences existent également : (i) peuvent être élargis plus longtemps que les CSM de la moelle osseuse, (ii) se différencier *in vitro* non seulement en types de cellules mésenchymateuses, mais également en cellules endothéliales (Reyes 2002; Schwartz 2002; Qi 2003; Aranguren 2007). Cependant il a été démontré également que les propriétés phénotypiques et fonctionnelles, ainsi que le profil d'expression des gènes exprimés est en partie influencé par les changements des conditions de culture (Roobrouck 2011).

Elles partagent des fonctions immunosuppressives avec les CSM (Aggarwal 2005), et sont capables d'inhiber la prolifération des cellules T *in vitro* et d'améliorer la réaction du greffon contre l'hôte (GvHD) dans des modèles animaux de petite taille (Highfill 2009). Chez l'homme, les premiers essais cliniques avec MAPCs ont été déjà lancés pour traiter la maladie de Crohn et de GvHD (Van Bokkelen 2011). En outre, elles possèdent des propriétés régénératrices, en contribuant à la régénération des vaisseaux dans les modèles d'ischémie du membre (Aranguren 2010), l'amélioration de la fonction cardiaque après un infarctus du myocarde (Dimomeletis 2010), et de contribuer à la régénération du foie lésé par leur capacité à se différencier en cellules hépatocytaires (Schwartz 2002).

### 6. *Les cellules souches mésenchymateuses*

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) possèdent une multi-potentialité et des propriétés de régulation immunologique et inflammatoire. La thérapie cellulaire basée sur leur greffe semble une approche particulièrement prometteuse à l'heure actuelle, car ces cellules



peuvent conduire à des adipocytes, des ostéoblastes, des chondrocytes, des cellules musculaires lisses ainsi qu'à des cellules endothéliales (Delorme 2008; Kaltz 2008; Delorme 2009).

## II. Cellules souches mésenchymateuses

---

### A. Propriétés biologiques

---

L'utilisation des cellules souches mésenchymateuses en thérapie cellulaire semble due à différents mécanismes : la transdifférenciation, la fusion cellulaire, la stimulation de l'angiogenèse, la sécrétion de cytokine ou de facteurs de croissance bénéfiques, la stimulation de la prolifération des cellules souches endogènes, l'inhibition de l'apoptose, et l'effet immunomodulateur.

La différenciation, c'est la capacité de ces cellules de se différencier en plusieurs types cellulaires. Plusieurs études ont montrées que les CSM acquièrent une morphologie et changent de phénotype et expriment de nombreux marqueurs spécifiques selon les conditions environnementales dans lesquelles elles se trouvent. Il a été observé des différenciations en cardiomyocytes (Antonitsis 2007), neurones (Mareschi 2006; Khoo 2008), cellules pancréatiques (Chen 2004) hépatocytes (Shu 2004; Ishii 2008), cellules tubulaires rénales (Imasawa 2001; Kale 2003) et cellules musculaire squelettiques ou lisses (Westerweel 2008).

#### 1. *Tissu de soutien ou niche des cellules*

---

Elle est composée des constituants cellulaires du micro-environnement qui entoure les cellules souches ainsi que des signaux solubles émanant de ces cellules. Chaque niche est très spécifique du lignage cellulaire.

Malgré de leur grande diversité, il est possible de dégager les caractéristiques communes d'une niche (Li 2005) :

- La niche a un rôle de support physique et nutritif.
- Elle est constituée par un groupe de cellules qui possèdent une composition variable d'un tissu à l'autre, dont le rôle est le maintien des cellules souches.
- Chez les invertébrés comme chez les vertébrés, la niche possède une structure asymétrique.
- Elle sécrète des facteurs extrinsèques dont certains se trouvent chez tous les mammifères comme BMP (bone morphogenic protein) et WNT qui contrôlent le devenir des

cellules souches et leur nombre. Les cellules souches sont ainsi régulées à la fois par un programme intrinsèque et à la fois par des facteurs extrinsèques provenant de la niche. Les programmes intrinsèques contrôlant l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches sont très variés (Morrison 2008).

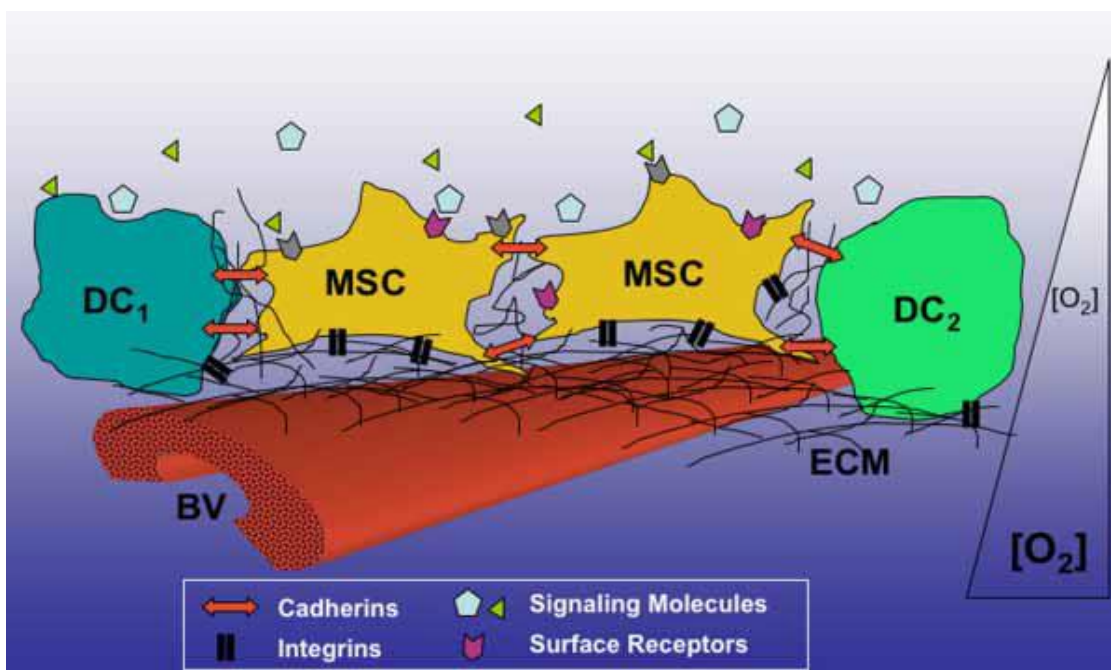
A la suite d'une division, une cellule est maintenue dans la niche et devient une cellule souche (auto-renouvellement) tandis que l'autre cellule quitte la niche, prolifère et s'engage dans une voie de différenciation. La niche semble avoir un rôle dans le maintien de la vitalité des cellules souches ainsi dans le vieillissement de l'organisme. Il est aussi à noter que certaines cellules souches peuvent migrer d'une niche à l'autre ou se localiser provisoirement dans des niches dites facultatives (Morrison 2008).

La notion de niche est largement confirmée et peut être appliquée à la plupart des cellules souches. Les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse constituent la population de cellules souches la mieux caractérisée. La transplantation des cellules souches hématopoïétique et les cellules progénitrices est utilisée dans le traitement de diverses tumeurs malignes (Thomas 2000; Bornhauser 2005). Pour améliorer le résultat clinique de la transplantation, de nombreux groupes travaillent sur l'expansion *ex vivo* de ces cellules, en particulier dans les cas où la taille de greffe est limitée (Sorrentino 2004). Plusieurs stratégies ont été développées pour élargir ces cellules *in vitro* en utilisant des cytokines (Heike 2002) et des cellules souches mésenchymateuses (CSM) (Burger 2003; Freund 2006; Gottschling 2007; Wagner 2007; Alakel 2009). Dans la moelle osseuse (*in vivo*), elles interagissent avec un micro-environnement spécifique, appelé « niche de cellules souches » qui règle la prolifération, la différenciation et l'auto-renouvellement des cellules souches. Ces niches sont considérées comme des régions hypoxiques, condition qui modifie de nombreuses propriétés biologiques et peut être leur potentiel immunologique, dans lesquelles seules les cellules nécessitant moins d'oxygène sont capables de survivre. D'autre part, les CSM sont les précurseurs des différentes populations stromales spécialisées qui interagissent avec les cellules immunitaires matures dans la moelle osseuse (Tokoyoda 2010).

En outre, la concentration en oxygène dans la moelle osseuse des sujets sains est inférieure à celle dans le sang périphérique (Harrison 2002). En effet les CSM peuvent être reconnues grâce à leurs marqueurs membranaires. Actuellement différents marqueurs non spécifiques sont testés comme le CD271, CD49a, CD73, CD146, CD140a pour isoler les CSM et leurs sous-populations et vérifier leur potentiel immunologique (Charbord 2011). Récemment, les cellules souches hématopoïétiques et les cellules progénitrices ont été signalés à être principalement dans une niche sinusoidale hypoxique (Parmar 2007; Kubota

2008). Plusieurs études *in vitro* ont révélé que l'hypoxie facilite le maintien de ces cellules (Shima 2009; Eliasson 2010).

La niche ou le microenvironnement physiologique joue un rôle crucial dans le maintien des propriétés des cellules souches, où la concentration d'oxygène est un élément important dans la composition de cette niche. La faible tension d'oxygène ou l'hypoxie est répandue dans le microenvironnement des cellules souches embryonnaire et dans de nombreuses cellules souches adultes à des stades précoces du développement (Nekanti 2010). A un stade précoce, les embryons de mammifères se développent dans un environnement à faible concentration d'O<sub>2</sub> (Hypoxie). Cependant, les cellules hES sont généralement cultivées dans une atmosphère de 21% d'O<sub>2</sub> (Normoxie), où elles tendent à se différencier spontanément. Cette condition peut ne pas être la plus appropriée pour la propagation de ces cellules. Par conséquent, en 2005, d'après l'équipe Ezashi *et al.*, la capacité de la prolifération des cellules hES sous les deux conditions hypoxie et normoxie était comparable, et que la culture des cellules en hypoxie peut réduire la différenciation cellulaire spontanée qui se produit dans les colonies hES. En outre, la croissance de cellules hES sous hypoxie fournit une meilleure formation de corps embryoïdes. La culture en conditions hypoxiques semble être nécessaire pour maintenir la pluripotence complète de ces cellules (Ezashi 2005). De même l'équipe Nékanti *et al.*, a montré qu'en hypoxie les cellules souche mésenchymateuses de la Gelée de Wharton possèdent une meilleure prolifération tout en gardant leur potentiel de différenciation en lignées multiple et l'expression des marqueurs de surface (Nekanti 2010).



**Figure 4:** Modèle de la niche des CSM (Kolf 2007).

(DC = Cellule différenciée,  $[O_2]$  = Concentration de l'Oxygène associée aux CSM, BV = Vaisseaux Sanguin, ECM = Matrice Extra-Cellulaire.).

## 2. Propriétés immunologiques

A ce jour, l'efficacité de l'injection de CSM dans différents modèles de lésions tissulaires chez l'animal (lésions myocardiques, musculaires, articulaires ou neuronales), serait essentiellement due à un effet paracrine au cours duquel les CSM produiraient après quelques jours des molécules anti-inflammatoires et immunosuppressives favorisant la régénération du tissu de l'hôte (Lee 2009). En effet, c'est dans la maladie aiguë du greffon contre l'hôte (GvHD) que les CSM ont fait la preuve de principe de leur efficacité clinique en matière d'immunosuppression. La GvHD se caractérise par une destruction des tissus du receveur reconnus comme étrangers par les cellules immunitaires présentes dans le greffon. Une étude publiée chez 55 patients atteints de GvHD sévère corticorésistante et traités par une ou plusieurs injections de CSM fait état d'un taux exceptionnel de réponses complètes atteignant 43% chez l'adulte et 68% chez l'enfant. Le taux de survie à 2 ans atteignait même 52% contre 10% attendus avec les autres thérapeutiques disponibles (Le Blanc 2008). Sachant que l'efficacité immunosuppressive des CSM en thérapeutique ne fait aucun doute, ceci conduit outre le traitement de la GvHD, à la réalisation de premiers essais cliniques prometteurs dans le lupus érythémateux disséminé sévère et corticorésistant (Sun 2010).

De plus, *in vitro* ces cellules ont été déjà appliquées dans les études préclinique et clinique, afin de traiter avec succès des maladies telle que le diabète de type I (Vojtassak 2006), sclérose en plaque (Christopeit 2008; Guiducci 2010), Cirrhose du foie (Kharaziha 2009), et la maladie de Crohn (Garcia-Olmo 2005; Duijvestein 2010). Ces études démontrent le potentiel clinique important des cellules souches mésenchymateuses.

Les caractéristiques les plus importants cliniquement applicable des cellules souches mésenchymateuses dépendent de leur facilité à proliférer dans la culture et de leur capacité immunosuppressive. Les CSM peuvent être très immunosuppressives et ont été trouvées à supprimer la prolifération des cellules T et la production des cytokines (Rasmusson 2005; Sato 2007). La protéine HLA-G (Antigène Humaine Leucocytaire), qui est une molécule non classique d'HLA classe I a été aussi considérée ayant un effet immunosuppressif sur les CSM (Selmani 2009). D'autres études ont démontré diversement que des médiateurs comme l'IL-10 (Batten 2006), TGF- $\beta$  (Groh 2005), NO (Sato 2007),IDO (indoléamine 2,3-dioxygénase) (Meisel 2004), facteur de nécrose tumorale (TNF) (Lee 2009) et de la prostanglandine (PG) E2 (Aggarwal 2005) sont responsables de la capacité immunosuppressive des CSM. L'effet

immunosuppresseur des CSM dépend de l'interféron-gamma (IFN) en présence d'une autre co-cytokine : TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  ou l'IL 1 $\beta$  (Ren 2009).

### *3. Migration*

---

Les CSM de la moelle osseuse et du placenta ont une plus grande capacité de migration que celles du cordon ombilical. Cette capacité semble être réglée par une expression accrue de la cathepsine B, cathepsine D, prohibitine et une diminution de l'expression du PAI-1 (plasminoggen activator inhibitor-1) et la superoxyde dismutase manganèse (Li 2009).

## *B. Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses*

---

### *1. Adhérence in vitro*

---

Généralement, les CSM sont isolées en utilisant leur adhérence sélective, sur des surfaces plastique (Rickard 1996; Kassem 2004). Bien que leur capacité d'y adhérer ait été exploitée pour définir ces cellules (Castro-Malaspina 1980), ceci a été contesté en 1999 par Phinney (Phinney 1999), qui ont montré que les progéniteurs pré-cellules B et les précurseurs monocytiques/granulocytiques adhèrent aussi au plastique dans les cultures de cellules de la moelle de rongeur. De même, les macrophages, les lymphocytes et les cellules musculaires lisses (CML) adhèrent au plastique et contaminent les préparations de moelle osseuse (Deans 2000; Oswald 2004). Cependant, si les CSM sont cultivées dans un milieu nutritif standard avec 10% de sérum de veau fœtal, alors les cellules différenciées du microenvironnement médullaire, telles que les ostéoblastes, les adipocytes ou les CE, ne prolifèrent pas ce qui évite leur contamination (Galmiche 1993; Digirolamo 1999; Colter 2000).

### *2. Relative facilité d'isolement et d'expansion in vitro à travers plusieurs générations en conservant leur capacité à se différencier*

---

Les CSM de la moelle osseuse sont 10 fois moins abondantes que les CSH, mais possèdent un pouvoir d'amplification rapide en culture (Bianco 2001). Cependant, les cellules ont un potentiel variable d'expansion en fonction de l'âge du donneur, de sa condition physique et des techniques de prélèvement (Colter 2000).

### *3. Réservoirs de cytokines et soutien de l'hématopoïèse*

---

Des études récentes sur la thérapie cellulaire indiquent que la majorité des effets bénéfiques observés après la greffe de CSM dans les tissus lésés est due à leur importante activité paracrine. Les CSM sont de véritables réservoirs à cytokine, chimokines et facteurs de

croissance ayant des rôles variables sur les tissus et les organes (Caplan 2006). L'étude du transcriptome des CSM a montré que ces cellules expriment les ARNm de plusieurs cytokines telles que les interleukines (IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15), le monocyte-colony stimulating factor (M-CSF), le Leukemia Inhibitory Factor (LIF), le Flt-3 Ligand (Fms-like Tyrosine kinase 3), le stem cell factor (SCF), le Granulocyte Monocyte- Colony Stimulating Factor (GM-CSF) et le Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF). En revanche l'étude des ARNm des CSM a révélé que ces cellules n'exprimaient pas les ARNm correspondant à l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, et l'IL-13 (Kim 2005).

#### 4. Phénotype

L'identification des molécules de la membrane cellulaire qui caractérisent et distinguent les différents types de cellules est d'une importance biologique (voir annexe). Ces molécules sont essentielles pour une gamme de propriétés fonctionnelles, y compris la signalisation cellulaire, l'activation du récepteur, et l'adhésion cellulaire. Parmi ces marqueurs :

CD29 (intégrine  $\beta$ 1) impliqué dans la migration des cellules souches mésenchymateuse (Margadant 2011) ; le récepteur CD44 (récepteur hyaluronane) (Zhu 2006) ; les protéines ancrées à glycosylphosphatidylinositol (GPI) : le CD73 (ecto-5'-nucléotidase) et CD90 (Thy-1), les molécules de transduction du signal dans le système immunitaire humain et les médiateurs des interactions cellule-cellule et cellule-matrice (Hunsucker 2005; Barker 2009) ; CD105 (endogline), une intégrine et une molécule de fixation de TGF- $\beta$  (Eliceiri 2001; Duff 2003) et les molécules d'adhésion CD106 (VCAM-1) et CD166 (Chamberlain 2007).

#### 5. Multipotence / Différenciation

La multipotentialité des CSM se base sur la capacité de se différencier sous certaines conditions en plusieurs tissus mésenchymateux : l'os (Aslan 2006), le cartilage (Johnstone 1998), le muscle (Rogers 1995), les cardiomyocytes et le tissu endothélial (Oswald 2004), le ligament et le tendon (Young 1998).

Jusqu'à présent, les cellules souches chez l'adulte n'étaient pas réellement considérées comme étant pluripotentes c'est-à-dire qu'elles n'étaient capables de ne donner que des cellules d'un même lignage cellulaire. La plasticité des cellules souches adultes est leur capacité à générer un type cellulaire spécialisé d'un autre tissu. Ce phénomène est appelé plasticité ou transdifférenciation. Cela revient à dire que les cellules souches adultes ne sont pas pluripotentes *stricto sensu* mais qu'elles peuvent, par différents mécanismes, se comporter comme tel (Ulloa-Montoya 2005). Les mécanismes exactes de la plasticité des cellules

souches adultes sont encore mal précisés et restent sujet à controverse. Les premières études sur le sujet, ont été réalisées par Lakshmipathy et Verfaillie (2005), mais ces travaux sur la souris n'ont pas pu être reproduits sur d'autres modèles animaux (Lakshmipathy 2005). Enfin la transdifférenciation peut également se manifester par un mécanisme de fusion cellule-cellule.

#### *Transdifférenciation*

La différenciation en cardiomyocytes se fait par le traitement des CSM avec un agent déméthylant l'ADN, la 5-azacytidine. En effet, après 15 jours de traitement, les CSM acquièrent une morphologie de myotube, changent de phénotype et expriment de nombreux marqueurs spécifiques des cardiomyocytes comme la connexine 4, la desmine ou la myosine (Antonitsis 2007). Lors de co-culture de CSM avec des cardiomyocytes (Wang 2006; Li 2007; Antonitsis 2008), des résultats pareils ont pu être observés. Aussitôt, des études *in vivo* montrent que les CSM ont la capacité de se transdifférencier en neurones (Priller 2001), cellules épithéliales du foie, du tractus intestinal ou de la peau (Krause 2001). D'autres études révèlent qu'une semaine après injection de ces cellules dans un cœur ischémie, une petite proportion des CSM survivantes acquiert une morphologie proche de celle des cardiomyocytes résidents et exprime des marqueurs cardiaques comme la troponine-T, l' $\alpha$ -actine et la desmine (Shake 2002; Toma 2002).

#### *Fusion cellulaire*

*In vitro*, les CSM possèdent un large potentiel de différenciation qui peut être rapporté à des mécanismes de fusion cellulaire. En effet, les CSM peuvent fusionner avec des hépatocytes, des neurones du réseau de Purkinje et des cardiomyocytes, entraînant de ce fait la formation de cellules multi-nucléées (Alvarez-Dolado 2003).

### C. Origine tissulaire de cellules souches mésenchymateuses

---

C'est en 1976, que pour la première fois, des cellules souches mésenchymateuses ont été isolées à partir de la moelle osseuse (MO) (Friedenstein 1976). Les CSM sont présentes dans divers tissus de l'organisme adulte (Pountos 2005). La découverte des capacités de différenciation ostéoblastique, chondrocytaire et adipocytaire de cette population adhérente au plastique, et capable d'autorenouvellement ont ensuite conduit Arnold Caplan à proposer en 1991 la dénomination de « cellules souches mésenchymateuses » (CSM). Les autres termes tels que CFU-F (Colony Forming Units-Fibroblast) ou "mesenchymal progenitor stroma cells" sont eux utilisés suivant la technique par laquelle elles sont isolées et mises en culture (Caplan 2001). Les CSM ont été également isolées à partir de divers tissus incluant le

cartilage (Alsalamah 2004), le périoste (Cuevas 2004), la membrane synoviale (De Bari 2001), le liquide synovial (Jones 2004), les muscles (Young 2001) et les tendons (Salingcarnboriboon 2003). Il a été également mis en évidence que le tissu fœtal (Hu 2003), le placenta, la veine ombilicale (Romanov 2003), la gelée de Wharton du cordon ombilical (Wang 2004), et le système vasculaire (Abedin 2004) contiennent des CSM. Le tissu adipeux pourrait servir d'excellente source de CSM du fait de la quantité présente dans l'organisme humain et de la disponibilité de déchets opératoires liés à la chirurgie (Dicker 2005).

Afin de faciliter l'étude de ces populations cellulaires, la Société internationale de thérapie cellulaire (ISCT) a proposé en 2006 de regrouper des populations cellulaires de phénotypes suffisamment proches sous une appellation unique (Dominici 2006). Cette dénomination s'applique à toute population de cellules remplissant trois critères :

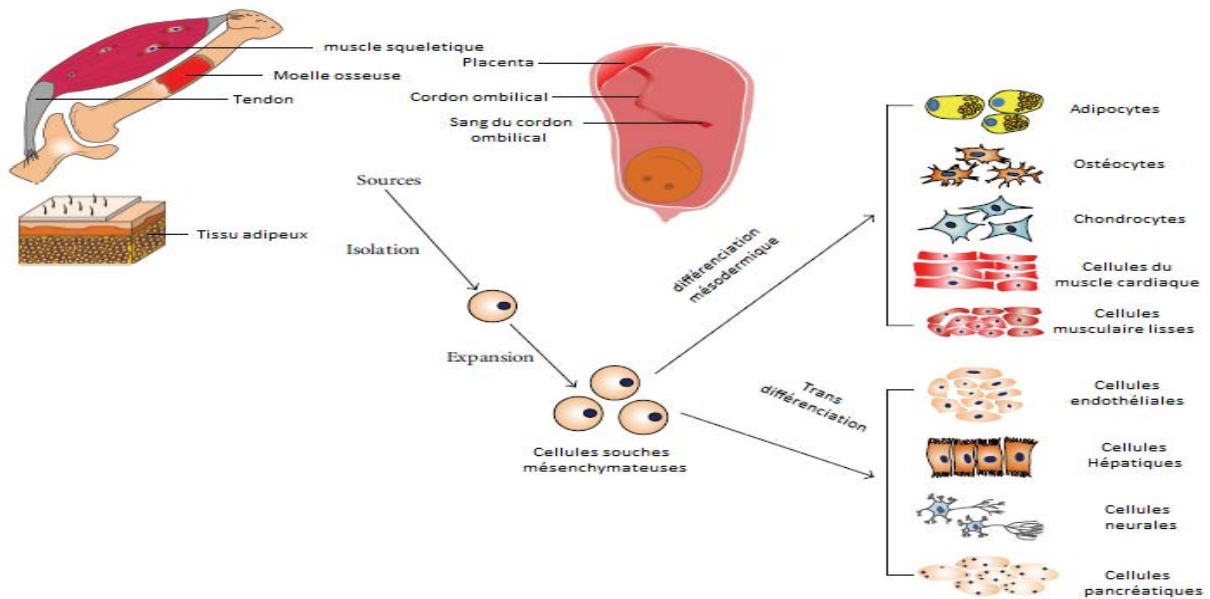
1. l'adhérence au plastique de culture.
2. un phénotype membranaire commun déterminé par cytométrie en flux (Tableau II).
3. la capacité à se différencier *in vitro* en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes

(Figure 5).

**Tableau II:** Marqueurs des CSM humaines de la moelle osseuse (Pontikoglou 2011).

Marqueur	Propriété	MSC en culture	MSC natifs
Stro-1	Antigène inconnu	+	+
GD2	Ganglioside	+	+
SSEA4	Stage-specific embryonic antigen	+	+
CD29	Intégrine $\beta$ 1 (VLA- $\beta$ )	+	
CD44	Récepteur d'acide hyaluronique (Pgp-1)	+	
CD49a	Intégrine $\alpha$ 1	+	+
CD49b	Intégrine $\alpha$ 2	+	
CD49c	Intégrine $\alpha$ 3	+	
CD49e	Intégrine $\alpha$ 5	+	
CD51	Intégrine $\alpha$ V	+	
CD73	Ecto-5-endonucléase	+	+
CD90	Thy-1	+	+
CD105	Transforming growth factor- $\beta$ receptor III (TGF- $\beta$ RIII)	+	+
CD106	Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)	+	+
CD133	Prominin (AG133)	-	+
CD140b	Platelet-derived growth factor receptor- $\beta$ (PDGF-R $\beta$ )	+	+
CD146	Melanoma-cell adhesion molecule (Mel-CAM)	+	+
CD166	Activated lymphocyte cell adhesion molecule (ALCAM)	+	+
CD200	OX-2	+	+
CD271	Neural growth factor receptor (NGFR)	-	+





**Figure 5:** Différenciation Multipotente des cellules souches mésenchymateuses provenant de différentes sources (Zhang 2009).

CSM peuvent être obtenues à partir de muscle squelettique, la moelle osseuse, les tendons, les tissus adipeux, le placenta, le cordon ombilical et le sang du cordon ombilical. Elles ont le potentiel pour générer des lignées mésodermiques comme les adipocytes, les ostéocytes et les chondrocytes, et peuvent aussi transdifférencier en cellules de certaines couches de lignées germinales comme les cellules du muscle cardiaque, des cellules musculaires lisses, les cellules hépatiques, les cellules neurales, les cellules endothéliales et les cellules pancréatiques.

#### A. La moelle osseuse

Les cellules souches hématopoïétiques ont été les cellules les plus étudiées et les mieux identifiées. Par suite, les chercheurs ont pu mettre en évidence de nouvelles cellules souches : des cellules souches non hématopoïétiques de la moelle osseuse. Le stroma de la moelle osseuse est une structure complexe richement vascularisée contenant des cellules souches mésenchymateuses et une matrice extracellulaire support de l'hématopoïèse (Mimeault 2006). Comme les cellules souches mésenchymateuses ne représentent que 0,001 à 0,01 % de la population totale des cellules nucléées de la MO, il est nécessaire de les purifier avant leur utilisation. Ces CSM peuvent se multiplier *in vitro* en **adhérant fortement** au support plastique de la culture, et possèdent une durée de vie assez limitée *in vitro* (Herzog 2003). Cette courte durée de vie semble être due soit à une sénescence progressive par manque d'activité télomérase soit à un engagement précoce dans les lignages de cellules différenciées (Ulloa-Montoya 2005). Ces CSM sont physiologiquement des cellules **quiescentes** avec un **faible taux de renouvellement** *in vivo* (Asahara 2000) et sont présentes en **très faible nombre** dans la moelle, soit 10 fois moins que les CSH (Liao 2007).

#### B. Le tissu adipeux

Le tissu adipeux est abondant et peut être facilement prélevé chez un patient par une méthode simple et peu invasive, sans préoccupation d'ordre éthique ou des problèmes de rejet

d'autogreffe. Ces cellules possèdent un taux de prolifération élevé lors de l'expansion *in vitro* avec une capacité de différenciation multiple (Yoshimura 2007; Bunnell 2008; Jurgens 2008). Ces cellules sont équivalentes à des CSM qui se trouvent dans la moelle osseuse mais qui prennent le nom de cellules stromales dérivées du tissu adipeux. Elles sont multipotentes et leur isolement se fait par adhérence au plastique en culture *in vivo*. Elles sont très facilement cultivables (1x10<sup>5</sup> cellules à partir d'une Souris et de 20 mL de lipoaspiration chez un Homme) (Nakagami 2006). Les marqueurs hématopoïétiques, leucocytaires et endothéliaux tels que CD31, CD34, CD45 et le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (HLA-DR) se sont révélés négatifs. Ces cellules sont aptes pour les procédures d'allogreffes (Aust 2004). Elles n'ont montré aucune différence significative entre les différents passages, ce qui indique que les cellules peuvent être amplifiées de façon stable *in vitro* pour plusieurs passages (Akino 2003). Elles peuvent se différencier en ostéoblastes, adipocytes et endothéliums qui sont typiques caractéristiques de cellules souches mésenchymateuses (Yang 2011). Elles semblent également avoir la capacité de se différencier en myocytes cardiaques, tout comme les cellules de la MO. De plus elles prolifèrent plus rapidement en culture que les cellules de la MO (multiplication par 10 en 1 semaine) (Nakagami 2006). Il semblerait également qu'elles soient capables de se différencier en neurones (Taupin 2006).

### C. Le sang placentaire

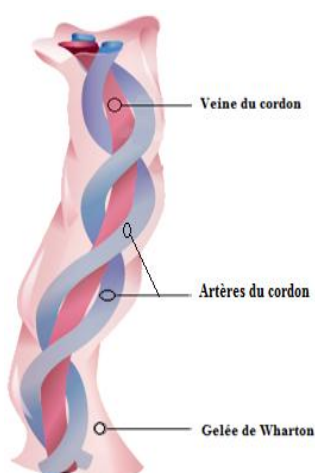
En 1974 S. Knudtzon a montré la présence de *cellules progénitrices hématopoïétiques* dans le sang du cordon ombilical humain (Knudtzon 1974). Dix ans plus tard, M.Ogawa et collègues (Nakahata 1982; Leary 1987) rapportèrent la présence de cellules progénitrices hématopoïétiques primitives dans ce même sang de cordon. Depuis, le sang de cordon ombilical a été reconnu comme une riche source de cellules hématopoïétiques primitives, souches et progénitrices. Sachant que le sang de cordon ombilical contenait des cellules capables de reproduire l'hématopoïèse *in vitro* et que ces cellules pouvaient être cryoconservées (Knudtzon 1974; Fauser 1978; Prindull 1978; Broxmeyer 1989), a ouvert la voie à leur utilisation clinique. Cette richesse du sang de cordon en cellules souches hématopoïétiques permet l'utilisation de ces cellules pour le traitement des maladies hématologiques. En dehors des applications dans le domaine des maladies hématologiques, l'efficacité thérapeutique des cellules souches du sang de cordon n'a pas été démontrée jusqu'à présent par des essais cliniques. La difficulté vient de ce que les autres cellules non hématopoïétiques du sang du cordon sont rares et leur présence n'est pas détectée dans tous les sangs de cordon. Ainsi, plusieurs études la difficulté d'obtenir des CSM d'un sang de

cordons (Lataillade 2007; Han 2009). Biebek *et al.*, ont montré que dans les conditions optimales le taux de succès maximal d'isolement des CSM de sang du cordon ne dépassait pas les 69% (Bieback 2004). La matrice extracellulaire du cordon appelée gelée de Wharton a attiré l'attention des chercheurs vu sa richesse en CS potentiellement utiles (Mitchell 2003).

#### D. Le cordon ombilical et la gelée de Wharton

Le cordon ombilical contient essentiellement des cellules souches tissulaires appelées cellules souches mésenchymateuses. On les trouve essentiellement dans ce que l'on appelle la gelée de Wharton, une source riche en cellules souches. Pendant la grossesse, le cordon ombilical est une sorte de tige gélatineuse, arrondie, blanchâtre et luisante qui unit le bébé au placenta dans le ventre de la mère et est habituellement jeté après l'accouchement. Il commence à se former environ cinq semaines après la conception. Sa longueur moyenne est d'environ 60 cm, avec une épaisseur d'environ 1,5 cm. Il est formé en grande partie par les cellules de l'amnios, une des membranes qui recouvrent le fœtus.

- ✚ Le cordon possède une veine et deux artères. La veine apporte au bébé de la nourriture et de l'oxygène prélevés et transformés par le placenta dans le sang maternel. Les deux artères emportent les déchets (gaz carbonique, urée, etc.) jusqu'au placenta qui les déverse dans la circulation sanguine maternelle.
- ✚ Le cordon est élastique ; il est très difficile de le comprimer et les transports sanguins ne risquent pas d'être perturbés. Il est souple, ce qui permet au bébé de faire tous les mouvements possibles dans l'espace restreint qui l'entoure.
- ✚ Ce cordon, est considéré juridiquement avec le placenta comme un déchet opératoire.



**Figure 6:** Schéma d'un cordon ombilical humain

*Le cordon ombilical contient deux artères (en bleu) et une veine (en rouge). La matrice ombilicale est appelée gelée de Wharton qui est riche en collagène.*

La gelée de Wharton tient son nom de son découvreur, Thomas Wharton. C'est un tissu conjonctif dérivant du mésoblaste extra-embryonnaire, élastique, avasculaire, fortement hydraté. Son degré d'hydratation dépend de l'osmolarité du liquide amniotique. Son rôle est d'envelopper et de protéger les vaisseaux ombilicaux d'éventuelles pressions. Cette substance est riche en polysaccharides et comporte un peu de collagène. Elle contient des myofibroblastes et des mastocytes, plus nombreux autour des vaisseaux, et quelques macrophages. On peut supposer qu'ils ont un rôle dans la régulation du débit ombilical du fait de leurs propriétés contractiles.

### **III. Intérêt des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton en médecine régénératrice**

---

#### **A. Définition**

---

Les CSM portent de grands espoirs pour l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative où la restauration des tissus lésés semble être un défi passionnant dans ce domaine. Plusieurs sources de cellules souches mésenchymateuses sont disponibles, mais quels sont les critères essentiels de sélection pour le meilleur candidat? Idéalement, les cellules doivent satisfaire à plusieurs pré-requis : être pluripotentes ou multipotentes, ne pas générer de morbidité pour le donneur, et être issues d'une source facilement accessible sans problèmes éthiques associés, être immunocompatibles et présenter une grande capacité d'expansion *in vitro* sur plusieurs passages, avec un coût de production raisonnable. Les CSM de moelle osseuse ne répondent pas à tous ces critères ni les cellules souches embryonnaires. En fait, ces dernières possèdent un grand potentiel pour restaurer les tissus lésés en raison de leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation pluripotente, mais leur utilisation est limitée du fait des problèmes éthiques qu'elles soulèvent et du fait de leur immunogénicité. De plus ces cellules peuvent former des tératomes après la transplantation dans le corps (Blum 2008). Aujourd'hui les CSM sont encore considérées comme « gold standard », mais présentent plusieurs inconvénients. Outre la procédure invasive et la collecte douloureuse, la fréquence des CSM isolées de la moelle osseuse est très basse (environ 0,001 à 0,01%) (Castro-Malaspina 1980), et leur qualité varie en fonction de l'âge du donneur. Cette faible fréquence implique qu'une expansion importante *in vitro* de ces cellules sera nécessaire pour administrer des doses cliniques à un patient, ce qui accroît le risque de dommages épigénétiques. Leur capacité de prolifération et leur potentiel de différenciation diminuant significativement avec l'âge (Mueller 2001; Kretlow 2008).

Toutefois, une nouvelle source prometteuse, les CSM issues de la gelée de Wharton du cordon ombilical (WJ-MSC) a attiré de plus en plus l'attention des chercheurs. Ces cellules sont en train d'apparaître dans l'ingénierie tissulaire et semblent répondre à des critères importants. Elles sont facilement accessibles sans préoccupation d'ordre éthique, le cordon ombilical étant considéré comme un déchet opératoire. Cet organe est riche en cellules stromales primitives présentant des caractéristiques typiques des CSM-MO, par exemple, leur pouvoir d'adhérence au plastique, une morphologie fibroblastique et l'expression de marqueurs de surface typiques des CSM. De plus, exposées à des conditions appropriées, les CSM du cordon ombilical peuvent se différencier *in vitro* en plusieurs lignées cellulaires comme les chondrocytes, les ostéoblastes, adipocytes, cardiomyocytes (Wang 2004), neurones (Mitchell 2003), pancréatiques (Chao 2008) ou les lignées d'hépatocytes (Kadner 2002; Mitchell 2003; Karahuseyinoglu 2007; Campard 2008; Chao 2008). En outre, WJ-MSC ne semblent pas former des tératomes lorsqu'elles sont transplantées (Fong 2007).

### 1. Point communs et différences principales entre les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse et de la gelée de Wharton

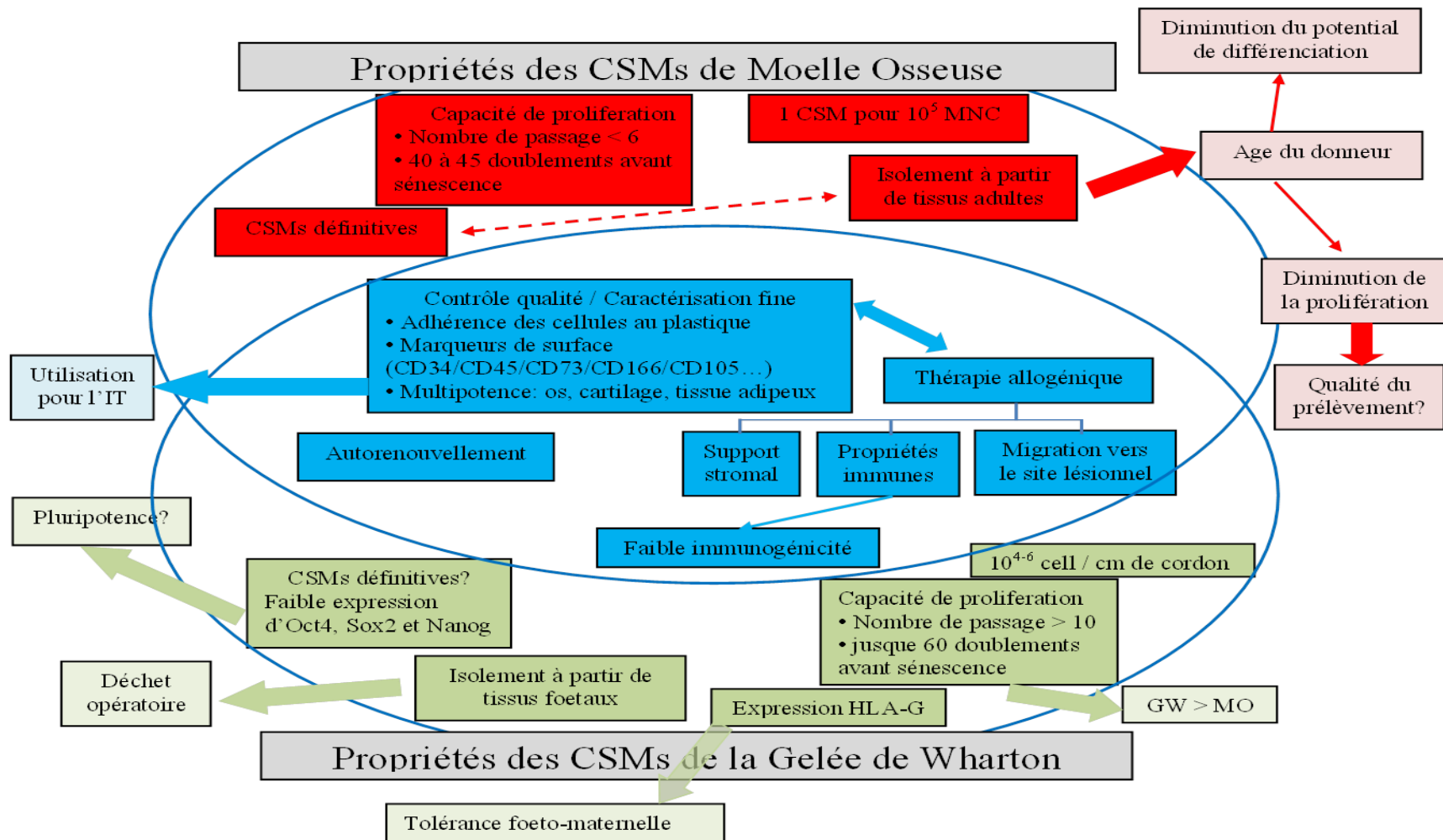
Les CSM dérivées de la MO et de la gelée de Wharton possèdent plusieurs propriétés communes parmi lesquels la morphologie, les marqueurs de surfaces, la capacité d'auto-renouvellement, la différenciation et leurs utilisations en thérapie allogénique et en ingénierie tissulaire. Cependant des différences existent surtout au niveau de la capacité de prolifération et le nombre de cellules extraites.

#### a. Point communs entre CSM de la moelle osseuse et de la gelée de Wharton

Les cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton et de la moelle osseuse sont morphologiquement et immunologiquement semblables. Elles sont des cellules capables d'auto-renouvellement et de différenciation en cellules des lignées ostéoblastiques, chondrocytaires et adipocytaires. De même, vue leur capacité immunosuppressive, ces cellules sont largement utilisées en thérapie allogénique et dans l'ingénierie tissulaire.

#### b. Différences principales entre CSM de la moelle osseuse et de la gelée de Wharton

Par rapport à la moelle osseuse, la fréquence des cellules stromales est plus élevée et elles possèdent un potentiel d'expansion plus important *in vitro*. Pratiquement parlant, la récolte de ces cellules est beaucoup plus facile et moins coûteux. La viabilité des cellules ne dépend pas de l'âge du donneur.



**Figure 7:** Comparaison des propriétés des CSM de la moelle osseuse et de la gelée de Wharton (d'après (Rouas-Freiss 1997; Stenderup 2003; Carlin 2006)).

## 2. Méthode d'isolement des CSM de la gelée de Wharton

Actuellement, il n'existe pas de procédure d'exploitation standard pour l'isolement de ces cellules. Diverses méthodes ont été utilisées et décrites pour isoler les cellules du tissu du cordon ombilical. Fondamentalement, la procédure d'isolement commence par la suppression des vaisseaux ombilicaux. Le cordon est alors réduit à de plus petits segments ou coupés en petits morceaux qui sont ensuite traités :

### a. Méthode enzymatique

Cette méthode consiste à utiliser une enzyme (trypsine et/ou la collagénase) pour extraire rapidement et avec un rendement élevé des CSM du cordon ombilical (Weiss 2006; Karahuseyinoglu 2007). La plupart des études utilise la collagénase seule ou en association avec différentes protéases afin d'accélérer la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire. Ainsi la collagénase est utilisée pour couper la triple hélice du collagène. Une fois coupée, d'autres protéases peut dégrader le collagène dénaturé ce qui conduit à une dégradation rapide des autre protéines de la matrice extracellulaire et finalement la libération de ces cellules provenant du tissu ombilical (McCarthy 2011). Salehinejad *et al.*, et Karahuseyinoglu *et al.*, ont utilisé la collagénase type B seule, sans l'ajout d'autres protéases. Leur méthode se base à laisser ces cellules incubées pendant 3 et 4 heures. Les rendements obtenus étaient successivement de  $9 \times 10^4$  et  $2,6 \times 10^4$  cellules mononuclées par centimètre de cordon (Karahuseyinoglu 2007; Salehinejad 2012). D'autres équipes ayant utilisées un panel de protéases, surtout l'hyaluronidase et la trypsine, ont pu parvenir à extraire un nombre plus élevé de cellules mononuclées. Le rendement des cellules étaient de l'ordre de  $0,95$  à  $1 \times 10^6$  cellules mononuclées par centimètre de cordon (Lu 2006; Tsagias 2011).

### b. Diffusion à partir des implants

La méthode mécaniques (ou cultures des explants) permet d'obtenir les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton sans digestion enzymatique. Elle est basée sur la spontanéité et la migration physique de ces cellules de leur matrice ombilicale (Majore 2009).

Récemment, Salehinejad *et al.*, a montré que le type de méthode d'isolement utilisé (culture des explants ou méthode enzymatique) peut affecter sur le nombre de cellule extraite et sur la capacité de prolifération. Ainsi, avec la digestion enzymatique, la densité cellulaire obtenue est plus élevée par rapport à la méthode des explants. Par contre, cette dernière, permet d'avoir un taux de prolifération plus rapide, et une meilleure viabilité, due à l'activité

lytique et à la sensibilité des cellules à la collagénase (Salehinejad 2012). D'autre part, Schugar *et al.*, a montré que la méthode de digestion peut affecter le niveau d'expression des marqueurs de surface en les limitant. Cette même équipe, en utilisant la collagénase sur l'ensemble du cordon a constaté une basse expression de CD146 (40-50%) qui est un marqueur de surface des CSM. Inversement, la culture mécanique ou des explants a donné une population de cellules riche en marqueur endothélial (CD146 100%) (Schugar 2009).

Pour isoler les cellules du tissu périvasculaire ou le sous-endothélium de la veine ombilicale, d'autres méthodes ont été établies. Par exemple, après avoir coupé le cordon en petits morceaux de 4 à 5 cm, tout d'abord l'épithélium a été tiré sur toute la longueur du cordon afin de le séparer de la gelée de Wharton. Ensuite chaque vaisseau (la veine et les deux artères) à part a été placé dans un tube contenant une solution de collagène pendant 18 à 24 heures. Cette méthode permet d'extraire les cellules souches du cordon de différentes parties et d'identifier l'expression de leur marqueur de surface dans chaque partie (Sarugaser 2005; Baksh 2007). Les protocoles peuvent être modifiés pour cibler les cellules de la gelée de Wharton ou d'autres zones spécifiques. Par exemple, Fong *et al.* a modifié leur protocole pour obtenir une population des cellules souches mésenchymateuse de la gelée de Wharton en utilisant un procédé de digestion enzymatique spécifique. Cette méthode consiste à une centrifugation à 250g pendant 5 minutes avant l'addition du collagène. Après 16 heures, les cellules ont été traitées avec de la trypsine pendant 30 minutes à la température ambiante (Wang 2004; Fong 2007).

### 3. Capacités Prolifératives des CSM de la gelée de Wharton

L'expansion des CSM de la gelée de Wharton peut atteindre sans perte d'activité proliférative et de la viabilité pendant au moins 50 doublements de population. Après environ 50 doublements de population les cellules entrent dans une phase de sénescence répllicative (Moretti 2010). D'autres études révèlent 18 doublements de population en trois mois (Jo 2008) et 25 au 9<sup>ème</sup> passage (Nekanti 2010).

Un potentiel prolifératif et une capacité d'expansion élevés sont les caractéristiques communes pour les cellules souches dérivées du cordon ombilical (Mitchell 2003; Weiss 2006; Baksh 2007; Chen 2009). En tant que source de cellules extra-embryonnaire, ces cellules ont un taux de prolifération rapide avec un temps de doublement plus court que les cellules souches adultes (Troyer 2008). Cependant, la qualité de ces cellules peut être affectée par la longueur du temps de culture et la densité d'ensemencement de ces cellules (Majore 2011).



#### 4. Les marqueurs de surfaces des CSM de la gelée de Wharton

Les antigènes de surface SH2 (CD105), SH3 (CD73), et Thy-1 (CD90) sont largement utilisés pour l'identification des CSM issues de la gelée de Wharton. Ces marqueurs sont également exprimés par les cellules hématopoïétiques et endothéliales, par conséquent, il est nécessaire de bien exclure les cellules d'origine hématopoïétique ou endothéliale en étudiant l'expression des marqueurs de surface comme CD34, CD45 ou CD31. Le récepteur CD44 est également un marqueur communément admis. En effet, chez les mammifères, la matrice extracellulaire du cordon ombilical est un tissu contenant une forte teneur d'acide hyaluronique (Raio 2005).

Histologiquement, les cellules fraîchement isolées à partir du cordon ombilical sont principalement fibroblastique d'apparence. Toutefois, certains groupes ont remarqué des changements dans la distribution du phénotype après plusieurs passages (Karahuseyinoglu 2007; Majore 2009).

Les CSM du cordon ombilical représentent une population de cellules adhérentes qui partagent un ensemble de marqueurs de surface avec les CSM adultes, y compris CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD51, CD73/SH3, CD90 (Thy-1), CD105/SH2, CD106, le CD117, CD166 et HLA -1/HLA ABC, et sont négatifs pour les marqueurs hématopoïétiques (par exemple, CD14, CD34, CD38, CD45 et HLA-DR) et endothéliaux (CD31 négatif).

En 2012, Salehinejad *et al.*, a constaté que la méthode d'extraction (explants ou enzymatique) a un impact sur l'expression de quelques marqueurs de surface. Leur étude montre que les cellules isolées par la méthode des explants et enzymatique (collagénase seule) expriment des taux plus élevés d'expression de CD90 (55,79% et 72,23% respectivement) qu'avec le traitement de collagénase en présence d'hyaluronidase (28,53%). En outre, CD73 montre une expression plus élevée par culture des explants (74,47%) par rapport à la méthode de digestion enzymatique (67,32% pour collagénase seule, et 13,33% collagénase avec hyaluronidase). Pour le reste des marqueurs, comme CD44 et CD105, la variation de l'expression n'était pas significative (Salehinejad 2012). D'autre part, Schugar *et al.*, a trouvé que le profits d'expression CD105, CD73, CD44 et CD90 ont été rapportés à 35%, 42%, 48% et 67% respectivement sur les cellules de la gelée de Wharton après digestion à la collagénase (Schugar 2009). Tandis que, Weiss *et al.*, a remarqué une expression positive de 96% et 91% pour CD44 et CD90 respectivement en utilisant un cocktail d'enzyme (colagénase, hyaluronidase, trypsine) (Weiss 2006). Au cours des passages (jusqu'à P18), Nekanti *et al.*, a constaté que ces cellules gardent constamment une expression positive de ces marqueurs

(CD44, CD73, CD90, CD105 et CD166) sans noter une variation significative entre les différents passages (Nekanti 2010).

### 5. Les marqueurs de pluripotences des CSM de la gelée de Wharton

Outre les marqueurs de surface, les facteurs de transcription comme Oct-4, Nanog et Sox-2 ont été signalés dans les cellules du cordon ombilical porcin à des niveaux faibles (Carlin 2006). Des études récentes ont révélé également l'expression de ces trois marqueurs dans les CSM du cordon ombilical humain (Jo 2008; Zhang 2009), et d'autres marqueurs pluripotentes, comme Rex-1, SSEA-3, Tra-1-60 et Tra-1-81 qui ont été conservés pendant au moins neuf passages au cours de la culture (Jo 2008).

Les profils de transcriptome des CSM de la gelée de Wharton étaient différents de ceux des CSE et ne partagent pas à même niveau l'expression des marqueurs pluripotents (POU5F1, Sox2, Nanog et Lin28) requis pour le renouvellement des CSE et l'induction de la pluripotence. Malgré cette différence, les CSM de la gelée de Wharton sont multipotentes et sont capables de se différencier en une grande variété de tissus (Sarugaser 2005; Fong 2007; Chao 2008; Troyer 2008; Hou 2009; Wang 2009). Contrairement aux CSE, les CSM de la gelée de Wharton ne produisent pas de tératomes dans des souris immunodéficientes. L'absence ou le faible niveau d'expression des principaux marqueurs de pluripotence comme POU5F1, Nanog, Lin28 et Sox2 peut expliquer pourquoi les CSM de la gelée de Wharton ne produisent pas de tératomes lorsqu'elles sont transplantées dans les cellules indifférenciées (Fong 2007). Chez l'être humain, il y a deux isoformes de POU5F1 (Oct4A et Oct4B) (La Rocca 2009) et donc la détection de POU5F1 est potentiellement problématique, car Oct4A seulement est impliquée dans le maintien de la pluripotence tandis qu'Oct4B est exprimée de manière ubiquitaire (Takeda 1992; Lee 2006). Oct4 a été considérée comme un régulateur majeur de la pluripotence des cellules (Campbell 2007). En effet, Lee *et al.*, a démontré que l'isoforme A est principalement responsable de l'auto-renouvellement des cellules souches humaines (Lee 2006).

### 6. Les capacités de différenciations des CSM de la gelée de Wharton

Les CSM du cordon ombilical ont la capacité de se différencier en plusieurs lignées cellulaires d'origine mésodermique ou ectodermique. La différenciation *in vitro* de CSM de la gelée de Wharton en ostéoblastes est classiquement impliquée par incubation d'une monocouche confluente de cellules avec de l'acide ascorbique,  $\beta$ -Glycérophosphate, et de la dexaméthasone pendant 2-3 semaines (Karahuseyinoglu 2007). Les CSM de la gelée de Wharton, ont montré que ces cellules sont capables à se différencier *in vitro* en 28 jours en

cellules positives pour l'ostéopontine (Wang 2004; Karahuseyinoglu 2007). Les cellules périvasculaires du cordon ombilical ont montré la formation des nodules osseux après avoir été cultivées en présence des suppléments ci-dessus dans une période d'induction de 5 jours (Sarugaser 2005). Karahuseyinoglu *et al.*, rapporte que les cellules isolées de la partie périvasculaire et intravasculaire ont subi avec succès la différenciation ostéogénique en 3 semaines, indiqué par l'expression intense de l'ostéopontine, BSP-2, ostéonectine, et l'ostéocalcine, la formation de dépôts de calcium et de formation des ostéoïde (Karahuseyinoglu 2007). Compte tenu de la possibilité que les cellules périvasculaires *in vivo* possèdent une différenciation en ostéoblastes relativement plus rapide (Sarugaser 2005), ces données suggèrent qu'ils existent des variations au niveau de différenciation de ces différents types de cellules en ostéoblastes. D'autre part, Majore *et al.*, a montré la forte capacité des CSM de la gelée de Wharton à se différencier en 3 semaines en chondroblastes en présence de pyruvate de sodium, L-ascorbate-2-phosphate, dexaméthasone, L-proline, ITS, du TGF- $\beta$ 3 et de gentamicine avec 1% de sérum. La différenciation chondrogénique a été mise en évidence par la formation des nodules riche en collagène de type II, les protéoglycanes et l'aggrécane, un protéoglycane qui se trouve généralement dans la matrice extracellulaire du cartilage hyalin. Par RT-PCR, cette équipe a révélé la transcription de gènes spécifiques du cartilage tels que SOX9, COMP et collagène X. L'expression du gène du collagène X suggère la présence de chondrocytes hypertrophiques ou pré-hypertrophique dans les cultures cellulaires (Majore 2011).

Recevant exactement le même milieu d'induction adipogénique que les CSM de la moelle osseuse, les CSM de la gelée de Wharton montrent un aspect relativement prématuré (formes multiloculaires) (Kierszenbaum 2002). L'accumulation de lipides dans ces cellules en général n'a pas procédé à l'état uniloculaire, comme dans les cas des adipocytes matures. La formation de gouttelettes lipidiques homogènes produites par les CSM de la moelle osseuse révèle que ces cellules possèdent une plus grande tendance à se différencier en adipocytes dans les mêmes conditions de culture (Sekiya 2004).

En 2002, Kadner *et al.*, a constaté que les cellules isolées du cordon ombilical montrent une croissance cellulaire supérieure à celle des cellules vasculaires du myofibroblastes. L'analyse du phénotype révèle des signaux positifs pour ASMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin), la desmine, et vimentine. L'histologie et l'immunohistochimie ont montré la formation de tissu couches contenant du collagène I, III, et glycoaminoglycanes (Kadner 2002). Mitchell *et al.*, a montré que les cellules de la gelée de Wharton expriment un phénotype neuronal après traitement par des facteurs de croissance basique des fibroblastes

avec un milieu contenant peu de sérum ainsi l'ajout de butylhydroxyanisole et le diméthylsulfoxyde. Après 3 jours, ces cellules possèdent une morphologie semblable aux cellules souches neuronales (bipolaire ou multipolaire). Par immunocytochimie, ces cellules indiquent l'expression du NSE (Neuron-specific enolase), un marqueur de cellules souches neuronales. Plusieurs protéines neuronales, y compris  $\beta$ -tubuline-III (protéine spécifique des neurones), le neurofilament M, une protéine associée à la croissance axonale des cônes, et la tyrosine hydroxylase étaient positives. Des marqueurs d'oligodendrocytes et des astrocytes ont également été détectés dans les cellules de gelée de Wharton (Mitchell 2003).

Des études récentes ont indiqué qu'elles étaient capables de se différencier à la fois *in vivo* et *in vitro* en hépatocytes. Exposées à un milieu de culture hépatocytaire, elles expriment les marqueurs hépatiques, y compris l'albumine,  $\alpha$ -fétoprotéine, cytokératine-19, la connexine-32 et la dipeptidyl peptidase IV (Campard 2008). Chao *et al.*, a suggéré qu'elles pourraient être différenciées en précurseurs des îlots pancréatiques, produire de l'insuline humaine et garder un réservoir de glucose pendant 12 semaines par xénotransplantation dans un modèle de diabète de type I (Chao 2008).

#### 7. Les propriétés immunomodulatrices des CSM de la gelée de Wharton

La Rocca *et al.*, a montré pour la première fois l'expression de HLA-G dans une lignée cellulaire des CSM, à la fois dans les cellules adultes et dans les dérivées des cellules fœtales (cordon ombilical) (La Rocca 2009). HLA-G est une forme particulière du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et est exprimé par les trophoblastes et les cellules du placenta lorsque l'embryon établit son contact avec l'utérus, et il est considéré à induire une tolérance immunitaire dans le processus d'implantation de l'embryon (Rouas-Freiss 1997; Le Bouteiller 2000; Blaschitz 2001). En fait, HLA-G a été montré pour lier les deux principaux récepteurs inhibiteurs de NK, KIR-1 et -2 (membres de la famille Killer-récepteur de cellule immunoglobuline-like), stoppant ainsi le processus d'abattage des NK (Moffett 2004).

#### 8. Les autres CSM du cordon ombilical : les hUCPVC

Les CSM du cordon ombilical humain représentent une population hétérogène de cellules. Afin de mieux comprendre leurs propriétés, de plusieurs zones différentes ces cellules peuvent être isolées et caractérisées. Les cellules périvasculaires entourant les vaisseaux (hUCPVCs) ont été isolées par digestion enzymatique. Ces cellules ont montré un phénotype de surface similaire aux CSM de la moelle osseuse et de la gelée de Wharton (Sarugaser 2005; Baksh 2007), y compris CD44, CD73, CD90, CD105 et HLA-ABC. Toutefois, l'antigène de surface CD146, largement exprimé dans les cellules endothéliales, a

été exprimée à un taux plus élevé de 52% dans hUCPVCs par rapport à la moelle osseuse (15%) (Baksh 2007). Un seul groupe a pu extraire les cellules de la zone subamniotique en raison de la difficulté d'isolement de ces cellules du tissu environnant. Ces cellules expriment les marqueurs des cellules souches (AESS-4, Oct-4 et Nanog) et les marqueurs mésenchymateux (CD73 et CD105), et étaient capables de se différencier en adipocyte, ostéocyte et chondrocyte (Kita 2010).

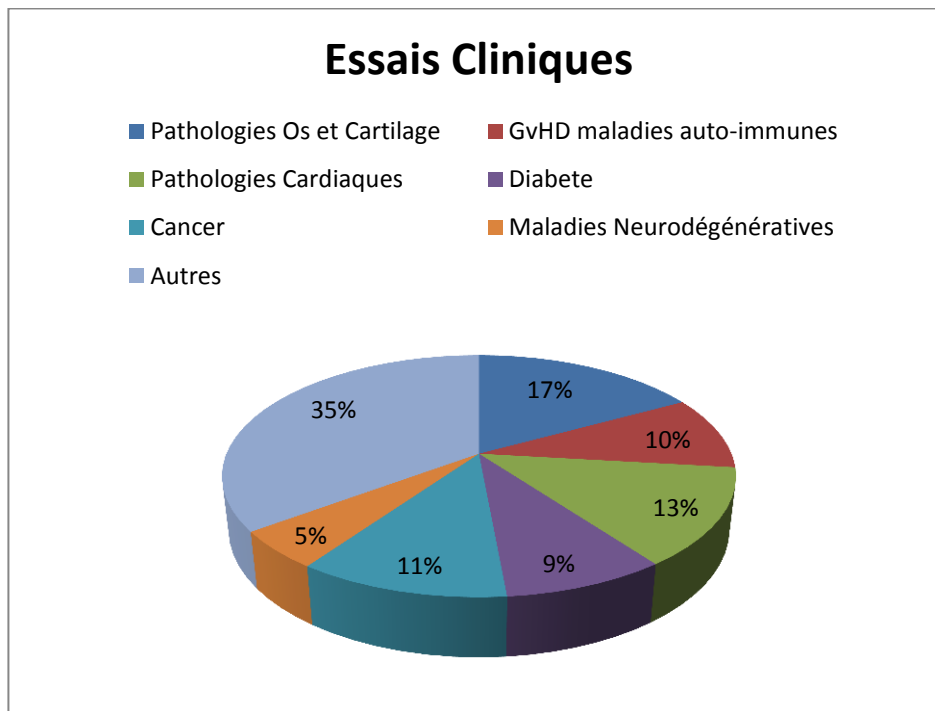
#### **IV. Thérapie cellulaire**

Les applications cliniques potentielles des CSM sont nombreuses. Les cadres physiopathologiques des pathologies ou lésions faisant l'objet d'un essai sont variés, comprenant les séquelles d'ischémie, la prévention ou le traitement de pathologies dysimmunitaires, dont le support de greffes de cellules hématopoïétiques ou de tissus solides, des pathologies dégénératives et dysfonctions d'organes aiguës ou chroniques, ainsi que quelques maladies monogéniques. La grande majorité des essais repose sur l'injection de CSM amplifiées, et un seul repose sur la modification de leur phénotype sécrétoire avant injection. Les essais ne reposant pas sur la thérapie cellulaire à strictement parler mais plutôt sur l'ingénierie tissulaire ont pour objet principal la réparation osseuse et cartilagineuse. Les CSM, ou cellules mononucléées de la moelle osseuse, y sont injectées directement avec des molécules mimant une matrice extracellulaire comme l'acide hyaluronique, ou déposées après culture sur un biomatériau permettant de combler une perte de substance.

##### **A. CSM et essais cliniques**

Le premier essai clinique utilisant la culture élargie des cellules autologues des CSM a été réalisé en 1995 (Lazarus 1995). Depuis lors, un certain nombre d'essais cliniques ont été menés afin de tester la faisabilité et l'efficacité de la thérapie des CSM. A la date du 22/11/2012, 276 essais cliniques utilisant des CSM étaient recensés par le service national des instituts de la santé aux États Unis et ce dans une très large gamme d'indications clinique. La plupart de ces essais sont en phase I (étude de sécurité), phase II (preuve de concept pour l'efficacité chez des patients humains), ou à l'interface, phase I / II. Seul un petit nombre de ces essais sont en phase III (comparaison d'un nouveau traitement au traitement standard ou mieux connu) ou de phase II / III. En outre, de nombreux essais cliniques achevés ont démontré l'efficacité de l'administration des CSM pour les maladies comme l'ischémie du myocarde aigu (IMA), la cirrhose du foie, accident vasculaire cérébral, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la GvHD (Wang 2012).

Actuellement et à travers le monde, les essais cliniques utilisant les CSM sont au nombre de 276 (<http://clinicaltrials.gov>) (22/11/2012) et ont pour indications : (Figure 8).

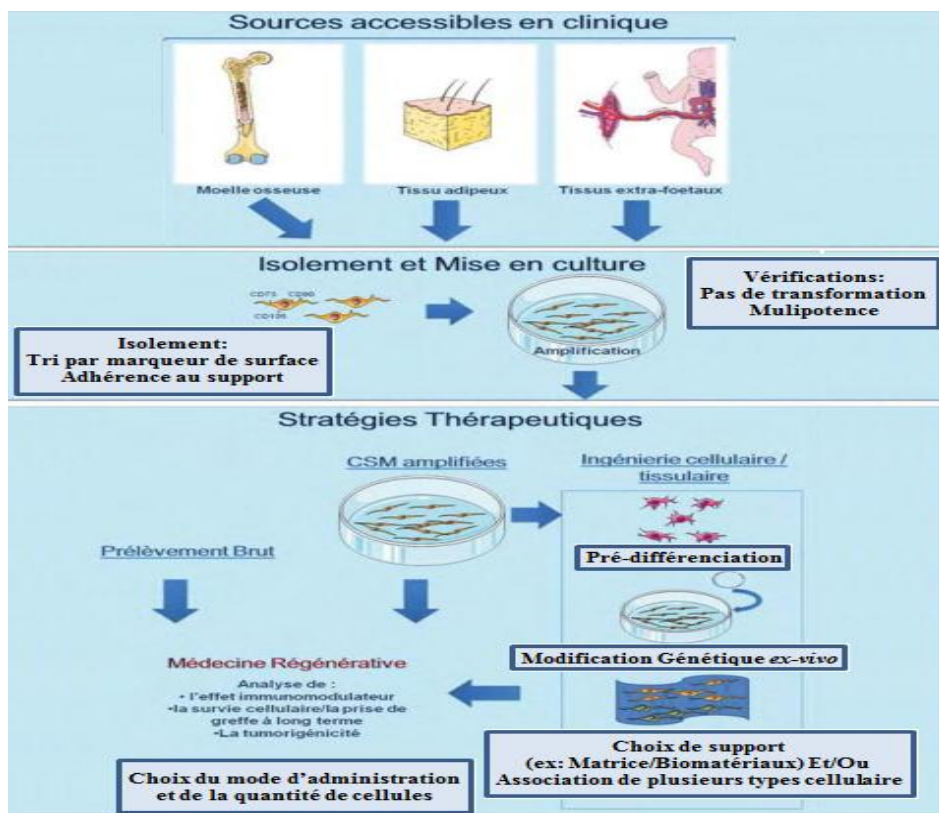


**Figure 8:** Nombre d'essais cliniques utilisant des CSM en fonction des indications thérapeutiques. ( $n$ =nombre d'essais en cours) (Source : <http://clinicaltrials.gov>).

La majorité de ces études sont encore en phase I ou II de la recherche biomédicale, évaluant la tolérance, l'innocuité de l'administration des CSM chez l'homme, ainsi que les premières preuves d'efficacité. Les sources cellulaires proviennent aussi bien de prélèvements autologues que des prélèvements allogéniques. La plupart des CSM utilisées sont isolées à partir de prélèvements de moelle osseuse (90% des essais cliniques). La première indication pour laquelle les CSM sont le plus utilisées en recherche clinique, concerne les pathologies ostéo-articulaires. Dans ce cas précis, c'est essentiellement les propriétés de différenciation et réparation tissulaire qui justifient l'emploi de ces cellules. La maladie du greffon contre l'hôte et les maladies auto-immunes arrivent en deuxième position et par conséquent, occupent une place importante dans l'utilisation des CSM en recherche biomédicale. Les propriétés immunomodulatrices des CSM sont alors mises à contribution.

L'utilisation clinique de ces cellules multipotentes a longtemps été envisagée sous l'angle du remplacement de types cellulaires déficients ou insuffisamment nombreux. Aujourd'hui, leurs multiples autres caractéristiques amènent à utiliser leurs capacités à moduler la cicatrisation et la réparation tissulaire, la réponse immune ou encore la mort cellulaire (effet anti-apoptotique). La capacité d'adressage vers un tissu lésé (phénomène de homing) existant physiologiquement est mise à profit en thérapeutique pour des lésions

tissulaires diffuses ou difficiles d'accès. L'utilisation autologue des CSM à des fins thérapeutiques, après amplification *in vitro*, permettrait de rétablir, une défaillance des cellules à sortir de leur niche, ou une insuffisance quantitative des CSM au sein de l'organisme. Actuellement, le choix du tissu d'origine des CSM pour les essais cliniques repose essentiellement sur la facilité et la richesse des prélèvements. Trois sources sont aujourd'hui utilisées : la moelle osseuse, le tissu adipeux et les tissus extra-fœtaux (gelée de Wharton du cordon ombilical, placenta). La source médullaire reste la plus employée (Martinaud 2010) (Figure 9). La grande majorité des essais repose sur l'injection de CSM amplifiées *in vitro* plutôt qu'utilisées directement ou après un éventuel tri cellulaire basé sur le phénotype membranaire. Cette amplification *in vitro* est limitée dans le temps, entraînant un faible nombre de doublement de population, pour ne pas induire d'aberrations chromosomiques. Dans certains cas, les CSM sont associées à une matrice support ou biomatériau qui permettra de combler la perte de substance. Les scientifiques et les cliniciens ne parlent plus alors de thérapie cellulaire mais plutôt d'ingénierie tissulaire, employée notamment dans les réparations osseuses et cartilagineuses. Pour l'instant, aucun essai reposant sur des CSM modifiées génétiquement *ex vivo* n'a été rapporté (Martinaud 2010).



**Figure 9:** Modes d'utilisations cliniques des CSM.

Des CSM isolées de différents tissus (moelle osseuse, tissu adipeux ou tissus extra-fœtaux) peuvent être amplifiées en culture, et utilisées directement, après prédifférenciation, insertion dans une matrice support, et potentiellement modifiées génétiquement avant réimplantation (ingénierie tissulaire). (Martinaud 2010).

La maladie de greffon contre l'hôte aiguë (aGvHD) survient après une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques et est associée à une morbidité et une mortalité élevées (Huang 2008; Messina 2008; Sun 2010). Actuellement, les corticoïdes sont le traitement de première ligne pour l'aGvHD. Cependant, certains patients présentent de l'aGvHD cortico-résistants. K. Le Blanc *et al.*, ont été les premiers à injecter des CSM haplo-identiques à un garçon de 9 ans présentant une GVHD aiguë sévère de grade IV avec atteinte intestinale et hépatique, résistante aux différentes lignes de traitements immunosuppresseurs. Une rémission complète de GvHD a été observée après deux injections de CSM (Le Blanc 2008).

**Tableau III:** Résumé des études cliniques des cellules souches mésenchymateuses impliquées dans le traitement de la GvHD.

Année de publication	Nombre de Patients	Source de CSM	Dose requise	Résultats
(Prasad 2011)	12	Donneur universel	$8 \times 10^6$ cell/kg pour 2 patients et $2 \times 10^6$ cell/kg pour les autres	7 (58%) patients ont présentés une réponse complète, 2 (17%) une réponse partielle, et 3 (25%) des réactions mixtes. La résolution complète des symptômes gastro-intestinaux est survenues chez 9 (75%) patients. La survie cumulée après 100 jours (à compter de l'instauration du traitement était de 58%
(Lucchini 2010)	11	HLA-sans lien de parenté et différents	La dose moyenne était $1,2 \times 10^6$ /kg (rang: 0,7 $3,7 \times 10^6$ /kg). Réponse globale 71,4%, avec une réponse complète chez 23,8% des cas	Aucun des patients n'a présenté une progression de la GvHD après administration des CSM, mais 4 patients ont présenté une récurrence de la GvHD 2 à 5 mois après injection. Deux patients ont développé une GvHD chronique limitée (cGvHD)
(Kebriaei 2009)	32	Donneurs sans lien de parenté et incompatible	$2-8 \times 10^6$ CSM/kg en association avec des corticostéroïdes	94% des patients avaient une réponse initiale (77% une réponse complète et 16% une réponse partielle). Aucune toxicité ni de formations tissulaires ectopiques n'ont été signalées
(Guo 2009)	33	PBSCT combiné avec des CSM	$0,5 \times 10^5$ à $1,7 \times 10^6$ /Kg	15 patients (45,5%) ont développé une GvHD aiguë (aGvHD) de grade I à IV et seulement 2 patients (6,1%) ont développé une aGvHD de grade III et IV. 9 (31%) parmi les 29 patients évaluables ont expérimenté du cGvHD



(von Bonin 2009)	13	Donneurs HLA-sans lien de parenté et différents	Une dose médiane de $0,9 \times 10^6$ /kg (rang 0,6-1,1)	2 patients (15%) n'ont pas eu besoin d'une nouvelle escalade de la thérapie immunosuppressive. 11 patients ont reçu en plus un traitement concomitant par des injections des CSM, et après 28 jours, 5 entre eux (45%) ont réagi. 4 patients (31%) sont en vie après 257 jours de suivi, y compris un patient qui au départ avait déjà réagi à un traitement de CSM
(Muller 2008)	7	Donneurs des cellules souches Hématopoïétiques (n=5), 1/3 donneur parental (n=2)	$0,4 \times 10^6$ à $3 \times 10^6$ /kg selon la disponibilité	Un tiers des patients a montré une légère amélioration de la cGvHD. 2 patients atteints de aGvHD n'ont pas évalué vers une cGvHD. 1 patient a reçu des CSM pour stabiliser la fonction du greffon après transplantation haplo-identique secondaire.
(Le Blanc 2008)	55	Donneurs HLA intra-familial (n=5), donneurs haplo-identiques (n=18), Donneurs HLA incompatibles (n=69)	$1,4 \times 10^6$ (rang 0,4- $9 \times 10^6$ ) Cellules par kg	30 patients ont présenté une réponse complète et 9 ont montré une amélioration. Aucun patient n'a présenté des effets secondaires pendant ou immédiatement après les injections des CSM. 3 patients avaient une maladie récidivante et un a développé une leucémie myéloïde aiguë de-novo d'origine receveur
(Fang 2007)	6	Donneurs familiaux haplo-identiques (n=2), donneurs sans lien de parenté et HLA incompatibles (n=4)	$1 \times 10^6$ /kg	aGvDH a complètement disparue chez cinq des six patients, dont quatre sont vivants après un suivi en moyenne de 40 mois (rang : 18-90 mois) après l'initiation du traitement. Les quatre patients cicants sont en bon état clinique et en rémission de leur hémopathie maligne

Malgré la progression des options de traitement, la cardiopathie ischémique et l'insuffisance cardiaque congestive restent les principales causes de morbidité et de mortalité. Parmi les types cellulaires utilisés, les CSM sont un candidat intéressant pour la réparation cardiovasculaire en raison de leurs propriétés biologiques. Dans les études précliniques sur des modèles animaux expérimentaux de lésion cardiaque, les CSM se sont implantées que ce

soit après une administration systémique ou une administration locale et ont contribué à améliorer la réparation des infarctus du myocarde (Nagaya 2005; Jiang 2006; Zhang 2006).

Des essais cliniques utilisant des CSM pour améliorer la fonction cardiaque ont également montré des résultats encourageants. Dans une étude, soixante-neuf patients ayant subi une intervention coronarienne percutanée (PCI) primaire dans les 12 heures après le début de l'infarctus du myocarde aigu ont été randomisés pour recevoir l'injection intracoronaire des cellules souches mésenchymateuses autologues de la moelle osseuse. Plusieurs techniques ont démontré que les CSM améliorent la fonction ventriculaire gauche (Chen 2004). Parmi 36 essais cliniques à l'heure actuelle, neuf ont été terminés utilisant les CSM dans le traitement des maladies cardiaques (Tableau IV).

En ce qui concerne les maladies du foie, les cellules souches mésenchymateuses ont été utilisées pour traiter la cirrhose dans un nombre limité de patients. Dans un essai de phase I, quatre patients atteints de cirrhose du foie décompensée ont été inclus. Ils ont reçu une perfusion autologue des CSM dans une veine périphérique. Il n'y a pas eu d'effets secondaires chez les patients au cours du suivi. La qualité de la vie de tous les quatre patients a été améliorée à la fin de suivi (Mohamadnejad 2007). Dans un autre essai clinique de phase I- II, huit patients atteints de la maladie hépatique au stade terminal (4 contre hépatite B, une hépatite C, un alcoolique, et deux cryptogénique) ont été inclus. Après injection des CSM autologues, leurs fonctionnements hépatiques ont été améliorés, ce qui suggère la faisabilité, la sécurité et l'efficacité de l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses dans le traitement de la maladie hépatique au stade terminal (Kharaziha 2009).

**Tableau IV:** Essais cliniques effectués à l'heure actuelle avec les CSM en pour les traitements des maladies cardiaques.*(Source : <http://clinicaltrials.gov>) (dernière consultation au 22/11/2012)*

Numéro d'identification de l'essai	Indications/Pathologies cardiaques	Source de CSM	Nombre de Patients	Mode d'administration	Phase de l'essai clinique
NCT00260338	Ischémie myocardique	CSM autologue de moelle osseuse	31	Injection intra-myocardique	I/II
NCT01291329	Infarctus du myocarde	CSM de la gelée de Wharton	160	Injection intra-coronaire	II
NCT00768066	Infarctus du myocarde	CSM autologue de moelle osseuse	67	Injection intra-myocardique	I/II
NCT00927784	Insuffisance cardiaque	Pas mentionnée	10	Injection intra-myocardique	II
NCT00587990	Infarctus du myocarde	CSM autologue de moelle osseuse	45	Injection intra-myocardique à une Dose élevée	I/II
NCT00135850	Ischémie myocardique	CSM autologue de moelle osseuse	48	Injection intra-coronaire	I/II
NCT00114452	Infarctus du myocarde	Pas mentionnée	53	Medicament : Provacel	I
NCT01392105	Infarctus aiguë du myocarde	CSM autologue de moelle osseuse	80	Injection intra-coronaire	II/III
NCT01087996	Infarctus du myocarde	CSM autologue et allogénique de moelle osseuse	30	Injection intra-myocardique	I/II

### CSM du cordon ombilical et applications cliniques

L'utilisation des CSM nécessite que la production soit effectuée en conditions de grade clinique car elles montrent un potentiel pour diverses applications thérapeutiques et ont attiré l'attention à des investigations cliniques. Pour une utilisation thérapeutique allogénique des caractéristiques de faible immunitaire sont nécessaires afin de ne pas stimuler la réponse immunitaire chez les patients immunocompétents (Pansky 2007; Jung 2009). Comme les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse, les CSM de la gelée de Wharton sont immunologiquement privilégiées. Elles invoquent une activité immunitaire minimale, et en outre, peuvent posséder des propriétés anti-inflammatoires et des effets immuno-modulateurs. Ces cellules expriment l'antigène du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) et expriment des niveaux faibles d'antigènes du CMH de classe II, relativement moins que les CSM de la moelle osseuse. Actuellement plusieurs études suggèrent que les CSM de la gelée de Wharton ne nécessitent pas une compatibilité envers les tissus, leur permettant ainsi d'être une source de thérapie cellulaire allogénique (Weiss 2008).

Les CSM de la gelée de Wharton partagent les mêmes capacités naturelles que les CSM de la moelle osseuse. La capacité immunosuppressive de ces cellules possède le potentiel pour traiter de nombreux troubles, y compris la réaction du greffon (GvHD) (Caimi 2010; Bernardo 2011), le diabète (Chao 2008; Anzalone 2011), et les tumeurs cancéreuses (Rachakatla 2008; Loebinger 2009). Bien qu'il y ait peu d'essais cliniques en cours avec les CSM de la gelée de Wharton, plusieurs essais pré-cliniques ont été menés pour proposer les avantages cliniques possibles de cette source de cellules. Plusieurs indices ont été étudiés chez les animaux, y compris la reconstitution hématopoïétique (Friedman 2007; Taghizadeh 2011), la maladie de Parkinson (Weiss 2006), le diabète (Chao 2008; Anzalone 2011), la dégénérescence maculaire (Lund 2007) et les lésions médullaires (Yang 2008).

Une étude récente a examiné la sûreté et l'efficacité des CSM dérivées du cordon ombilical chez les patients atteints de la cirrhose du foie décompensée (Liver Cirrhosis, LC). Un total de 45 patients ayant de l'hépatite B avec une cirrhose de foie décompensée ont été recrutés, dont 30 ont reçu une transfusion de CSM du cordon ombilical et 15 une solution saline comme témoin. Après un an de suivi, aucuns effets secondaires et complications importants ont été observés dans les deux groupes. Par contre, il y avait une réduction significative du volume de l'ascite chez les patients traités avec les CSM du cordon ombilical, ce qui a considérablement amélioré la fonction hépatique par augmentation du taux d'albumine sérique et par diminution des concentrations totales de la bilirubine sérique et de

sodium (Zhang 2012). Une autre étude a montré que sur un total de 72 patients atteints de pseudarthrose ; les 36 patients ayant reçu une transplantation percutanée de CSM provenant du cordon ombilical qu'après un suivi de  $13,2 \pm 4,6$  mois que la mobilité et la fonction de la hanche, du genou et de la cheville étaient bonnes. Le temps de l'union osseuse était significativement plus rapide de  $5,6 \pm 0,8$  mois pour le groupe ayant subi une transplantation et  $10,3 \pm 2,8$  pour le groupe du témoin qui a reçu du greffe osseuse auto-iliaque (Qu 2009).

## B. Ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire, au carrefour de différentes disciplines a pour but de remplacer, maintenir ou améliorer la fonction de tissus humains, grâce à des substituts tissulaires incluant des éléments vivants (Langer 1993). Il s'agit donc d'élaborer des tissus artificiels, en faisant appel aux cultures de cellules (cellules différenciées, ou plus souvent cellules souches de la moelle osseuse), à des biomatériaux (matériaux poreux à architecture contrôlée), à des facteurs de croissance (comme les *bone morphogenetic proteins*, ou *TGF- $\beta$* ), aux protéines intervenant dans l'adhésion cellulaire (telles que la fibronectine, ou les séquences reconnues par les sous unités d'intégrine), ou encore à la thérapie génique des cellules (notamment en utilisant des cellules-souches transfectées). En outre, la voie de l'ingénierie tissulaire présente l'avantage de s'affranchir des problèmes comme le manque de donneurs et le risque de transmission virale. Les applications sont nombreuses et recouvrent la reconstitution aussi bien de la peau (MacNeil 2007), du foie (Bhandari 2001), de la cornée (Hu 2005; Rimmer 2007), mais également de l'appareil locomoteur (Tuli 2003; MacIntosh 2008; Hardouin 2000). Plusieurs essais clinique comme la greffe de la peau (Eaglstein 1997), du cartilage et de l'os (Roberts 2008) sont déjà en cours d'application. Cette approche thérapeutique est actuellement considérée comme innovante en médecine régénératrice à côté des deux principales thérapies que sont la transplantation d'organes et la chirurgie prothétique (Vacanti 1999; Lavik 2004).

L'ingénierie tissulaire implique en général l'utilisation des matrices "*scaffolds*", littéralement échafaudage en anglais, qui sont des architectures sophistiquées tridimensionnelles, formant des motifs précis. Un « *scaffold* » doit satisfaire aux critères suivants (Hutmacher 2001):

- Hautement poreux avec des pores interconnectés et présentant une taille appropriée afin de favoriser l'intégration et la vascularisation du nouveau tissu, la diffusion des nutriments et l'évacuation des déchets

- Construit à partir de matériaux biocompatibles et dont la biodégradabilité est contrôlée
- Favoriser l'adhésion, prolifération et la différenciation cellulaire
- Assurer à la fois le rôle de support mécanique lors de la transplantation et le rôle de trame temporaire mimant la matrice extracellulaire des cellules afin de guider la reconstruction tissulaire
- Ne pas induire une réponse inflammatoire
- Facilement modulable en forme et en taille

Les « *scaffolds* » peuvent être fabriqués à partir de matériaux inorganiques (Hench 2002) comme le phosphate de calcium (LeGeros 2002), utilisé dans la régénération des tissus minéralisés (le tissu osseux), ou de matériaux organiques comme les polymères naturels ou synthétiques (Drury 2003; Shin 2003). Parmi les polymères naturels utilisés dans l'ingénierie tissulaire, les hydrogels à base de biopolymères, comme l'alginate et le chitosan sont particulièrement attractifs. En effet, ils présentent une structure proche de celle des macromolécules composant les tissus humains (Lee 2001; Falcone 2006), une faible cytotoxicité, une bonne biocompatibilité et un coût relativement bas. Le concept d'ingénierie tissulaire est basé sur le triptyque cellules/biomatériaux/facteurs biologiques dans le but de générer un tissu hybride (Merceron 2008). Afin d'améliorer la fonctionnalité du tissu néoformé et obtenir une nouvelle matrice tridimensionnelle la plus appropriée possible du tissu d'origine, une source abondante de cellules saines est nécessaire (Galois 2005). Une des sources cellulaires pouvant servir à cette amélioration est : les cellules souches mésenchymateuses.

### 1. *Le Cartilage*

Les dommages des cartilages dans les genoux et les hanches se produisent généralement soit lors des blessures sportives ou à cause de l'usure avec l'âge. Des tels défauts du cartilage prennent longtemps pour guérir à cause de la nature avasculaire du cartilage et de l'incapacité des cellules locales à régénérer des nouveaux tissus. L'ingénierie tissulaire du cartilage émerge comme une thérapeutique prometteuse pour la correction de ces défauts. Ce domaine a été largement étudié mais est toujours entravé par l'identification de la source cellulaire la plus appropriée pour la différenciation et l'intégration au sein de la transplantation des constructions développées pour la réparation du cartilage.

L'utilisation des cellules souches à la place des chondrocytes et des fibroblastes a généré un intérêt énorme dans l'ingénierie tissulaire du cartilage, mais la cellule souche idéale

n'a pas été identifiée. Les cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) ont été différenciées en cartilage (Oldershaw 2010), mais depuis les tissus dérivés provenant de CSEh allogéniques ont été l'objet d'un rejet immunitaire après la transplantation. Cependant, des tentatives sont faites pour contourner ce problème grâce à la personnalisation des tissus par le biais du transfert nucléaire (NT) au sein de la CSEh du noyau issu d'une cellule somatique du patient : clonage thérapeutique, ou par une reprogrammation des cellules du patient en les dirigeant vers l'état de cellules pluripotentes par transfection avec des gènes pluripotents (cellules souches humaines pluripotentes induites, hiPSCs) (Takahashi 2006; Yu 2007; French 2008). Malheureusement, en raison de leur pluripotence, l'utilisation de ces cellules n'est pas sans risque avec le problème de production et de la formation de tératome (Aleckovic 2008) (Knoepfler 2009), rendant les dérivés chondrocytaires dangereux pour la réparation du cartilage, et semblent être immunogénétiquement actifs après la transplantation dans l'hôte (Zhao 2010). En revanche les CSM présentent des caractéristiques uniques : elles sont immunosuppressives et immunoprivilégiées (Nauta 2007). Elles ne génèrent pas la formation de tératome détectable, et possèdent une forte capacité de migration (Breitbach 2007; Jackson 2007; Bernardo 2009; Salem 2010).

Cliniquement, les études reposant sur l'insertion intra-articulaire de chondrocytes, ou de CSM amplifiées sur des gels de collagène dans des genoux de malades arthrosiques, n'ont pas montré de bénéfice statistiquement significatif. Devant l'amélioration des connaissances sur les processus de différenciation et du rôle des molécules de matrices, la réparation cartilagineuse fait néanmoins l'objet de plusieurs essais reposant sur des CSM amplifiées, injectées directement, cultivées en suspension afin d'induire un début de différenciation chondrocytaire ou encore en association avec des molécules de matrice comme l'acide hyaluronique.

A l'heure actuelle, 16 essais cliniques utilisant des CSM dans le traitement de lésions cartilagineuses ont été mis en place (<http://clinicaltrials.gov>) (dernière consultation au 22/11/2012) (Tableau V). L'hypothèse d'un déficit simple de migration des CSM vers la lésion ou d'un nombre insuffisant de cellules physiologiquement, justifie l'emploi de ces dernières en thérapeutique. Les indications de ce type de traitement concernent essentiellement les lésions du cartilage articulaire dans leur globalité. La majorité des essais (environ 80%) sont en phase I ou II et utilisent comme source cellulaire, des CSM de la moelle osseuse isolées à partir d'un prélèvement autologue. Deux essais utilisent, respectivement, des CSM provenant du tissu adipeux et du cordon ombilical (sang du cordon). Ces cellules sont soit, implantées directement chez le patient après amplification *in vitro*,

soient intégrées dans une matrice support (Collagène de type I, polymère, autre matrice de nature protéique). Cette association cellules-matrice tente d'améliorer le comblement des lésions cartilagineuses en diminuant la diffusion des cellules en dehors de la lésion. L'implantation des cellules se fait directement par injection intra-articulaire et parfois, sous arthroscopie. Certains essais utilisent approximativement 40 millions de cellules en dose unique (Tableau V). Le caractère confidentiel des essais cliniques rend difficile la description précise des protocoles employés : nombre d'injection, rythme d'injection, nombre de cellules implantées, etc.



**Tableau V:** Ensemble des essais cliniques, en cours de réalisation, utilisant des CSM dans le traitement de lésions cartilagineuses. (Source : <http://clinicaltrials.gov>) (dernière consultation au 22/11/2012). Le caractère confidentiel des essais cliniques rend parfois difficile la description précise des protocoles employés. (Mb : membrane).

Numéro d'identification de l'essai	Indications/Pathologies du cartilage	Source de CSM	Association à une matrice support	Mode d'administration	Phase de l'essai clinique
NCT01586312	Gonarthrose grade II à IV	CSM autologue de moelle osseuse	Non	Injection intra-articulaire	I/II
NCT00850187	Lésions profondes (genou) Gonarthrose	CSM autologue de moelle osseuse	Collagène de type I	Injection intra-articulaire	I
NCT01459640	Gonarthrose	CSM autologue de moelle osseuse	Non	Injection intra-articulaire	II
NCT01436058	Arthrose (Cheville)	CSM autologue de moelle osseuse	Non	Injection intra-articulaire	I
NCT01504464	Arthrose (genou)	CSM autologue de moelle osseuse	Non	Injection intra-articulaire	II
NCT01626677	Lésions, gonarthrose	Allogénique, du sang de cordon ombilical	Polymère semi-solide Cartistem®	Injection intra-articulaire Simple dose, 500µL/cm <sup>2</sup>	III
NCT01499056	Arthrose (Hanche)	CSM autologue de moelle osseuse	Non	Injection intra-articulaire	I
NCT00891501	Arthrose précoce Lésions ostéochondrales	CSM autologue de moelle osseuse	Non	Injection intra-articulaire	II/III
NCT00885729	Lésions focales (genou)	CSM autologue de moelle osseuse	Membrane (nature ??)	Injection intra-articulaire sous arthroscopie	I
NCT01159899	Lésions profondes (genou) Gonarthrose	CSM autologue de moelle osseuse	Matrice support protéique	Injection intra-articulaire sous arthroscopie	I
NCT01227694	Gonarthrose grade II-III	CSM autologue de moelle osseuse	Non	Injection intra-articulaire Simple dose, 4.10 <sup>7</sup> CSM	I/II
NCT01207661	Gonarthrose	??	Non	Injection intra-articulaire Simple dose	I
NCT01041001	Lésions, gonarthrose	Allogénique, du sang de cordon ombilical	Polymère semi-solide Cartistem®	Injection intra-articulaire Simple dose, 500µL/cm <sup>2</sup>	III
NCT01399749	Lésions condyle fémorale	CSM autologue de tissu adipeux	Non	Injection intra-articulaire 1.10 <sup>6</sup> CSM/cm <sup>2</sup> lésions Suture Mb périoste	I/II
NCT01183728	Gonarthrose grade II à IV	CSM autologue de moelle osseuse	Non	Injection intra-articulaire, 4.10 <sup>7</sup> CSM	I/II
NCT01152125	Arthrose	CSM autologue de moelle osseuse	Non	Injection intra-articulaire	I/II

Hormis ces essais cliniques en cours de réalisation, des résultats encourageants de certaines études ont déjà été publiés. Tout d'abord, des travaux ont montré une innocuité de la transplantation autologue de CSM de moelle osseuse à moyen terme (11 ans et 5 mois) (Wakitani 2007). De plus, l'injection intra-articulaire de CSM amplifiées est une procédure sûre n'entraînant théoriquement aucune complication.

Cette même équipe a montré également, quelques années auparavant, que la transplantation autologue de CSM de moelle osseuse amplifiées *in vitro*, améliore les symptômes de patients atteints de lésions articulaires. Les CSM sont isolées à partir de moelle osseuse de la crête iliaque. Les cellules sont amplifiées en culture puis suspendues dans une solution de collagène de type I ( $5 \cdot 10^6$  cellules/mL) et enfin injectées en intra-articulaire. Un an après la transplantation, un comblement total de la lésion est observé chez un patient grâce aux techniques d'imagerie (IRM). Cependant, il est difficile de savoir si le tissu de réparation constitue un cartilage hyalin ou un fibrocartilage (Wakitani 2007).

Une autre étude, utilisant le même procédé, s'est intéressée à la transplantation de CSM autologues chez un jeune sportif adulte présentant une lésion au niveau du condyle fémoral. Dans cette étude, l'implant est recouvert par une membrane de périoste autologue. Sept mois après la transplantation, l'arthroscopie révèle une réparation tissulaire. L'histologie confirme qu'il s'agit bien d'un cartilage de phénotype hyalin. Un an après l'opération, les symptômes cliniques sont améliorés de façon significative (Kuroda 2007) et l'athlète peut reprendre normalement ses activités sportives.

D'autres études ont également démontré l'effet bénéfique de la transplantation autologue de CSM sur la régénération du ménisque (Centeno 2008).

Un essai plus récent, sur des résultats plus mitigés, conclut une amélioration des symptômes (diminution des douleurs) chez des patients atteints d'une pathologie dégénérative du cartilage. En revanche, les réponses au traitement sont variables d'un individu à l'autre et pour certains, la transplantation autologue de CSM n'a pas montré de bénéfice statistiquement significatif (Davatchi 2011). Une meilleure connaissance des processus de différenciation et du rôle des molécules de matrice (HA, collagène, etc) permettrait d'obtenir de meilleurs résultats.

## 2. L'Os

C'est un organe dynamique en perpétuel remodelage mais aux capacités de régénération limitées justifiant le recours à la chirurgie en cas de perte de substance, de malformations ou de pseudarthrose. Dans le cadre de la reconstruction de larges segments

osseux, le traitement de choix est l'autogreffe osseuse mais souvent le matériel est insuffisant et peu vascularisé ; dans le cadre de l'allogreffe le problème principal demeure la disponibilité des greffons, la compatibilité et le risque infectieux, expliquant l'intérêt que représentent des biomatériaux ensemencés par des CSM amplifiées *in vitro*. Chez des malades ayant bénéficié d'ostéotomie tibiale pour maladie de Blount, les CSM ont ainsi eu un effet bénéfique majeur (Dallari 2007).

Comme une approche d'ingénierie des tissus, les CSM de la moelle osseuse peuvent être incorporées dans les biomatériaux pour des implantations directes, avec ou sans l'accord préalable de culture *in vitro* dans les médias ostéogéniques. Le support typique ostéogénique comprend de la dexaméthasone et / ou BMP-2, en plus de  $\beta$ -glycérophosphate et de l'acide ascorbique à l'aide de synthèse de la matrice. L'exposition des CSM de la moelle osseuse à ce milieu avant leur implantation permet la livraison de plus de cellules matures ostéogéniques, ce qui accélère la régénération de l'os *in vivo* (Salgado 2004). L'induction ostéogénique des CSM du cordon ombilical en monocouche 2D a été réalisée par traitement à la dexaméthasone et  $\beta$ -glycérophosphate (Wang 2004; Sarugaser 2005; Lu 2006; Baksh 2007; Karahuseyinoglu 2007; Wu 2007). Au cours de la différenciation ostéogénique, il est apparu que la minéralisation des CSM du cordon ombilical formait moins de nodules que les CSM de la moelle osseuse (Lu 2006; Karahuseyinoglu 2007). Exposées dans un milieu ostéogénique, les cellules périvasculaires se différencient plus rapidement le long de la lignée ostéogénique avec la formation de nodules osseux après seulement 4-5 jours (Sarugaser 2005). En comparaison avec les CSM du cordon ombilical les cellules périvasculaires, les types de cellules étaient phénotypiquement semblables, sauf pour l'expression de CD146 (37,9% des cellules périvasculaires, 16,2% pour les CSM du cordon ombilical) (Martin-Rendon 2008). Après exposition à un milieu ostéogénique, la coloration positive de von Kossa a été légèrement plus forte dans les cellules périvasculaires que dans les CSM du cordon ombilical. Dans la différenciation induite par le BMP-2, l'expression de phénotypes ostéogéniques et les voies de transduction du signal des CSM du cordon ombilical sont similaires par rapport aux CSM de la moelle osseuse (Hou 2009). La différenciation des CSM du cordon ombilical pourrait être déclenchée par utilisation de matrices. Les cellules cultivées sur le ciment de phosphate de calcium ont été présentées à proliférer et à subir une différenciation ostéogénique (Xu 2010). Lorsque les CSM du cordon ombilical sont cultivées pendant 7 jours en monocouche avec un milieu contenant une matrice osseuse déminéralisée, leur prolifération a été inhibée, leur morphologie est apparue raccourci et aplatie, et l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) est augmentée de façon significative. Ces phénomènes ont indiqué que les

CSM du cordon ombilical peuvent se différencier le long de la lignée ostéogénique (Honsawek 2006), tandis qu'une culture à long terme sera nécessaires pour vérifier la présence de marqueurs ostéogéniques tardifs. Toutefois, la capacité ostéogénique des CSM du cordon ombilical semble inférieure aux CSM de la moelle osseuse (Zhang 2009).

Les CSM du cordon ombilical sont considérées comme une alternative aux cellules souches embryonnaires et les CSM de la moelle osseuse, avec des avantages évidents par rapport à chacun. Les CSM du cordon ombilical sont pas controversées, en revanche des CES. En termes de disponibilité et de l'efficacité de récolte, elles offrent un avantage majeur par rapport aux CES, vue la quantité infinie de cordons ombilicaux (Martin 2007). Pratiquement parlant, la récolte et la culture de ces cellules est beaucoup plus facile et moins coûteux que les CES. Quant à leur capacité de différenciation, les CSM du cordon ombilical peuvent se différencier selon les lignées mésenchymateuses.

Actuellement, la plupart des efforts de différenciation ont été menées *in vitro* en culture monocouche. Les différences entre les environnements 2D et 3D peuvent certainement affecter la migration cellulaire, la prolifération et la différenciation. Zhang *et al.*, a signalé que les CSM du cordon ombilical en culture monocouche 2D avait légèrement un mieux potentiel prolifératif et ostéogénique que les CSM de la moelle osseuse adultes, mais, lorsque ces cellules ont été cultivées en 3D, et dans les deux cas des implantations *in vitro* ou *in vivo*, les cellules adultes de la moelle osseuse ont montré une meilleure performance que les CSM du cordon ombilical (Zhang 2009).

## Chapitre 2. Matériels et Méthodes

---

## I. Culture primaire des cellules souches mésenchymateuses

### A. Origine des prélèvements

A la naissance, le cordon ombilical et les tissus environnants, notamment le placenta et le sang placentaire, sont destinés à être éliminés et sont donc considérés comme des déchets opératoires. Si la mère consent à en faire le don, le prélèvement du sang est réalisé avant le sectionnement du cordon.

#### 1. Matériel et réactifs

##### a) Matériel

- Poches stériles
- Boîte de culture ventilée T75, avec un bouchon à filtre (réf. CC7682-4875, CytoOne)

##### b) Réactifs

- Tampon HBSS (Hank's Balanced Salts Solution, réf.H2387, Sigma, France) (KCl 0,4 g/L, NaCl 8,0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,06 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,04778 g/L, D-glucose 1,0 g/L et Rouge de phénol 0,011 g/L). Ce tampon se présente sous forme de poudre et doit être reconstitué dans de l'eau distillée Le pH de la solution est ajusté à 7,2 en ajoutant du NaHCO<sub>3</sub>.
- Fungizone (2,5 µg/mL, réf. Gibco, France)

#### 2. Recueil des prélèvements

Le recueil des sangs placentaires et des cordons ombilicaux est réalisé par des sages-femmes de la Maternité Régionale de Nancy, dans la salle de naissance, juste avant la délivrance et après avoir obtenu le consentement des mères.

##### Sang Placentaire :

Le recueil de sang placentaire est réalisé dans les mêmes conditions que celui destiné à la Banque de Sang Placentaire Thérapeutique. Les échantillons de sang placentaire sont recueillis dans des poches stériles de 200mL contenant de l'héparine comme anticoagulant.

##### Cordons ombilicaux :

Les cordons ombilicaux proviennent de donneurs sains. De longueurs variables (entre 15 et 40cm), ils sont placés rapidement dans une boîte de culture T75 cm<sup>2</sup> contenant 200 mL d'HBSS stérile et 2 mL de fungizone. Le cordon ombilical est ensuite stocké à 4°C jusqu'à

utilisation. Il est préférable que le cordon soit manipulé dans le plus rapidement possible après son prélèvement, sinon il peut se garder 24h à 4°C.

## B. Extraction et amplification des cellules mononucléées du sang placentaire

### 1. Matériel et réactifs

#### a) Matériel

- Centrifugeuse "Labofuge 400" (Heraeus Instruments)
- Support de culture (plaques 6 puits, réf. 657160, Greiner bio-one)
- Tube Falcon de 50 mL (réf. 352098, Dutscher, France)

#### b) Réactifs

- Milieux de culture. Selon la méthode de culture utilisée (« coatée » ou « optimisée »), le milieu de culture diffère. Les compositions sont résumées dans le Tableau VI.
- Alpha Modified Eagle Medium ( $\alpha$ -MEM) (réf. Lonza, Belgique)
- Sérum de veau fœtal (SVF, réf. Sigma, France) décomplémenté à +56°C pendant 30 min et utilisé à 10% (v/v dans  $\alpha$ -MEM).
- IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (réf. 21980, Invitrogen, France)
- Antibiotiques : Pénicilline à 10 mU/mL / Streptomycine à 10 ng/mL (P/S, réf. 15070-063, Gibco, France) et une solution antifongique (Fungizone 2,5  $\mu$ g/mL, réf. Gibco, France).
- L-Glutamine à 2mM (réf. G7513, Sigma, France)
- FGF-2 (0,1 $\mu$ L/mL) (réf. R&D Systems, Lille, France)
- GM-CSF à 5 ng/mL (réf. R&D Systems, Lille, France)
- IL-3 à 15 ng/mL (réf.403-ML-010 R&D Systems, Lille, France)
- Ficoll (réf. Sigma, France)
- Solution de lavage PBS

**Tableau VI:** Composition de différents milieux de culture pour des cellules souches mésenchymateuses provenant du sang placentaire.

	<b>Méthode Coatée</b>	<b>Méthode Optimisée</b>
<b><math>\alpha</math>-MEM</b>	✓	
<b>IMDM</b>		✓
<b>SVF à 10% (v/v)</b>	✓	✓
<b>Antibiotiques</b>	✓	✓
<b>L-Glutamine à 2mM</b>	✓	
<b>FGF-2 à 0,1<math>\mu</math>L/mL</b>	✓	
<b>GM-CSF à 5 ng/mL</b>		✓
<b>IL-3 à 15 ng/mL</b>		✓

## 2. Méthodologie

Le sang collecté est dilué au demi avec une solution stérile de PBS. Deux volumes de sang dilués sont ensuite déposés délicatement à la surface d'un volume de milieu de séparation contenu dans un tube Falcon de 50 mL. Après centrifugation (400g pendant 20 minutes), les globules rouges sont agglutinés par le Ficoll et sédimentent au fond du tube tandis que les cellules mononucléées (MNCs) se retrouvent à l'interface entre le plasma et le Ficoll. L'anneau contenant les MNCs est délicatement aspiré et déposé dans un nouveau tube de 50mL. Les cellules sont lavées deux fois, par centrifugation (300 g, 10 minutes) dans du PBS. Les cellules sont alors divisées en 2 populations afin de réaliser les 2 modalités de culture :

Pour la culture des cellules selon la méthode dite « coatée », avant de transférer les cellules dans les plaques de culture, ces dernières sont traitées avec du sérum de veau (SVF). Pour cela, 2 ml de SVF sont déposés dans chaque puits pendant 30 minutes puis sont retirés. Les cellules sont ensuiteensemencées à une densité de  $2 \times 10^6$  cellules /  $\text{cm}^2$  dans un milieu de culture contenant de l' $\alpha$ -MEM avec 10% SVF.

Pour la culture des cellules selon la méthode dite « optimisée », les cellules sont directementensemencées à une densité de  $10 \times 10^6$  cellules /  $\text{cm}^2$  dans du milieu IMDM avec 10% SVF dans des plaques 6 puits sans traitement préalable.

Quelle que soit la méthode de culture utilisée, les cellules sont laissées en culture pendant au moins 12 heures à 37°C. Dès lors, le milieu de culture est changé une fois par semaine pour la méthode « coatée » et remplacé à 50% du milieu tous les 3 jours pour la méthode « optimisée ».



## C. Extraction et amplification des cellules souches mésenchymateuses

### 1. Matériel et réactifs

#### a) Matériel

- Microscope inversé à imagerie par contraste de phase, Olympus IMT-2 (Japon) et Nikon DIAPHOT 300 (Japon)
- Boîte de culture ventilée T75, avec un bouchon à filtre (réf. CC7682-4875, CytoOne)
- Boîte carrée stérile (réf. C223693, Fisher, France)
- Cryotubes (réf. 11311675 Fisher, France)
- Tube Falcon de 50 mL (réf. 352098, Dutscher, France)
- Une pince, une pince à clavier, et une paire de ciseaux stériles
- Cellule de Thoma (réf. Chambre de Thoma, A4500T, Bioblock, France)

#### b) Réactifs :

##### Milieu de culture :

- Alpha Modified Eagle Medium ( $\alpha$ -MEM) (réf. Lonza, Belgique)
- Sérum de veau fœtal (SVF, réf. F7524, Sigma, France) décomplémenté à +56°C pendant 30 min et utilisé à 10% (v/v dans  $\alpha$ -MEM).
- L - Glutamine à 2 mM (réf. G7513, Sigma, France)
- Antibiotiques : Pénicilline à 10 mU/mL / Streptomycine à 10 ng/mL (P/S, réf. 15070-063, Gibco, France) et une solution antifongique (Fungizone 2,5  $\mu$ g/mL, réf. Gibco, France).

Lorsque le milieu de base est supplémenté avec les antibiotiques, la glutamine et le SVF, il forme le milieu complet.

##### Solution de digestion

- Collagenase B à 2 mg/mL (réf. 1088815, Roche Applied Science, USA), dissous dans du milieu  $\alpha$ -MEM contenant des antibiotiques.
- Solution de trypsine-EDTA (réf. 25300-054, Sigma, France) initialement à une concentration de 0,05% et diluée de moitié dans de l'HBSS pour l'amener à la concentration de 0,025%.

### Solution de congélation

Diméthyl sulfoxyde (DMSO) dilué à 10% dans du SVF (v/v) (réf. 5879, Sigma, France).

### Tampons

Pour laver les cellules ainsi que pour maintenir l'intégrité des tissus, des tampons isotoniques, ayant un pH compris entre 7,2 et 7,4, et ne contenant ni calcium ni magnésium sont utilisés. Les deux principaux tampons utilisés sont l'HBSS et le PBS.

- Tampon HBSS (réf.H2387, Sigma, France) reconstitué dans de l'eau distillée (pH 7,2).
- Tampon PBS (Phosphate Buffered Saline). Ce tampon contient du NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,4 mM) et D-glucose (1,0 g/L).

Ces deux solutions sont filtrées sur des filtres de 0,2 µm (réf. PN 4612, Life Sciences) puis conservées à 4°C.

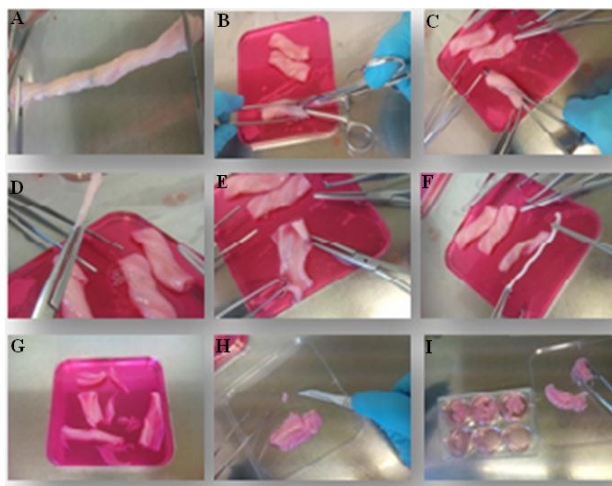
- Ethanol 70% (prolabo)
- Bleu de trypan (réf. T8154 Sigma, France)

## 2. Extraction des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton

En nous basant sur deux études publiées (Mitchell 2003; Wang 2004), deux protocoles d'extraction de CSM issues de la gelée de Wharton sont utilisés dans le cadre de ce travail. Le premier protocole est appelé « méthode des explants » et se base sur la capacité de migration des CSM. Le second repose sur une digestion enzymatique à la collagénase pour isoler les cellules.

### a) Méthode des explants

A l'aide d'une pince, le cordon est retiré de la boîte de culture, puis placé dans une boîte carrée remplie d'HBSS (Figure 10). Afin d'éliminer les résidus sanguins, l'extérieur du cordon est lavé avec de l'éthanol à 70% (**A**) puis divisé en plusieurs morceaux d'environ 5 cm de longueur (**B**). Chaque morceau est découpé sur la longueur afin de retirer la veine et les artères à l'aide de la pince (**C-D**). Les morceaux restants (membrane ombilicale et gelée de Wharton) sont récupérés avec la pince et déposés dans une autre boîte (**E à G**). La gelée est détachée de la membrane puis hachée en petits morceaux de 2 à 3 mm avant d'être répartis dans des plaques 6 puits (**H-I**). La gelée de Wharton est ensuite couverte de 2 mL de milieu de culture, et laissée à incuber à 37°C sous deux conditions différentes : normoxie (21% de di-oxygène (O<sub>2</sub>) et 5% de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>)) et hypoxie (5% d'O<sub>2</sub> et 5% de CO<sub>2</sub>).



**Figure 10 :** Isolement de la gelée de Wharton à partir du cordon ombilical humain.

*A. Le cordon ombilical est retiré du flacon T75 et lavé avec de l'éthanol à 70%. B. Découpage du cordon en segments d'environ 5 cm de long C. Insertion de la pince dans la veine ombilicale. D. Incision longitudinale de la paroi du cordon. E. Détachement de la veine ombilicale. F. Retrait des artères ombilicales. G et H. Division de la gelée de Wharton en des morceaux de 2 à 3 mm. I. Distribution des morceaux de gelée dans des plaques 6 puits.*

### b) Méthode enzymatique

Après avoir retiré la veine et les artères et coupé la gelée de Wharton en petits segments, ces derniers sont placés dans un tube Falcon de 50mL contenant un volume de 20mL du milieu avec 1mg/mL de collagénase de type I et sont incubés pendant 16 heures (37°C et 5% de CO<sub>2</sub>). Après digestion, du milieu de culture est ajouté et le mélange est ensuite centrifugé à 1258g pendant 15min. Une numération cellulaire et un test de viabilité au bleu de Trypan sont réalisés. Les cellules sont réparties dans des boîtes de culture T75 à raison de 1000 cellules vivantes/cm<sup>2</sup>.

### 3. Amplification en monocouche des CSM de la gelée de Wharton

Pour la méthode des explants, les plaques 6 puits contenant les morceaux de gelée de Wharton sont légèrement agités chaque jour afin de favoriser la migration des cellules du tissu foetal vers le support de culture. L'examen quotidien, au microscope inversé à contraste de phase, renseigne sur l'adhésion, le bon étalement, et la morphologie des CSM au fond des plaques 6 puits et montre la formation des petites colonies de cellules sous forme fibroblastique (CFU-F). Après 6 jours de culture, les morceaux de gelée sont retirés des puits. Pour éviter toute contamination et afin d'éliminer toutes traces de cellules sanguines non adhérentes, un double lavage à l'HBSS est nécessaire avant de renouveler le milieu de culture.

Pour la suite de la culture ainsi que pour les cellules obtenues par digestion enzymatique, le milieu sera changé deux fois par semaine. Les cellules sont laissées en culture jusqu'à l'obtention de 80% de confluence (subconfluence).

#### 4. Fractionnement et conservation des cellules

##### *a) Détachement des Cellules Souches Mésoenchymateuses*

Lorsque les cellules atteignent 80% de confluence, elles sont lavées deux fois avec 5 mL de tampon HBSS à 37°C dans le bain marie. Le décollement des cellules se fait soit en grattant les cellules avec un grattoir de cellule, soit en laissant agir 5 mL de trypsine-EDTA (0,025%) pendant 5 min à 37°C. Afin d'inhiber l'action de la trypsine, 5 mL du milieu de culture complet sont ajoutés dans chaque boîte de culture. La suspension cellulaire est donc récupérée dans un tube de 50 mL et est centrifugée (300g pendant 10 min). Les cellules sont remises en suspension et homogénéisées afin de réaliser la numération. Cette dernière s'évalue par le test d'exclusion au bleu de trypan. Les cellules sont comptées sur une cellule de Thoma. Les cellules mortes se colorent en bleu et ne sont pas estimées.

La densité d'ensemencement est de  $10^3$  cellules par  $\text{cm}^2$ . Les cellules sont déposées dans des boîtes T75 contenant déjà 15 mL de milieu complet et sont ensuite placées dans des incubateurs en conditions normoxie ou hypoxie. Dès lors le milieu est changé deux fois par semaine.

Les cellules sont multipliées en monocouche jusqu'au passage 7. A l'issue de chaque passage, une caractérisation des CSM est réalisée. Afin de procéder à l'étude du potentiel de différenciation, les cellules sont congelées dans des cryotubes.

##### *b) Congélation et décongélation des cellules*

Pour conserver des cellules inutilisées, à chaque passage, une partie du culot cellulaire est suspendu dans du SVF supplémenté avec 10% de DMSO à  $10^6$  cellules/mL. La suspension cellulaire est ensuite répartie dans des cryotubes et maintenue à -80°C pendant une nuit avant d'être conservée dans l'azote liquide pour des utilisations ultérieures.

Les cellules cryoconservées dans l'azote liquide sont décongelées dans un bain-marie à 37°C, puis diluées immédiatement dans le milieu de culture complet. Afin d'éliminer le DMSO, toxique pour les cellules, ces dernières sont lavées 2 fois dans le milieu de culture complet par centrifugation (200g, 10 minutes). Le culot cellulaire est repris dans du milieu complet et les cellules sont ensemencées avec ce même milieu supplémenté à 20% de SVF. Enfin, le renouvellement du milieu de culture est fait deux fois par semaine.

## II. Prolifération et activité métabolique

### A. Matériel et réactifs

#### 1. Matériel

- Plaques 48 puits (réf. 677 180, Greiner Bio-one)
- Tubes Eppendorf DNase RNase free (réf. 3213, Costar)
- Centrifugeuse à Eppendorf (Bioblock Scientific 1-15, Sigma)
- Spectrofluorimètre : Varioskan (Thermoscientific)

#### 2. Réactifs

- Milieu de culture : DMEM-F12 sans rouge de phénol supplémenté d'antibiotiques (réf. 21041, Gibco, France), de L-Glutamine à 2 mM, est appelé "milieu sans rouge de phénol"
- Solution d'Alamar Blue : Alamar Blue™ (réf. DAL1100, Invitrogène, France) utilisé à 10% (v/v dans du milieu sans rouge de phénol)
- Solution de Hoechst : Hoechst 33258 (réf. H3569, Invitrogène, France) à 0,1 µg/mL dans un tampon de Hoechst (10 mM de Tris, 1 mM d'EDTA et 0,1 mM de NaCl à un pH de 7,4)
- ADN de thymus de veau (réf. D3664, Sigma, France)

### B. Temps de doublement

A partir de l'estimation du temps de doublement, nous avons recherché le rendement des cellules souches mésenchymateuses par rapport au nombre initialementensemencé. A chaque passage et dès une confluence à 80-90% les cellules cultivées dans les deux conditions de cultures citées précédemment sont grattées et comptées pour comparer l'indice PD (*doublement de population ou population doubling*) qui reflète la capacité de prolifération. Plus les cellules prolifèrent, plus le PD est élevé. Cet indice est calculé selon la formule  $PD = (\log N_f/N_i) / \log 2$ , où  $N_f$  est le nombre final de cellules obtenu et  $N_i$  le nombre de cellules lors de l'ensemencement. D'autre part, le temps de doublement de population est obtenu selon la formule  $TDP = t_p \times \log 2 / (\log N_f/N_i)$ , où  $t$  est le temps de culture (heures). Le TDP est inversement proportionnel au doublement de population, donc plus les cellules prolifèrent rapidement, plus le TDP est faible.

## C. Activité métabolique

### 1. Principe

La mesure de l'activité métabolique est évaluée au moyen d'indicateur coloré, l'Alamar Blue™, et d'un dosage d'ADN.

L'Alamar Blue™ est un indicateur Rédox qui s'oxyde lorsque la chaîne respiratoire mitochondriale fonctionne, sans capter ses électrons. Au cours de la respiration, les cellules libèrent des co-enzymes d'oxydo-réduction, tel que NADH, NADPH, FADH<sub>2</sub> et FMNH<sub>2</sub>, qui réduisent l'Alamar Blue™ présent dans le milieu. Plus l'activité mitochondriale est forte, plus la réduction du composé d'Alamar Blue™ sera importante. Le pourcentage de réduction de l'Alamar Blue™ est donc basé sur le taux d'oxydo-réduction de l'Alamar Blue™ déterminé par les mesures des absorbances à 570 nm (A<sub>570</sub>, absorbance du composé réduit) et à 600 nm (A<sub>600</sub>, absorbance du composé oxydé).

Par ailleurs, ce composé est non toxique pour les cellules puisqu'il les laisse produire l'ATP dont elles ont besoin et ne nécessite pas non plus leur lyse pour réaliser le dosage. Cela permet notamment de suivre l'évolution du signal de manière cinétique.

### 2. Test d'Alamar Blue™

Afin d'éliminer l'interférence du rouge de phénol, le milieu de culture est retiré, et les cellules sont lavées avec du DMEM sans rouge de phénol pendant 2 minutes à 37°C. Puis 500µL d'une solution d'Alamar Blue™ à 10% dans DMEM sans rouge de phénol sont déposés dans chaque puits. Les cellules sont alors incubées pendant 4h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Parallèlement aux échantillons, des contrôles négatifs sont préparés. Il s'agit de déposer 500µL de solution d'Alamar Blue™ dans un puits ne contenant pas de cellule et de laisser incuber la solution dans les mêmes conditions que celles mentionnées précédemment. Les surnageants sont ensuite récupérés et la lecture de l'absorbance des composés réduits et oxydés est faite à  $\lambda = 570$  nm et  $\lambda = 600$  nm, respectivement. Enfin, les cellules sont lavées dans du DMEM sans rouge de phénol pour éliminer les traces d'Alamar Blue™ avant de réaliser sur ces mêmes échantillons un dosage d'ADN. Enfin, les rapports entre les composés réduits et oxydés sont calculés selon la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction} = \frac{(Ox_{600} \times Abs_{\text{ech}570}) - (Ox_{570} \times Abs_{\text{ech}600})}{(Rd_{570} \times Abs_{\text{c neg}600}) - (Rd_{600} \times Abs_{\text{c neg}570})}$$

Où

$Abs_{ech570}$  = absorbance à 570nm du surnageant de l'échantillon

$Abs_{ech600}$  = absorbance à 600nm du surnageant de l'échantillon

$Abs_{c\ neg570}$  = absorbance à 570nm du surnageant du contrôle négatif

$Abs_{c\ neg600}$  = absorbance à 600nm du surnageant du contrôle négatif

Les coefficients d'extinction molaire sont connus :

$Ox_{570} = 80586$        $Ox_{600} = 117216$        $Rd_{570} = 155677$        $Rd_{600} = 14652$

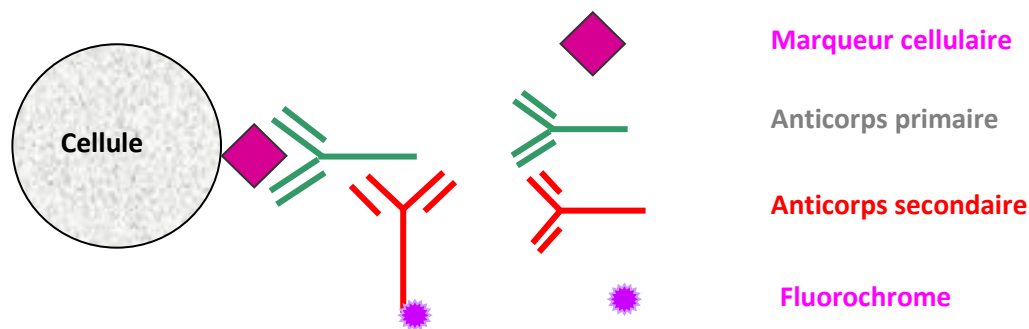
### III. Marquage par immunofluorescence

#### A. Principe

##### 1. Immuno-fluorescence indirecte :

Les récepteurs exprimés à la surface des cellules (marqueurs cellulaires) sont reconnus spécifiquement par un anticorps (Anticorps primaire). Afin de mettre en évidence la formation du complexe récepteur-anticorps primaire, un deuxième anticorps est utilisé (Anticorps secondaire). Ce dernier est couplé à un fluorochrome et est dirigé spécifiquement contre la partie Fc de l'anticorps primaire (Figure 11).

L'immuno-fluorescence indirecte est utilisée pour visualiser l'expression du collagène de type I présent dans la gelée de Wharton.

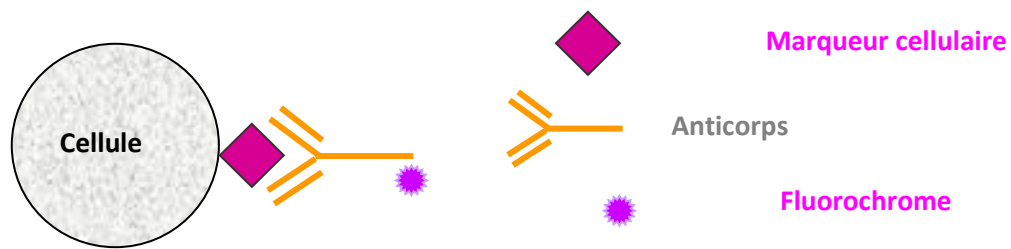


**Figure 11** : Principe de l'immuno-fluorescence indirecte.

##### 2. Immuno-fluorescence directe :

A la différence de l'immuno-fluorescence indirecte, l'anticorps spécifique du marqueur cellulaire est directement couplé à un fluorochrome (Figure 12).

L'immuno-fluorescence directe est utilisée pour identifier les protéines membranaires appelées clusters de différenciation (CD), dont la présence ou l'absence permettent de déterminer le phénotype des cellules.



**Figure 12** : Principe de l'immuno-fluorescence directe.

## B. Matériel et réactifs

---

### 1. Matériel

---

- Plaques 48 puits (réf. 677 180, Greiner Bio-one)
- Centrifugeuse "Labofuge 400" (Heraeus Instruments)
- Tube à hémolyse (réf. 212-1837, VWR)

### 2. Réactifs

---

- Milieu de culture DMEM F-12 sans rouge de phénol (réf. 11880, Gibco, France)
- Tampon Phosphate Buffer Saline (PBS) (réf. 14190, Invitrogène, France)
- Solution de blocage : Albumine de Sérum Bovine (BSA, réf. A-9667, Sigma Aldrich, France) utilisé à 0,4% (p/v dans Milieu DMEM sans rouge de phénol). La BSA est utilisée afin d'empêcher toute fixation aspécifique des anticorps.
- Solution de perméabilisation : Triton X100 à 0,1% dans PBS à 37°C (réf. Sigma, France)
- Solution de fixation : PAF (Paraformaldéhyde, réf. P6148, Sigma Aldrich, France) à 4% (p/v dans PBS)
- Anticorps impliqués dans un immunomarquage indirect (Tableau VII) ou dans un immunomarquage direct (Tableau IX)



**Tableau VII :** Anticorps impliqués dans un immunomarquage indirect.

*Les anticorps (Ac) anti-collagène serviront d'Ac primaire dans les marquages de ces protéines. Ils vont se fixer spécifiquement sur les protéines de collagène. L'Ac IgG-Alexa Fluor® 488 est l'Ac secondaire qui se fixera sur la partie Fc des Ac primaires et rendra visible en microscopie confocale à fluorescence les protéines de collagène.*

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Isotype	Fournisseur (référence)
Anti collagène type I	Humain	IgG (Lapin)	Merck (234167)
Anti collagène type II	Humain	IgG (Lapin)	Merck (234188)
Anti collagène type X	Humain	IgG (Lapin)	Merck (234196)
IgG-Alexa Fluor® 488	Lapin	IgG (Chèvre)	Molecular Probes (A-110008)

**Tableau VIII :** Anticorps utilisés dans un immunomarquage direct.

Anticorps	Fluorochrome	Isotype	Fournisseur (référence)
IgG1 FITC control	FITC	IgG1 (Souris)	Dako (X0927)
IgG1 PE control	PE	IgG1(Souris)	BD (555749)
IgG2a control	PE	IgG2a (Souris)	BD (555574)
CD29	FITC	IgG1(Souris)	CYTO-STAT (6604105)
CD34	PE	IgG1(Souris)	BD (345802)
CD44	FITC	IgG1(Souris)	BC (IM1219U)
CD45	FITC	IgG1(Souris)	BD (345808)
CD73	PE	IgG1(Souris)	BD (550257)
CD90	PE	IgG1(Souris)	BD (555596)
CD105	PE	IgG1(Souris)	BC (A07414)
CD146	PE	IgG1(Souris)	BioCytex (5050-PE100T)
CD164	PE	IgG2a (Souris)	BD (551298)
CD166	PE	IgG1(Souris)	BD (559263)
HLA-DR	FITC	IgG1(Souris)	BC (IM0463U)

### C. Marquage du collagène de types I, II ou X dans la gelée de Wharton

Un "contrôle négatif" et un contrôle ne contenant que l'Ac secondaire sont faits. Le premier va subir tous les lavages sans aucun marquage, et le second contrôle va subir les lavages et sera mis en présence seulement de l'Ac secondaire pour vérifier qu'il ne se fixe pas aspécifiquement sur les échantillons.

Les morceaux de la gelée de Wharton, répartis dans une plaque de 24 puits, sont incubés dans 500  $\mu$ L de solution de blocage pendant 15 min. Pour réaliser l'immunomarquage, les échantillons sont incubés 45 min, à température ambiante avec 200  $\mu$ L de solution de blocage contenant soit l'anticorps anti-collagène de type I, II ou X, dilués au 50<sup>ème</sup> dans du DMEM sans rouge de phénol. Puis, les échantillons sont lavés dans 500  $\mu$ L de solution de blocage pendant 10 min avant d'être incubés avec 200  $\mu$ L de solution d'immunomarquage contenant l'anticorps secondaire (dilution au 50<sup>ème</sup> dans du DMEM sans rouge de phénol) pendant 45 min, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après 10 min de lavage avec du DMEM sans rouge de phénol, les échantillons sont fixés dans 500  $\mu$ L de solution de fixation pendant 10 min avant d'être à nouveau lavés dans du DMEM sans rouge de phénol puis conservés à +4°C ou observés en microscopie confocale.

### D. Marquage des clusters de différenciation exprimés par des CSM dans la Gelée de Wharton

Des coupes fines du cordon sont remises dans des plaques de 12 puits. Elles sont lavées deux fois avec 2 mL du RPMI 1640 sans rouge de phénol et l'anticorps (AC) dilué dans 300  $\mu$ L du RPMI-BSA 1% y est ajouté dans les conditions de dilution indiquées par les fournisseurs, pendant 50min sous légère agitation à la température ambiante et à l'abri de la lumière. Les tissus sont de nouveau lavés sous légère agitation avec du RPMI sans rouge de phénol pendant 30 min, puis fixés avec 2 mL de PAF 4% pendant 1h à la température ambiante. Le PAF est retiré et les tissus sont perméabilisés avec 500  $\mu$ L de Triton X100 0,5% pendant 15min qui permet de digérer les phospholipides composant la membrane cytoplasmique, créant ainsi des pores qui permettront l'entrée de l'Anticorps. Le marquage des filaments d'actine est donc réalisé en incubant pendant 30 min à la température ambiante et à l'abri de la lumière avec 500  $\mu$ L de phalloïdine Alexa® 488 ( $\lambda_{ex}$  = 488 nm,  $\lambda_{em}$  = 519 nm, Invitrogen, USA) diluée au 1 :100 dans du Triton X100 0,1%. La phalloïdine étant une grosse molécule, la dilution dans le Triton lui facilite le passage à travers la membrane cytoplasmique. Le milieu est retiré et deux lavages sont effectués avec du RPMI. Enfin les cellules sont prêtes à être observées directement ou peuvent être conservées quelques jours à

4°C et à l'abri de la lumière dans RPMI sans rouge phénol jusqu'à l'observation en microscopie confocale.

Un contrôle négatif (tissu sans AC) a été effectué aux mêmes temps que les échantillons, afin de prendre en considération une éventuelle auto-fluorescence des cellules.

#### E. Marquage des clusters de différenciation exprimés par des CSM en culture en monocouche

De P0 à P6, quelles que soient les conditions de culture, lorsque les cellules arrivent à 80% de confluence, elles sont grattées puis diluées dans du DMEM sans rouge de phénol avant d'être centrifugées. Le culot cellulaire est suspendu dans du DMEM sans rouge de phénol afin de pouvoir déposer 100 000 cellules par tube à hémolyse ; tubes servant pour la cytométrie en flux. Les sites de fixation aspécifiques des cellules sont bloqués en ajoutant 500 µL de solution de blocage au culot cellulaire pendant 5 min. Après une nouvelle centrifugation, le "contrôle négatif" (sans Ac), les "contrôles isotypiques" et les échantillons sont préparés en suspendant le culot cellulaire avec les solutions de blocage contenant 10µL d'anticorps couplés au fluorochromes. Après 30 min d'incubation à l'abri de la lumière, le marquage est arrêté par addition de 500 µL de DMEM sans rouge de phénol. Après une centrifugation (5 min à 200g), le culot cellulaire est suspendu dans 300 µL de DMEM sans rouge de phénol. Les échantillons sont ensuite analysés par cytométrie en flux en mesurant l'émission de fluorescence des cellules marquées avec des Ac couplés au FITC (Fluorescéine IsoThiocyanate,  $\lambda_{\text{émission}} = 518 \text{ nm}$ ) ou à la PE (phycoérythrine,  $\lambda_{\text{émission}} = 578 \text{ nm}$ ).

#### F. Marquage du cytosquelette

Le marquage des microfilaments de F-actine est réalisé en présence de phalloïdine-Alexa 488 après avoir fixé et perméabilisé les échantillons. Pour cela, chaque échantillon de gelée de Wharton est placé dans un puits d'une plaque 48 puits, puis lavé avec 500 µL de PBS pendant 10 min. Les échantillons sont fixés dans 200 µL de solution de fixation, pendant 5 min. Après un nouveau lavage avec du PBS, les cellules sont perméabilisées avec 200 µL de solution de Triton à 0,1%, pendant 15 min. Puis, 200 µL de la solution Phalloïdine-Alexa 488 sont ajoutés et incubés pendant 30 min. Le marquage est ensuite arrêté en ajoutant 500 µL de DMEM sans rouge de phénol. Les échantillons sont lavés deux fois dans du DMEM sans rouge de phénol pendant 5 min et conservés avec ce même milieu à +4°C et à l'abri de la lumière, jusqu'à l'observation de la fluorescence à l'aide du microscope confocal.

Un contrôle négatif (gelée de Wharton non marquée) est préparé en même temps que les échantillons, afin de prendre en considération l'auto-fluorescence des cellules lors du réglage du microscope confocal.

#### **IV. Observation de la fluorescence au microscope confocal à balayage laser**

Les observations des filaments d'actines, et des protéines collagéniques sont réalisées en utilisant un microscope confocal (réf. TCS SP2-AOBS, Leica microsystems, Allemagne) avec un objectif X40 (ON = 0,8, à immersion à eau) ou X10 (ON = 0,3). Deux fluorescences sont observées : le vert, avec l'Alexa 488 et Syto 16 qui sont excités à une longueur d'onde de 488 nm et l'énergie fluorescente est récoltée à une longueur d'onde de 519, et le rouge avec PKH 26 où  $\lambda_{\text{excitation}} = 551 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{émission}} = 567 \text{ nm}$ . Les réglages ont été optimisés avec les différents contrôles : négatifs et de l'Ac secondaire. Des images de haute résolution (512 x 512 pixels) ont ainsi été obtenues.

##### **A. Principe de la microscopie monophotonique**

La microscopie de fluorescence classique constitue une avancée technologique majeure dans l'imagerie cellulaire et tissulaire. Or, les images acquises présentent une perte de résolution qui se manifeste par la présence de la lumière parasite provenant de l'émission de fluorescence par les fluorochromes situés hors du plan confocal. La microscopie confocale à balayage LASER (ou CLSM, Confocal LASER Scanning Microscopy) résout ce problème en utilisant un diaphragme de diamètre très fin appelé pinhole, permettant de collecter uniquement la fluorescence émise dans le plan focal en éliminant la lumière parasite. Ainsi, seule la lumière d'émission de fluorescence provenant du plan focal est collectée au niveau du photomultiplicateur (PMT) pour constituer l'image. L'ouverture du diaphragme conditionne en grande partie la qualité de l'image en éliminant la lumière parasite. L'excitation du fluorochrome par un faisceau laser résulte de l'émission de fluorescence. Il existe plusieurs sources d'excitation, mais les plus utilisées sont : les lasers argon/krypton (488 nm) et hélium/néon (568-633 nm). Après excitation, la fluorescence est réémise et récupérée par un diaphragme présent à l'entrée du photodétecteur qui récolte uniquement les photons provenant du point excité. Les photons captés sont ensuite amplifiés puis transformés en signaux électriques dont l'intensité est proportionnelle au nombre de photons captés. L'acquisition d'images en 3D ce fait par balayage de laser qui permet la visualisation des échantillons biologiques en trois dimensions, en fournissant des images de haute résolution. La construction de l'image totale de l'objet nécessite le balayage du faisceau laser point par point

à l'aide d'un système constitué de deux miroirs appelés miroirs galvanométriques qui vibrent en x et en y. le déplacement en hauteur selon l'axe z est réalisé grâce à une sur-platine (quartz piézo-électrique) faisant varier le plan de mise au point, ce qui permet d'obtenir une série de coupes optiques appelées série z.

Pour notre étude les images ont été acquises sur deux endroits différents : dans la gelée de Wharton et dans la veine.

## B. Principe de la microscopie multiphotonique

---

Selon une étude publiée par notre laboratoire, la modification de la matrice extra cellulaire par compression mécanique ou réaction biochimique (environnement hypoxie ou action de collagénase) a pu être caractérisée. Ainsi, les principaux composants de l'ECM cartilagineux peuvent être observés sans marquage fluorescent. En particulier, le réseau de collagène émet un fort signal de la génération du second harmonique (SHG) qui pourrait être recueillie à la moitié de la longueur d'onde d'excitation. La combinaison de la détection du signal d'autofluorescence et SHG permet d'obtenir des informations structurales complémentaires. Cette même étude a montré que la microscopie multiphotonique représente un outil approprié pour l'imagerie du cartilage en *ex vitro*, en montrant que le signal SHG vient précisément de collagène (digestion à la collagénase), et que l'utilisation d'un filtre passe-bande approprié permet de rejeter l'autofluorescence de l'ECM. La spécificité de cette méthode optimisée permet d'effectuer une analyse de texture des images par SHG et d'observer la restructuration du réseau de collagène en fonction des contraintes (Werkmeister 2009).

## V. Analyse par cytométrie en flux

---

### A. Principe

---

La cytométrie en flux est une méthode d'analyse semi-quantitative de signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser. En effet, elle permet de distinguer des populations cellulaires en fonction de leur taille et de leur granulosité (dépendant de la composition du cytoplasme, des organites, ...) et d'y sélectionner une population de cellules d'intérêt. Pour obtenir ces paramètres, les cellules passent une à une devant un laser. Les signaux de la diffusion, récoltés sous un angle de 90° (Side Scatter, SSC), correspondent à la structure intracellulaire de la cellule (réfringence du cytoplasme, morphologie, rapport nucléo-cytoplasmique). Les signaux de diffraction sont récoltés, c'est à

dire dans un petit angle de diffusion (Forward Scatter, FSC), donnent des informations sur la taille des cellules. Enfin, après un immunomarquage fluorescent, le laser peut exciter le fluorochrome qui va émettre de l'énergie à une longueur d'onde supérieure à l'énergie du laser et la fluorescence va être captée par l'appareil. Ainsi, les données de ces trois paramètres vont être collectées par des photomultiplicateurs (PMT), puis amplifiées, numérisées, traitées et finalement stockées par un ordinateur. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres et permet de savoir pour une population donnée le pourcentage de cellules positives à un immunomarquage.

## B. Matériel et réactifs

### 1. Matériel

- Cytomètre en flux (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS Canto 1, réf. BD Pharmingen).
- Logiciel : Diva FACS quanto

## C. Analyse des échantillons par cytométrie en flux

Les cellules sont analysées sur le cytomètre BD FACS Canto. Un minimum de 10 000 événements est 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 (contrôle isotypique permettant de s'affranchir de la 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 Diva FACS quanto (Becton Dickinson). Les résultats obtenus par cytométrie en flux, sont exprimés en pourcentage de cellules positives pour un marqueur.

## VI. Différenciation des CSM en trois lignées cellulaires

### A. Différenciation ostéocytaire

Pour l'ostéogénèse, lorsque les cellules arrivent à 80% de confluence, elles sont trypsinées dans une solution de trypsine-EDTA à 0,025% selon le protocole décrit au paragraphe (I.C.4.a.), lavées dans le milieu de culture I et ensemencées à 1000 cellules par  $\text{cm}^2$  dans des plaques six puits. A sub-confluence, le milieu de culture est alors retiré et les cellules sont lavées dans du tampon HBSS avant de déposer dans chaque puits un milieu d'induction spécifique de la différenciation ostéocytaire (milieu III). Les cellules sont remises en culture pendant 21 jours et le renouvellement du milieu de culture III est effectué deux fois par semaine. La révélation de la différenciation ostéogénique a été réalisée par la coloration en Rouge Alizarine. Elle est utilisée pour identifier les dépôts calciques durant le processus de différenciation ostéogénique. Le calcium forme un complexe avec le rouge alizarine par chélation. Après élimination du milieu de culture, les cellules sont rincées avec du PBS puis fixées au PAF 4% pendant 1 heure à la température ambiante. Après trois rinçages avec de l'eau distillée, les cellules sont incubées avec la solution de Rouge Alizarine pendant 10 minutes. La réaction est arrêtée par des rinçages successifs avec de l'eau distillée puis les cellules sont laissées dans du PBS pendant 15 minutes sous légère agitation. Enfin, les cellules sont laissées sécher avant d'être observées au microscope.

Le Rouge Alizarine est utilisé pour identifier les dépôts calciques. Le fond cytoplasmique est orangé pâle, les sels de calcium (phosphates et carbonates) sont orange vif à rouge, le tissu conjonctif et les noyaux ne sont pas colorés.

### B. Différenciation adipocytaire

Pour induire la différenciation adipogénique, les cellules sont trypsinées puis ensemencées dans des plaques 6 puits à une densité de 1000 cellules /  $\text{cm}^2$  dans un milieu de croissance normale (milieu I). Ce dernier est changé 2 fois par semaine jusqu'à 80% de confluence, puis le milieu de croissance a été remplacé par un milieu de différenciation adipogénique consistant du milieu I avec 1  $\mu\text{M}$  dexaméthasone, 60  $\mu\text{M}$  indométhacin, 0,5 mM 3-isobutyl-1-méthyl-xanthine, et 5  $\mu\text{g/ml}$  insuline. Les cellules sont cultivées pendant trois semaines.

Pour visualiser les vacuoles lipidiques, une coloration avec du l'huile rouge O est utilisée permettant la mise en évidence de la différenciation adipocytaire.

Les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS et fixées avec du méthanol à 4°C pendant 2min, puis rincées une fois avec de l'éthanol 50°. Les cellules sont ensuite incubées

dans une solution d'huile rouges O (2mL / puit) à 37°C dans une étuve pendant 10min. Enfin, elles étaient rincées deux fois avec de l'eau distillée, laissées sécher et les cellules étaient observées à l'aide d'un microscope optique.

L'huile rouge O permet d'identifier les lipides hydrophobes en phase liquide (gouttelettes lipidiques contenues dans les cellules) par un mécanisme physique de transfert d'un corps coloré (lysochrome) du solvant dans lequel il se trouve (alcool, diacétine, ...) au corps gras en phase liquide.

### C. Différenciation chondrocytaire

A 80% de confluence, les cellules sont détachées en utilisant 0,025% de la trypsine, selon le protocole décrit dans le paragraphe (I.C.4.a.), et lavées deux fois avec le tampon HBSS préchauffé à 37°C. Un test de viabilité cellulaire est effectué à l'aide du bleu de trypan. Le culot cellulaire, obtenu lors du lavage des cellules, est resuspendu dans le milieu I afin d'obtenir environ  $3 \times 10^5$  cellules viables/ml. Un mL de cette suspension est déposée au fond d'un tube Falcon de 15mL puis centrifugées à 200g pendant 5 minutes, à température ambiante pour former un culot cellulaire appelé micromasse. Chaque micromasse est maintenue en culture pendant 24 heures dans le milieu I. Le milieu I est ensuite retiré et les micromasses sont maintenues en culture dans du milieu de différenciation chondrocytaire (milieu II) pendant 28 jours. Le milieu II est renouvelé tous les 3 jours. Pour visualiser l'engagement des CSM dans la chondrogénèse, la morphologie des cellules, les protéoglycannes et les collagènes totaux sont observés grâce, respectivement, aux colorations d'HES (Hématoxyline-Eosine-Safran), Rouge Sirius et Bleu Alcian.

Les micromasses sont fixées à l'aide d'une solution de fixation à température ambiante pendant 4 heures. Elles sont ensuite placées toute une nuit à 4°C dans une solution de lavage. Les constructions subissent ensuite une série de déshydratation progressive dans des bains croissants d'alcool (alcool 70° pendant 1h minimum, alcool 95° 2 fois 1 heure, alcool absolu 3 fois 1 heure). L'alcool est ensuite éliminé par 3 bains de 15 minutes dans du toluène.

Pour l'inclusion en paraffine, les prélèvements sont placés dans des cassettes en plastique de façon à les laisser s'imbibber dans un bain de paraffine liquide (58°C) pendant 2 à 3 heures. Les prélèvements sont ensuite inclus, définitivement, dans la paraffine et les blocs sont solidifiés par la diminution de la température.

Des coupes de 5 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome. Les lames sont ensuite colorées avec un appareil à coloration automatisé.



**Tableau IX :** Composition des milieux de culture utilisés pour induire la différenciation des CSM en chondrocytes (milieu II), ostéocytes (milieu III) et adipocytes (milieu IV).

	Milieu I (CSM)	Milieu II (Chondrocytes)	Milieu III (Ostéocytes)	Milieu IV (Adipocytes)
<b><math>\alpha</math>-MEM</b>	♦		♦	♦
<b>DMEM-HG</b>		♦		
<b>SVF à 10%</b>	♦		♦	♦
<b>Glutamine à 2mM</b>	♦	♦	♦	♦
<b>Antibiotiques</b>	♦	♦	♦	♦
<b><math>\beta</math>-glycerol phosphate 10 mM</b>			♦	
<b>Pyruvate de Sodium à 100 <math>\mu</math>g/mL</b>		♦		
<b>L-Proline à 40 <math>\mu</math>g/mL</b>		♦		
<b>L-acide ascorbique à 50 <math>\mu</math>g/mL</b>		♦	♦	
<b>Dexaméthasone à 100 nM</b>		♦	♦	♦
<b>ITS 1%</b>		♦		
<b>TGF-<math>\beta</math>1 10 ng/mL</b>		♦		
<b>Indométhacine à 60<math>\mu</math>M</b>				♦
<b>3-isobutyl-1-methyl- xanthine à 0,5 mM</b>				♦
<b>Insuline à 5<math>\mu</math>g/mL</b>				♦

## VII. Analyse de la synthèse matricielle par histologie et différenciation des CSM dans différents tissus mésodermiques

La capacité des CSM à engendrer différents types cellulaires issus du mésoderme (notamment chondrocytes, ostéocytes et adipocytes) est étudiée au cours de l'amplification en monocouche (P1 à P7), dans des conditions normoxies ou hypoxies.

### A. Principe

Les colorants utilisés sont l'HES, le Rouge Sirius et le Bleu Alcian :

- L'HES (Hématoxyline-Erythrosine-Safran) : L'hématoxyline (0,5 %, 5 min), l'éosine (1 %, 5 min), et le safran (1 %, 5 min).
- La coloration au Rouge Sirius est réalisée avec une solution saturée en acide picrique à 0,1 %. Les lames sont alors rincées dans un bain d'acide chlorhydrique 0,01N pendant 2 min puis

dans une solution d'alcool à 95 °C et enfin dans de l'alcool absolu pendant 2 min. Elles sont ensuite déshydratées et montées avec la résine synthétique PERTEX.

- La coloration au Bleu alcian est réalisée avec une solution de bleu Alcian à 0,1% pendant 2 heures, puis des rinçages à l'eau courante. Un bain de 10 min dans la solution de Kernechtrot est ensuite réalisé. Les échantillons sont ensuite déshydratés dans des bains d'alcool croissants (1 min alcool 95 °C, et 5 min alcool absolu).

Après les colorations, les échantillons peuvent être observés sous le microscope. Les lames colorées au Rouge Sirius, sont dans un premier temps, observées en lumière classique puis en lumière polarisée en disposant les lames à 45° sous un microscope équipé de deux filtres spécifiques. La lumière polarisée permet de visualiser l'architecture du réseau collagénique.

L'HES est un colorant, permettant de visualiser la morphologie des cellules puisque l'hématoxyline colore les noyaux en violet foncé (structures basophiles), l'éosine se fixe sur les éléments acidophiles et leur confère une coloration rose (cytoplasme), tandis que le safran se lie aux collagènes (coloration jaune).

Le Rouge Sirius est un colorant anionique du collagène. La réaction se produit entre les groupements sulfoniques du colorant et les groupements basiques présents sur les molécules de collagène.

Le Bleu Alcian permet de mettre en évidence les mucopolysaccharides. A un pH acide (de 1,3 utilisé dans cette étude), il colore uniquement les polysaccharides sulfatés en bleu comme les GAG (sauf l'acide hyaluronique qui n'est pas sulfaté). Il met ainsi en évidence indirectement les protéoglycannes. Pour visualiser plus précisément les cellules, le noyau est coloré en rouge avec une solution de Kernechtrot.

## B. Matériel et réactifs

---

### 1. Matériel

---

- Plaques six puits (réf. 657160, Greiner, Bio-one)
- Tube propylène de 15 mL (réf. 352097, Dutscher, France)
- Appareil à coloration automatisé (Tissue TekDRS, réf. Sakaura, Japon)
- Résine de montage PERTEX (réf. 02407831, Baler, France)
- Cassette (réf. M490-6, Simport)
- Mousse en forme de rectangle (réf. M476-1, biopsy foam pads, Simport, Canada)
- Appareil pour la déshydratation : ASP 300S (réf. Leica, Allemagne)
- Appareil pour l'inclusion : Tissue - Tek® DRS 2000E-D2 (réf. Sakura)
- Microtome RM 2135 (réf. Leica, Allemagne)

- Lame pour le microtome (réf. Acu Edge 4690, Sakura)
- Lames de verre (réf. LCSF02, Menzel-Gläser SUPERFROST®, Thermo Scientific)
- Microscope optique : DMD 108 (réf. Leica, Allemagne)

## 2. Réactifs

- Tampon HBSS (réf. H2387, Sigma, France) reconstitué dans de l'eau distillée (pH 7,2).
- ITS (Insulin, Transferring, Selenous acid) à 25 mg (réf. I1884, Sigma, France) utilisé à 1% (p/v dans DMEM-HG).
- Solution de trypsine-EDTA (réf. 25300-054, Sigma, France) initialement à une concentration de 0,05% et diluée de moitié dans de l'HBSS pour l'amener à la concentration de 0,025%.
- Glutamine à 2 mM (réf. 25030, GibcoBRL, France)
- Dexamethasone à 100 mg (réf. D4902, Sigma, France) utilisé à  $10^{-7}$ M (dans DMEM-HG).
- TGF- $\beta$ 1 à 2  $\mu$ g/tube (réf. T7093, Sigma, France) utilisé à 10 ng/ml (dans DMEM-HG).
- Acide L-ascorbique à 25g (réf. A4544, Sigma, France) utilisé à 50  $\mu$ M (dans DMEM-HG).
- L-proline à 25 g (réf. P5607, Sigma, France) utilisé à 40  $\mu$ g/ml (dans DMEM-HG).
- Pyruvate de sodium à 25g (réf. P5280, Sigma, France) utilisé à 1 mM (dans DMEM-HG).
- Indomethacine à 60  $\mu$ M (réf. 57413, Sigma, France).
- 3-isobutyl-1-methyl-xanthine à 0,5 mM, (réf. I5879, Sigma, France)
- Insuline à 5 $\mu$ g/ml (réf. I6634, Sigma, France)
- Solution de fixation : Paraformaléhyde (PAF, réf. P6148, Sigma, France) à 4% (p/v), 10 mM de CaCl<sub>2</sub> dans un tampon cacodylate (réf. C0250, Sigma, France) à 0,1 M.
- Solution de lavage : 50 mM de BaCl<sub>2</sub> (réf. B0750, Sigma, France) dans un tampon cacodylate à 0,1 M.
- Alcool absolu (Prolabo) est dilué à 70° et 95° dans de l'eau distillée ;
- Solution d'acide picrique à 0,1% : acide picrique (réf. 20.642, Prolabo, France)
- Solution de Bleu alcian à 0,1% : Bleu Alcian 8GX Gurr (réf. M/N24, Searle Diagnostic, France)
- Solution d'Hématoxyline : Haematoxyline (réf. 34034, Gurr microscopy material)
- Solution d'éosine : Erythrosine 239 (réf. 312820-0100, réactifs ral) dilué à 1% dans de

l'eau distillée.

- Solution de Safran : pistil de safran (réf. 11507736, Labonord) dilué à 1% dans de l'alcool absolu.
- Solution de Kernechtrot à 0,1% : 0,5 g Kernechtrot (réf. 5189, Merck, USA) et 25 g de sulfate d'aluminium (réf. 21070.297, Prolabo, France) sont dissouts dans 500 mL d'eau distillée.
- Rouge Alizarine S (réf. A5533, Sigma, France)
- Tissue Clear (réf. 1466 Tissue-Clear® 5 L Xylene Substitute, Sakura)
- Huile Rouge O (réf. 00625, Sigma, France)
- PBS (réf. 14190, Invitrogène, France)

Les colorations à l'HES (Hématoxyline-Erythrosine –Safran), au Rouge Sirius, au Bleu Alcian, au Rouge Alizarine et à l'Huile Rouge O sont utilisées respectivement pour visualiser la morphologie des cellules, le collagène, les GAGs, les dépôts calciques et les vésicules lipidiques.

### **VIII. Analyse Statistique**

---

Toutes les données sont présentées selon leur moyennes  $\pm$  l'écart-type moyen (ETM). Pour chaque étude, un minimum de 3 intra-essais est réalisé. Les différences statistiques entre les groupes d'expériences sont analysées par une analyse de variance par un test ANOVA à une ou deux directions à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, USA). Un test T de Tukey ou de Bonferri est effectué et les valeurs p inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives statistiquement.

## Chapitre 3. Résultats

---

## I. Isolement des cellules souches mésenchymateuse du sang placentaire

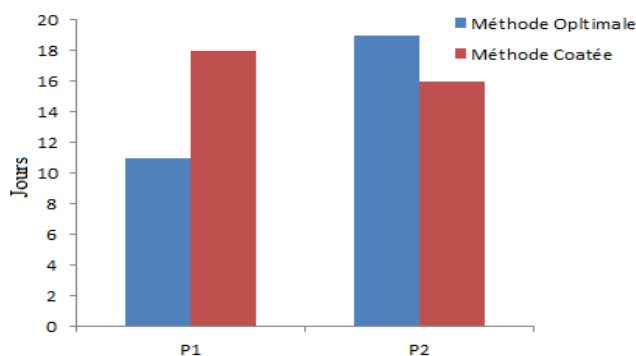
L'objectif de ce travail a été de choisir la meilleure méthode pour cultiver les CSM issues du sang placentaire. Pour cela, deux méthodes ont été testées : la méthode dite « coatée » et la méthode « optimisée ».

Le tableau X résume les caractéristiques des prélèvements traités. Les 15 sangs placentaires ont été traités dans les 6 heures qui ont suivi leur prélèvement. La quantité moyenne de sang récolté, par les sages-femmes de la Maternité Régionale, était de  $62,4 \pm 8$  mL pour les sangs destinés à la méthode optimisée (N=5) et de  $68,9 \pm 14$  mL pour ceux destinés à la méthode coatée (N=10). Après purification des cellules mononuclées,  $1,3 \cdot 10^8 \pm 0,4 \cdot 10^8$  et  $1,7 \cdot 10^8 \pm 0,6 \cdot 10^8$  cellules/mL ont été prélevées et mises en culture, respectivement pour la méthode « optimisée » et la méthode « coatée ». Après 24 heures, les cellules non adhérentes ont été retirées complètement par changement du milieu pour la méthode « coatée ». Pour la méthode « optimisée » seul 50% du milieu a été changé.

**Tableau X:** Caractéristiques des prélèvements de sang placentaire obtenus.

	Méthode « Optimisée »	Méthode « Coatée »
<b>Nombre d'échantillons traités</b>	5	10
<b>Durée séparant la collecte de l'isolement des cellules</b>	< 6h	< 6h
<b>Volume de sang recueilli (mL)</b>	$62,4 \pm 8,0$	$68,9 \pm 14,0$
<b>Cellules mononuclées x <math>10^8</math>/ mL</b>	$1,3 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,6$

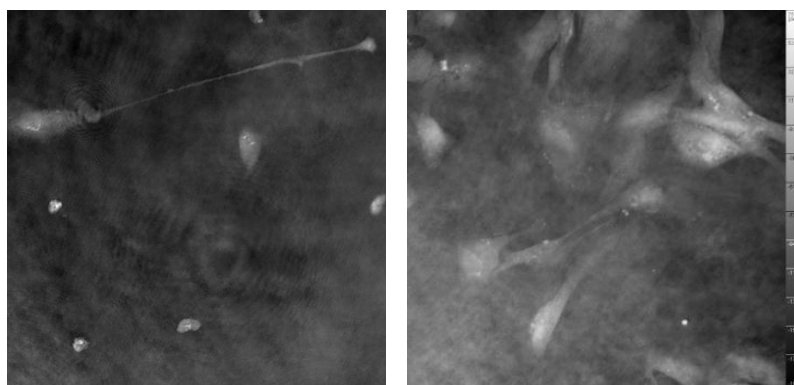
D'après la figure 13, il apparaît qu'au cours du premier passage (P1), si les cellules cultivées par la méthode « optimisée » atteignent la confluence après 11 jours de culture, il en fallait en moyenne 19 pour les cellules cultivées par la méthode « coatée ». A partir de P2, plus aucune différence significative n'est observée entre les deux méthodes. Les cellules atteignaient la confluence à partir d'environ 17 jours de culture (Figure 13).



**Figure 13:** Comparaison de la durée de culture au cours de l'expansion en monocouche des CSM issues de sang placentaire et maintenues en culture par la méthode « optimisée » et la méthode « coatée ».

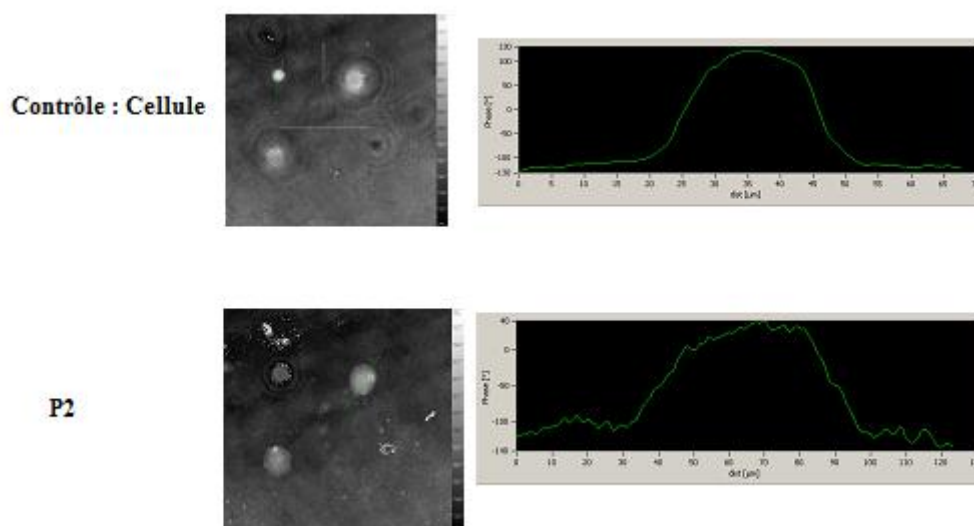
*La méthode « optimisée » nécessite moins de temps pour le premier passage par rapport à la méthode « coatée », par contre au cours du deuxième passage, la durée de temps du passage pour la méthode « coatée » est inférieur à celle de la méthode « optimisée » (N=1).*

Avec la méthode « coatée », lors de la culture en P1, deux morphologies cellulaires ont pu être observées au microscope à contraste de phase : des cellules sphériques et des cellules fusiformes. Après un passage, toutes les cellules présentent une forme fusiforme (Figure 14). En revanche, l'observation des cellules cultivées par la méthode « optimisée » a montre que, quel que soit le passage (P1 ou P2), toutes les cellules adoptaient une forme sphérique (Figure 15). En comparant le profil des cellules cultivées par la méthode « optimisée » par rapport à des cellules en suspension dans le même milieu de culture que les cellules étudiées, il est apparu que les cellules adhérentes possédaient un étalement plus important et une hauteur moindre que les cellules en suspension.



**Figure 14 :** Morphologie des CSM obtenues par la méthode coatée au cours du P1 (A) et du P2 (B).

*Lors de la culture en P1, deux morphologies sont observées au microscope à contraste de phase : des cellules sphériques et des cellules fusiformes. Lors du P2, toutes les cellules présentent une forme fusiforme.*



**Figure 15 :** Morphologie des CSM obtenues par la méthode « optimisée » au cours du P2. *L'observation des cellules, en microscopie à contraste de phase, a montré que, quel que soit le passage (P1 ou P2), toutes les cellules adoptaient une forme sphérique. En comparant le profil des cellules par rapport à des cellules en suspension dans le même milieu de culture, il est apparu que les cellules adhérentes possédaient un étalement plus important et une hauteur moindre que les cellules en suspension.*

Enfin, quelle que soit la méthode de culture utilisée, le taux de succès de la culture n'a jamais dépassé 20% pour la méthode « optimisée » et 10% pour la méthode « coatée ».

## II. Caractérisation des cellules souches de la gelée de Wharton

La seconde partie de notre travail s'est portée sur la caractérisation des CSM de la gelée de Wharton lorsque ces dernières sont maintenues dans leur environnement physiologique mais aussi sur une estimation du nombre de cellules potentiellement disponibles au sein de cette matrice ombilicale.

Pour cela, une analyse de l'environnement matriciel mais aussi du phénotype des CSM a été réalisée par microscopie confocale monophotonique (immunofluorescence) et multiphotonique (Génération de seconde harmonique). L'estimation du nombre de cellules a été réalisée après digestion enzymatique de la gelée de Wharton provenant d'un centimètre de cordon ombilical.

### A. Identification des CSM et de leur environnement dans la Gelée de Wharton

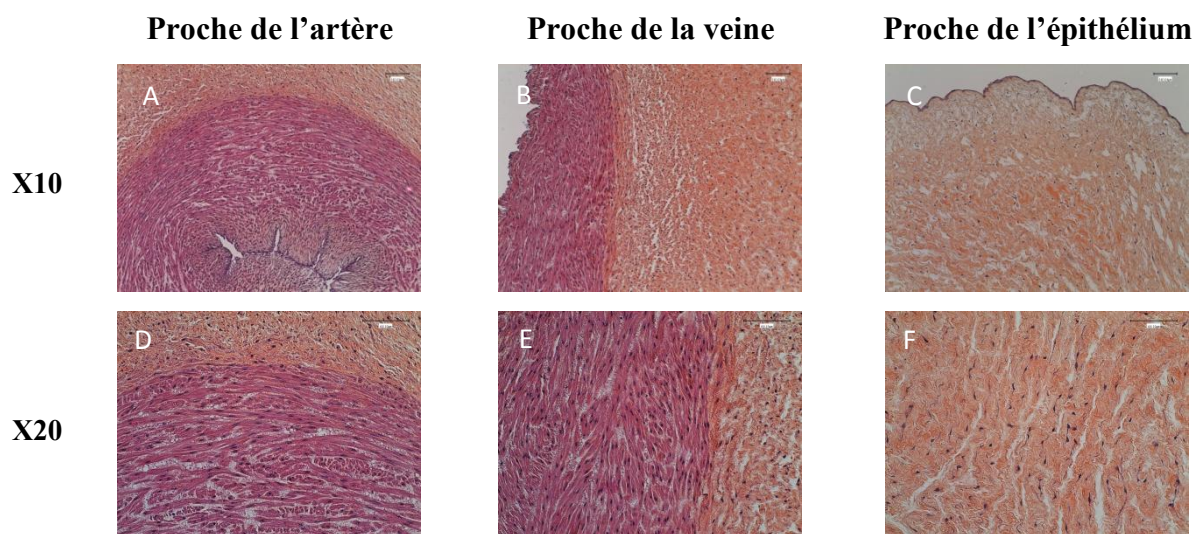
Les CSM ont été identifiées, dans une section de cordon ombilical, d'une part grâce au marquage de l'actine à la phalloïdine couplée au fluorochrome Alexa-488 et d'autre part par histologie avec une coloration à l'HES. L'environnement matriciel a, quant à lui, été observé de manière globale par histologie afin de visualiser les glycosaminoglycannes (coloration au



Bleu Alcian) et les collagènes totaux (coloration au Rouge Sirius). Enfin, une observation en microscopie confocale (imagerie par Génération de Seconde Harmonique et immunomarquage) a permis d'affiner le type de collagène synthétisé au sein de la gelée de Wharton.

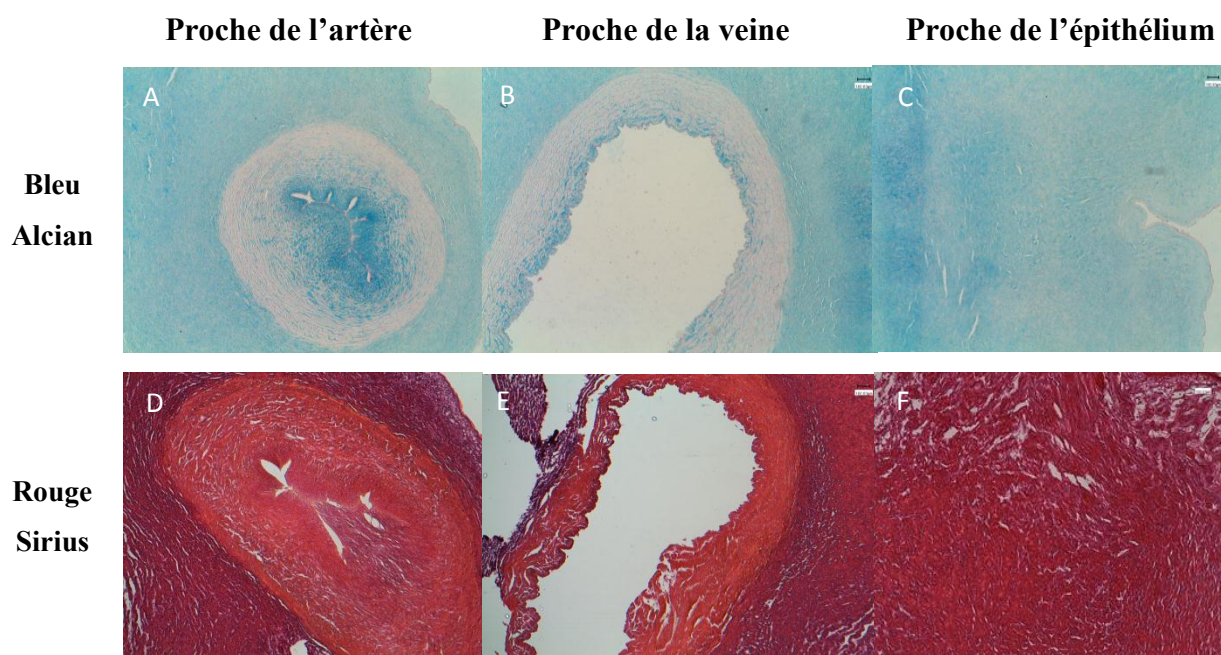
L'observation des coupes de cordon ombilical marquées à l'HES a montré que la gelée de Wharton, colorée en jaune orangé sur la figure 16, englobait chaque vaisseau composant le cordon ombilical (artères et veine). Ce tissu conjonctif contenait des cellules entourées d'une abondante matrice extracellulaire composée de collagènes (Figure 17 A, B et C) et de glycosaminoglycannes (Figure 17 D, E et F). La densité cellulaire semblait, cependant, plus importante dans l'espace périvasculaire qu'au centre de la matrice ombilicale et inversement pour la matrice extracellulaire (Figure 16 et Figure 17).

La morphologie des cellules a été observée au microscope confocal après un marquage à la phalloïdine-Alexa488. Cette observation a montré que, quelle que soit la localisation des cellules dans la matrice ombilicale, les cellules formaient un réseau tridimensionnel et présentaient une morphologie fusiforme, étoilée (Figure 18).



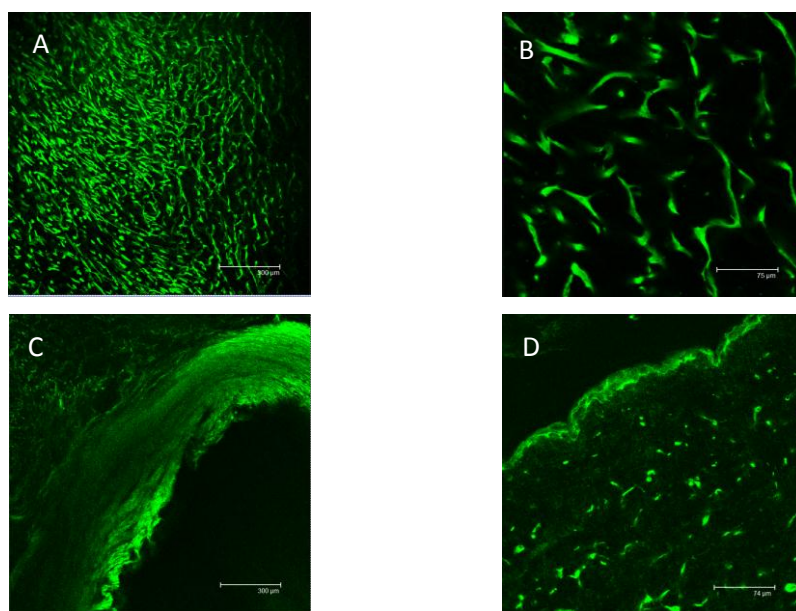
**Figure 16 :** Observation des cellules dans la gelée de Wharton proche des artères (A et D), de la veine (B et E) et de l'épithélium (C et F).

*Etude réalisée par coloration à HES (A à C : Objectif 10 ; D à F : Objectif 20). L'observation des coupes de cordon ombilical marquées à l'HES a montré que la gelée de Wharton englobait chaque vaisseau (artères ou veine). Ce tissu conjonctif se compose de cellules entourées d'une abondante matrice extracellulaire colorée en jaune orangé. Il semble, cependant, qu'il existe une hétérogénéité dans la répartition des cellules et de leur matrice extracellulaire (Figure 21 A-C).*



**Figure 17 :** Observation des glycosaminoglycannes et des collagènes totaux présents dans le cordon ombilical.

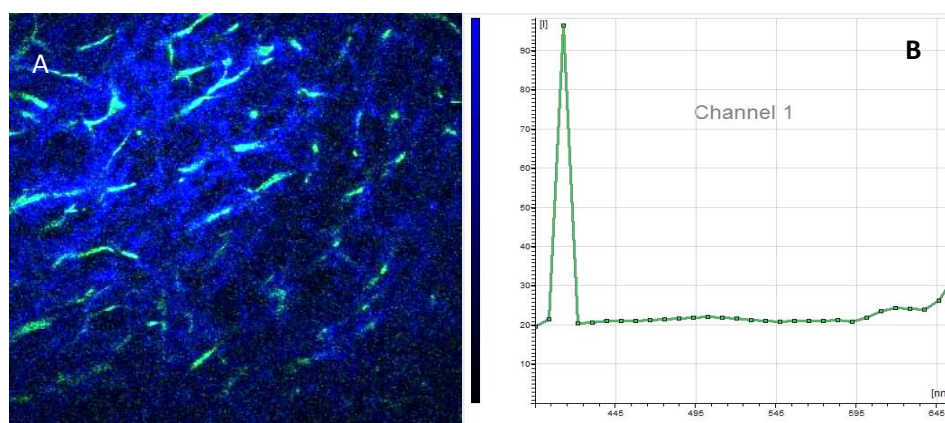
*Etude réalisée à partir d'une coloration au Bleu Alcian (A, B, C) ou au Rouge Sirius (D, E, F), pour observer respectivement la présence de glycosaminoglycannes et des collagènes totaux sur une section de cordon ombilical (Objectif x4).*



**Figure 18:** Morphologie des CSM présentes au centre de la matrice ombilicale (A-B) et au niveau de l'espace périvasculaire (C-D).

*Le cytosquelette des cellules a été marqué avec la phalloïdine couplée au fluorochrome Alexa-488 puis observé, par microscopie confocale, aux objectifs 10 (O.N = ; figures A et C) et 40 (O.N= ; figures B et D). Les cellules présentent une morphologie fusiforme, étoilée.*

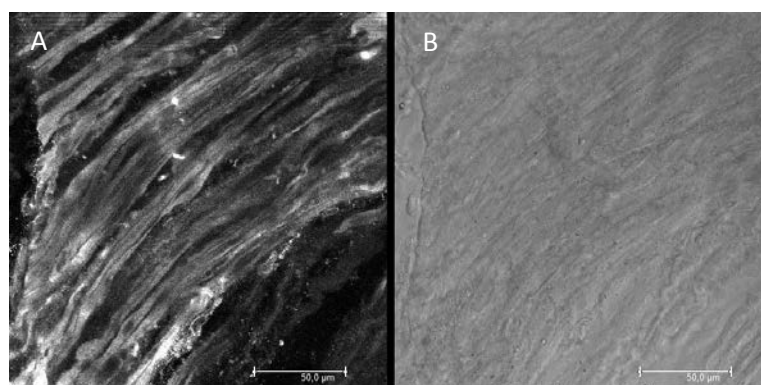
Le réseau de collagène a pu être observé au moyen de l'imagerie par Génération de Seconde Harmonique (SHG). La figure 19 représente une image obtenue par mesure du signal SHG au niveau de la gelée de Wharton. La figure 19A représente une image double couleur où la couleur bleue correspond au signal détecté par le canal d'au fluorescence tandis que la couleur verte correspond au signal détecté par le canal SHG. Ainsi, en absence de marquage fluorescent, l'association d'une excitation de type multiphoton ( $\lambda_{\text{excitation}} = 820\text{nm}$ ) avec la détection de signal SHG ( $\lambda_{\text{émission}} = 410\text{nm}$ ) permet de distinguer la présence d'un réseau matriciel composé de fibrilles (Figure 19A et 19B).



**Figure 19 :** Excitation de type multiphoton avec détection de signal SHG provenant de la matrice extracellulaire présente dans la gelée de Wharton (A). B :  $\lambda_{\text{excitation}} = 820\text{nm}$  /  $\lambda_{\text{émission}} = 410\text{nm}$ .

*Un filtre passe-bande ( $400 \pm 25 \text{ nm}$ ) a permis de recueillir le signal spécifique SHG (410 nm) et un filtre passe-bas (700 nm) a permis de stopper le faisceau d'excitation (820 nm) pouvant éventuellement traverser l'échantillon.*

Par immunofluorescence indirecte puis observation au microscope confocal monophotonique, nous avons pu observer une expression de collagène de type I entourant les cellules de la Gelée de Wharton (Figure 20).



**Figure 20 :** Expression du collagène de type I dans la gelée de wharton.

*Les protéines collagéniques de types I ont été immunomarquées, et la fluorescence a été observée en microscopie confocale (figure A, Leica SP5, Objectif x40, ON = 0,8). L'image en lumière transmise apparaît en figure B. Les barres d'échelle représentent 50 µm pour les 2 figures.*

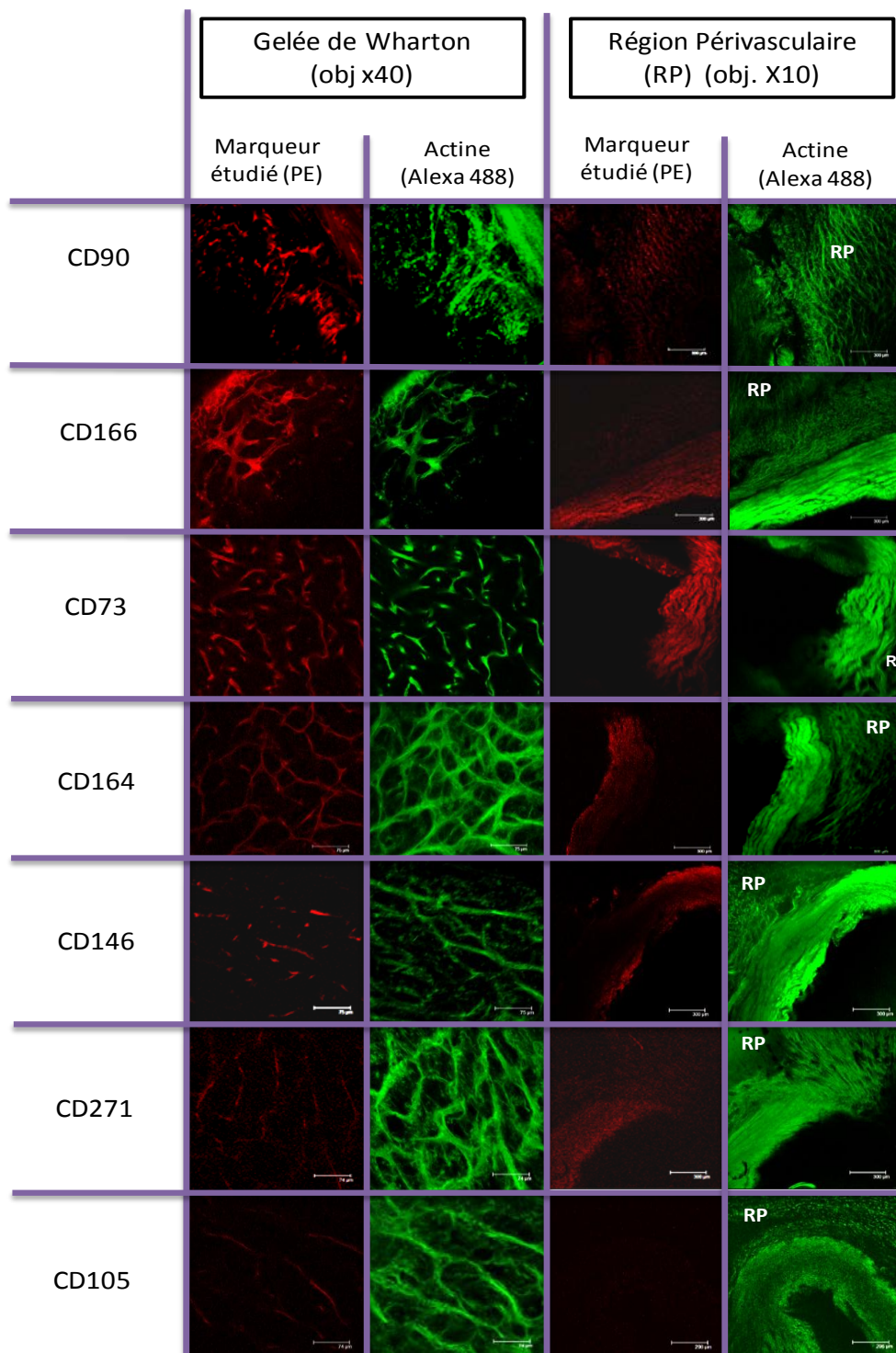
---

## B. Détection *in situ* des marqueurs mésenchymateux dans le tissu de la gelée de Wharton et la région périvasculaire du cordon ombilical

---

L'expression des principaux marqueurs mésenchymateux à la surface des CSM maintenus dans leur environnement physiologique a été évaluée par immunomarquage puis observation par microscopie confocale. Des sections de cordon ombilical ont été réalisées et mises au contact des solutions d'immunomarquage. L'observation a été réalisée non seulement au niveau de la gelée de Wharton mais aussi dans la région périvasculaire (Figure 21). Afin de visualiser toutes les cellules, un marquage du cytosquelette avec la phalloïdine couplée au fluorochrome Alexa 488 a également été réalisé.

La figure 21 montre que, dans la gelée de Wharton, si les CSM expriment fortement les marqueurs CD90, CD166, CD73 et CD146, l'expression des marqueurs CD146, CD271 et CD105 semble plus faible. Par ailleurs, dans la région périvasculaire, l'expression des marqueurs CD73, CD105, CD166 et CD271 est restée difficilement détectable contrairement aux marqueurs CD90 et CD146.



**Figure 21:** Expression *in situ* des principaux marqueurs mésenchymateux à la surface des cellules composant la gelée de Wharton et la région périvasculaire.

Les marqueurs (CD146, CD164, CD166, CD271, CD105, CD73 et CD90) ont été observés par microscopie confocale après immunomarquage direct (Fluorescence rouge). Les cellules se trouvant dans la gelée de Wharton ou dans l'espace périvasculaire ont été identifiées grâce au marquage des filaments de F-actine (Fluorescence verte).

### III. Isolement des cellules souches mésenchymateuses par méthode mécanique ou enzymatique

---

Afin de pouvoir extraire les cellules de la gelée de Wharton avant la mise en culture, deux protocoles d'extraction ont été appliqués. La première méthode consiste à évider le cordon ombilical de sa veine et de ses deux artères puis à découper la matrice extracellulaire en petits morceaux et à les placer au fond d'un puits de culture dans lequel les CSM vont migrer et adhérer. C'est ce que nous avons appelé « la méthode mécanique ». La deuxième méthode fait intervenir une action enzymatique, la collagénase, pour isoler les cellules de leur matrice extracellulaire. C'est ce que nous avons appelé « la méthode enzymatique ».

Pour chacune des méthodes d'extraction, nous avons étudié et comparé le métabolisme des cellules ainsi que leur phénotype. La méthode enzymatique nous a également permis de quantifier le nombre de cellules potentiellement disponibles dans la matrice ombilicale.

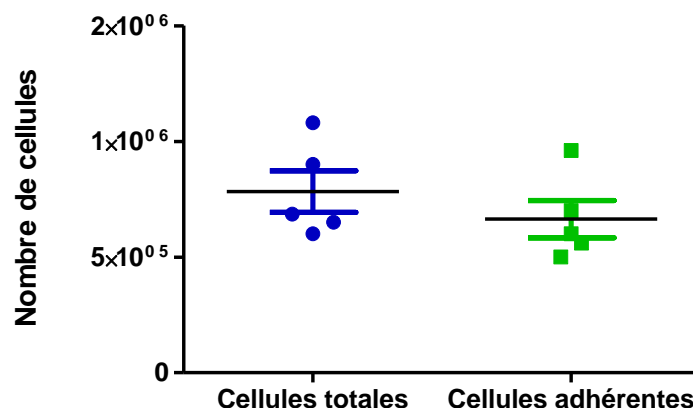
#### A. Comportement des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton après digestion enzymatique

---

A l'issue de la digestion enzymatique, une détermination du nombre de cellules disponibles dans un cordon a été réalisée ainsi qu'une analyse de l'activité métabolique et du phénotype des cellules au cours des premiers passages de culture cellulaire (P0 et P1).

D'après la figure 22, la digestion enzymatique à la collagénase B a permis l'obtention de  $7,8 \pm 0,2 \times 10^5$  cellules pour un centimètre de cordon ombilical. Lorsque ces cellules ont été ensemencées en monocouche, après 24 heures, plus de 85% de ces cellules étaient adhérentes. Cela représentait  $6,7 \pm 0,2 \times 10^5$  cellules.

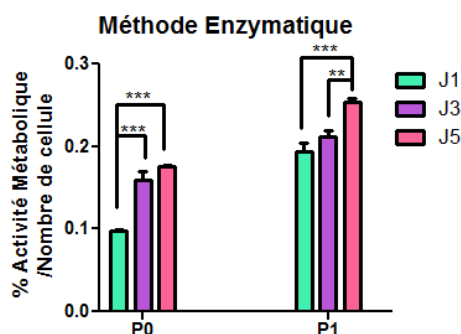
Au cours de cette étude, la longueur des cordons ombilicaux utilisés variait entre 15 et 35 cm. Ainsi, le nombre total de cellules totales potentiellement disponibles dans un cordon entier pourrait être compris entre  $11,7 \times 10^6$  et  $27,3 \times 10^6$  tandis que le nombre de cellules adhérentes pourrait être compris entre  $9,9 \times 10^6$  et  $23 \times 10^6$ .



**Figure 22:** Nombre de cellules obtenues à partir de la digestion enzymatique d'un centimètre de cordon ombilical dépourvu des vaisseaux et de l'épithélium.

La digestion enzymatique à la collagénase B a permis l'obtention de  $7,8 \pm 0,2 \times 10^5$  cellules pour un centimètre de cordon ombilical. Lorsque ces cellules ont été ensemencées en monocouche, après 24 heures, plus de 85% de ces cellules étaient adhérentes. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (N=5).

L'activité métabolique des CSM ensemencées dans des plaques 6 puits a été évaluée après 1 et 5 jours de culture au cours de la primo-culture (P0) et du premier passage (P1). Cette activité, présentée sur la Figure 23, a été calculée grâce au pourcentage d'Alamar Blue réduit rapporté au nombre de cellules présentes dans le même échantillon. La figure 23 montre que, quel que soit le passage, l'activité métabolique est significativement plus élevée au 5<sup>ème</sup> jour qu'au 1<sup>er</sup> jour de culture ( $p < 0,001$ ). Il apparaît également qu'en P1, les cellules ont une activité métabolique plus importante qu'en P0.

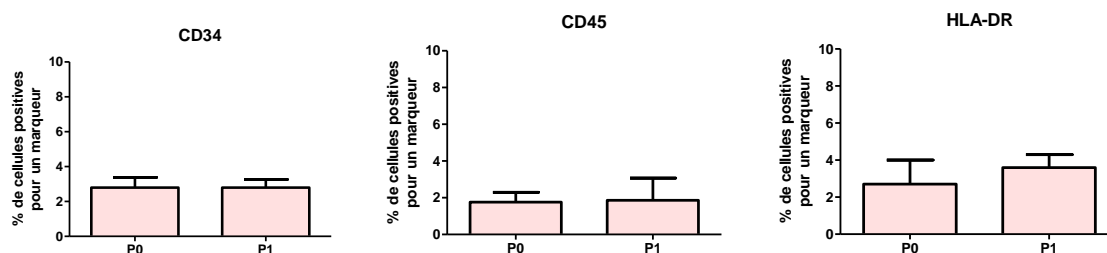


**Figure 23:** Comparaison de l'activité métabolique *in vitro* après isolement par méthode enzymatique au cours de la culture en P0 et P1.

Les résultats sont exprimés en % de réduction du Bleu d'Alamar et ramenés au nombre de cellules (N=3). Quel que soit le passage, l'activité métabolique est significativement plus élevée au 5<sup>ème</sup> jour qu'au 1<sup>er</sup> jour de culture ( $p < 0,001$ ). Il apparaît également qu'en P1, les cellules ont une activité métabolique plus importante qu'en P0.

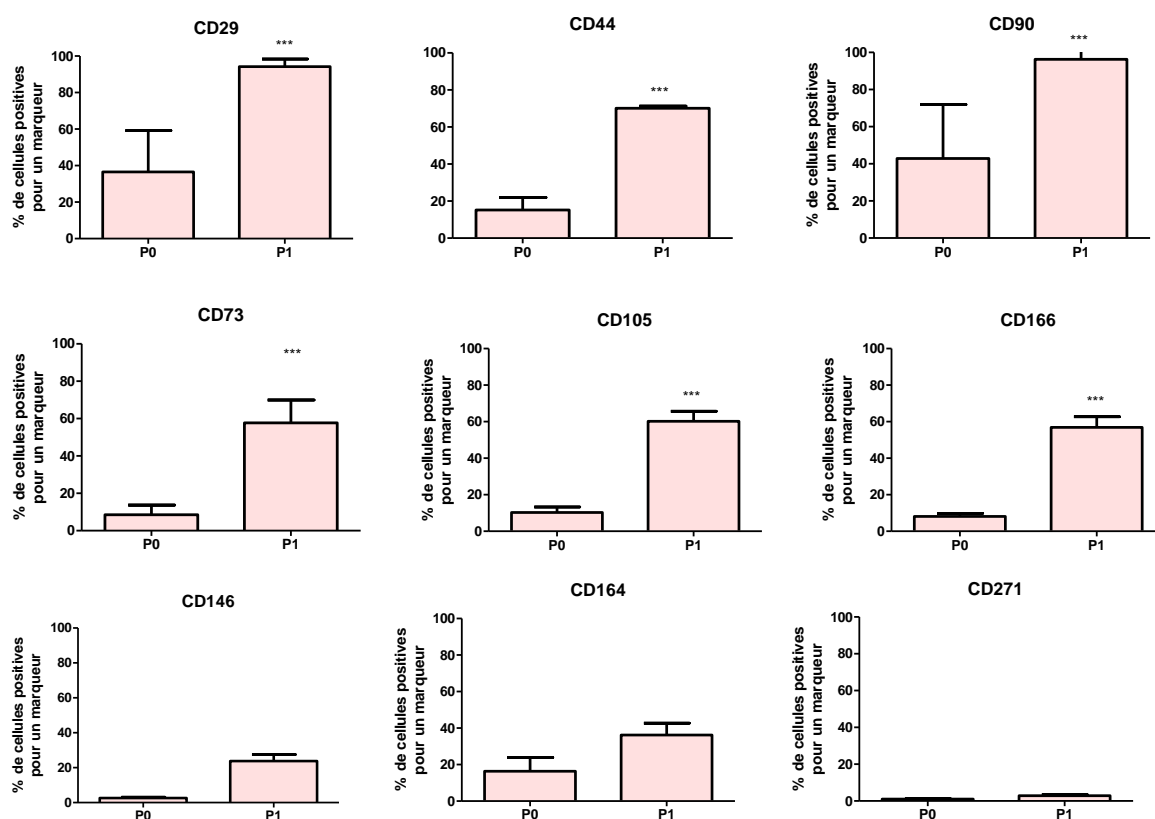
Afin de déterminer l'influence de la digestion enzymatique sur l'expression des clusters de différenciation à la surface des cellules souches mésenchymateuses, les cellules, issues de trois cordons ombilicaux, ont été extraites et caractérisées par cytométrie en flux en P0 et P1.

La figure 24 montre que, quel que soit le passage, les cellules exprimaient moins de 10% les marqueurs hématopoïétiques CD34, CD45 ainsi que le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (HLA-DR).



**Figure 24:** Expression des marqueurs hématopoïétiques CD34 et CD45 et du complexe majeur d'histocompatibilité HLA-DR à la surface de CSM issues de la Gelée de Wharton par digestion enzymatique.

Quel que soit le passage (P0 ou P1), les cellules exprimaient à moins de 10% les récepteurs CD34 et CD45, ainsi que le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (HLA-DR). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (N=3).



**Figure 25:** Analyse phénotypique des cellules souches mésenchymateuses dérivées de la gelée de Wharton après digestion enzymatique et cultivées en monocouche (P0 et P1).

L'analyse, par cytométrie de flux, a montré que toutes les cellules étaient positives pour les marqueurs CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD164, et CD166, mais négatives pour CD34, CD271, et HLA-DR. En P1, à l'exception de CD146, CD164 et CD271, tous les clusters étudiés avaient une expression entre 2,7 et 6,8 fois plus importante que lors de la primo-culture. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (N=3), \*\*\*  $P < 0.001$  (P0 vs P1).

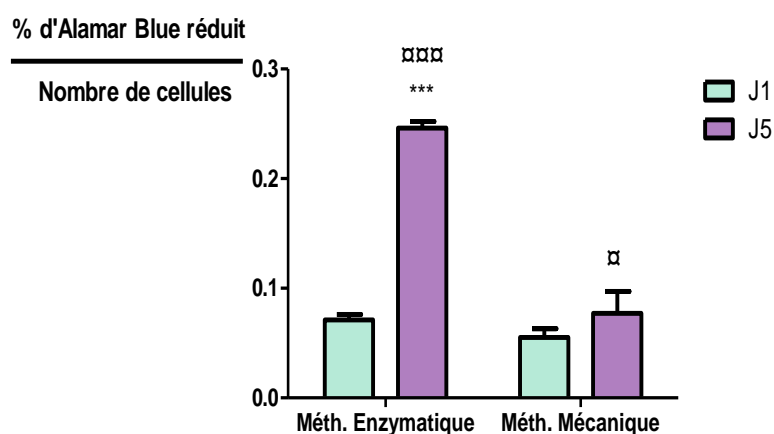


Par ailleurs, à P0, les cellules obtenues exprimaient les clusters ayant une interaction avec la matrice extracellulaire (CD29, CD44, CD90), le marqueur stromal (CD166), le marqueur endothélial (CD146), ainsi que d'autres marqueurs de différenciation comme CD73 et CD105 (Figure 25). En P1, à l'exception des marqueurs CD146, CD164 et CD271, tous ces clusters avaient une expression significativement plus importante par rapport à leur expression lors de la primo-culture (rapport P0/P1 compris entre 2,7 et 6,8 selon les clusters de différenciation;  $p < 0,001$ ).

### B. Influence de la technique d'isolement sur le comportement des CSM

Compte tenu de la spécificité de la méthode mécanique, l'influence de la technique d'isolement n'a pu se faire qu'à P1. La figure 26 compare l'activité métabolique des cellules obtenues par digestion enzymatique ou par méthode mécanique au cours des 5 premiers jours de culture en P1.

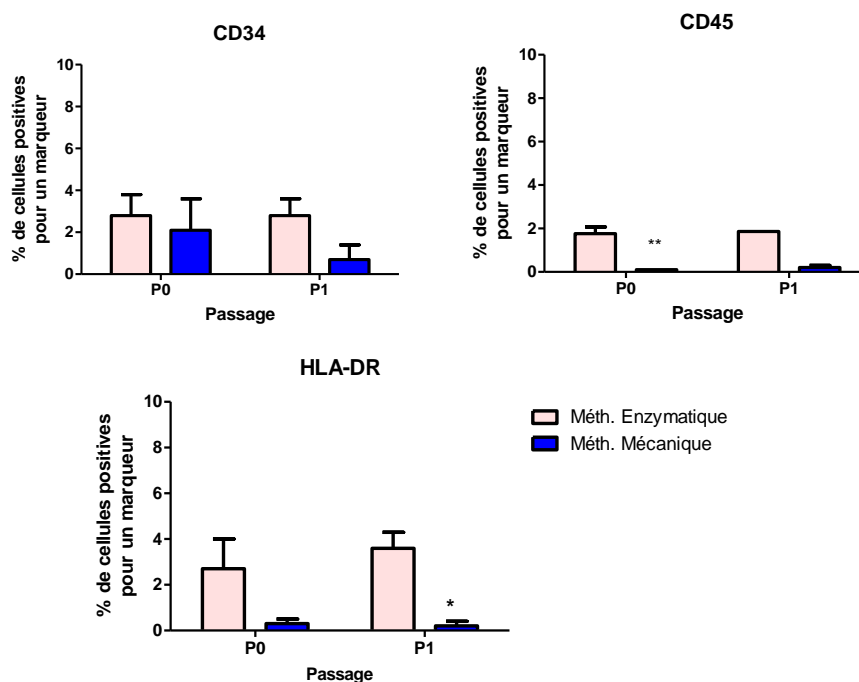
Globalement, quelle que soit la méthode d'obtention des cellules, l'activité métabolique, à J5, est significativement plus importante qu'à J1. De plus, si aucune différence n'est observée, entre les techniques, au premier jour de la culture, à J5, l'activité métabolique des cellules obtenues par digestion enzymatique est 3 fois plus élevée que celle pour les cellules obtenues par la méthode mécanique ( $p < 0,001$ ).



**Figure 26:** Comparaison de l'activité métabolique des CSM obtenues par digestion enzymatique ou *via* la méthode mécanique au cours de cinq premiers jours de la culture en monocouche (P1).

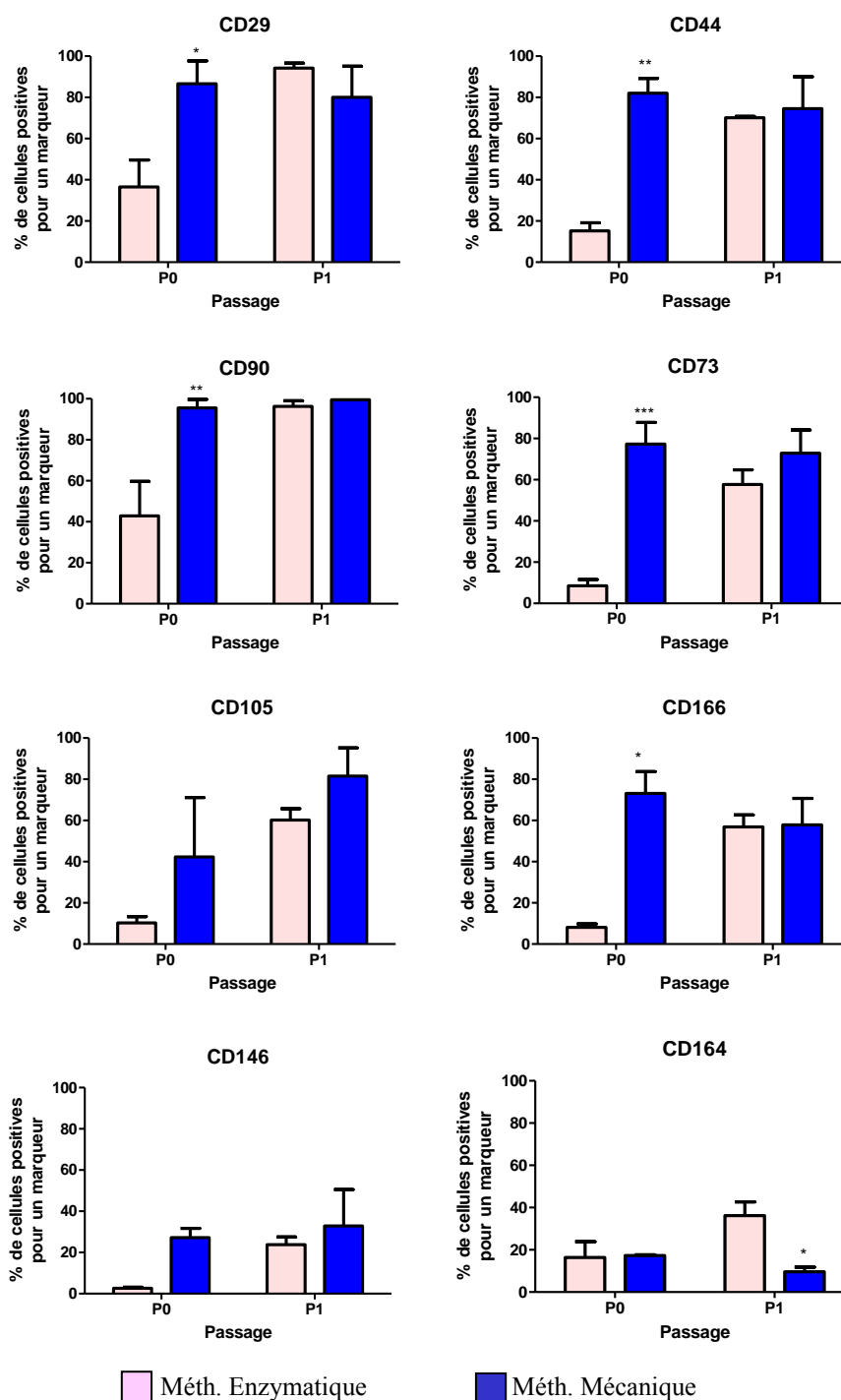
L'activité métabolique augmente au cours de la culture. Toutefois, celle obtenue par la méthode enzymatique est significativement plus importante que celle obtenue avec la méthode mécanique, après 5 jours de culture en P1 ( $p > 0,001$ ). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD ( $N = 3$ ), \*\*\*  $P < 0,001$  (Méthode enzymatique vs Méthode mécanique) ; □  $P < 0,05$ , □□□  $P < 0,001$  (J1 vs J5).

L'influence de la technique d'isolement des cellules sur le phénotype de ces dernières a ensuite été analysée par cytométrie en flux à l'issue du P0 et du P1. Il apparaît, sur la figure 27 que les marqueurs hématopoïétiques CD34, CD45 ainsi que le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (HLA-DR) étaient toujours exprimés à moins de 10% dans les échantillons analysés, quelles que soient la techniques d'isolement et le passage.



**Figure 27:** Comparaison de l'expression des marqueurs hématopoïétiques CD34 et CD45 et du complexe d'histocompatibilité HLA-DR à la surface de CSMs issues de la Gelée de Wharton par digestion enzymatique ou la méthode mécanique et cultivées en P0 et P1. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM ( $N = 3$ ), \*  $P < 0,05$  (Méthode enzymatique vs Méthode mécanique).

La figure 28 montre, qu'en P0, à l'exception du récepteur CD164, une proportion plus importante de CSM exprimaient les récepteurs CD29 ( $p < 0,05$ ); CD44 ( $p < 0,01$ ); CD90 ( $p < 0,01$ ), CD73 ( $p < 0,001$ ), CD166 ( $p < 0,05$ ). En revanche, en P1, plus aucune différence significative n'est apparue concernant l'expression de ces récepteurs à la surface de cellules obtenues par les 2 méthodes.



**Figure 28:** Comparaison de l'expression des marqueurs de surface des cellules souches mésenchymateuses obtenues à partir de la méthode enzymatique et la méthode mécanique.

La comparaison d'expression a été réalisée à l'issue du P0 et du P1. Si, à P0, des différences d'expression sont apparues à la surface des CSM obtenues par méthode mécanique par rapport à la méthode enzymatique ; plus aucune différence significative n'a été observée dans le niveau d'expression des marqueurs en fonction de la technique d'isolement à l'issue du P1. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM ( $N = 3$ ). \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  (Méthode enzymatique vs Méthode mécanique).

---

## IV. Influence de l'amplification et de la concentration en oxygène sur le comportement des CSM de la gelée de Wharton

---

Dans la quatrième partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à l'amplification des CSM, issues de la gelée de Wharton, en monocouche afin de déterminer, si la durée de la culture et/ou la concentration en oxygène avaient une influence sur le comportement des cellules. Pour cela, les cellules obtenues par la méthode mécanique ont été cultivées jusqu'au 7<sup>ème</sup> passage en conditions dites « normoxie » (21% O<sub>2</sub>) et/ou « hypoxie » (5% d'O<sub>2</sub>).

Pour simplifier la présentation des résultats, pour chaque paramètre étudié (morphologie, prolifération, phénotype et potentiel de différenciation), nous présenterons dans un premier temps l'effet de l'amplification sur le comportement des cellules puis nous comparerons l'influence de la concentration en oxygène.

### A. Influence de l'expansion des CSM et/ou de la concentration en oxygène sur leur morphologie et leur prolifération

---

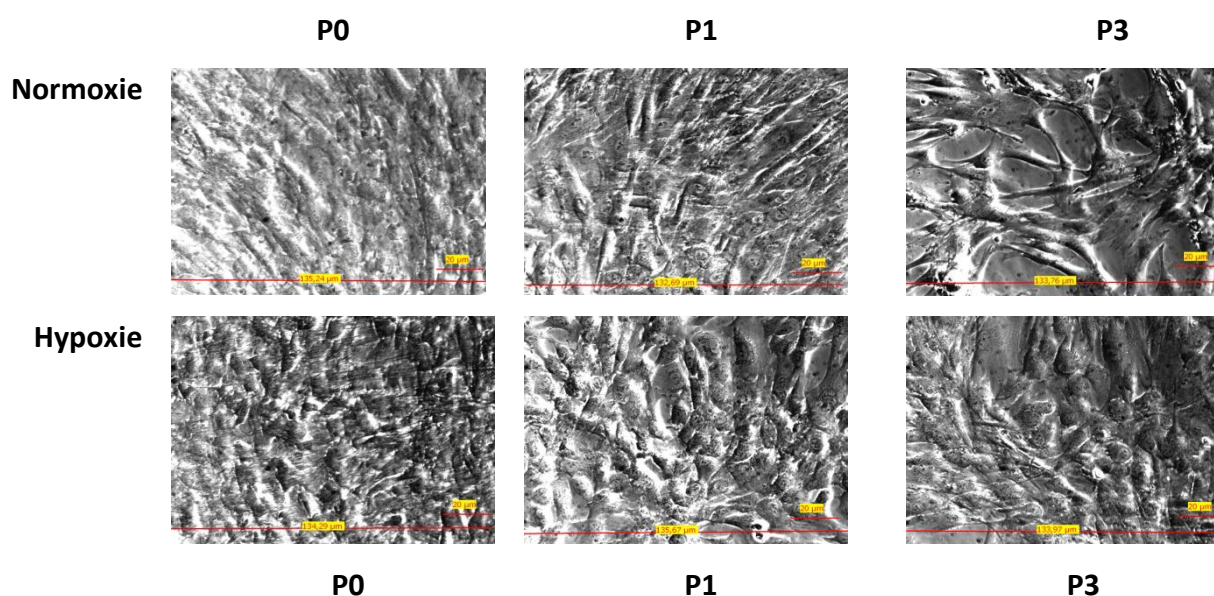
#### 1. Impact sur la morphologie

---

Lors de la primo-culture (P0), les morceaux de gelée de Wharton ont été maintenus, durant 7 jours, dans des plaques 6 puits. A partir du retrait de ces derniers et jusqu'au 7<sup>ème</sup> passage, nous avons observé la morphologie des cellules, par microscopie optique à contraste de phase (Figure 29).

Dans les premiers jours de l'ensemencement, les CSM possédaient une forme axiale fusiforme. Deux semaines après, les cellules ressemblaient à de longues cellules fibroblastiques et commençaient à former des colonies. Cette morphologie fibroblastique a été maintenue tout au long de l'expansion : de P0 à P7 (Figure 29).

Il semblerait, par ailleurs, que la présence ou non d'oxygène au cours de la culture, n'ait pas influencé la morphologie des cellules.



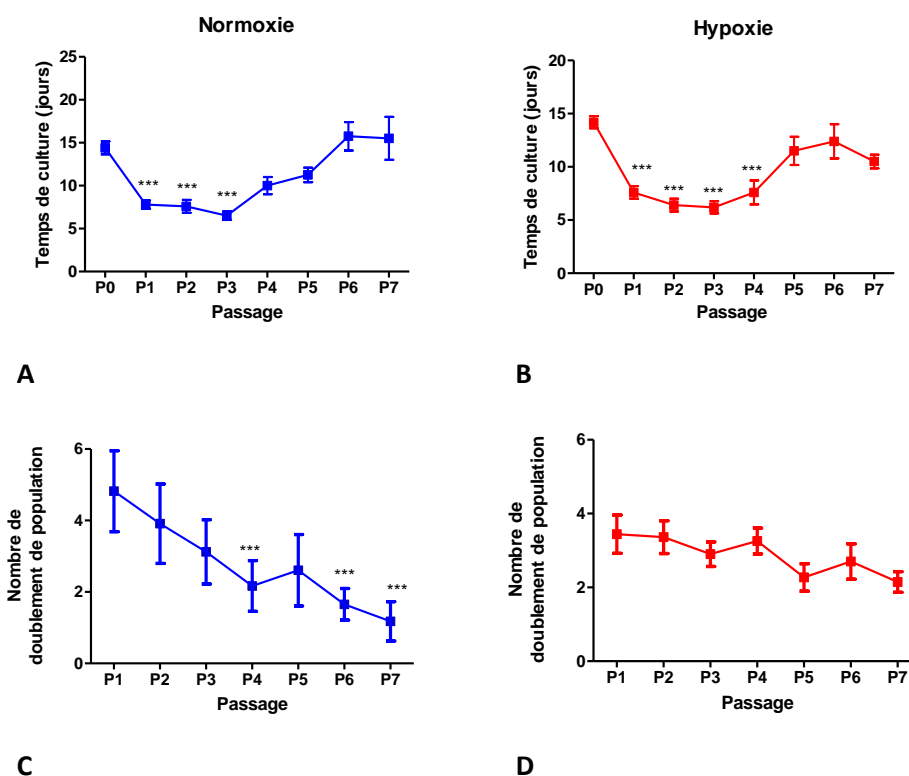
**Figure 29:** Observation, en microscopie optique, de la morphologie des cellules souches mésenchymateuses cultivées, durant 7 passages, dans deux conditions de culture différentes (Normoxie et Hypoxie).

*Une morphologie fibroblastique a été observée dès P0 et jusqu'à P7. Par ailleurs, aucune différence n'a été constatée au niveau de la forme des cellules entre les deux conditions de culture.*

## 2. Impact sur la prolifération des CSM

Concernant l'influence de l'expansion sur le temps de culture, il apparaît, sur la figure 30, que ce dernier diminue de manière significative entre P0 et P1 pour atteindre un temps minimum de 6,5 jours en normoxie et 6,2 jours en hypoxie au cours du 3<sup>ème</sup> passage ( $p < 0,001$  en normoxie et  $p < 0,01$  en hypoxie ; respectivement figure 30 A et B).

Parallèlement au temps de culture, une estimation du nombre de doublement de population, qui reflète la capacité de prolifération des cellules, a été réalisée lorsque les cellules atteignaient 80-90% de confluence (Figure 30 C et D). Ce paramètre semble diminuer au cours de l'expansion, particulièrement en présence d'oxygène. En effet, dans ces conditions de culture, entre P0 et P7, le nombre de doublement est divisé par un facteur 4 ( $p < 0,001$  P0 vs P7). En revanche, en absence d'oxygène, bien qu'il semblait exister une diminution du temps de doublement, entre P0 et P7, celle-ci n'est pas apparue comme significative ( $p > 0,05$  P0 vs P7).

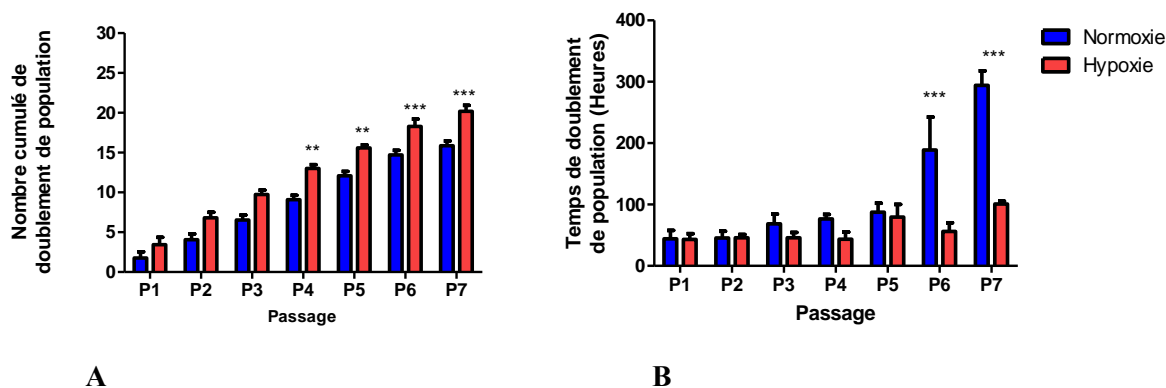


**Figure 30:** Influence de l'expansion en monocouche sur le temps de culture des CSM (fig. A et B) et le nombre de doublement de population (fig. C et D).

Concernant l'influence de l'expansion sur le temps de culture, il apparaît que ce dernier diminue de manière significative entre P0 et P1 pour atteindre un temps minimum en P3. Le nombre de doublement de population semble diminuer au cours de l'expansion, particulièrement en présence d'oxygène. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM ( $N = 5$ ). \*\*\*  $p < 0,001$  (Fig A et B : P0 vs Px et Fig C et D : P1 vs Px).

Pour évaluer l'impact de la concentration en oxygène sur la capacité de prolifération des CSM, nous avons repris l'estimation du nombre de doublement de population et l'avons présenté en cumulé de P1 à P7 (Figure 31A) et calculé le temps de doublement de population (Figure 31B). La figure A montre que le nombre cumulé de doublement de population est plus important lorsque les cellules ont été cultivées dans des conditions « hypoxie » que dans des conditions « normoxie ». Bien que cette différence ne soit juste qu'une tendant entre P1 et P3, elle devient statistiquement significative à partir de P4 ( $p < 0,01$  de P4 à P5 et  $p < 0,001$  de P6 à P7).

La figure B montre qu'en début de culture, aucune différence entre les 2 conditions de culture n'a été observée concernant le temps de doublement de population : il était de  $44,1 \pm 13,7$  heures lorsque les cellules étaient cultivées en présence d'oxygène et de  $43,0 \pm 9,4$  heures lorsque les cellules étaient cultivées avec moins de 5% d'oxygène. En revanche, il apparaît qu'en P6 et P7, les cellules cultivées en présence d'oxygène mettaient, respectivement, 3,3 et 2,9 fois plus de temps pour doubler la population qu'en condition « hypoxie » ( $p < 0,001$ ).



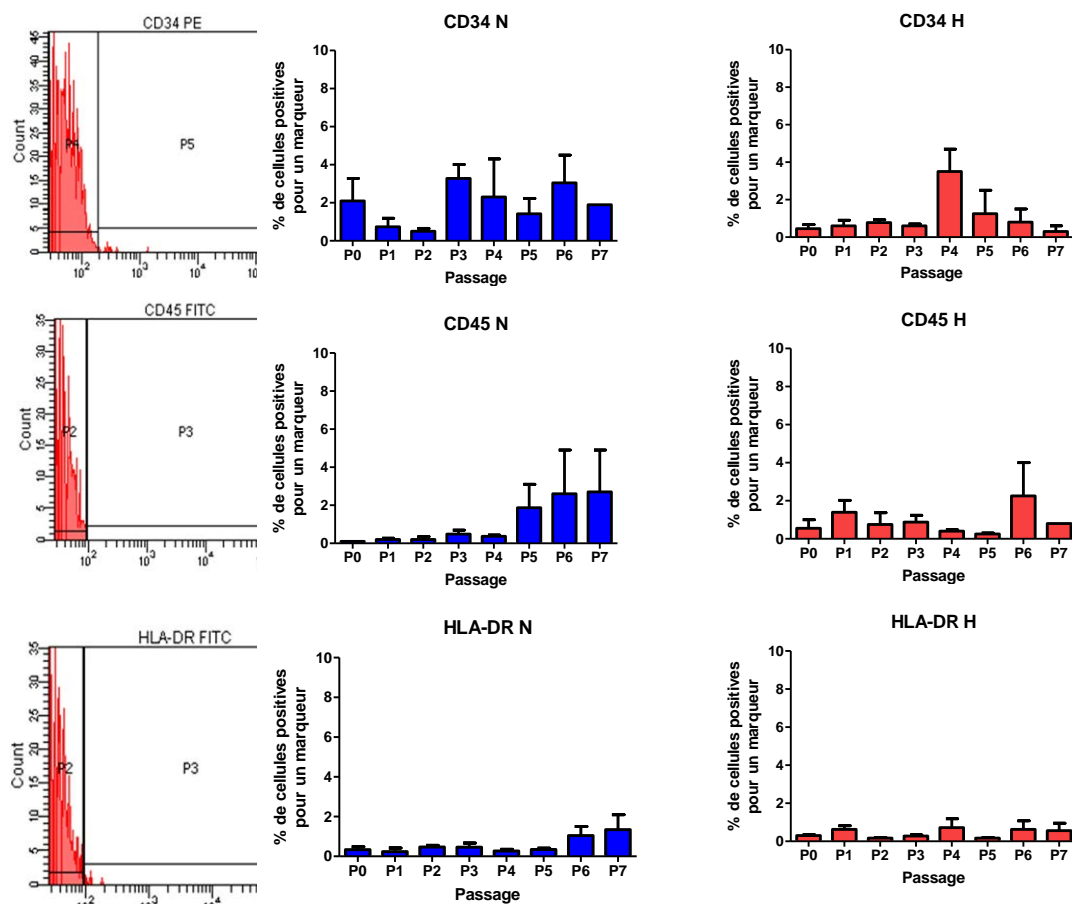
**Figure 31:** Potentiel de prolifération des CSM cultivées en présence ou absence d'oxygène exprimé par le nombre cumulé de doublement de population (Fig. A) et le doublement de population (Fig. B).

La figure A montre que le nombre cumulé de doublement de population est plus important lorsque les cellules ont été cultivées dans des conditions « hypoxie » que dans des conditions « normoxie ». Le temps de doublement (Fig. B) est calculé selon la formule suivante ( $\text{Temps de doublement} = T_p \times \text{Log}2 / (\text{Log} (N_f/N_i))$  avec,  $T_p$  = temps de culture (heures),  $N_f$  = nombre final de cellules,  $N_i$  = Nombre initial de cellules) et montre qu'en début de culture, aucune différence entre les 2 conditions de culture n'a été observée. En revanche, il apparaît qu'en P6 et P7, les cellules cultivées en présence d'oxygène mettaient, respectivement, 3,3 et 2,9 fois plus de temps pour doubler la population qu'en condition « hypoxie ». Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (N = 5). \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  (Normoxie vs Hypoxie).

## B. Influence de l'expansion des CSM et/ou de la concentration en oxygène sur le phénotype des cellules

Le phénotype des CSM a été réalisé, par cytométrie en flux, après chaque passage. Pour chaque échantillon, le pourcentage de cellules exprimant les marqueurs hématopoïétiques (CD34 et CD45), HLA-DR et les marqueurs spécifiques des CSM ont été déterminés (Figure 32 à Figure 35).

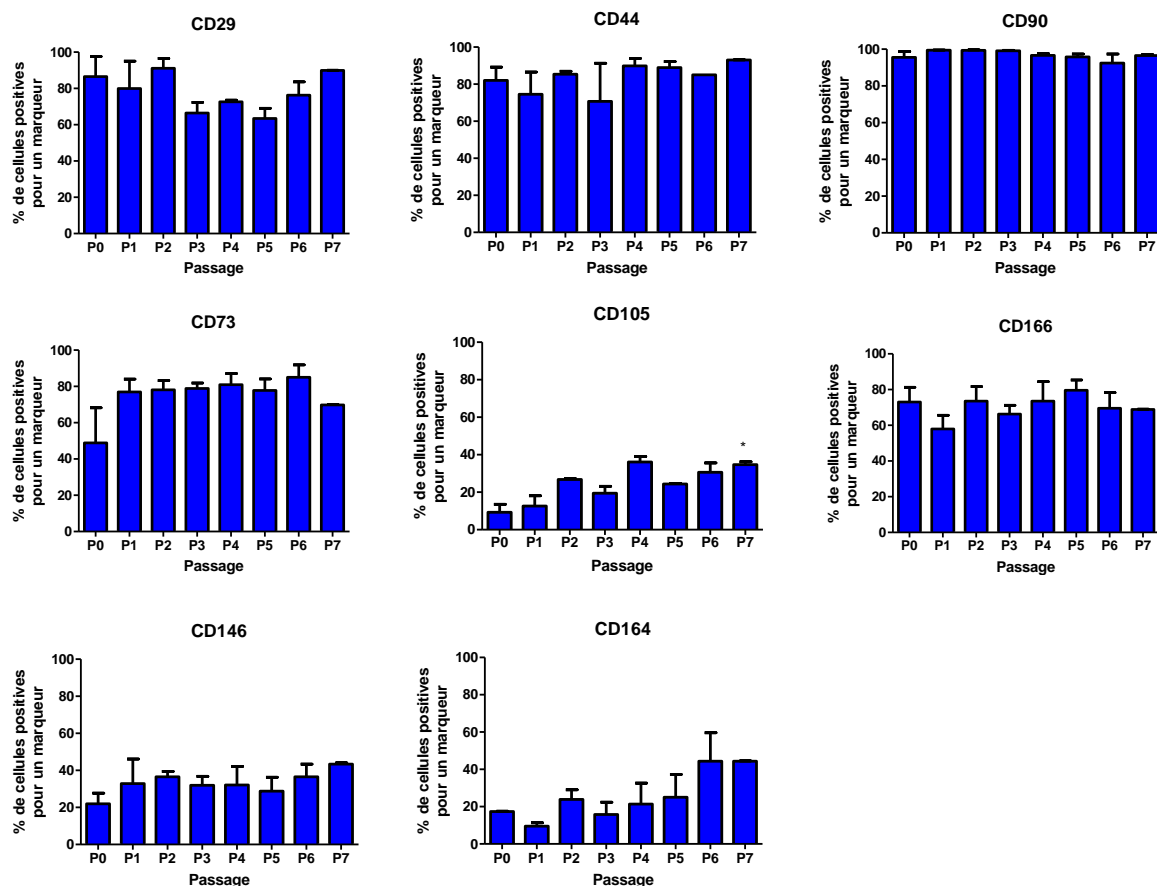
Il est important de noter que tout au long de la culture, quelles que soient les conditions de culture, la proportion de cellules possédant les antigènes CD34 et CD45, et exprimant HLA-DR est toujours restée inférieure à 5% (Figure 32).



**Figure 32:** Expression des marqueurs hématopoïétiques CD34 et CD45 ainsi que du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (HLA-DR) à la surface de CSM issues de la Gelée de Wharton et cultivées durant 7 passages soit en présence d'oxygène (Noté « N ») ou en Hypoxie (Noté « H »).  
Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM ( $N = 5$ ).

Ces analyses semi-quantitatives ont permis de constater que les CSM issues de la gelée de Wharton et cultivées en présence d'oxygène jusqu'au septième passage exprimaient à plus de 70% les récepteurs CD29, CD44, CD90, CD73 et CD166 (Figure 33). Pour ces récepteurs, aucune variation significative de leur expression n'a été observée au cours de l'amplification ( $p > 0,05$  pour P0 vs Px). Pour les récepteurs CD105, CD146 et CD164, il semblerait que la proportion de cellules exprimant ces récepteurs soit plus importante au fur et à mesure de l'amplification dans des conditions « Normoxie » (pour CD105: en P0 :  $9,3 \pm 4,6\%$  et  $34,6 \pm 2,6\%$  en P7; pour CD146 : en P0 :  $22,0 \pm 8,6\%$  et  $42,8 \pm 0,1\%$  en P7 et pour CD164 : en P0 :  $17,3 \pm 0,3\%$  et  $44,4 \pm 0,2\%$  en P7).



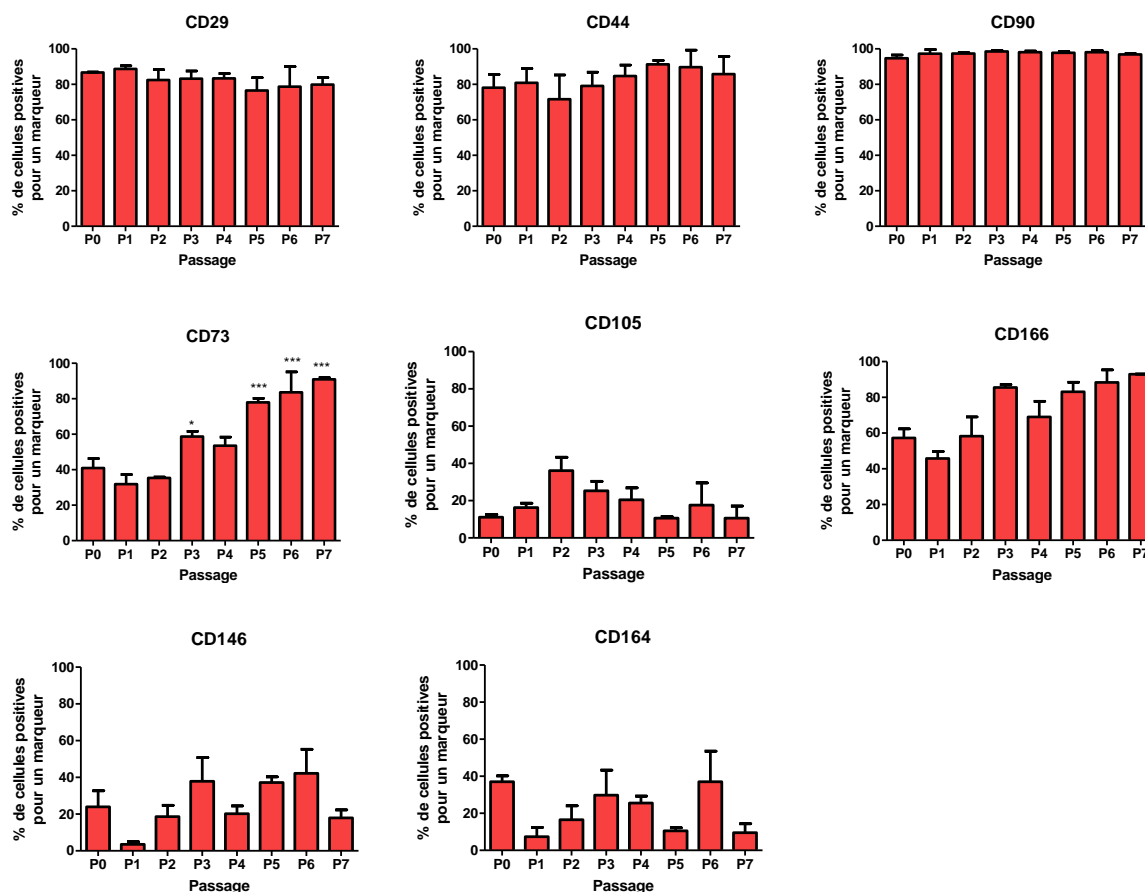


**Figure 33:** Expression des marqueurs caractérisant le phénotype mésenchymateux des cellules stromales issues de la gelée de Wharton et cultivées durant 7 passages en présence d'oxygène.

Les cellules issues de la gelée de Wharton et cultivées en présence d'oxygène jusqu'au septième passage exprimaient à plus de 70% les récepteurs CD29, CD44, CD90, CD73 et CD166. Pour les récepteurs CD105, CD146 et CD164, il semblerait que la proportion de cellules exprimant ces récepteurs soit plus importante au fur et à mesure de l'amplification. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM ( $N = 5$ ). \*  $p < 0,05$  ( $P_0$  vs  $P_x$ ).

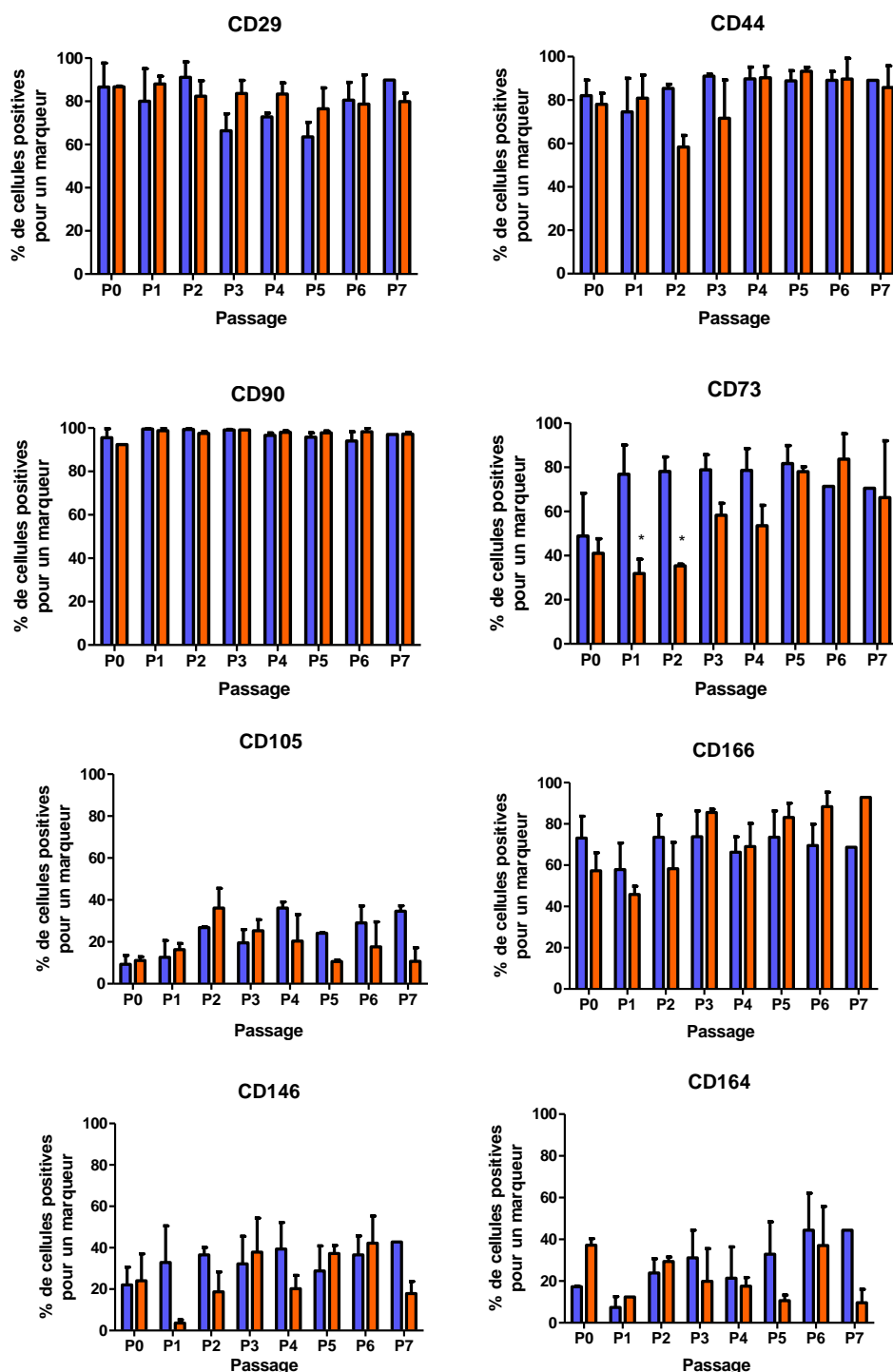
Durant l'amplification en absence d'oxygène, les cellules étaient à plus de 70% positives pour les récepteurs CD29, CD44 et CD90 et aucune variation significative de ces expressions n'a été observée entre P0 et les autres passages ( $p > 0,05$  ; Figure 34).

Si pour les récepteurs CD105, CD146 et CD164, les cellules exprimaient à moins de 40% ces récepteurs à leur surface tout au long de l'expansion, les cellules ont montré une augmentation de l'expression du récepteur CD73 et CD166 entre P0 et P7.



**Figure 34:** Expression des marqueurs caractérisant le phénotype mésenchymateux des cellules stromales issues de la gelée de Wharton et cultivées durant 7 passages en absence d'oxygène.

Durant l'amplification en absence d'oxygène, les cellules étaient à plus de 70% positives pour les récepteurs CD29, CD44 et CD90 et aucune variation significative de ces expressions n'a été observée entre P0 et les autres passages. Pour les récepteurs CD105, CD146 et CD164, les cellules ont montré une augmentation de l'expression de ces récepteurs entre P0 et P7. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM ( $N = 5$ ). \*  $p < 0,05$  et \*\*\*  $p < 0,001$  (P0 vs Px).



**Figure 35:** Comparaison de l'expression des marqueurs de surface des CSM après expansion en monocouche en présence ou absence d'oxygène.

Mis à part pour l'expression du récepteur CD73, la concentration en oxygène n'a pas semblé influencer de manière significative l'expression de marqueurs de surface caractérisant les CSM. Pour le récepteur CD73, les cellules cultivées en absence d'oxygène exprimaient moins ce récepteur à leur surface que leurs homologues cultivées en présence d'oxygène ( $p < 0,05$  en P1 et P2). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM ( $N = 5$ ). \*  $p < 0,05$  (Normoxie vs Hypoxie).

La comparaison, entre les 2 conditions de culture utilisées, de l'expression des récepteurs membranaires caractérisant les CSM a montré que, mis à part le récepteur CD73, la concentration en oxygène n'a pas semblé influencer de manière significative l'expression de CD29, CD44, CD90, CD105, CD166, CD146 et CD164.

Pour le récepteur CD73, les cellules cultivées en absence d'oxygène exprimaient moins ce récepteur à leur surface que leurs homologues cultivées en présence d'oxygène. Ces variations d'expression ont été observées essentiellement de P1 à P4 avec une significativité en P1 et P2 ( $p < 0,05$ ).

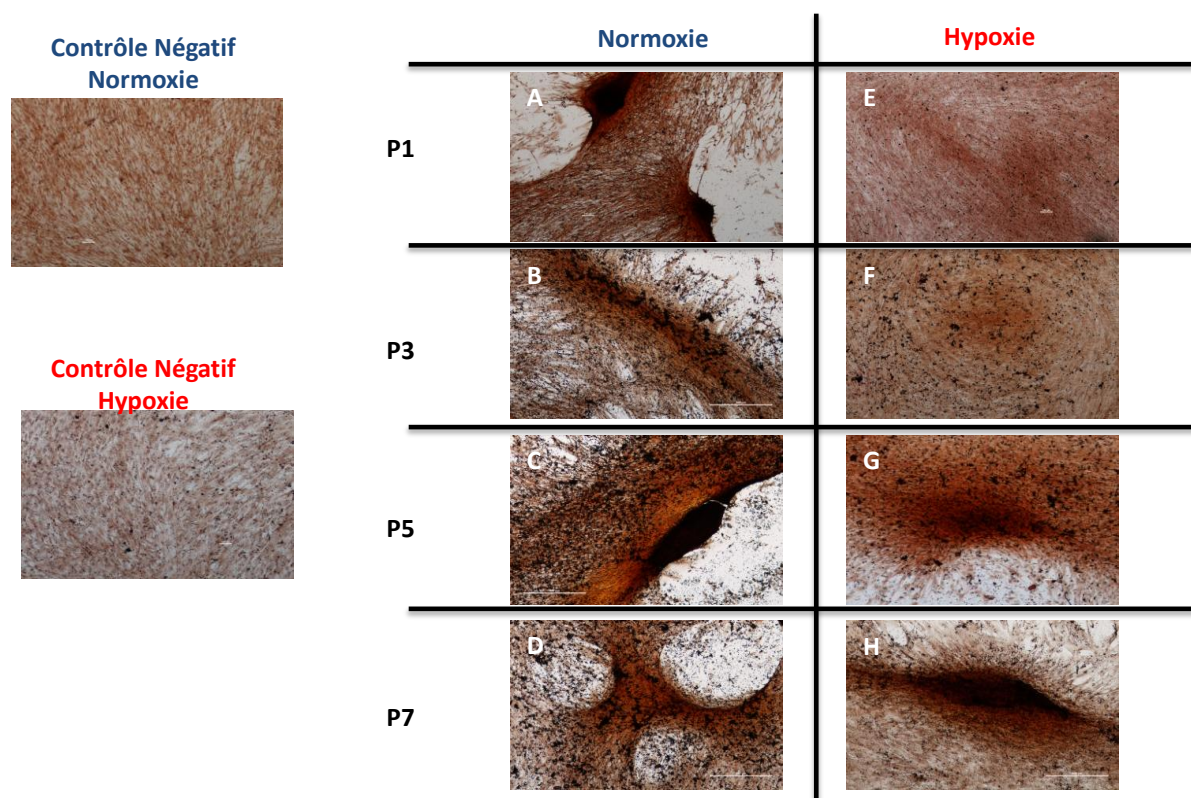
### C. Influence de l'expansion des CSM et/ou de la concentration en oxygène sur le potentiel de différenciation des cellules

Pour étudier l'influence de l'expansion des CSM en monocouche et/ou de la concentration d'oxygène sur le potentiel de différenciation des cellules, une différenciation ostéogénique, chondrogénique et adipocytaire a été induite en P1, P3, P5 et P7 en présence de milieux d'induction spécifiques. A l'issue de la culture en monocouche (différenciations ostéogénique et adipogénique) ou tridimensionnelle (différenciation chondrogénique), une coloration histochimique, caractérisant chaque tissu recherché, a été effectuée pour montrer la capacité des CSM issues de la gelée de Wharton à se différencier en ostéocytes, chondrocytes et adipocytes.

#### 1. Différenciation ostéogénique

L'évaluation du potentiel ostéogénique des CSM a été réalisée en utilisant une solution de rouge d'alizarine permettant de révéler la présence de dépôts calciques au sein de la matrice extracellulaire (Figure 36). D'après les colorations histologiques, en comparaison avec le contrôle négatif (cellules maintenues en culture dans un milieu non inductif de la différenciation), il semblerait, qu'en présence d'oxygène, la matrice extracellulaire présente une coloration plus importante de P1 à P5 qu'en P7. En revanche, en absence d'oxygène, la coloration issue du rouge alizarine s'intensifie à partir de P5.

A passage équivalent, la matrice extracellulaire des cellules maintenues en culture en présence d'oxygène présente une coloration plus intense que celle des cellules cultivées en absence d'oxygène.



**Figure 36:** Evaluation des dépôts de minéralisation calcique après 21 jours de différenciation ostéocytaire (culture en monocouche), après coloration par le Rouge Alizarine.

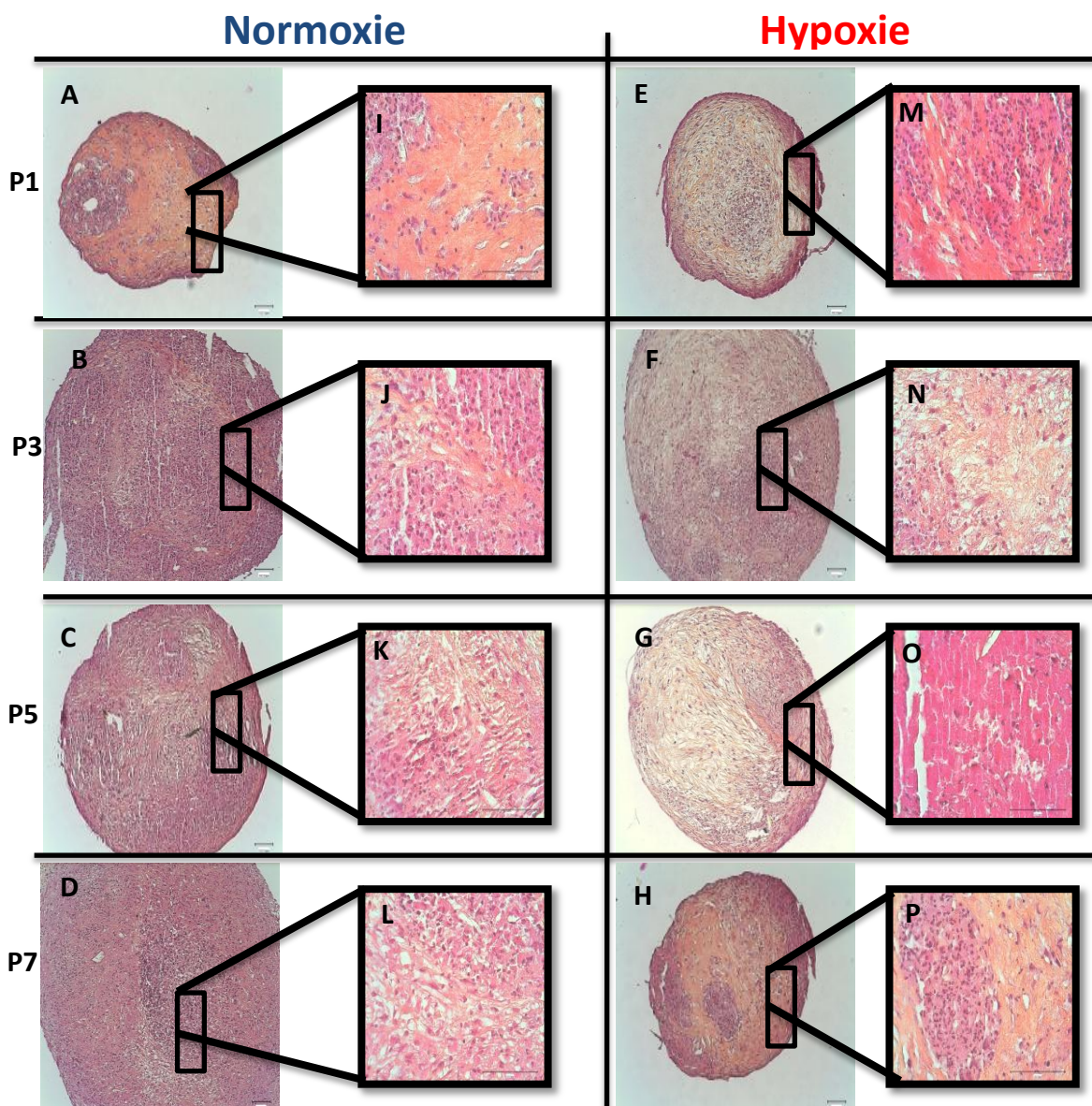
*Il semblerait, qu'en présence d'oxygène, la matrice extracellulaire présente une coloration plus importante de P1 à P5 qu'en P7. En revanche, en absence d'oxygène, la coloration issue du rouge alizarine s'intensifie en fin d'expansion. A passage équivalent, la matrice extracellulaire des cellules maintenues en culture en présence d'oxygène présente une coloration plus intense que celle des cellules cultivées en l'absence d'oxygène.*

## 2. Différenciation chondrogénique

Une étude histologique a été réalisée après maintien en culture pendant 28 jours des CSM dans un système de micromasse (culture 3D).

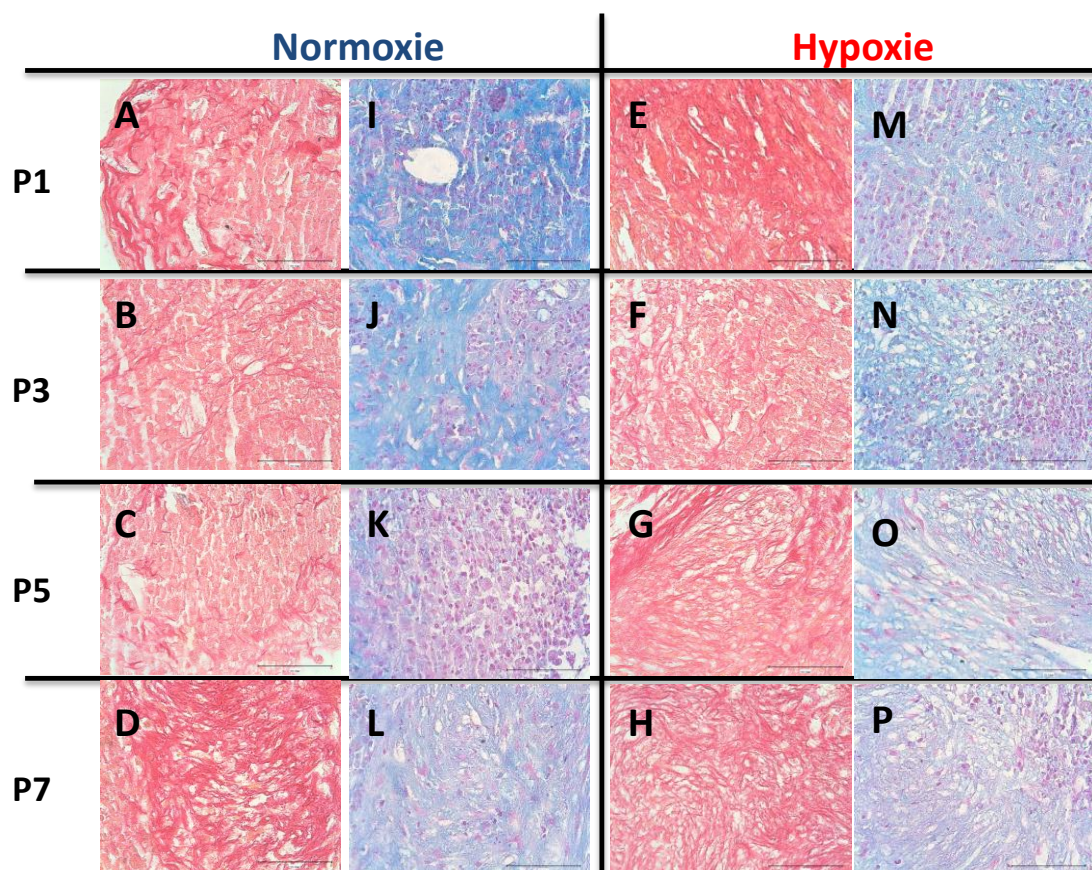
La Figure 37 montre les résultats issus de la coloration à l'HES. Les noyaux apparaissent en bleu par coloration des acides nucléiques par l'Hématoxyline, les protéines en rouge par l'Eosine et le collagène en jaune par le Safran. Il semblerait qu'en normoxie, la coloration s'affaiblisse au cours des passages, tandis qu'en hypoxie aux passages P1 et P5 la coloration est renforcée comparée aux passages P3 et P7.

La Figure 38 montre que les collagènes et les GAGs synthétisés par les culots des CSM ont été observés dans la matrice extracellulaire après 28 jours par la coloration respectivement par le Bleu Alcian et le Rouge Sirius. La matrice extracellulaire pour la présence de collagène et les GAGs semblerait avoir une coloration plus importante en P1 pour les deux conditions de culture que pour le reste des passages.



**Figure 37:** Evolution de la matrice extracellulaire des CSM après 28 jours de différenciation par coloration à l'HES.

*Après 28 jours de culture avec le milieu d'induction chondrogénique, les culots ont été traités en HES (Les Acides nucléiques en bleu par l'Hématoxyline, les protéines en rouge par l'Eosine et le collagène en jaune par le Safran).*



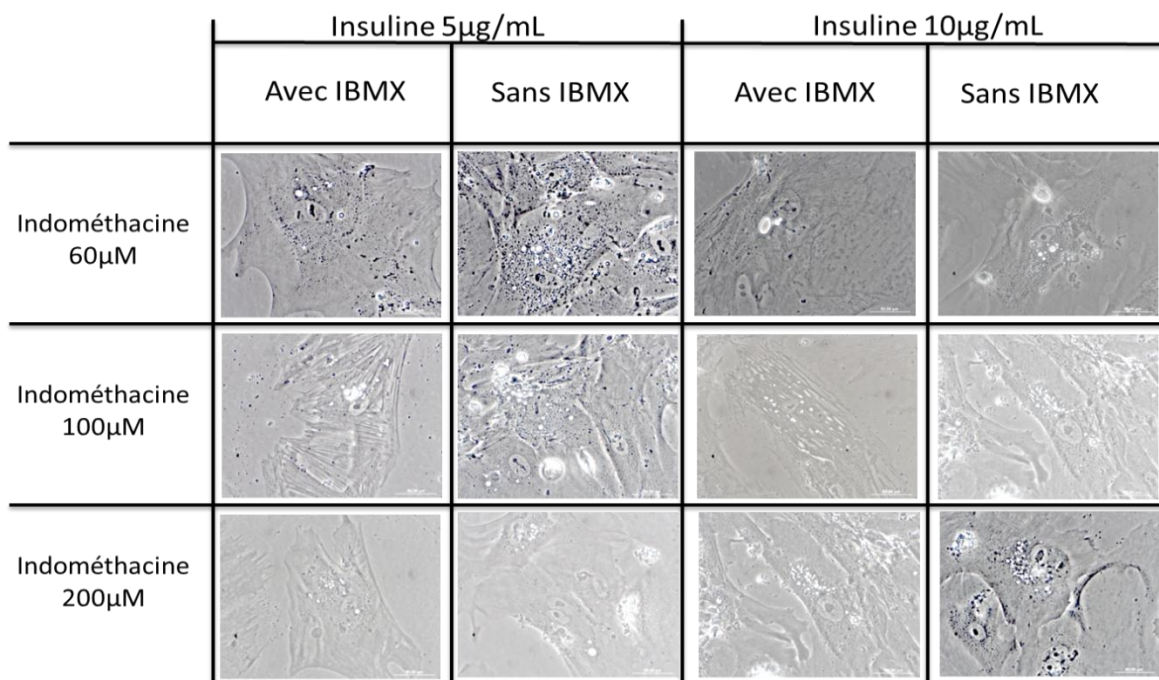
**Figure 38:** Evaluation de la synthèse matricielle (synthèse collagénique : fig. A-H et synthèse des protéoglycannes : fig. I-P) après 28 jours de différenciation chondrocytaire en présence ou absence d'oxygène (culture en pellet).

*Les PGs et les collagènes sont marqués, respectivement par le Bleu Alcian et le Rouge Sirius.*

### 3. Différenciation adipogénique

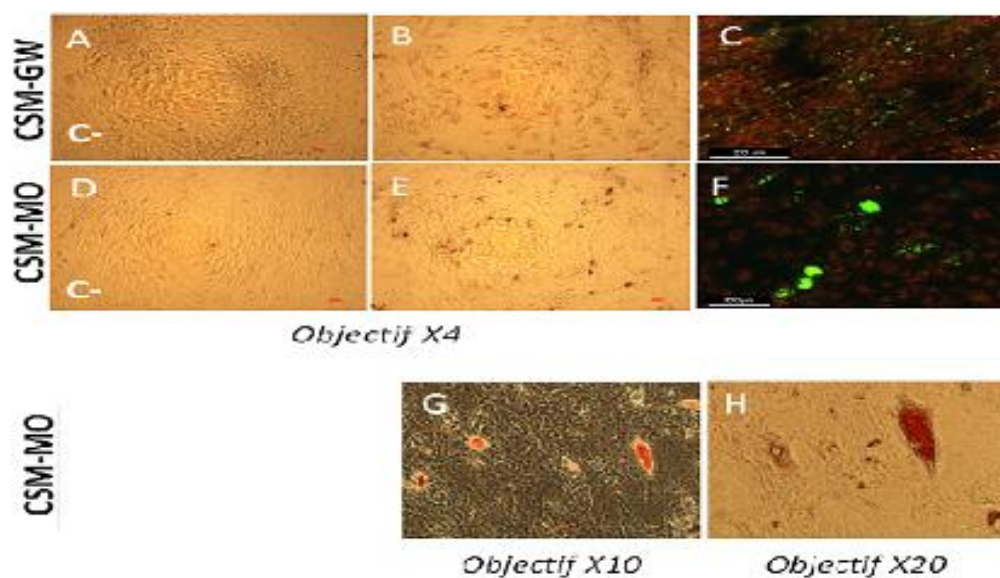
Après 21 jours de différenciation des CSM en adipocytes dans différents milieux, les cellules ne présentaient pas de gouttelettes lipidiques visibles à la microscopie optique avant et après coloration par de l'huile rouge O.

La figure 39 montre que les variations de concentration de l'insuline et de l'indométhacine et la présence ou non de l'IBMX dans le milieu d'induction adipogénique affectent sur la formation des gouttelettes lipidiques. Il semblerait que le meilleur arrangement pour un milieu de différenciation adipogénique est avec 5µg/mL avec 60µM d'Indométhacine sans l'ajout de l'IBMX.



**Figure 39:** Différentes concentration d'IBMX d'Indométhacine et d'Insuline pour la détection des vacuoles lipidiques dans les CSM avant la coloration avec de l'huile rouge O. Comparaison avec la MO (composition du milieu : DXM 1 $\mu$ M, Indomethacin 200 $\mu$ M, Insuline 10 $\mu$ M, IBMX 0,5 mM).

Quelque soit le milieu d'induction utilisé dans notre étude, la figure 40, montre que les CSM issues de la moelle osseuse peuvent plus facilement être induite dans la voie de la différenciation adipogénique que celles de la gelée de Wharton.



**Figure 40:** Images après différenciation en adipocytes des CSM humaines (P5) avec de l'huile rouge O.

La différenciation des CSM provenant de la gelée de Wharton semble difficile à obtenir.



## **Chapitre 4. Discussion**

---

Compte tenu des propriétés immunomodulatrices et de la capacité d'auto-renouvellement des CSM, ces cellules portent de grands espoirs pour l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative où la restauration des tissus lésés semble être un défi passionnant dans ce domaine. Ces cellules sont ainsi largement utilisées en thérapie allogénique et pour l'ingénierie tissulaire. Le nombre d'applications cliniques potentielles des CSM est très vaste. La grande majorité des essais actuels repose sur l'injection de CSM amplifiées. Dans l'ingénierie tissulaire, la majorité des essais concerne la réparation osseuse et cartilagineuse (Source : <http://clinicaltrials.gov>).

Le présent travail a pour objectif de caractériser sur le plan phénotypique ainsi que sur le potentiel de différenciation deux sources de CSM d'origine fœtale pouvant être utilisées en ingénierie tissulaire : le sang placentaire et la gelée de Wharton.

Dans un premier temps, pour caractériser les CSM de sang placentaire, il a fallu valider une technique de culture cellulaire. D'après la bibliographie, deux techniques étaient décrites : la méthode dite «coatée» qui consiste, avant le transfert des cellules, à traiter les plaques de culture avec du SVF pendant 30 minutes (Bieback 2004), et la méthode «optimisée» qui comprend un milieu IMDM avec 10% SVF où les cellules sont directement ensemencées sans traitement préalable (Fan 2009).

Sur les 15 sangs placentaires prélevés par les sages-femmes de la Maternité Régionale et Universitaire de Nancy, 5 ont été réservés pour la culture avec la méthode « optimisée » et 10 pour la culture avec la méthode « coatée ». Avec les deux méthodes, plus de  $10^8$  cellules mononucléées ont été mises en culture. Cependant, malgré le nombre important de poches de sang placentaire manipulées, le taux de succès de la culture n'a jamais dépassé 20% pour la méthode « optimisée » et 10% pour la méthode « coatée ». Cela se caractérisait soit par des cellules qui n'adhéraient pas au support de culture, soit par des cellules qui ne proliféraient pas. Selon Bieback *et al.*, plusieurs points cruciaux sont à respecter pour isoler et maintenir les CSM issues de sangs placentaires en culture : (i) la durée séparant la collecte de l'isolement ne doit pas dépasser 15 heures, (ii) le volume net de sang doit être supérieur à 33 mL, et (iii) le nombre de cellules mononucléées (MNC) doit être supérieur à  $1 \times 10^8$  MNCs. Même avec ces conditions réunies, les auteurs n'ont jamais dépassé un taux de succès de la culture primaire de plus de 63% (Bieback 2004). Récemment, Divya *et al.*, ont rapporté que sur 45 sang placentaires, des CSM n'ont pu être générées qu'à partir de 9 seulement (Divya 2012). Par ailleurs, lorsque des CSM peuvent être isolées à partir des prélèvements de sang placentaire, elles sont, très souvent, en faible quantité et possèdent un temps de doublement

relativement lent (Bieback 2004; Lataillade 2007; Han 2009). C'est également ce que nous avons observé. En effet, pour les cultures contenant des cellules en capacité de prolifération, si les cellules cultivées par la méthode « optimisée » atteignaient la confluence après 11 jours de culture, il en fallait en moyenne 19 pour les cellules cultivées par la méthode « coatée ». A partir de P2, plus aucune différence significative n'était observée entre les deux méthodes : les cellules atteignaient la confluence à partir d'environ 17 jours de culture. Durant ce temps de culture, le risque majeur pouvant conduire à l'arrêt de la culture des cellules était leur contamination. Selon plusieurs études, le pourcentage de CSM obtenues à partir de sang placentaire serait d'autant plus important que le prélèvement est obtenu avant le terme de la grossesse. Toutes ces études ont trouvé une corrélation inverse entre le nombre de semaine d'aménorrhée et le pourcentage de CSM disponibles dans le prélèvement ou leur capacité proliférative (Jain 2012; Ma 2012). Ne connaissant pas le nombre exact de semaines de gestation pour les prélèvements obtenus, nous ne pouvons ni affirmer ni exclure que les 3 sangs placentaires nous ayant permis d'isoler et de maintenir en culture des CSM provenaient d'accouchement ayant eu lieu une ou plusieurs semaines avant le terme.

Néanmoins, à partir de ces trois sangs placentaires, les CSM obtenues ne présentaient pas de morphologies identiques selon la méthode de culture ou selon le passage. En effet, avec la méthode « coatée », lors de la culture en P1, deux morphologies cellulaires ont pu être observées en microscopie à contraste de phase : des cellules sphériques et des cellules fusiformes. Après un passage, toutes les cellules présentaient un aspect fusiforme. En revanche, l'observation des cellules cultivées par la méthode « optimisée » a montré que, quel que soit le passage (P1 ou P2), toutes les cellules adoptaient une forme sphérique. Plusieurs études montrent la présence de populations cellulaires différentes. Biebeck *et al.*, a trouvé que, sur 29 échantillons de CSM de sang placentaire, 22 présentaient une morphologie fusiforme et 7 avaient une forme sphérique (Bieback 2004). D'autre part, en 2009, une étude réalisée par Fan *et al.*, montre aussi une hétérogénéité de population présentant des cellules fusiformes courtes ou longues et des cellules rondes. Toutefois, ces dernières n'ont pas été prises en considération comme étant des CSM (Fan 2009).

Enfin, il est à noter qu'en dehors des applications dans le domaine des maladies hématologiques, l'efficacité thérapeutique des cellules souches du sang placentaire n'a pas été démontrée jusqu'à présent par des essais cliniques. Par conséquent, compte tenu des difficultés rencontrées pour obtenir des CSM, des études publiées relatant également ces difficultés et du fait que le sang placentaire a montré son efficacité dans le traitement des

maladies hématologiques, grâce à sa richesse en cellules souches hématopoïétiques, nous nous sommes tournés, vers une autre source fœtale : le cordon ombilical lui-même.

Le tissu conjonctif du cordon ombilical appelé aussi gelée de Wharton, a attiré l'attention des chercheurs étant donnée sa richesse en cellules souches potentiellement utiles pour des applications en ingénierie cellulaire et/ou tissulaire (Mitchell 2003). Cette origine fœtale confère des avantages par rapport aux CSM issues de tissus adultes : les CSM-GW semblent plus immatures sur le plan immunologique et ont un potentiel de prolifération plus élevé. Leur phénotype est intermédiaire, entre les CSM de moelle osseuse et les cellules souches embryonnaires, bien qu'assez éloigné de ces dernières, sans les inconvénients éthiques et réglementaires liés aux cellules souches embryonnaires. Ainsi, la GW est une source extrêmement intéressante de par son obtention facile et non invasive, et d'autre part sa richesse en CSM. Ces avantages nous ont conduits à vouloir caractériser ces cellules.

La deuxième partie de notre travail a consisté à (i) observer, par microscopie confocale, une section du cordon ombilical, (ii) à identifier l'environnement matriciel des cellules par histologie et (iii) à déterminer leur phénotype *in situ*. L'observation réalisée par microscopie confocale sur 3 cordons ombilicaux a montré que les CSM-GW *in situ* présentaient une morphologie fusiforme et étoilée, caractéristique des CSM. Dans cette partie, nous avons observé une abondante matrice extracellulaire composée de collagènes et de glycosaminoglycannes qui entourait les cellules (Figure 17 A-F). Cet ensemble constitue le tissu mucoïde qu'on ne trouve qu'au niveau du cordon ombilical et dont la fonction première est de protéger les vaisseaux ombilicaux de compressions éventuelles tout en rendant relativement flexible le cordon. Ces fonctions sont possibles grâce à la composition de la matrice extracellulaire. Le collagène a été constaté comme une protéine principale de la matrice de la gelée de Wharton, avec la teneur totale en collagène rapportée à environ 550 mg/g, soit environ 50% du poids sec de la gelée. Les techniques les plus couramment utilisées pour étudier des échantillons de cartilage sont la microscopie confocale et / ou la microscopie multiphotonique (Dumas 2000) qui permettent d'obtenir des informations complémentaires à l'IRM (Rubenstein 1996; Alhadlaq 2004; de Visser 2008) et la microscopie électronique (Kouri 1996; Notzli 1997). En particulier, l'excitation multiphotonique couplée à l'imagerie de la seconde génération harmonique (SHG) et à l'analyse d'image permet l'obtention des informations structurelles sur le réseau de collagène de la matrice extracellulaire du cartilage sans aucune coloration fluorescente (Werkmeister and Dumas 2008; Werkmeister 2008).

Ainsi, en absence de marquage fluorescent, l'association d'une excitation de type multiphoton avec la détection de signal SHG nous a permis de distinguer la présence d'un

réseau matriciel composé de fibrilles collagéniques se révélant être du collagène de type I (Figure 20). Nanaev *et al.*, à l'aide d'imagerie par immunofluorescence, ont examiné la distribution de ces protéines dans la matrice extracellulaire de la gelée de Wharton. Les collagènes de types I, II et VI sont répartis de manière homogène à travers toute la couche de la gelée de Wharton (Nanaev 1997). D'autre part, pour les GAGs, il a été constaté que l'acide hyaluronique (HA) constituait environ 70% de la teneur totale des glycosaminoglycannes de la gelée de Wharton (Sobolewski 1997). Il est reconnu que la présence d'HA dans un tissu lui confère des propriétés mécaniques telles que la viscoélasticité et la résistance à la compression grâce notamment à l'entretien de l'hydratation du tissu.

Avant d'inclure les CSM de la gelée de Wharton en culture en monocouche, un immunophénotypage sur des coupes de 3 cordons ombilicaux a permis d'étudier l'expression des différents marqueurs mésenchymateux dans la gelée et dans la région périvasculaire. Expérimentalement, des coupes de cordon ombilical ont été marquées avec plusieurs anticorps fluorescents dirigés contre un grand nombre de clusters de différenciation puis observés par microscopie confocale. Nos résultats montrent que les cellules présentes dans la gelée de Wharton n'expriment pas forcément tous les marqueurs reconnus pour caractériser des CSM. En effet, si les cellules expriment fortement les marqueurs CD90, CD166, CD73 et CD146, l'expression des marqueurs CD146, CD271 et CD105 semble plus faible. Par ailleurs, dans la région périvasculaire, l'expression des marqueurs CD73, CD105, CD166 et CD271 est restée difficilement détectable contrairement aux marqueurs CD90 et CD146. L'expression de certains de ces marqueurs, comme CD146, a déjà été étudiée *in situ*. Ainsi, Baksh *et al.* ont également constaté une hétérogénéité dans l'expression de CD146 puisqu'ils ont rapporté qu'il était fortement exprimé dans la région périvasculaire mais pas dans la gelée de Wharton (Baksh 2007). L'expression de ces marqueurs de surface fluctue entre différentes études et peut dépendre de la localisation de ce marqueur (périvasculaire vs intravasculaire) dans les cellules extraites du cordon ombilical. Nous pouvons alors supposer que si les cellules expriment à des degrés variables les marqueurs mésenchymateux dans la matrice du cordon ombilical, cela signifie qu'il existe probablement des sous-populations de cellules souches mésenchymateuses : la première exprime CD146 tandis que la seconde (région périvasculaire) est dépourvue de ce marqueur. De ce fait, il serait intéressant de comparer le potentiel de différenciation des cellules issues de ces deux régions.

Par ailleurs, certains auteurs ont décrit les marqueurs CD271 et CD146 comme des indicateurs spécifiques des CSM de la moelle osseuse (Quirici 2002; Jarocho 2008; Battula 2009). CD271 compterait parmi les marqueurs les plus sélectifs pour la caractérisation et la

purification des CSM de la moelle osseuse (Buhning 2007). Le fait qu'il soit présent dans le tissu conforte l'idée que les cellules de la gelée de Wharton possèdent bien un phénotype mésenchymateux. Or, dans notre étude, en comparant l'expression de ce marqueur *in situ* par rapport à celle observée de la surface de cellules extraites de la GW puis maintenues en culture jusqu'au premier passage, nous constatons que si le marqueur CD271 est exprimé *in situ*, son expression disparaît à la surface des cellules cultivées *in vitro*. Ishige *et al.*, ont également montré l'absence du marqueur CD271 à la surface des CSM issues de la gelée de Wharton après l'isolement de ces cellules par la méthode des explants (Ishige 2009).

En utilisant la méthode enzymatique, nous avons réussi à isoler les CSM du cordon ombilical et nous avons évalué la quantité de CSM disponibles. Sur 3 échantillons traités, nous avons observé que le cordon ombilical humain contenait en moyenne  $7,8 \times 10^5$  cellules par cm de cordon. Le nombre de CSM potentiellement disponible après 24 heures de culture était de  $6,7 \times 10^5$  cellules par cm de cordon. En prenant en compte nos résultats et le fait que la longueur moyenne du cordon ombilical est d'environ 25 cm, on peut s'attendre à récupérer en moyenne 16 millions de cellules, si toute la longueur du cordon est digérée. La dose moyenne de CSM, qui est actuellement appliquée dans les essais cliniques pour l'amélioration de la prise de greffe hématopoïétique ou le traitement de la maladie de greffon contre l'hôte (GvDH) correspond à  $1-2 \times 10^6$  CSM/Kg (Battiwalla 2009). Dans nos conditions de culture, en se basant sur l'hypothèse que le poids corporel moyen d'un homme adulte correspond à environ 80 Kg, cette dose peut être facilement produite après quelques passages (d'après nos conditions de culture que nous discuterons plus loin : P2 en présence d'oxygène voire dès P1 en absence d'oxygène), si elles sontensemencées à une densité de 1000 Cellules par  $\text{cm}^2$ .

Lorsque l'on compare notre rendement d'extraction des cellules à ceux rapportés dans la littérature par d'autres équipes utilisant la collagénase seule pour digérer le cordon, nous pouvons nous apercevoir qu'il est supérieur (Tableau XI). Le procédé d'isolement de nos cellules consistait à digérer les cellules de la gelée de Wharton avec de la collagénase type I à 1mg/mL pendant 16 heures à 37°C. Les méthodes de digestion enzymatique utilisées par les autres équipes sont différentes : Sarugaser *et al.*, et Romanov *et al.*, ont utilisé la même méthode d'isolement mais avec un temps d'incubation de 18 à 24 heures (Romanov 2003; Sarugaser 2005). Par contre Salehinejad *et al.*, ont diminué le temps d'incubation à moins de 3 heures et changé le type d'enzyme (Collagénase B) (Salehinejad 2012). D'autres équipes ont préféré l'utilisation d'un cocktail d'enzymes. A la lecture du Tableau XI, nous pouvons voir que le rendement est très hétérogène d'un protocole à un autre. Plusieurs paramètres

peuvent affecter le rendement cellulaire lors de l'isolement des cellules de la gelée de Wharton.

**Tableau XI:** Etudes du nombre de cellules nucléées obtenues à partir de cordons ombilicaux.

Méthode Enzymatique	Cellules nucléées /cm de Cordon	Références
<b>Digestion enzymatique avec collagénase seule</b>	Collagénase type I 1mg/mL pendant 16h	7.8 x 10 <sup>5</sup> (Margossian 2012)
	Collagénase type B 1µg/mL pendant 4h	2.6 x 10 <sup>4</sup> (Karahuseyinoglu 2007)
	Collagénase 1mg/mL pendant 18 - 24h	2.5 – 25 10 <sup>4</sup> (Sarugaser 2005) (Romanov 2003) (Wang 2004)
	Collagénase type B 1mg/mL pendant 3h	9 x 10 <sup>4</sup> (Salehinejad 2012)
<b>Digestion enzymatique avec un mélange d'enzymes</b>	Collagénase type II 0,075% pendant 30min, trypsine 0,125% pendant 30min	1 x 10 <sup>6</sup> (Lu 2006)
	Collagénase type I 2,7mg/mL, hyaluronidase 0,7mg/mL, trypsine 2,5% pendant 3h	0.95 x 10 <sup>6</sup> (Tsagias 2011)
	Collagénase type II 0,4% et DNase 0,01% pendant 30min	0.5 10 <sup>6</sup> (Tong 2011)
	Hyaluronidase, collagénase, trypsine pendant 45-60 min	1,5 – 1,7 x 10 <sup>4</sup> (Weiss 2006)
	Hyaluronidase 1,5mg/mL, mélange d'enzyme libérase purifié 0,5mg/mL pendant 30min	1,5 – 2 x 10 <sup>4</sup> (Montanucci 2011)
	Collagénase type B 1mg/mL pendant 3h, trypsine 2,5% pendant 15 min	0,5 – 1 x 10 <sup>4</sup> (Salehinejad 2012)
Collagénase type I 1mg/mL pendant 3h, hyaluronidase 300µg/mL pendant 2h, trypsine 2,5% pendant 15min	0,25 x 10 <sup>4</sup> (Salehinejad 2012)	

Parmi ces paramètres : le temps d'incubation, la concentration et le type d'enzyme utilisée ont une influence sur le nombre des cellules obtenues. L'activité métabolique des CSM obtenues a été évaluée grâce au pourcentage d'Alamar Blue réduit rapporté au nombre

de cellules présentes dans le même échantillon. Il apparaît que si l'activité métabolique semble être faible au début de la culture (1<sup>er</sup> jour après la digestion enzymatique) elle augmente significativement au 5<sup>ème</sup> jour et paraît être plus importante en P1 qu'en P0. Si nous comparons ces résultats à ceux obtenus au sein du laboratoire sur des CSM de la MO, il apparaît qu'au cours de la première semaine de la culture (jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour) les cellules gardent une activité métabolique constante (Tritz-Schiavi 2010). Il semble donc que les CSM de la gelée de Wharton ont une activité métabolique plus rapide que les CSM de la moelle osseuse.

Outre l'isolement des cellules par une digestion enzymatique, il est également possible d'isoler ces dernières en se basant sur la capacité de migration des cellules au cours du temps. C'est ce que nous appelons la méthode « mécanique » ou méthode des explants. Ces deux techniques, enzymatique ou mécanique, peuvent influencer sur la quantité et la qualité des cellules isolées en modifiant notamment la capacité de prolifération des cellules isolées. La méthode enzymatique utilisant la collagénase permet d'extraire plus rapidement les cellules (24 heures après la digestion) et d'obtenir une densité cellulaire plus élevée par rapport à la méthode mécanique. Toutefois, cette méthode induit plus de risque de contamination. Par ailleurs, en 2012, Salehinejad *et al.* ont montré que les méthodes de digestion enzymatique diminuaient la viabilité cellulaire due à l'activité lytique et à la sensibilité aux collagénases (Salehinejad 2012). Nous avons, également montré que la méthode de digestion enzymatique pouvait affecter de manière significative le niveau d'expression de la plupart des marqueurs de surface caractérisant la cellule mésenchymateuse. A l'exception du récepteur CD164, une proportion plus importante de CSM exprimait les récepteurs CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, et CD166 après isolement par la méthode mécanique. Cette différence pourrait être due au traitement enzymatique qui aurait clivé les marqueurs de surface. Si la culture se poursuit au-delà du premier passage, il n'est pas surprenant de voir une augmentation d'expression de ces marqueurs à la surface de cellules obtenues par digestion enzymatique étant donné que ces derniers sont responsables de l'adhérence cellulaire ou sont des molécules de signalisation (Salmi 1995; Bajorath 2000; Boquest 2005). Dans la suite de notre étude, nous avons décidé de n'utiliser que la méthode mécanique ou méthode des explants pour isoler les cellules de la gelée de Wharton, nous avons établi des lignées de cellules souches mésenchymateuses humaines à partir de la gelée de Wharton, et nous les avons caractérisées pendant 7 passages.



Nous avons souhaité nous intéresser aux effets de l'Oxygène sur le comportement de ces CSM de gelée de Wharton. En effet, comme pour toutes les autres lignées cellulaires, les cellules souches ont été initialement cultivées en normoxie en accordant peu d'attention au milieu métabolique de la niche dans laquelle elles résidaient habituellement. Toutefois, l'effet de la concentration d'oxygène sur ces cellules commence à être montré et il apparaît qu'une faible tension en oxygène influence considérablement à la fois la biologie des cellules souches embryonnaires et adulte (Panchision 2009; Silvan 2009; Eliasson 2010; Nekanti 2010).

Nous avons en premier lieu étudié l'influence de la concentration de l'oxygène sur la morphologie et la capacité de prolifération de ces cellules en comparant les conditions de normoxie (21% O<sub>2</sub>) et d'hypoxie (5% O<sub>2</sub>). Les CSM provenant du cordon ombilical possèdent une morphologie de type fibroblastique observée dès P0 et jusqu'à P7, et aucune différence n'a été observée au niveau de la forme des cellules entre les deux conditions de culture (Figure 29).

Le doublement de population diminue significativement ( $p < 0,001$  P0 vs P7) au cours de l'expansion, particulièrement en présence d'oxygène. En revanche, en hypoxie, bien qu'il semblait exister une diminution du temps de doublement, entre P0 et P7, celle-ci n'est pas apparue comme significative ( $p > 0,05$  P0 vs P7) (Figure 30). D'autres auteurs ont pu montrer que les CSM de la moelle osseuse cultivées dans des conditions de normoxie présentent une sénescence prématurée et une réduction de doublement de population par rapport à des cellules cultivées en conditions d'hypoxie (Grayson 2007; Dos Santos 2010), et peuvent également limiter la division cellulaire en raison du raccourcissement des télomères et la sénescence répllicative (Bertram 2008; Wagner 2010). Néanmoins, les cellules souches mésenchymateuses provenant du cordon ombilical prolifèrent nettement plus rapidement que les CSM isolées à partir de la moelle osseuse (Sarugaser 2005; Baksh 2007; Can 2007; La Rocca 2009). La capacité migratoire des CSM cultivées en hypoxie est également renforcée par opposition à celle observée en normoxie (Rosova 2008).

Dans notre étude le temps de doublement est calculé selon la formule suivante (*Temps de doublement* =  $T_p \times \text{Log}2 / (\text{Log} (N_f/N_i))$  avec,  $T_p$  = temps de culture (heures),  $N_f$  = nombre final de cellules,  $N_i$  = Nombre initial de cellules). Le potentiel de prolifération des CSM cultivées en présence ou absence d'oxygène montre qu'en début de culture, aucune différence entre les 2 conditions de culture n'a été observée. En revanche, il apparaît qu'en P6 et P7, les cellules cultivées en présence d'oxygène mettent, respectivement, 3,3 et 2,9 fois plus de temps pour doubler la population qu'en condition « hypoxie » (Figure 31). Nekanti *et al.*, a également montré qu'en hypoxie, les CSM de la gelée de Wharton possèdent une prolifération

supérieure et un temps de doublement de population inférieur à ceux observés en normoxie (Nekanti 2010).

En conséquence de ces observations, dans notre étude, à partir d'un cordon de 15cm de longueur, il est possible d'aboutir à  $2,6 \times 10^{13}$  cellules au 6<sup>ème</sup> passage si elles sont cultivées dans une condition normoxie et  $3 \times 10^{14}$  cellules si elles sont cultivées dans une condition hypoxie.

Cette expansion rapportée en conditions hypoxique peut être reliée à la présence d'une activité télomérase. En effet, Grayson et al ont montré que la culture des CSM en hypoxie est accompagnée d'une augmentation de l'activité télomérase et de l'expression du facteur de transcription Oct4 (Grayson 2007) qui sont impliqués dans le maintien de caractère « souche ». En outre, l'hypoxie active les voies moléculaires dans de multiples systèmes de cellules souches qui semblent réguler Oct4 et la signalisation Notch, deux régulateurs importants du caractère « souche » (Simon 2008). Enfin une concentration de 3-5% semble maintenir la pluripotence de ces cellules (Ezashi 2005).

Dans un second temps, nous avons exploré l'impact de la concentration de l'oxygène sur l'expression des marqueurs de surface au cours de l'amplification (P0 à P7) et sur le potentiel de différenciation des cellules (P1, P3, P5 et P7).

En effet, à l'issue de la culture en monocouche, un immunophénotypage des CSM a été réalisé à chaque passage et dans chacune des conditions de culture (normoxie ou hypoxie). Tout au long de la culture, quelles que soient les conditions, la proportion de cellules possédant les marqueurs hématopoïétiques (CD34 et CD45), et exprimant HLA-DR est toujours restée inférieure à 5% (Figure 32). D'autre part, les cellules étaient positives à plus de 70% et tout au long de la culture pour CD29, CD44, CD73, CD90, et CD166 en normoxie et CD29, CD44 et CD90 en hypoxie. Toutefois, pour les marqueurs CD105, CD146 et CD164, il semblerait que la proportion de cellules exprimant ces récepteurs soit plus importante au fur et à mesure de l'amplification dans des conditions « Normoxie ». En normoxie, CD105 a atteint un pourcentage maximal en P4 (40%) et a gardé son expression constante jusqu'à P7. Par contre en hypoxie ce marqueur est exprimé à moins de 40% tout au long de l'expansion. En 2006, Weiss *et al.*, ont rapporté que CD105 est fortement exprimé (97%) dans les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton au quatrième passage, mais cette expression diminue en P8 (25%) (Weiss 2006). En revanche, Kim *et al* (2011) ont trouvé que CD105 est fortement exprimé en P3 (85%), mais il a également observé que seulement près de 60% de ces cellules affichent l'expression de ce marqueur en P9 (Kim 2011). D'autre part, le CD146, dans les deux conditions de culture, la proportion maximale

atteinte des cellules exprimant ce récepteur au cours de l'amplification est entre 42% (Normoxie) (Figure 33) et 55% (Hypoxie) (Figure 34). Nos résultats sont conformes avec ceux du Schugar *et al.*, qui a montré que les CSM de la gelée de Wharton possèdent une expression constante de CD146 (environ 50%) tout au long de la culture (jusqu'au passage 10) (Schugar 2009). Dans notre étude, le pourcentage d'expression du marqueur CD105 pour les deux conditions de culture est relativement plus faible que la MO. De même, comme nous avons aussi remarqué, l'expression des marqueurs de surface CD146 et CD105 semble faible dans la gelée de Wharton.

Mise à part pour l'expression du récepteur CD73, la concentration en oxygène n'a pas semblé influencer de manière significative l'expression de marqueurs de surface caractérisant les CSM. Pour le récepteur CD73, les cellules cultivées en absence d'oxygène exprimaient moins ce récepteur à leur surface que leurs homologues cultivées en présence d'oxygène ( $p < 0,05$  en P1 et P2) (Figure 35). Le CD73 est un facteur de prolifération et est impliqué dans le contrôle de la croissance cellulaire. Il est connu comme étant un marqueur de différenciation (annexe). La plus faible expression de CD73 en condition d'hypoxie suggère une capacité de différenciation diminuée. Nous suggérons que même si les CSM de la gelée de Wharton possèdent une meilleure capacité de prolifération en absence d'oxygène, cependant leur potentiel de différenciation sera probablement meilleur en normoxie.

Nous avons ensuite étudié les capacités de différenciation des CSM de Gelée de Wharton en cellules issues du feuillet mésodermique : en ostéoblastes, chondroblastes et en adipocytes.

Au cours des deux dernières décennies, les CSM ont été amenées en clinique pour plusieurs raisons. Initialement, les CSM ont été utilisés dans un certain nombre d'études visant à créer le cartilage ou le tissu osseux par thérapie cellulaire en raison de leur potentiel de différenciation chondrocytaires et ostéocytaires *in vivo* (Noel 2002).

Les études de Schneider *et al.* (2010) suggèrent différents mécanismes pour la formation de cellules osseuses pour les CSM provenant de cordon ombilical par rapport à la moelle osseuse. Les propriétés de différenciation ostéogénique des CSM de cordon ombilical sont renforcées par le contact avec le collagène, alors que les CSM de la moelle stimule la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire, y compris le collagène de type I, III et IV. Cette même étude a montré que les CSM du cordon ombilical plus cultivées sur des surfaces rigides présentent des caractéristiques correspondant aux ostéoblastes plus matures qui sont déterminés par la mesure de l'expression de l'ARNm pour les plus importants facteurs spécifiques de la lignée ostéogénique tels que Runx2 et l'ostéocalcine. L'expression la plus

élevée a été observée sur des lames de verre. La forte réaction ostéogénique des CSM du cordon ombilical avec le substrat rigide, a été également confirmée par la coloration de minéralisation et est attribuée au fait qu'un tel substrat imite le mieux le micro-environnement de l'os naturel (Witkowska-Zimny 2012).

Par ailleurs, nos résultats sur la différenciation ostéogénique ont montré que celle-ci a été obtenue après 21 jours de la culture (Figure 36). D'autres études récentes nécessitaient plus de temps (Karahuseyinoglu 2007; Salehinejad 2012). Par contre, Nous constatons qu'après la coloration histologique, l'hypoxie semble exercer un effet initial inhibiteur sur la différenciation ostéogénique, puis cette dernière semble augmenter au cours des passages. Nekanti et al., a montré qu'en hypoxie, les CSM de la gelée de Wharton conservent leur potentiel de différenciation en lignées multiples (ostéocytaire, chondrocytaire et adipocytaire) (Nekanti 2010). Une autre étude a montré aussi que les CSM du cordon ombilical cultivés dans 5% d'oxygène ont conservé leur potentiel de différenciation en lignée mésenchymateuse, y compris l'adipogenèse, l'ostéogenèse et la chondrogenèse (Farias 2011). D'autre part, le renforcement de la différenciation ostéogénique des CSM du tissu adipeux peut être induit sous normoxie (Malladi 2006; Markway 2010).

Heureusement, jusqu'ici, les études cliniques signalées n'ont pas suggéré des effets indésirables critiques des CSM sur un état pathologique dans de nombreux cas. Par conséquent, l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses en thérapeutique peut être considérée comme sûre.

Dans notre étude la différenciation chondrocytaire des CSM du tissu adipeux a été observée à des niveaux accrus dans les conditions d'hypoxie où l'ostéogenèse est inhibée.

En 2012, une étude conclue que les CSM de la gelée de Wharton cultivées sur des échafaudages en nano-fibres avec 16 ng/mL du bFGF permettront d'avoir une meilleure induction chondrogénique *in vitro* par rapport aux CSM de la moelle osseuse (Fong 2012). Une autre étude a montré que le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) entraîne une augmentation de l'élastine après 7 jours d'induction chondrogénique des CSM de la gelée de Wharton. ce facteur peut être considéré comme un complément utile dans le maintien du phénotype du cartilage élastique dans l'ingénierie tissulaire des CSM issues de la gelée de Wharton du cordon ombilical (Caballero 2013). D'autres études révèlent une légère augmentation de l'expression des marqueurs de surface comme le CD40 et CD80 après la différenciation chondrocytaire des CSM de la gelée de Wharton (Liu 2012).

D'autres études sont nécessaires pour clarifier le potentiel de différenciation des CSM de la gelée de Wharton pour leur utilisation dans la régénération des tissus et dans la thérapie

cellulaire. Il serait bien d'examiner dans les travaux futurs le rôle de l'hypoxie sur l'expression de ces facteurs lors de la différenciation chondrocytaire.

Notre travail a montré que la différenciation *in vitro* des CSM amplifiées à partir de la gelée de Wharton pour tous les passages, a permis de vérifier que ces cellules humaines isolées gardent leur potentiel de différenciation ostéocytaire et chondrocytaire au moins jusqu'au septième passage.

Contrairement aux potentiels de différenciation chondrocytaire et ostéocytaire, qui sont confirmés par plusieurs équipes, les résultats concernant la capacité de différenciation adipocytaire des cellules provenant de la gelée de Wharton du cordon ombilical sont très différents. En effet, les cellules ont été cultivées pendant 21 jours dans un milieu adipogénique puis ont été évaluées par coloration d'huile rouge O (Figure 38). Nous avons constaté que les cellules ne se différenciaient que faiblement en adipocytes. La majorité des cellules provenant de l'ensemble de tissu du cordon ombilical n'a pu terminer la différenciation adipocytaire, même après l'ajout des substances nécessaires puissantes pour une telle différenciation. Deux paramètres sembleraient affecter leur potentiel de différenciation : la méthode de coloration et le temps d'incubation.

Nous avons aussi démontré que la concentration de l'insuline de l'indométhacine et la présence ou non de l'IBMX affectent sur la formation des vacuoles lipidiques qui ont été observées par la coloration avec de l'huile rouge O lors de la différenciation adipocytaire (Figure 39).

De même, en 2007, Karahuseyinoglu *et al.*, ont rapporté que les cellules ont montré un phénotype adipocytaire après 40 jours (Karahuseyinoglu 2007). D'autre part, en 2011, Struys *et al.*, rapportent que seulement un tiers des CSM humaines avait un potentiel adipogénique (Struys 2011).

Alors que certaines études décrivent un potentiel adipocytaire comparable aux cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (Tsagias 2011; Salehinejad 2012), d'autres études montrent que les cellules recueillies à partir du cordon ombilical humain sont faiblement différenciées en adipocytes et seulement certains d'entre eux sont capables de subir et d'exprimer des vacuoles lipidiques (Struys 2011).

En 2013, l'équipe Huang *et al.*, a observé une différence liée à l'âge de la mère lors du potentiel de différenciation adipocytaire des CSM dérivées du cordon ombilical. L'étude est basée sur deux groupes différents : le premier dont l'âge varie entre 19 et 25 (groupe jeune) et le second entre 29 et 35 (groupe âgé). La capacité de différenciation adipogénique des CSM était beaucoup plus importante chez les femmes âgées par rapport à celles du groupe de

jeunes, d'où l'étude conclue que les femmes âgées peuvent être considérées comme une source de cellules disponibles pour l'ingénierie du tissu adipeux. Cette étude raisonne que cela pourrait être attribué à une diminution de l'état fonctionnel des organes due à l'âge de la mère, qui assurent un rôle de soutien et de microenvironnement qui permettent le développement des CSM du cordon ombilical pour une si longue durée (Huang 2013).

Toutefois d'autres incertitudes demeurent quant à l'impact des différences individuelles (production des hormones, obésité, durée de gestation, etc...) sur la différenciation adipocytaire des CSM du cordon ombilical. Ces incertitudes pourraient avoir une importance pertinente sur la mise en place de cellules souches mésenchymateuses dans les applications pratiques.

Les caractéristiques biologiques favorables et l'absence de questions éthiques relatives à l'application des CSM de la gelée de Wharton du cordon ombilical suggèrent que ces cellules pourraient être des candidats prometteurs pour l'ingénierie tissulaire et la thérapie de cellules souches. La compréhension des mécanismes et des processus moléculaires de la différenciation des cellules souches sous-jacente et la détermination du destin cellulaire n'est pas complète. Les raisons qui mènent ces divergences doivent encore être clarifiées par des expériences ultérieures. Il faut cependant penser que le potentiel de différenciation des cellules du cordon ombilical dépend de leur localisation dans le tissu du cordon ombilical.



## **Chapitre 5. Conclusions et Perspectives**

---



Actuellement, les critères de choix du tissu d'origine des CSM pour les essais cliniques reposent essentiellement sur la richesse des prélèvements et leur facilité d'accès. L'isolement des CSM à partir de prélèvement de moelle osseuse reste la méthode la plus employée. Cependant, la nécessité d'avoir recours à une anesthésie générale, le risque plus élevé d'une contamination virale des prélèvements, et l'impact de l'âge du donneur sur la capacité de prolifération et de différenciation des cellules sont des inconvénients à prendre en compte. C'est pourquoi, les chercheurs se sont tournés vers d'autres sources de CSM, notamment les tissus fœtaux (sang placentaire et gelée de Wharton du cordon ombilical). Leurs propriétés les situent entre les CSM de moelle osseuse et les cellules souches embryonnaires, sans les inconvénients éthiques et réglementaires liés à ces dernières. Leur isolement est relativement facile puisque le cordon ombilical est considéré comme un déchet opératoire. Bien qu'ayant les mêmes caractéristiques que les CSM issues de tissus adultes, les CSM provenant des tissus fœtaux semblent plus immatures sur le plan immunologique, ont un potentiel de prolifération plus élevé et peuvent se différencier en un nombre de tissus plus important (elles peuvent se différencier en adipocytes, ostéocytes ou en chondrocytes et même dans certaines conditions en cellules cardiaques ou hépatiques).

L'enjeu de ce travail de thèse a donc été d'identifier et d'amplifier ces cellules souches mésenchymateuses issues du sang placentaire et surtout du cordon ombilical lui-même (plus spécifiquement de la GW). Les cellules ainsi produites ont été caractérisées sur le plan phénotypique et fonctionnel.

Dans un premier temps, pour caractériser les CSM de sang placentaire, il a fallu valider une technique de culture cellulaire. D'après la bibliographie, deux techniques étaient décrites : la méthode dite « coatée » et la méthode « optimisée ». Malgré le nombre important de poches de sang placentaire manipulées, quelle que soit la méthode de culture utilisée, le taux de succès de la culture n'a jamais dépassé 20%. Dans le sang placentaire, la concentration en CSM est plus faible que dans la moelle (1 pour  $10^8$  cellules mononucléées dans le sang *versus* 1 pour  $10^5$  cellules dans la moelle osseuse), ce qui rend très difficile leur expansion. La difficulté à obtenir des CSM a été également relayée par d'autres auteurs qui ont montré une corrélation inverse entre le nombre de semaine d'aménorrhée et le pourcentage de CSM disponibles dans le prélèvement ou leur capacité proliférative (Jain 2012; Ma 2012). Ne connaissant pas le nombre exact de semaines de gestation pour les prélèvements obtenus, nous ne pouvions ni affirmer ni exclure que les sangs placentaires nous ayant permis d'isoler et de maintenir en culture des CSM provenaient d'accouchement ayant eu lieu une ou plusieurs semaines avant le terme. Par conséquent, compte tenu des difficultés

rencontrées, nous nous sommes tournés vers une autre source fœtale : le cordon ombilical lui-même.

Au cours de la seconde phase du projet, nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'environnement physiologique des CSM. Nous avons montré que la gelée de Wharton se composait de cellules entourées d'une abondante matrice extracellulaire riche en collagènes et glycosaminoglycannes et que les CSM possédaient un phénotype variable selon leur localisation dans la gelée. Cela nous laisse penser qu'il existerait probablement des sous-populations de cellules souches mésenchymateuses à l'intérieur même de la gelée de Wharton. Après avoir retiré l'épithélium, la veine et les artères du cordon, une digestion enzymatique de la gelée de Wharton a montré que cette source générait une quantité importante de CSM (environ  $6,7 \times 10^5$  CSM potentielles pour un centimètre de cordon). Etant donné dans notre étude que la longueur moyenne des cordons ombilicaux est de 25 cm, le nombre total de CSM disponibles dans un cordon entier pourrait être d'environ 16 millions. D'un point de vue thérapeutique, cette source présente l'avantage de pouvoir réaliser un grand nombre de doses thérapeutiques à partir d'un seul prélèvement et après une expansion sur seulement quelques passages.

L'influence de la concentration en oxygène au cours de l'amplification des cellules a également été étudiée. Pour cela, les CSM-GW ont été cultivées jusqu'au septième passage en normoxie (21%) ou en hypoxie (5%). Une caractérisation des cellules a été réalisée à l'issue de différents passages (P1, P3, P5 et P7) et consistait en une étude de la prolifération mais aussi du potentiel de différenciation. Quel que soit le passage, la faible teneur en oxygène au cours de l'expansion ne semble pas avoir d'effet sur le phénotype des cellules tandis qu'elle semble diminuer le temps de doublement des CSM. D'après les colorations histologiques, l'hypoxie au cours de l'expansion puis tout au long de la différenciation semble favoriser la chondrogénèse et inhiber la différenciation ostéogénique. En revanche, quelles que soient les conditions de culture, la différenciation adipogénique des CSM-GW semble difficile à obtenir. Dans de futurs travaux, il faudra comprendre pourquoi les cellules issues de cette source fœtale rencontrent autant de difficulté à s'engager dans cette voie de différenciation.

L'ensemble de nos travaux ont montré que les cellules souches du cordon ombilical possédaient de multiples avantages:

- Chaque cordon peut générer une quantité importante de CSM ce qui permettrait de préparer des lots homogènes pour le traitement de patients, ce qui fait défaut aujourd'hui avec les CSM de la moelle osseuse.

- Ces CSM ont des propriétés au moins équivalentes à celles déjà décrites dans de précédents travaux de la moelle osseuse.

- Le 3<sup>ème</sup> avantage qui est très important, est que ces cellules souches sont bien tolérées d'un point de vue immunologique (faible expression des molécules HLA).

Bien entendu, tous ces avantages nécessitent des développements complémentaires, en particulier de la stabilité des lignées au cours de l'expansion (longueur des télomères et absence de transformation maligne à travers le caryotype) et de la caractérisation fonctionnelle (expression d'HLA-G et caractère multipotent de ces cellules).

La caractérisation fine de ces cellules permettrait à moyen terme de :

- réaliser un transfert technologique de la recherche vers la clinique d'une méthode d'isolement et de production de CSM issues de la Gelée de Wharton du cordon ombilical.
- créer une banque de cellules souches mésenchymateuses finement caractérisées qui seraient disponibles pour des applications pré-cliniques et cliniques de Médecine régénérative, (intéressant le muscle cardiaque, les vaisseaux, les tissus osseux, le cartilage, et même d'autres tissus ou organes). D'autres applications pourront également être concernées comme le traitement de la réaction du Greffon contre l'Hôte (GvHD, survenant après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques) ou encore le traitement du choc septique.

---

## Annexe

---

### CD34

Le CD34 est une protéine transmembranaire à simple chaîne d'environ 116 kDa. Il est exprimé sur les cellules souches/progénéiteurs hématopoïétiques immatures, les cellules endothéliales des capillaires, les fibroblastes embryonnaires et quelques rares cellules gliales du tissu nerveux (Krause 1996)

L'expression du CD34 semble être maximale sur les progénéiteurs les plus précoces et diminue progressivement avec la maturation (Civin 1990).

C'est un antigène de différenciation des leucocytes spécifique à un stade plutôt qu'à une lignée. Les précurseurs lymphoïdes B définissables les plus immatures (CD19+/CD10+ sont CD34+ (Civin 1990; Krause 1996). Les précurseurs lymphoïdes T immatures expriment également la TdT et le CD34+ (Krause 1996). Les lymphocytes, les monocytes, les granulocytes et les plaquettes du sang périphérique normal n'expriment pas le CD34. Environ 60 % des leucémies à lymphocytes B aiguës, 40 % des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) et 1 à 5 % des leucémies à lymphocytes T aiguës expriment le CD34 (Civin 1990). On constate que les leucémies lymphoïdes chroniques, les lymphomes et plusieurs types de myélomes présentent un résultat uniformément négatif au CD34 (Civin 1990; Krause 1996).

### CD45

Le CD45 est une protéine transmembranaire à chaîne unique de type I qui est exprimée généralement à un degré élevé dans les cellules nucléées d'origine hématopoïétique (Sewell WA 1997). Par conséquent, il est présent dans les lymphocytes B et T, les granulocytes, les monocytes et les macrophages, à l'exception des érythrocytes et des mégacaryocytes en cours de maturation (Leong AS-Y 1999). Il existe cinq isoformes différentes du CD45, en fonction de l'épissage différentiel des exons 4, 5 et 6. Le poids moléculaire des isoformes varie mais tout en gardant en commun le même segment intracellulaire qui joue un rôle fonctionnel dans l'activation et la différenciation lymphocytaire (Sewell WA 1997).

### **CD29 (intégrine $\beta$ 1)**

Les intégrines jouent un rôle majeur dans la médiation des interactions entre les cellules et leur environnement de la matrice extracellulaire (ECM). En effet ils interagissent avec l'ECM à travers leurs domaines extracellulaires, et avec des composants du cytosquelette et des molécules de signalisation à travers leurs domaines intracellulaires. En plus de fournir l'ancrage physique des cellules, l'engagement des intégrines transmet des signaux dans les cellules qui contrôlent leur survie et leur comportement (Hynes 2002) et peuvent réguler de nombreuses fonctions cellulaires, comme l'adhésion cellulaire, la motilité, la forme, la croissance et la différenciation. Le CD29 (intégrine  $\beta$ 1) fait partie de la superfamille des intégrines et est impliqué dans l'adhésion cellule-cellule (Behzad 1996; Werr 1998). Par ailleurs, l'hypoxie est un régulateur majeur de l'expression du CD29 qui peut être due à un élément de HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia Inductible Factor) dans sa région promotrice (Thompson 2004; Keely 2009).

### **CD44**

CD44 est une glycoprotéine transmembranaire de 37KDa, exprimée à la surface des cellules vasculaires et pro-inflammatoires et qui induit leur activation par adhésion. Egalement détectée sur d'autres types cellulaires tels que les fibroblastes, les cellules endothéliales et épithéliales, elle est caractérisée par la très grande variabilité de sa structure, due à l'expression variable de plusieurs exons (régulée par épissage alternatif), et de différence de glycosylation. Elle assure également l'adhésion des lymphocytes activés au niveau des cellules de l'endothélium et des muscles lisses. Cette hétérogénéité moléculaire du CD44 est probablement à l'origine de son affinité pour de multiples ligands et de sa participation à de nombreux processus biologiques, comme l'adhérence cellulaire (par exemple, l'adhérence des lymphocytes aux cellules endothéliales, et celle des lymphocytes B aux cellules stromales), l'agrégation et la migration cellulaires, l'activation et la différenciation lymphocytaires. Par ailleurs, l'expression du CD44 change profondément au cours de l'évolution métastatique des tumeurs, et elle pourrait être un précieux indicateur de la progression tumorale. Les multiples dénominations sous lesquelles le CD44 a été décrit, comme homing cell adhesion molecule (H-CAM), Hermès, phagocytic glycoprotein1 (Pgp-1), class III extracellular matrix receptor (ECMR-III), etc., rendent compte de la multiplicité fonctionnelle de cette molécule (Naor 1997; Zoller 1997). D'autre part l'acide hyaluronique, un des principaux constituants de la matrice extracellulaire, est le principal ligand de CD44. Il est particulièrement abondant dans les tissus conjonctifs mais la moelle osseuse et les

ganglions en contiennent aussi de grandes quantités (Del Rosso 1981; Gallagher 1983; Gordon 1988; Smadja-Joffe 1992).

De même, le CD44 est un récepteur important impliqué dans les interactions cellule-matrice et est exprimé sur les CSM (Schieker 2004; Schieker 2007). Ce récepteur transmembranaire unique est responsable de la liaison à l'acide hyaluronique. Il est aussi abondamment exprimé sur la surface des cellules chondrocytaires et il est un facteur important dans le maintien de l'homéostasie du cartilage (Knudson 2002).

### **CD73**

CD73 est une glycoprotéine de poids moléculaire 70 KDa ancrée à la surface cellulaire via un GPI (glycosylphosphatidylinositol) ayant une activité enzymatique ecto-5'-nucléotidase qui catalyse la déphosphorylation de l'AMP à l'adénosine (Lennon 1998; Volmer 2006). CD73 est un facteur de prolifération et est impliqué dans le contrôle de la croissance cellulaire (Ujhazy 1996; Sadej 2006), dans la prolifération des cellules de gliome (Bavaresco 2008), dans l'interaction cellule-cellule et cellule-matrice surtout laminine et fibronectine (Stochaj 1989; Mehul 1992; Zhou 2007; Sadej 2008). En effet sa surexpression est liée à la malignité accrue des cellules du cancer du sein (Wang 2008) et du mélanome de haut degré (Sadej 2006).

CD73, initialement défini comme un antigène de différenciation des lymphocytes, fonctionne comme une molécule d'adhésion nécessaire pour la liaison des lymphocytes aux endothéliums (Airas 1995), et est une molécule de co-signalisation sur les lymphocytes T lorsqu'il est lié à des anticorps (Resta 1998).

CD73 est hautement régulé par l'HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia Inductible Factor) (Synnestvedt 2002; Thompson 2004).

### **CD90 (THY 1)**

CD90 est une glycoprotéine de surface cellulaire initialement identifiée sur les thymocytes de souris. Bien que le CD90 a été identifié sur une variété de cellules souches et à différents niveaux dans les tissus non lymphoïdes tels que les fibroblastes, les cellules du cerveau, et les cellules endothéliales activées. La reconnaissance sur les niveaux d'expression de CD90 sur les différents types cellulaires, y compris les cellules humaines primaires, reste limitée. C'est une molécule d'adhésion cellulaire et appartient au plus petit membre de la superfamille des immunoglobulines avec un poids moléculaire de 25-35 KDa. Il est une glycoprotéine ancrée à la surface cellulaire via un GPI motif (Rege 2006). L'expression de

CD90 diffère entre les espèces. Chez les humains, il est exprimé sur les cellules souches, y compris les cellules souches mésenchymateuses, cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches kératinocytaires et à différents niveaux sur les tissus no-lymphoïdes tels que les fibroblastes, les neurones et les cellules endothéliales activées (Nakamura 2006).

CD90 est normalement exprimé sur les cellules hématopoïétiques immatures de la moelle osseuse, mais aussi sur le tissu conjonctif et les cellules stromales. Sa fonction n'est pas encore complètement connue, mais éventuellement il est responsable de l'adhérence des cellules hématopoïétiques et leur croissance (Zucchini 2001).

CD90 fonctionne dans l'inflammation et la cicatrisation des plaies en synthétisant et en libérant des facteurs de croissance, des cytokines et des composants de la matrice extracellulaire pour aider à réparer les tissus endommagés. Il joue un rôle dans l'adhésion cellule-matrice et cellule-cellule entre les médiateurs inflammatoires de la réponse immunitaire. Par exemple, les monocytes CD90, site de ligand, se lie à CD90 des cellules endothéliales activées lors de l'inflammation, permettant à la migration des cellules immunitaires vers les sites d'inflammation. Il inhibe également la croissance des cellules non-neuronales et peut jouer un rôle dans la croissance et la différenciation des cellules souches (Rege and Hagood 2006).

En ce qui concerne les cellules souches mésenchymateuses, plusieurs études ont montré que le marqueur CD90 était exprimé à leur surface et plus particulièrement à la surface des CSM indifférenciées. Par ailleurs, son expression diminue une fois que les cellules souches mésenchymateuses s'engagent dans la voie de différenciation chondrocytaire ou ostéogénique (Krampera 2005; Wiesmann 2006).

### **CD105 (Endogline)**

CD105 est une glycoprotéine transmembranaire de 180 KDa constitutivement phosphorylée (Haruta 1986; Gougos 1988; Gougos 1990; Bellon 1993; Lastres 1994) avec des marqueurs tissulaires spécifiques (Burrows 1995). Il est principalement exprimé sur les cellules endothéliales (Burrows 1995; Miller 1999; Fonsatti 2000) et son promoteur est fortement et sélectivement actif dans ces cellules (Graulich 1999; Botella 2002). Des niveaux d'expression élevés de ce marqueur ont été détectés sur l'endothélium microvasculaire humaine (Wong 2000) et sur les cellules endothéliales vasculaires qui subissent une angiogenèse active, comme la régénération et les tissus enflammés ou des tumeurs endothéliales (Wang 1993; Krupinski 1994; Burrows 1995; Miller 1999; Schimming 2002; Torsney 2002; Chung 2004). CD105 est un composant du récepteur complexe TGF- $\beta$

(Transforming Growth Factor) (Cheifetz 1992; Lastres 1996; Barbara 1999), une cytokine pléiotropique impliquée dans la prolifération, la différenciation cellulaire et la migration (Govinden 2003). Il se lie aux composants de la superfamille du TGF- $\beta$  (Cheifetz 1992; Lastres 1996; Barbara 1999).

Particulièrement le CD105 est largement exprimé dans les petits vaisseaux tumoraux immatures comme a été démontré dans le sein, la prostate et le cancer gastrique (Wang 1994; Wikstrom 2002; Yu 2003) et rarement il est exprimé dans le cytoplasme des cellules néoplasiques (Fonsatti 2003).

Dans les chondrocytes, son expression est inversement proportionnelle à la capacité de synthèse de la matrice cartilagineuse observé chez le rat (Dell'Accio 2001). La protéine transmembranaire CD105 serait donc un marqueur prédictif permettant d'évaluer la capacité des chondrocytes à former une matrice cartilagineuse. Par ailleurs, le marqueur CD105 est également présent à la surface des CSM (Cheifetz 1992). Il a été montré que les cellules progénitrices exprimant le marqueur CD105 étaient capables de s'engager dans la voie de différenciation chondrocytaire (Majumdar 2000).

### **CD146**

CD146, aussi connu comme Mel-CAM, MUC18, Antigène A32 et S-Endo-1, est une glycoprotéine de membrane qui fonctionne comme une molécule d'adhésion cellulaire (Lehmann 1989) et est exprimé de façon constitutive dans l'endothélium humain (Bardin 1996). Basé sur l'homologie de la séquence nucléotidique, CD146 est classé en tant que membre de la superfamille des gènes d'immunoglobulines.

L'expression de CD146 a été démontrée dans un spectre relativement limité de tissus humains normaux et de tumeurs malignes. Son profil d'expression peut être utile dans le diagnostic de certaines lésions, y compris les mélanomes (Lehmann 1989) et cellules musculaires lisses et des cellules dendritiques (Bardin 1996). Bien que le rôle biologique de CD146 dans l'endothélium reste incertain, il a été suggéré de jouer un rôle important comme une molécule d'adhésion (Shih 1999).

### **CD164**

La caractérisation biochimique et fonctionnelle de CD164, également connu sous les noms de Sialomucin ou MGC-24 (Multi-glycosylated core protein 24), indique que c'est une nouvelle famille de glycoprotéine d'environ 80-90 KDa exprimée dans les cellules souches hématopoïétiques CD34+ (Watt 1993), et est présente au cours des premiers stades de la



cellule B, des cellules érythroïdes et le développement cellulaire myélomonocytaire. Il est également exprimé sur les cellules épithéliales, les monocytes du sang périphérique et faiblement sur les lymphocytes. Des rapports suggèrent que CD146 pourrait jouer un rôle dans l'hématopoïèse en facilitant l'adhésion des cellules CD34+ de la moelle osseuse du stroma (Watt 1998; Zannettino 1998).

### **CD166 (ALCAM)**

ALCAM également connu sous le nom CD166 (Cluster differentiation 166) est un membre de la superfamille des immunoglobulines. Cette protéine se lie à l'antigène CD6 des cellules T, et est impliquée dans le processus d'adhésion, de migration cellulaire (King 2004; Ofori-Acquah 2008), et de croissance, y compris le développement neuronal, le développement des organes de branchement, de l'hématopoïèse, la réponse immunitaire et la progression tumorale (Swart 2002). Il est exprimé dans différents types de tissus (normaux et néoplasiques). Les données sur la distribution tissulaire des ALCAM suggèrent que cette protéine est exprimée d'une manière aberrante dans différents tumeurs comme mélanome, cancer de la prostate, le cancer du sein, cancer colorectal, et cancer de la vessie (Swart 2002; King 2004; Ofori-Acquah 2008; Tachezy 2011) et est impliquée dans la progression tumorale et les métastases (Jeziarska 2006).

Elle est exprimée dans les cellules en développement des 3 lignées embryonnaire, et se localise au niveau des jonctions intercellulaires dans l'épithélium dans le cadre d'un complexe adhésif qui maintient l'architecture tissulaire (Ofori-Acquah 2008).

En ce qui concerne les CSM, ce marqueur est exprimé à leur surface lors des phases de prolifération (Swart 2002). Récemment, sa présence a été montrée à la surface des chondrocytes, après culture en monocouche, donc à la surface de cellules en voie de dédifférenciation (Diaz-Romero 2005). Son expression diminue dès lors que les cellules sont engagées dans la voie de différenciation ostéogénique (Bruder 1997). Il est donc considéré comme marqueur du stade de différenciation.

### **CD271**

CD271, aussi connu comme récepteur de faible affinité nerveuse, de facteur de croissance (LNGFR) ou p75NTR, est le seizième membre du récepteur de facteur de nécrose tumorale (TNFR) de la superfamille de protéines transmembranaires (Thomson 1988). Ces derniers partagent une homologie dans leur domaine extracellulaire, et ont un domaine

cytoplasmique mort. CD271 se différencie des autres membres de la famille des récepteurs TNFR car elle affecte sur la croissance, la différenciation et la mort du système nerveux (Rogers 2008). Ce marqueur de surface cellulaire définit potentiellement un sous-groupe précurseur des cellules souches mésenchymateuses, et peut être utilisé pour l'enrichissement des cellules souches non-hématopoïétiques à partir de la moelle osseuse (Jones 2006).

CD271 a des actions contradictoires, il fonctionne pour promouvoir la survie cellulaire ou induire sa mort (Lu 2005). Il est largement exprimé dans le développement de tissu neural (Roux 2002). En dehors du système nerveux, p75NTR est exprimé dans les myoblastes et les tissus en développement d'origine mésenchymateuse, y compris les follicules pileux, les fibroblastes, les reins, les poumons et les testicules (Wheeler 1992).

Surtout, bien que CD271 soit abondamment exprimé au cours du développement, il baisse l'expression de nombreuses cellules de l'origine adulte et est seulement révélée dans des conditions entraînant des lésions neuronales, comme l'état des maladies neurodégénératives. Dans de nombreuses maladies neurologiques, les déficits et les syndromes ont été corrélés avec l'expression CD271. Il s'agit notamment de la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, les tumeurs de la crête neurale, ischémie, la dégénérescence des cellules de Purkinje du cervelet, la schizophrénie, l'asthme bronchique et certaines maladies auto-immune (Dawbarn 2003; Schor 2005).

Les profils d'expression de CD271 dans différents types de cancer ont également été étudiés en profondeur. Bien que l'expression de CD271 n'ait pas été corrélée à un phénotype cancéreux, il a été trouvé pour être un marqueur utile dans certaines tumeurs (Fanburg-Smith 2001). En outre, dans certains cancers comme le cancer de la prostate et de vessie, CD271 agit comme un suppresseur de tumeur et la progression des tumeurs bénignes métastatique est associée à une diminution de l'expression de CD271 (Krygier 2001; Khwaja 2003; Khwaja 2004).

## Références Bibliographiques

---

- Abedin, M. T., Y. Demer, L. L. (2004). "Mesenchymal stem cells and the artery wall." *Circ Res* **95**(7): 671-6.
- Agarwal, S. H., K. L. Lanza, R. (2008). "Efficient differentiation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells." *Stem Cells* **26**(5): 1117-27.
- Aggarwal, S. P., M. F. (2005). "Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses." *Blood* **105**(4): 1815-22.
- Airas, L. H., J. Salmi, M. Bono, P. Puurunen, T. Smith, D. J. Jalkanen, S. (1995). "CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73." *J Exp Med* **182**(5): 1603-8.
- Akino, K. M., T. Fukui, M. Fujii, T. Akita, S. (2003). "Bone morphogenetic protein-2 regulates proliferation of human mesenchymal stem cells." *Wound Repair Regen* **11**(5): 354-60.
- Alakel, N. J., D. Muller, K. Bornhauser, M. Ehninger, G. Ordemann, R. (2009). "Direct contact with mesenchymal stromal cells affects migratory behavior and gene expression profile of CD133+ hematopoietic stem cells during ex vivo expansion." *Exp Hematol* **37**(4): 504-13.
- Aleckovic, M. S., C. (2008). "Is teratoma formation in stem cell research a characterization tool or a window to developmental biology?" *Reprod Biomed Online* **17**(2): 270-80.
- Alhadlaq, H. A. X., Y. (2004). "The structural adaptations in compressed articular cartilage by microscopic MRI (microMRI) T(2) anisotropy." *Osteoarthritis Cartilage* **12**(11): 887-94.
- Alsalameh, S. A., R. Gemba, T. Lotz, M. (2004). "Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage." *Arthritis Rheum* **50**(5): 1522-32.
- Alvarez-Dolado, M. P., R. Garcia-Verdugo, J. M. Fike, J. R. Lee, H. O. Pfeffer, K. Lois, C. Morrison, S. J. Alvarez-Buylla, A. (2003). "Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes." *Nature* **425**(6961): 968-73.
- Antonitsis, P. I.-P., E. Kaidoglou, A. Charokopos, N. Kalogeridis, A. Kouzi-Koliakou, K. Kyriakopoulou, I. Klonizakis, I. Papakonstantinou, C. (2008). "Cardiomyogenic potential of human adult bone marrow mesenchymal stem cells in vitro." *Thorac Cardiovasc Surg* **56**(2): 77-82.
- Antonitsis, P. I.-P., E. Kaidoglou, A. Papakonstantinou, C. (2007). "In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine." *Interact Cardiovasc Thorac Surg* **6**(5): 593-7.
- Anzalone, R. L. I., M. Loria, T. Di Stefano, A. Giannuzzi, P. Farina, F. La Rocca, G. (2011). "Wharton's jelly mesenchymal stem cells as candidates for beta cells regeneration: extending the differentiative and immunomodulatory benefits of adult mesenchymal stem cells for the treatment of type 1 diabetes." *Stem Cell Rev* **7**(2): 342-63.
- Aranguren, X. L. L., A. Clavel, C. Moreno, C. Abizanda, G. Barajas, M. A. Pelacho, B. Uriz, M. Arana, M. Echavarri, A. Soriano, M. Andreu, E. J. Merino, J. Garcia-Verdugo, J. M. Verfaillie, C. M. Prosper, F. (2007). "In vitro and in vivo arterial differentiation of human multipotent adult progenitor cells." *Blood* **109**(6): 2634-42.
- Aranguren, X. L. P., B. Penuelas, I. Abizanda, G. Uriz, M. Eca, M. Collantes, M. Arana, M. Beerens, M. Coppiello, G. Prieto, I. Perez-Illarbe, M. Andreu, E. J. Luttun, A. Prosper, F. (2010). "MAPC transplantation confers a more durable benefit than AC133+ cell transplantation in severe hind limb ischemia." *Cell Transplant* **20**(2): 259-69.
- Asahara, T. K., C. Isner, J. M. (2000). "Stem cell therapy and gene transfer for regeneration." *Gene Ther* **7**(6): 451-7.
- Aslan, H. Z., Y. Kandel, L. Liebergall, M. Oskouian, R. J. Gazit, D. Gazit, Z. (2006). "Osteogenic differentiation of noncultured immunisolated bone marrow-derived CD105+ cells." *Stem Cells* **24**(7): 1728-37.
- Aust, L. D., B. Foster, S. J. Halvorsen, Y. D. Hicok, K. du Laney, T. Sen, A. Willingmyre, G. D. Gimble, J. M. (2004). "Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates." *Cytotherapy* **6**(1): 7-14.

- Bajorath, J. (2000). "Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions." *Proteins* **39**(2): 103-11.
- Baksh, D. Y., R. Tuan, R. S. (2007). "Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow." *Stem Cells* **25**(6): 1384-92.
- Barbara, N. P. W., J. L. Letarte, M. (1999). "Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily." *J Biol Chem* **274**(2): 584-94.
- Barberi, T. B., M. Dincer, Z. Panagiotakos, G. Socci, N. D. Studer, L. (2007). "Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells." *Nat Med* **13**(5): 642-8.
- Barberi, T. W., L. M. Socci, N. D. Studer, L. (2005). "Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells." *PLoS Med* **2**(6): e161.
- Bardin, N. G., F. Mutin, M. Brisson, C. Horschowski, N. Frances, V. Lesaule, G. Sampol, J. (1996). "S-Endo 1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen." *Tissue Antigens* **48**(5): 531-9.
- Barile, L. C., I. Gaetani, R. Forte, E. Miraldi, F. Frati, G. Messina, E. Giacomello, A. (2007). "Cardiac stem cells: isolation, expansion and experimental use for myocardial regeneration." *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **4** Suppl 1: S9-S14.
- Barker, T. H. H., J. S. (2009). "Getting a grip on Thy-1 signaling." *Biochim Biophys Acta* **1793**(5): 921-3.
- Batten, P. S., P. Antoniow, J. W. Tay, S. S. Lowdell, M. W. Taylor, P. M. Yacoub, M. H. (2006). "Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: relevance to tissue engineering human heart valves." *Tissue Eng* **12**(8): 2263-73.
- Battiwalla, M. H., P. (2009). "Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation." *Cytotherapy* **11**(5): 503-15.
- Battula, V. L. T., S. Bareiss, P. M. Gieseke, F. Roelofs, H. de Zwart, P. Muller, I. Schewe, B. Skutella, T. Fibbe, W. E. Kanz, L. Buhring, H. J. (2009). "Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1." *Haematologica* **94**(2): 173-84.
- Bavaresco, L. B., A. Braganhol, E. Cappellari, A. R. Rockenbach, L. Farias, P. F. Wink, M. R. Delgado-Canedo, A. Battastini, A. M. (2008). "The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation." *Mol Cell Biochem* **319**(1-2): 61-8.
- Behzad, A. R. C., F. Walker, D. C. (1996). "Fibroblasts are in a position to provide directional information to migrating neutrophils during pneumonia in rabbit lungs." *Microvasc Res* **51**(3): 303-16.
- Bellon, T. C., A. Lastres, P. Cales, C. Cebrian, M. Vera, S. Cheifetz, S. Massague, J. Letarte, M. Bernabeu, C. (1993). "Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions." *Eur J Immunol* **23**(9): 2340-5.
- Beltrami, A. P. B., L. Torella, D. Baker, M. Limana, F. Chimenti, S. Kasahara, H. Rota, M. Musso, E. Urbanek, K. Leri, A. Kajstura, J. Nadal-Ginard, B. Anversa, P. (2003). "Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration." *Cell* **114**(6): 763-76.
- Bernardo, M. E. L., F. Fibbe, W. E. (2009). "Mesenchymal stromal cells." *Ann N Y Acad Sci* **1176**: 101-17.
- Bernardo, M. E. P., D. Locatelli, F. (2011). "Mesenchymal stromal cell therapy: a revolution in Regenerative Medicine?" *Bone Marrow Transplant* **47**(2): 164-71.
- Bertram, C. H., R. (2008). "Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging." *Biol Chem* **389**(3): 211-20.
- Bhandari, R. N. R., L. A. Lewis, A. L. Fry, J. R. Hammond, A. H. Tendler, S. J. Shakesheff, K. M. (2001). "Liver tissue engineering: a role for co-culture systems in modifying hepatocyte function and viability." *Tissue Eng* **7**(3): 345-57.

- Bianco, P. R., P. G. (2001). "Stem cells in tissue engineering." *Nature* **414**(6859): 118-21.
- Bieback, K. K., S. Kluter, H. Eichler, H. (2004). "Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood." *Stem Cells* **22**(4): 625-34.
- Bielby, R. C. B., A. R. Polak, J. M. Buttery, L. D. (2004). "In vitro differentiation and in vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells." *Tissue Eng* **10**(9-10): 1518-25.
- Bigdeli, N. K., C. Strehl, R. Concaro, S. Hyllner, J. Lindahl, A. (2009). "Coculture of human embryonic stem cells and human articular chondrocytes results in significantly altered phenotype and improved chondrogenic differentiation." *Stem Cells* **27**(8): 1812-21.
- Blancas, A. A. L., N. E. McCloskey, K. E. (2008). "Endothelial differentiation of embryonic stem cells." *Curr Protoc Stem Cell Biol* **Chapter 1**: Unit 1F 5.
- Blaschitz, A. H., H. Dohr, G. (2001). "HLA Class I protein expression in the human placenta." *Early Pregnancy* **5**(1): 67-9.
- Blum, B. B., N. (2008). "The tumorigenicity of human embryonic stem cells." *Adv Cancer Res* **100**: 133-58.
- Bonab, M. M. A., K. Talebian, F. Ghaffari, S. H. Ghavamzadeh, A. Nikbin, B. (2006). "Aging of mesenchymal stem cell in vitro." *BMC Cell Biol* **7**: 14.
- Bongso, A. F., C. Y. Gauthaman, K. (2008). "Taking stem cells to the clinic: Major challenges." *J Cell Biochem* **105**(6): 1352-60.
- Boquest, A. C. S., A. Fronsdal, K. Sigurjonsson, O. Tunheim, S. H. Collas, P. Brinchmann, J. E. (2005). "Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture." *Mol Biol Cell* **16**(3): 1131-41.
- Bornhauser, M. E., L. Oelschlaegel, U. Auffermann-Gretzinger, S. Kiani, A. Schetelig, J. Illmer, T. Schaich, M. Corbeil, D. Thiede, C. Ehninger, G. (2005). "Rapid reconstitution of dendritic cells after allogeneic transplantation of CD133+ selected hematopoietic stem cells." *Leukemia* **19**(1): 161-5.
- Botella, L. M. S.-E., T. Sanz-Rodriguez, F. Kojima, S. Shimada, J. Guerrero-Esteo, M. Cooreman, M. P. Ratziu, V. Langa, C. Vary, C. P. Ramirez, J. R. Friedman, S. Bernabeu, C. (2002). "Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury." *Blood* **100**(12): 4001-10.
- Breitbach, M. B., T. Roell, W. Xia, Y. Dewald, O. Nygren, J. M. Fries, J. W. Tiemann, K. Bohlen, H. Hescheler, J. Welz, A. Bloch, W. Jacobsen, S. E. Fleischmann, B. K. (2007). "Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts." *Blood* **110**(4): 1362-9.
- Brolen, G. S., L. Bjorquist, P. Eriksson, G. Ek, M. Semb, H. Johansson, I. Andersson, T. B. Ingelman-Sundberg, M. Heins, N. (2010). "Hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells specifically via definitive endoderm and a progenitor stage." *J Biotechnol* **145**(3): 284-94.
- Broxmeyer, H. E. D., G. W. Hangoc, G. Cooper, S. Bard, J. English, D. Arny, M. Thomas, L. Boyse, E. A. (1989). "Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(10): 3828-32.
- Bruder, S. P. J., N. Haynesworth, S. E. (1997). "Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation." *J Cell Biochem* **64**(2): 278-94.
- Buhring, H. J. B., V. L. Tremel, S. Schewe, B. Kanz, L. Vogel, W. (2007). "Novel markers for the prospective isolation of human MSC." *Ann N Y Acad Sci* **1106**: 262-71.
- Bunnell, B. A. E., B. T. Guilak, F. Gimble, J. M. (2008). "Differentiation of adipose stem cells." *Methods Mol Biol* **456**: 155-71.
- Burger, J. A. S., A. Dwenger, A. Burger, M. Behringer, D. (2003). "CXCR4 chemokine receptors (CD184) and alpha4beta1 integrins mediate spontaneous migration of human CD34+ progenitors and acute myeloid leukaemia cells beneath marrow stromal cells (pseudoemperipolesis)." *Br J Haematol* **122**(4): 579-89.

- Burrows, F. J. D., E. J. Tazzari, P. L. Amlot, P. Gazdar, A. F. King, S. W. Letarte, M. Vitetta, E. S. Thorpe, P. E. (1995). "Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy." *Clin Cancer Res* **1**(12): 1623-34.
- Caballero, M. S., M. D. Halevi, A. E. Pegna, G. Pappa, A. K. Krochmal, D. J. Morse, J. van Aalst, J. A. (2013). "Effects of connective tissue growth factor on the regulation of elastogenesis in human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells." *Ann Plast Surg* **70**(5): 568-73.
- Caimi, P. F. R., J. Lee, Z. Lazarus, H. M. (2010). "Emerging therapeutic approaches for multipotent mesenchymal stromal cells." *Curr Opin Hematol* **17**(6): 505-13.
- Campard, D. L., P. A. Najimi, M. Sokal, E. M. (2008). "Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells." *Gastroenterology* **134**(3): 833-48.
- Campbell, P. A. P.-I., C. Andrade-Navarro, M. A. Rudnicki, M. A. (2007). "Oct4 targets regulatory nodes to modulate stem cell function." *PLoS One* **2**(6): e553.
- Can, A. K., S. (2007). "Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells." *Stem Cells* **25**(11): 2886-95.
- Caplan, A. I. B., S. P. (2001). "Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century." *Trends Mol Med* **7**(6): 259-64.
- Caplan, A. I. D., J. E. (2006). "Mesenchymal stem cells as trophic mediators." *J Cell Biochem* **98**(5): 1076-84.
- Carlin, R. D., D. Weiss, M. Schultz, B. Troyer, D. (2006). "Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells." *Reprod Biol Endocrinol* **4**: 8.
- Carpenter, M. K. R., E. Rao, M. S. (2003). "Characterization and differentiation of human embryonic stem cells." *Cloning Stem Cells* **5**(1): 79-88.
- Castro-Malaspina, H. G., R. E. Resnick, G. Kapoor, N. Meyers, P. Chiarieri, D. McKenzie, S. Broxmeyer, H. E. Moore, M. A. (1980). "Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny." *Blood* **56**(2): 289-301.
- Centeno, C. J. B., D. Kisdav, J. Keohan, C. Freeman, M. Karli, D. (2008). "Regeneration of meniscus cartilage in a knee treated with percutaneously implanted autologous mesenchymal stem cells." *Med Hypotheses* **71**(6): 900-8.
- Chamberlain, G. F., J. Ashton, B. Middleton, J. (2007). "Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing." *Stem Cells* **25**(11): 2739-49.
- Chan, J. O. D., K. Gavina, M. Torrente, Y. Kennea, N. Mehmet, H. Stewart, H. Watt, D. J. Morgan, J. E. Fisk, N. M. (2006). "Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration." *Stem Cells* **24**(8): 1879-91.
- Chao, K. C. C., K. F. Fu, Y. S. Liu, S. H. (2008). "Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes." *PLoS One* **3**(1): e1451.
- Charbord, P. C., L. (2011). "[Human mesenchymal stem cell biology]." *Med Sci (Paris)* **27**(3): 261-7.
- Cheifetz, S. B., T. Cales, C. Vera, S. Bernabeu, C. Massague, J. Letarte, M. (1992). "Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells." *J Biol Chem* **267**(27): 19027-30.
- Chen, L. B. J., X. B. Yang, L. (2004). "Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells." *World J Gastroenterol* **10**(20): 3016-20.
- Chen, M. Y. L., P. C. Li, Z. L. Wei, X. (2009). "Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells." *Exp Hematol* **37**(5): 629-40.
- Chen, S. L. F., W. W. Ye, F. Liu, Y. H. Qian, J. Shan, S. J. Zhang, J. J. Chunhua, R. Z. Liao, L. M. Lin, S. Sun, J. P. (2004). "Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction." *Am J Cardiol* **94**(1): 92-5.

- Christopeit, M. S., M. Foll, J. Muller, L. P. Keysser, G. Behre, G. (2008). "Marked improvement of severe progressive systemic sclerosis after transplantation of mesenchymal stem cells from an allogeneic haploidentical-related donor mediated by ligation of CD137L." *Leukemia* **22**(5): 1062-4.
- Chung, Y. C. H., Y. C. Pan, A. C. (2004). "Endoglin (CD105) expression in the development of haemorrhoids." *Eur J Clin Invest* **34**(2): 107-12.
- Civin, C. I. S., L. C. Fackler, M. J. Trischmann, T. M. Wiley, J. M. Loken, M. R. (1990). "Positive stem cell selection--basic science." *Prog Clin Biol Res* **333**: 387-401; discussion 402.
- Clark, A. T. B., M. S. Fox, M. Rodriguez, R. T. Abeyta, M. J. Firpo, M. T. Pera, R. A. (2004). "Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro." *Hum Mol Genet* **13**(7): 727-39.
- Collins, K. M., J. R. (2002). "Telomerase in the human organism." *Oncogene* **21**(4): 564-79.
- Colter, D. C. C., R. DiGirolamo, C. M. Prockop, D. J. (2000). "Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3213-8.
- Crisan, M. Y., S. Casteilla, L. Chen, C. W. Corselli, M. Park, T. S. Andriolo, G. Sun, B. Zheng, B. Zhang, L. Norotte, C. Teng, P. N. Traas, J. Schugar, R. Deasy, B. M. Badylak, S. Buhning, H. J. Giacobino, J. P. Lazzari, L. Huard, J. Peault, B. (2008). "A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs." *Cell Stem Cell* **3**(3): 301-13.
- Cuevas, P. C., F. Garcia-Gomez, I. Yan, M. Dujovny, M. (2004). "Bone marrow stromal cell implantation for peripheral nerve repair." *Neurol Res* **26**(2): 230-2.
- D'Amour, K. A. B., A. G. Eliazar, S. Kelly, O. G. Agulnick, A. D. Smart, N. G. Moorman, M. A. Kroon, E. Carpenter, M. K. Baetge, E. E. (2006). "Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells." *Nat Biotechnol* **24**(11): 1392-401.
- Dallari, D. S., L. Stagni, C. Cenni, E. Cenacchi, A. Fornasari, P. M. Albisinni, U. Rimondi, E. Baldini, N. Giunti, A. (2007). "Enhanced tibial osteotomy healing with use of bone grafts supplemented with platelet gel or platelet gel and bone marrow stromal cells." *J Bone Joint Surg Am* **89**(11): 2413-20.
- Davatchi, F. A., B. S. Mohyeddin, M. Shahram, F. Nikbin, B. (2011). "Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients." *Int J Rheum Dis* **14**(2): 211-5.
- Dawbarn, D. A., S. J. (2003). "Neurotrophins and neurodegeneration." *Neuropathol Appl Neurobiol* **29**(3): 211-30.
- De Bari, C. D. A., F. Luyten, F. P. (2001). "Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age." *Arthritis Rheum* **44**(1): 85-95.
- de Visser, S. K. C., R. W. Pope, J. M. (2008). "Structural adaptations in compressed articular cartilage measured by diffusion tensor imaging." *Osteoarthritis Cartilage* **16**(1): 83-9.
- Deans, R. J. M., A. B. (2000). "Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses." *Exp Hematol* **28**(8): 875-84.
- Del Rosso, M. C., R. Dini, G. Fibbi, G. Vannucchi, S. Chiarugi, V. Guazzelli, C. (1981). "Involvement of glycosaminoglycans in detachment of early myeloid precursors from bone-marrow stromal cells." *Biochim Biophys Acta* **676**(2): 129-36.
- Dell'Accio, F. D. B., C. Luyten, F. P. (2001). "Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage in vivo." *Arthritis Rheum* **44**(7): 1608-19.
- Delorme, B. R., J. Gallay, N. Le Vern, Y. Kerboeuf, D. Jorgensen, C. Rosset, P. Sensebe, L. Layrolle, P. Haupl, T. Charbord, P. (2008). "Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells." *Blood* **111**(5): 2631-5.
- Delorme, B. R., J. Pontikoglou, C. Gaillard, J. Langonne, A. Sensebe, L. Noel, D. Jorgensen, C. Haupl, T. Charbord, P. (2009). "Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity." *Stem Cells* **27**(5): 1142-51.



- Dexter, T. M. S., E. (1987). "Growth and differentiation in the hemopoietic system." Annu Rev Cell Biol **3**: 423-41.
- Dhara, S. K. S., S. L. (2008). "Neural differentiation of human embryonic stem cells." J Cell Biochem **105**(3): 633-40.
- Diaz-Romero, J. G., J. P. Grogan, S. P. Nestic, D. Trub, T. Mainil-Varlet, P. (2005). "Immunophenotypic analysis of human articular chondrocytes: changes in surface markers associated with cell expansion in monolayer culture." J Cell Physiol **202**(3): 731-42.
- Dicker, A. L. B., K. Astrom, G. van Harmelen, V. Gothelstrom, C. Blomqvist, L. Arner, P. Ryden, M. (2005). "Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue." Exp Cell Res **308**(2): 283-90.
- Digirolamo, C. M. S., D. Colter, D. Phinney, D. G. Class, R. Prockop, D. J. (1999). "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 **107**(2): 275-81.
- Dimomeletis, I. D., E. Zaruba, M. Groebner, M. Zahler, S. Laslo, S. M. David, R. Kostin, S. Deutsch, M. A. Assmann, G. Mueller-Hoecker, J. Feuring-Buske, M. Franz, W. M. (2010). "Assessment of human MAPCs for stem cell transplantation and cardiac regeneration after myocardial infarction in SCID mice." Exp Hematol **38**(11): 1105-14.
- Divya, M. S. R., G. E. Divya, T. S. Abdul Rasheed, V. Santhoshkumar, T. R. Elizabeth, K. E. James, J. Pillai, R. M. (2012). "Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells consist of a unique population of progenitors co-expressing mesenchymal stem cell and neuronal markers capable of instantaneous neuronal differentiation." Stem Cell Res Ther **3**(6): 57.
- Dominici, M. L. B., K. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, I. Marini, F. Krause, D. Deans, R. Keating, A. Prockop, D. Horwitz, E. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-7.
- Dos Santos, F. A., P. Z. Boura, J. S. Abecasis, M. M. da Silva, C. L. Cabral, J. M. (2010). "Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia." J Cell Physiol **223**(1): 27-35.
- Drury, J. L. M., D. J. (2003). "Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications." Biomaterials **24**(24): 4337-51.
- Ducrest, A. L. S., H. Lingner, J. Nabholz, M. (2002). "Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene." Oncogene **21**(4): 541-52.
- Duff, S. E. L., C. Garland, J. M. Kumar, S. (2003). "CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications." FASEB J **17**(9): 984-92.
- Duijvestein, M. V., A. C. Roelofs, H. Wildenberg, M. E. Wendrich, B. B. Verspaget, H. W. Kooy-Winkelaar, E. M. Koning, F. Zwaginga, J. J. Fidder, H. H. Verhaar, A. P. Fibbe, W. E. van den Brink, G. R. Hommes, D. W. (2010). "Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study." Gut **59**(12): 1662-9.
- Dumas, D. G., C. Presle, N. Cippolletta, C. Miralles, G. Payan, E. Jouzeau, J. Y. Mainard, D. Terlain, B. Netter, P. Stoltz, J. F. (2000). "The role of 3D-microscopy in the study of chondrocyte-matrix interaction (alginate bead or sponge, rat femoral head cap, human osteoarthritic cartilage) and pharmacological application." Biorheology **37**(1-2): 165-76.
- Eaglstein, W. H. F., V. (1997). "Tissue engineering and the development of Apligraf, a human skin equivalent." Clin Ther **19**(5): 894-905.
- Ek, M. S., T. Kuppers-Munther, B. Edsbacke, J. Andersson, T. B. Bjorquist, P. Cotgreave, I. Jernstrom, B. Ingelman-Sundberg, M. Johansson, I. (2007). "Expression of drug metabolizing enzymes in hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells." Biochem Pharmacol **74**(3): 496-503.
- Eliasson, P. J., J. I. (2010). "The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be." J Cell Physiol **222**(1): 17-22.

- Eliasson, P. R., M. Hammar, P. Larsson, P. Sirenko, O. Flippin, L. A. Cammenga, J. Jonsson, J. I. (2010). "Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during in vitro culture." *Exp Hematol* **38**(4): 301-310 e2.
- Eliceiri, B. P. (2001). "Integrin and growth factor receptor crosstalk." *Circ Res* **89**(12): 1104-10.
- Eminli, S. U., J. Arnold, K. Jaenisch, R. Hochedlinger, K. (2008). "Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression." *Stem Cells* **26**(10): 2467-74.
- Evans, M. J. K., M. H. (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." *Nature* **292**(5819): 154-6.
- Ezashi, T. D., P. Roberts, R. M. (2005). "Low O2 tensions and the prevention of differentiation of hES cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(13): 4783-8.
- Falcone, S. J., Palmeri, D., and Berg, R. A. (2006). "Biomedical applications of hyaluronic acid." *Polysaccharides for Drug Delivery and Pharmaceutical Applications* **934**: 155-174.
- Fan, X. L., T. Liu, Y. Ma, X. Cui, Z. (2009). "Optimization of primary culture condition for mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood with factorial design." *Biotechnol Prog* **25**(2): 499-507.
- Fanburg-Smith, J. C. M., M. (2001). "Low-affinity nerve growth factor receptor (p75) in dermatofibrosarcoma protuberans and other nonneural tumors: a study of 1,150 tumors and fetal and adult normal tissues." *Hum Pathol* **32**(9): 976-83.
- Fang, B. S., Y. Liao, L. Zhang, Y. Zhao, R. C. (2007). "Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease." *Transplant Proc* **39**(10): 3358-62.
- Farias, V. A. L.-F., J. L. Penalver, J. L. Paya Colmenero, J. A. Ferron, G. O. Duran, E. L. Fernandez, R. M. Olivares, E. G. O'Valle, F. Puertas, A. Oliver, F. J. Ruiz de Almodovar, J. M. (2011). "Human umbilical cord stromal stem cell express CD10 and exert contractile properties." *Placenta* **32**(1): 86-95.
- Fausser, A. A. M., H. A. (1978). "Granuloerythropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood, and cord blood." *Blood* **52**(6): 1243-8.
- Feng, J. F., W. D. Wang, S. S. Weinrich, S. L. Avilion, A. A. Chiu, C. P. Adams, R. R. Chang, E. Allsopp, R. C. Yu, J. et al., (1995). "The RNA component of human telomerase." *Science* **269**(5228): 1236-41.
- Fong, C. Y. R., M. Manasi, N. Biswas, A. Bongso, A. (2007). "Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly." *Reprod Biomed Online* **15**(6): 708-18.
- Fong, C. Y. S., A. Gauthaman, K. Venugopal, J. Biswas, A. Ramakrishna, S. Bongso, A. (2012). "Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells undergo enhanced chondrogenic differentiation when grown on nanofibrous scaffolds and in a sequential two-stage culture medium environment." *Stem Cell Rev* **8**(1): 195-209.
- Fonsatti, E. A., M. Nicotra, M. R. Natali, P. G. Maio, M. (2003). "Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels." *Oncogene* **22**(42): 6557-63.
- Fonsatti, E. J., A. P. Kairemo, K. J. Coral, S. Snellman, M. Nicotra, M. R. Natali, P. G. Altomonte, M. Maio, M. (2000). "Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model." *Clin Cancer Res* **6**(5): 2037-43.
- French, A. J. A., C. A. Anderson, L. S. Kitchen, J. R. Hughes, M. R. Wood, S. H. (2008). "Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts." *Stem Cells* **26**(2): 485-93.
- Freund, D. B., N. Boxberger, S. Feldmann, S. Streller, U. Ehninger, G. Werner, C. Bornhauser, M. Oswald, J. Corbeil, D. (2006). "Polarization of human hematopoietic progenitors during contact with multipotent mesenchymal stromal cells: effects on proliferation and clonogenicity." *Stem Cells Dev* **15**(6): 815-29.

- Friedenstein, A. J. G., J. F. Kulagina, N. N. (1976). "Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs." *Exp Hematol* **4**(5): 267-74.
- Friedman, R. B., M. Boissel, L. Tuncer, H. Cetrulo, C. Klingemann, H. (2007). "Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation." *Biol Blood Marrow Transplant* **13**(12): 1477-86.
- Gallagher, J. T. S., E. Dexter, T. M. (1983). "Role of the cellular matrix in haemopoiesis. I. Synthesis of glycosaminoglycans by mouse bone marrow cell cultures." *J Cell Sci* **63**: 155-71.
- Galmiche, M. C. K., V. E. Briere, J. Herve, P. Charbord, P. (1993). "Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway." *Blood* **82**(1): 66-76.
- Galois, L. F., A. M. Herbage, D. Mainard, D. (2005). "[Cartilage tissue engineering: state-of-the-art and future approaches]." *Pathol Biol (Paris)* **53**(10): 590-8.
- Garcia-Olmo, D. G.-A., M. Herreros, D. Pascual, I. Peiro, C. Rodriguez-Montes, J. A. (2005). "A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation." *Dis Colon Rectum* **48**(7): 1416-23.
- Gerami-Naini, B. D., O. V. Durning, M. Wegner, F. H. Thomson, J. A. Golos, T. G. (2004). "Trophoblast differentiation in embryoid bodies derived from human embryonic stem cells." *Endocrinology* **145**(4): 1517-24.
- Gordon, M. Y. (1988). "Extracellular matrix of the marrow microenvironment." *Br J Haematol* **70**(1): 1-4.
- Gottschling, S. S., R. Seckinger, A. Krause, U. Horsch, K. Miesala, K. Ho, A. D. (2007). "Human mesenchymal stromal cells regulate initial self-renewing divisions of hematopoietic progenitor cells by a beta1-integrin-dependent mechanism." *Stem Cells* **25**(3): 798-806.
- Gougos, A. L., M. (1988). "Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line." *J Immunol* **141**(6): 1925-33.
- Gougos, A. L., M. (1990). "Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells." *J Biol Chem* **265**(15): 8361-4.
- Govinden, R. B., K. D. (2003). "Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta." *Pharmacol Ther* **98**(2): 257-65.
- Graulich, W. N., D. M. Fischer, D. Kissel, T. Muller, R. (1999). "Cell type specificity of the human endoglin promoter." *Gene* **227**(1): 55-62.
- Grayson, W. L. Z., F. Bunnell, B. Ma, T. (2007). "Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells." *Biochem Biophys Res Commun* **358**(3): 948-53.
- Groh, M. E. M., B. Szekely, E. Koc, O. N. (2005). "Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells." *Exp Hematol* **33**(8): 928-34.
- Gronthos, S. M., M. Brahimi, J. Robey, P. G. Shi, S. (2000). "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13625-30.
- Guenou, H. N., X. Larcher, F. Feteira, J. Lemaitre, G. Saidani, M. Del Rio, M. Barrault, C. C. Bernard, F. X. Peschanski, M. Baldeschi, C. Waksman, G. (2009). "Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study." *Lancet* **374**(9703): 1745-53.
- Guiducci, S. P., F. Saccardi, R. Guidi, S. Ibba-Manneschi, L. Manetti, M. Mazzanti, B. Dal Pozzo, S. Milia, A. F. Bellando-Randone, S. Miniati, I. Fiori, G. Fontana, R. Amanzi, L. Braschi, F. Bosi, A. Matucci-Cerinic, M. (2010). "Autologous mesenchymal stem cells foster revascularization of ischemic limbs in systemic sclerosis: a case report." *Ann Intern Med* **153**(10): 650-4.
- Guo, M. S., Z. Sun, Q. Y. Han, Q. Yu, C. L. Wang, D. H. Qiao, J. H. Chen, B. Sun, W. J. Hu, K. X. Liu, G. X. Liu, B. Zhao, R. C. Ai, H. (2009). "A modified haploidentical nonmyeloablative transplantation without T cell depletion for high-risk acute leukemia: successful engraftment and mild GVHD." *Biol Blood Marrow Transplant* **15**(8): 930-7.
- Han, Z. C. (2009). "Umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSC: biology, banking and clinical applications)." *Bull Acad Natl Med* **193**(3): 545-7; discussion 547.

- Hardouin, P., Anselme, K., Flautre, B., Bianchi, F., Bascoulergue, G., and Bouxin, B. (2000). "Ingénierie tissulaire et maladies du squelette." *Revue du Rhumatisme* **67**: 498-504.
- Harrington, L. M., T. Mar, V. Zhou, W. Oulton, R. Bass, M. B. Arruda, I. Robinson, M. O. (1997). "A mammalian telomerase-associated protein." *Science* **275**(5302): 973-7.
- Harrington, L. Z., W. McPhail, T. Oulton, R. Yeung, D. S. Mar, V. Bass, M. B. Robinson, M. O. (1997). "Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits." *Genes Dev* **11**(23): 3109-15.
- Harrison, J. S. R., P. Chang, V. Bandari, P. (2002). "Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers." *Blood* **99**(1): 394.
- Haruta, Y. S., B. K. (1986). "Distinct human leukemia-associated cell surface glycoprotein GP160 defined by monoclonal antibody SN6." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(20): 7898-902.
- Hay, D. C. Z., D. Fletcher, J. Hewitt, Z. A. McLean, D. Urruticoechea-Uriguen, A. Black, J. R. Elcombe, C. Ross, J. A. Wolf, R. Cui, W. (2008). "Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo." *Stem Cells* **26**(4): 894-902.
- Heike, T. N., T. (2002). "Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines." *Biochim Biophys Acta* **1592**(3): 313-21.
- Hench, L. L. P., J. M. (2002). "Third-generation biomedical materials." *Science* **295**(5557): 1014-7.
- Herzog, E. L. C., L. Krause, D. S. (2003). "Plasticity of marrow-derived stem cells." *Blood* **102**(10): 3483-93.
- Highfill, S. L. K., R. M. O'Shaughnessy, M. J. Zhou, Q. Xia, L. Panoskaltis-Mortari, A. Taylor, P. A. Tolar, J. Blazar, B. R. (2009). "Multipotent adult progenitor cells can suppress graft-versus-host disease via prostaglandin E2 synthesis and only if localized to sites of allopriming." *Blood* **114**(3): 693-701.
- Honsawek, S. D., D. Phupong, V. (2006). "Effects of demineralized bone matrix on proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord." *J Med Assoc Thai* **89 Suppl 3**: S189-95.
- Hou, T. X., J. Wu, X. Xie, Z. Luo, F. Zhang, Z. Zeng, L. (2009). "Umbilical cord Wharton's Jelly: a new potential cell source of mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering." *Tissue Eng Part A* **15**(9): 2325-34.
- Hu, B. Y., and Zhang, S.C. (2009). "Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells." *Nat Protoc* **4**: 1295-1304.
- Hu, B. Y., Du, Z.W., and Zhang, S.C. (2009). "Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells." *Nat Protoc* **4**: 1614-1622.
- Hu, X. L., W. Cui, L. Wang, M. Cao, Y. (2005). "Tissue engineering of nearly transparent corneal stroma." *Tissue Eng* **11**(11-12): 1710-7.
- Hu, Y. L., L. Wang, Q. Ma, L. Ma, G. Jiang, X. Zhao, R. C. (2003). "Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas." *J Lab Clin Med* **141**(5): 342-9.
- Huang, S. F., C. Wu, Y. Yang, S. Ma, K. Wu, X. Fu, X. (2013). "Dissimilar characteristics of umbilical cord mesenchymal stem cells from donors of different ages." *Cell Tissue Bank*.
- Huang, X. J. (2008). "Current status of haploidentical stem cell transplantation for leukemia." *J Hematol Oncol* **1**: 27.
- Hunsucker, S. A. M., B. S. Sychala, J. (2005). "The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism." *Pharmacol Ther* **107**(1): 1-30.
- Hutmacher, D. W. (2001). "Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives." *J Biomater Sci Polym Ed* **12**(1): 107-24.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." *Cell* **110**(6): 673-87.
- Idelson, M. A., R. Obolensky, A. Ben-Shushan, E. Hemo, I. Yachimovich-Cohen, N. Khaner, H. Smith, Y. Wisner, O. Gropp, M. Cohen, M. A. Even-Ram, S. Berman-Zaken, Y. Matzrafi, L. Rechavi, G. Banin, E. Reubinoff, B. (2009). "Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells." *Cell Stem Cell* **5**(4): 396-408.

- Imasawa, T. U., Y. Kawamura, T. Zhong, Y. Nagasawa, R. Okabe, M. Maruyama, N. Hosoya, T. Ohno, T. (2001). "The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells." *J Am Soc Nephrol* **12**(7): 1401-9.
- Ishige, I. N.-I., T. Honda, M. J. Harnprasopwat, R. Kido, M. Sugimoto, M. Nakauchi, H. Tojo, A. (2009). "Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord." *Int J Hematol* **90**(2): 261-9.
- Ishii, K. Y., Y. Akechi, Y. Sakabe, T. Nishio, R. Ikeda, R. Terabayashi, K. Matsumi, Y. Gonda, K. Okamoto, H. Takubo, K. Tajima, F. Tsuchiya, H. Hoshikawa, Y. Kurimasa, A. Umezawa, A. Shiota, G. (2008). "Hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by tetracycline-regulated hepatocyte nuclear factor 3beta." *Hepatology* **48**(2): 597-606.
- Itoh, M. K., M. Cairo, M. S. Christiano, A. M. (2011). "Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(21): 8797-802.
- Jackson, L. J., D. R. Scotting, P. Sottile, V. (2007). "Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications." *J Postgrad Med* **53**(2): 121-7.
- Jain, A. M., N. Jeevashankar, M. Mukhopadhyay, A. Agarwal, R. Deorari, A. K. Paul, V. K. (2012). "Does Mesenchymal Stem Cell Population in Umbilical Cord Blood Vary at Different Gestational Periods?" *Indian J Pediatr*.
- James, D. N., H. S. Seandel, M. Nolan, D. Janovitz, T. Tomishima, M. Studer, L. Lee, G. Lyden, D. Benezra, R. Zaninovic, N. Rosenwaks, Z. Rabbany, S. Y. Rafii, S. (2010). "Expansion and maintenance of human embryonic stem cell-derived endothelial cells by TGFbeta inhibition is Id1 dependent." *Nat Biotechnol* **28**(2): 161-6.
- Janknecht, R. (2004). "On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells." *FEBS Lett* **564**(1-2): 9-13.
- Jarocho, D. L., E. Majka, M. (2008). "Advantage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105+ and CD271+ cells." *Folia Histochem Cytobiol* **46**(3): 307-14.
- Jeong, J. A. H., S. H. Gang, E. J. Ahn, C. Hwang, S. H. Yang, I. H. Han, H. Kim, H. (2005). "Differential gene expression profiling of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells by DNA microarray." *Stem Cells* **23**(4): 584-93.
- Jeziarska, A. O., W. P. Pietruszkiewicz, J. Olszewski, W. Matysiak, W. Motyl, T. (2006). "Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) is associated with suppression of breast cancer cells invasion." *Med Sci Monit* **12**(7): BR245-56.
- Jiang, S. H., HKh Idris, N. M. Salim, A. Ashraf, M. (2006). "Supportive interaction between cell survival signaling and angiocompetent factors enhances donor cell survival and promotes angiomyogenesis for cardiac repair." *Circ Res* **99**(7): 776-84.
- Jiang, Y. and B. N. R. Jahagirdar, R. L. Schwartz, R. E. Keene, C. D. Ortiz-Gonzalez, X. R. Reyes, M. Lenvik, T. Lund, T. Blackstad, M. Du, J. Aldrich, S. Lisberg, A. Low, W. C. Largaespada, D. A. Verfaillie, C. M. (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." *Nature* **418**(6893): 41-9.
- Jo, C. H. K., O. S. Park, E. Y. Kim, B. J. Lee, J. H. Kang, S. B. Han, H. S. Rhee, S. H. Yoon, K. S. (2008). "Fetal mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord sustain primitive characteristics during extensive expansion." *Cell Tissue Res* **334**(3): 423-33.
- Johnstone, B. H., T. M. Caplan, A. I. Goldberg, V. M. Yoo, J. U. (1998). "In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells." *Exp Cell Res* **238**(1): 265-72.
- Jones, E. A. E., A. Henshaw, K. Kinsey, S. E. Markham, A. F. Emery, P. McGonagle, D. (2004). "Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis." *Arthritis Rheum* **50**(3): 817-27.
- Jones, E. A. E., A. Kinsey, S. E. Straszynski, L. Emery, P. Ponchel, F. McGonagle, D. (2006). "Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow." *Cytometry B Clin Cytom* **70**(6): 391-9.

- Jung, D. I. H., J. Kang, B. T. Kim, J. W. Quan, F. S. Lee, J. H. Woo, E. J. Park, H. M. (2009). "A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury." *J Neurol Sci* **285**(1-2): 67-77.
- Jurgens, W. J. O.-V., M. J. Helder, M. N. Zandiehoulabi, B. Schouten, T. E. Kuik, D. J. Ritt, M. J. van Milligen, F. J. (2008). "Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies." *Cell Tissue Res* **332**(3): 415-26.
- Kadner, A. H., S. P. Tracy, J. Breymann, C. Maurus, C. F. Melnitchouk, S. Kadner, G. Zund, G. Turina, M. (2002). "Human umbilical cord cells: a new cell source for cardiovascular tissue engineering." *Ann Thorac Surg* **74**(4): S1422-8.
- Kale, S. K., A. Clark, P. R. Kashgarian, M. Krause, D. S. Cantley, L. G. (2003). "Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule." *J Clin Invest* **112**(1): 42-9.
- Kaltz, N. F., A. Hippauf, S. Delorme, B. Noel, D. Riminucci, M. Jacobs, V. R. Haupl, T. Jorgensen, C. Charbord, P. Peschel, C. Bianco, P. Oostendorp, R. A. (2008). "In vivo osteoprogenitor potency of human stromal cells from different tissues does not correlate with expression of POU5F1 or its pseudogenes." *Stem Cells* **26**(9): 2419-24.
- Karahuseyinoglu, S. C., O. Kilic, E. Kara, F. Akay, G. G. Demiralp, D. O. Tukun, A. Uckan, D. Can, A. (2007). "Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys." *Stem Cells* **25**(2): 319-31.
- Karner, E. U., C. Sloan, A. J. Ahrlund-Richter, L. Sugars, R. V. Wendel, M. (2007). "Bone matrix formation in osteogenic cultures derived from human embryonic stem cells in vitro." *Stem Cells Dev* **16**(1): 39-52.
- Kassem, M. K., M. Abdallah, B. M. (2004). "Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy." *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **95**(5): 209-14.
- Kaufman, D. S. (2009). "Toward clinical therapies using hematopoietic cells derived from human pluripotent stem cells." *Blood* **114**: 3513-3523.
- Kebriaei, P. I., L. Bahceci, E. Holland, K. Rowley, S. McGuirk, J. Devetten, M. Jansen, J. Herzig, R. Schuster, M. Monroy, R. Uberti, J. (2009). "Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease." *Biol Blood Marrow Transplant* **15**(7): 804-11.
- Keely, S. G., L. E. MacManus, C. F. Campbell, E. L. Scully, M. M. Furuta, G. T. Colgan, S. P. (2009). "Selective induction of integrin beta1 by hypoxia-inducible factor: implications for wound healing." *FASEB J* **23**(5): 1338-46.
- Kharaziha, P. H., P. M. Noorinayer, B. Farzaneh, F. Aghajani, K. Jafari, F. Telkabadi, M. Atashi, A. Honardoost, M. Zali, M. R. Soleimani, M. (2009). "Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial." *Eur J Gastroenterol Hepatol* **21**(10): 1199-205.
- Khoo, M. L. S., B. Tao, H. Ma, D. D. (2008). "Long-term serial passage and neuronal differentiation capability of human bone marrow mesenchymal stem cells." *Stem Cells Dev* **17**(5): 883-96.
- Khwaja, F. A., J. Lynch, J. Andrews, P. Djakiew, D. (2004). "Ibuprofen inhibits survival of bladder cancer cells by induced expression of the p75NTR tumor suppressor protein." *Cancer Res* **64**(17): 6207-13.
- Khwaja, F. D., D. (2003). "Inhibition of cell-cycle effectors of proliferation in bladder tumor epithelial cells by the p75NTR tumor suppressor." *Mol Carcinog* **36**(3): 153-60.
- Kierszenbaum, A. (2002). "Connective tissue. In: Kierszenbaum A." *Histology and Cell Biology*(St. Louis: Mosby Inc.): 111-112.
- Kim, D. H. Y., K. H. Choi, K. S. Choi, J. Choi, S. Y. Yang, S. E. Yang, Y. S. Im, H. J. Kim, K. H. Jung, H. L. Sung, K. W. Koo, H. H. (2005). "Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell." *Cytokine* **31**(2): 119-26.
- Kim, M. J. S., K. S. Jeon, J. H. Lee, D. R. Shim, S. H. Kim, J. K. Cha, D. H. Yoon, T. K. Kim, G. J. (2011). "Human chorionic-plate-derived mesenchymal stem cells and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: a comparative analysis of their potential as placenta-derived stem cells." *Cell Tissue Res* **346**(1): 53-64.

- Kim, N. W. P., M. A. Prowse, K. R. Harley, C. B. West, M. D. Ho, P. L. Coviello, G. M. Wright, W. E. Weinrich, S. L. Shay, J. W. (1994). "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer." *Science* **266**(5193): 2011-5.
- King, J. A. O.-A., S. F. Stevens, T. Al-Mehdi, A. B. Fodstad, O. Jiang, W. G. (2004). "Activated leukocyte cell adhesion molecule in breast cancer: prognostic indicator." *Breast Cancer Res* **6**(5): R478-87.
- Kita, K. G., G. G. Phan, T. T. Herndon, D. N. Jeschke, M. G. (2010). "Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane." *Stem Cells Dev* **19**(4): 491-502.
- Klimanskaya, I. C., Y. Becker, S. Lu, S. J. Lanza, R. (2006). "Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres." *Nature* **444**(7118): 481-5.
- Knecht, A. K. B.-F., M. (2002). "Induction of the neural crest: a multigene process." *Nat Rev Genet* **3**(6): 453-61.
- Knoepfler, P. S. (2009). "Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine." *Stem Cells* **27**(5): 1050-6.
- Knudson, W. L., R. F. (2002). "CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis." *Cell Mol Life Sci* **59**(1): 36-44.
- Knudtzon, S. (1974). "In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood." *Blood* **43**(3): 357-61.
- Kolf, C. M. C., E. Tuan, R. S. (2007). "Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation." *Arthritis Res Ther* **9**(1): 204.
- Kopp, J. L. O., B. D. Desler, M. Rizzino, A. (2008). "Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells." *Stem Cells* **26**(4): 903-11.
- Kouri, J. B. J., S. A. Quintero, M. Chico, A. (1996). "Ultrastructural study of chondrocytes from fibrillated and non-fibrillated human osteoarthritic cartilage." *Osteoarthritis Cartilage* **4**(2): 111-25.
- Kramer, J. H., C. Guan, K. Wobus, A. M. Muller, P. K. Rohwedel, J. (2000). "Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4." *Mech Dev* **92**(2): 193-205.
- Krampera, M. P., A. Rigo, A. Scupoli, M. T. Tecchio, C. Malpeli, G. Scarpa, A. Dazzi, F. Pizzolo, G. Vinante, F. (2005). "HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation." *Blood* **106**(1): 59-66.
- Krause, D. S. F., M. J. Civin, C. I. May, W. S. (1996). "CD34: structure, biology, and clinical utility." *Blood* **87**(1): 1-13.
- Krause, D. S. T., N. D. Collector, M. I. Henegariu, O. Hwang, S. Gardner, R. Neutzel, S. Sharkis, S. J. (2001). "Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell." *Cell* **105**(3): 369-77.
- Kretlow, J. D. J., Y. Q. Liu, W. Zhang, W. J. Hong, T. H. Zhou, G. Baggett, L. S. Mikos, A. G. Cao, Y. (2008). "Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells." *BMC Cell Biol* **9**: 60.
- Krupinski, J. K., J. Kumar, P. Kumar, S. Wang, J. M. (1994). "Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke." *Stroke* **25**(9): 1794-8.
- Krygier, S. D., D. (2001). "The neurotrophin receptor p75NTR is a tumor suppressor in human prostate cancer." *Anticancer Res* **21**(6A): 3749-55.
- Kubota, Y. T., K. Suda, T. (2008). "Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche." *Biochem Biophys Res Commun* **366**(2): 335-9.
- Kuroda, R. I., K. Matsumoto, T. Akisue, T. Fujioka, H. Mizuno, K. Ohgushi, H. Wakitani, S. Kurosaka, M. (2007). "Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells." *Osteoarthritis Cartilage* **15**(2): 226-31.

- Kurpinski, K. L., H. Chu, J. Wang, A. Kim, A. Tsay, E. Agrawal, S. Schaffer, D. V. Li, S. (2010). "Transforming growth factor-beta and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells." *Stem Cells* **28**(4): 734-42.
- La Rocca, G. A., R. Corrao, S. Magno, F. Loria, T. Lo Iacono, M. Di Stefano, A. Giannuzzi, P. Marasa, L. Cappello, F. Zummo, G. Farina, F. (2009). "Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers." *Histochem Cell Biol* **131**(2): 267-82.
- Lakshmipathy, U. V., C. (2005). "Stem cell plasticity." *Blood Rev* **19**(1): 29-38.
- Langer, R. V., J. P. (1993). "Tissue engineering." *Science* **260**(5110): 920-6.
- Larsson, J. K., S. (2005). "The role of Smad signaling in hematopoiesis." *Oncogene* **24**(37): 5676-92.
- Lastres, P. L., A. Zhang, H. Rius, C. Almendro, N. Raab, U. Lopez, L. A. Langa, C. Fabra, A. Letarte, M. Bernabeu, C. (1996). "Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1." *J Cell Biol* **133**(5): 1109-21.
- Lastres, P. M.-P., J. Langa, C. Bernabeu, C. (1994). "Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin." *Biochem J* **301** ( Pt 3): 765-8.
- Lataillade, J. J. D., C. Bey, E. Carsin, H. Huet, C. Clairand, I. Bottollier-Depois, J. F. Chapel, A. Ernou, I. Gourven, M. Boutin, L. Hayden, A. Carcamo, C. Buglova, E. Joussemet, M. de Revel, T. Gourmelon, P. (2007). "New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy." *Regen Med* **2**(5): 785-94.
- Lavik, E. L., R. (2004). "Tissue engineering: current state and perspectives." *Appl Microbiol Biotechnol* **65**(1): 1-8.
- Lazarus, H. M. H., S. E. Gerson, S. L. Rosenthal, N. S. Caplan, A. I. (1995). "Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use." *Bone Marrow Transplant* **16**(4): 557-64.
- Le Blanc, K. F., F. Ball, L. Locatelli, F. Roelofs, H. Lewis, I. Lanino, E. Sundberg, B. Bernardo, M. E. Remberger, M. Dini, G. Egeler, R. M. Bacigalupo, A. Fibbe, W. Ringden, O. (2008). "Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study." *Lancet* **371**(9624): 1579-86.
- Le Bouteiller, P. (2000). "HLA-G in the human placenta: expression and potential functions." *Biochem Soc Trans* **28**(2): 208-12.
- Leary, A. G. O., M. (1987). "Blast cell colony assay for umbilical cord blood and adult bone marrow progenitors." *Blood* **69**(3): 953-6.
- Lee, D. S. Y., K. Rho, J. Y. Lee, E. Han, J. S. Koo, D. B. Cho, Y. S. Kim, J. Lee, K. K. Han, Y. M. (2006). "Cyclopamine treatment of human embryonic stem cells followed by culture in human astrocyte medium promotes differentiation into nestin- and GFAP-expressing astrocytic lineage." *Life Sci* **80**(2): 154-9.
- Lee, J. K., H. K. Rho, J. Y. Han, Y. M. Kim, J. (2006). "The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal." *J Biol Chem* **281**(44): 33554-65.
- Lee, K. Y. M., D. J. (2001). "Hydrogels for tissue engineering." *Chem Rev* **101**(7): 1869-79.
- Lee, O. K. K., T. K. Chen, W. M. Lee, K. D. Hsieh, S. L. Chen, T. H. (2004). "Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood." *Blood* **103**(5): 1669-75.
- Lee, R. H. P., A. A. Seo, M. J. Kota, D. J. Ylostalo, J. Larson, B. L. Semprun-Prieto, L. Delafontaine, P. Prockop, D. J. (2009). "Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6." *Cell Stem Cell* **5**(1): 54-63.
- LeGeros, R. Z. (2002). "Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates." *Clin Orthop Relat Res*(395): 81-98.
- Lehmann, J. M. R., G. Johnson, J. P. (1989). "MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(24): 9891-5.



- Lennon, P. F. T., C. T. Stahl, G. L. Colgan, S. P. (1998). "Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation." *J Exp Med* **188**(8): 1433-43.
- Leong AS-Y, C. K., Leong FJW-M (1999). "Manual of diagnostic antibodies for immunohistology." London: Oxford University Press: 95-8.
- Levenberg, S. Z., J. Basevitch, Y. Langer, R. (2007). "Endothelial potential of human embryonic stem cells." *Blood* **110**(3): 806-14.
- Li, G. Z., X. A. Wang, H. Wang, X. Meng, C. L. Chan, C. Y. Yew, D. T. Tsang, K. S. Li, K. Tsai, S. N. Ngai, S. M. Han, Z. C. Lin, M. C. He, M. L. Kung, H. F. (2009). "Comparative proteomic analysis of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow, umbilical cord, and placenta: implication in the migration." *Proteomics* **9**(1): 20-30.
- Li, L. X., T. (2005). "Stem cell niche: structure and function." *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 605-31.
- Li, X. Y., X. Lin, Q. Deng, C. Shan, Z. Yang, M. Lin, S. (2007). "Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment." *J Mol Cell Cardiol* **42**(2): 295-303.
- Liao, R. P., O. Jain, M. Mouquet, F. (2007). "The bone marrow--cardiac axis of myocardial regeneration." *Prog Cardiovasc Dis* **50**(1): 18-30.
- Liu, S. Y., M. Hou, K. Zhang, L. Zheng, X. Zhao, B. Sui, X. Xu, W. Lu, S. Guo, Q. (2012). "Immune characterization of mesenchymal stem cells in human umbilical cord Wharton's jelly and derived cartilage cells." *Cell Immunol* **278**(1-2): 35-44.
- Loebinger, M. R. E., A. Davies, D. Janes, S. M. (2009). "Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer." *Cancer Res* **69**(10): 4134-42.
- Lu, B. P., P. T. Woo, N. H. (2005). "The yin and yang of neurotrophin action." *Nat Rev Neurosci* **6**(8): 603-14.
- Lu, L. L. L., Y. J. Yang, S. G. Zhao, Q. J. Wang, X. Gong, W. Han, Z. B. Xu, Z. S. Lu, Y. X. Liu, D. Chen, Z. Z. Han, Z. C. (2006). "Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials." *Haematologica* **91**(8): 1017-26.
- Lu, S. J. F., Q. Caballero, S. Chen, Y. Moore, M. A. Grant, M. B. Lanza, R. (2007). "Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells." *Nat Methods* **4**(6): 501-9.
- Lucchini, G. I., M. Dander, E. Rovelli, A. Balduzzi, A. Bonanomi, S. Salvade, A. Capelli, C. Belotti, D. Gaipa, G. Perseghin, P. Vinci, P. Lanino, E. Chiusolo, P. Orofino, M. G. Marktel, S. Golay, J. Rambaldi, A. Biondi, A. D'Amico, G. Biagi, E. (2010). "Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population." *Biol Blood Marrow Transplant* **16**(9): 1293-301.
- Lund, R. D. W., S. Lu, B. Girman, S. Holmes, T. Sauve, Y. Messina, D. J. Harris, I. R. Kihm, A. J. Harmon, A. M. Chin, F. Y. Gosiewska, A. Mistry, S. K. (2007). "Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease." *Stem Cells* **25**(3): 602-11.
- Ma, L. L. M., F. B. Shi, P. Li, G. Pang, X. N. (2012). "Quantity and proliferation rate of mesenchymal stem cells in human cord blood during gestation." *Cell Biol Int* **36**(4): 415-8.
- MacIntosh, A. C. K., V. R. Crawford, A. Hatton, P. V. (2008). "Skeletal tissue engineering using silk biomaterials." *J Tissue Eng Regen Med* **2**(2-3): 71-80.
- MacNeil, S. (2007). "Progress and opportunities for tissue-engineered skin." *Nature* **445**(7130): 874-80.
- Mahmood, A. H., L. Schroder, H. D. Abdallah, B. M. Kassem, M. (2010). "Enhanced differentiation of human embryonic stem cells to mesenchymal progenitors by inhibition of TGF-beta/activin/nodal signaling using SB-431542." *J Bone Miner Res* **25**(6): 1216-33.
- Majore, I. M., P. Hass, R. Kasper, C. (2009). "Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord." *Cell Commun Signal* **7**: 6.

- Majore, I. M., P. Stahl, F. Hass, R. Kasper, C. (2011). "Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord." Stem Cell Rev **7**(1): 17-31.
- Majumdar, M. K. B., V. Peluso, D. P. Morris, E. A. (2000). "Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells." J Cell Physiol **185**(1): 98-106.
- Malladi, P. X., Y. Chiou, M. Giaccia, A. J. Longaker, M. T. (2006). "Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells." Am J Physiol Cell Physiol **290**(4): C1139-46.
- Mareschi, K. N., M. Rustichelli, D. Ferrero, I. Guido, D. Carbone, E. Medico, E. Madon, E. Vercelli, A. Fagioli, F. (2006). "Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: Evidence for expression of neural markers and eag K<sup>+</sup> channel types." Exp Hematol **34**(11): 1563-72.
- Margadant, C. M., H. N. Norman, J. C. Sonnenberg, A. (2011). "Mechanisms of integrin activation and trafficking." Curr Opin Cell Biol **23**(5): 607-14.
- Margossian, T. R., L. Makdissy, N. Stoltz, J. F. Bensoussan, D. Huselstein, C. (2012). "Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly: comparative phenotype analysis between tissue and in vitro expansion." Biomed Mater Eng **22**(4): 243-54.
- Marion, R. M. S., K. Li, H. Tejera, A. Schoeftner, S. Ortega, S. Serrano, M. Blasco, M. A. (2009). "Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells." Cell Stem Cell **4**(2): 141-54.
- Markway, B. D. T., G. K. Brooke, G. Hudson, J. E. Cooper-White, J. J. Doran, M. R. (2010). "Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures." Cell Transplant **19**(1): 29-42.
- Martin-Rendon, E. S., D. Lu, F. Girdlestone, J. Navarrete, C. Watt, S. M. (2008). "5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies." Vox Sang **95**(2): 137-48.
- Martin, G. R. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7634-8.
- Martin, J. A. H., B. E. Sutton, P. D. Ventura, S. J. Menacker, F. Kirmeyer, S. Munson, M. L. (2007). "Births: final data for 2005." Natl Vital Stat Rep **56**(6): 1-103.
- Martinaud, C., C. Thepenier (2010). "Les cellules souches mésenchymateuses: des cellules pour la médecine régénérative du futur?" Revue Francophone des Laboratoires **427**: 47-59.
- Mateizel, I. D. B., A. Van de Velde, H. De Rycke, M. Van Steirteghem, A. Cornelissen, R. Van der Elst, J. Liebaers, I. Van Riet, I. Sermon, K. (2008). "Efficient differentiation of human embryonic stem cells into a homogeneous population of osteoprogenitor-like cells." Reprod Biomed Online **16**(5): 741-53.
- Mathew, R. J., W. Sharma, A. Zhao, Y. Clarke, L. E. Cheng, X. Wang, H. Salli, U. Vrana, K. E. Robertson, G. P. Zhu, J. Wang, S. (2010). "Robust activation of the human but not mouse telomerase gene during the induction of pluripotency." FASEB J **24**(8): 2702-15.
- Mays, R. W. v. t. H., W. Ting, A. E. Perry, R. Deans, R. (2007). "Development of adult pluripotent stem cell therapies for ischemic injury and disease." Expert Opin Biol Ther **7**(2): 173-84.
- McCarthy, R. C. B., A. G. Green, M. L. Dwulet, F. E. (2011). "Tissue dissociation enzymes for isolating human islets for transplantation: factors to consider in setting enzyme acceptance criteria." Transplantation **91**(2): 137-45.
- McLaren, A. (2001). "Ethical and social considerations of stem cell research." Nature **414**(6859): 129-31.
- Mehul, B. D.-M., M. A. Aubery, M. Codogno, P. Mannherz, H. G. (1992). "Enzymatic activity and in vivo distribution of 5'-nucleotidase, an extracellular matrix binding glycoprotein, during the development of chicken striated muscle." Exp Cell Res **203**(1): 62-71.

- Meisel, R. Z., A. Laryea, M. Gobel, U. Daubener, W. Dilloo, D. (2004). "Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation." Blood **103**(12): 4619-21.
- Merceron, C. V., C. Clouet, J. Collic-Jouault, S. Weiss, P. Guicheux, J. (2008). "Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue engineering." Joint Bone Spine **75**(6): 672-4.
- Messina, C. F., M. de Fazio, V. Dini, G. Calo, M. P. Calore, E. (2008). "Prevention and treatment of acute GvHD." Bone Marrow Transplant **41 Suppl 2**: S65-70.
- Metcalf, D. (2007). "Concise review: hematopoietic stem cells and tissue stem cells: current concepts and unanswered questions." Stem Cells **25**(10): 2390-5.
- Meyer, J. S. S., R. L. Capowski, E. E. Wright, L. S. Wallace, K. A. McMillan, E. L. Zhang, S. C. Gamm, D. M. (2009). "Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(39): 16698-703.
- Meyerson, M. C., C. M. Eaton, E. N. Ellisen, L. W. Steiner, P. Caddle, S. D. Ziaugra, L. Beijersbergen, R. L. Davidoff, M. J. Liu, Q. Bacchetti, S. Haber, D. A. Weinberg, R. A. (1997). "hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization." Cell **90**(4): 785-95.
- Miller, D. W. G., W. Karges, B. Stahl, S. Ernst, M. Ramaswamy, A. Sedlacek, H. H. Muller, R. Adamkiewicz, J. (1999). "Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells." Int J Cancer **81**(4): 568-72.
- Mimeault, M. B., S. K. (2006). "Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies." Stem Cells **24**(11): 2319-45.
- Mitchell, K. E. W., M. L. Mitchell, B. M. Martin, P. Davis, D. Morales, L. Helwig, B. Beerenstrauch, M. Abou-Easa, K. Hildreth, T. Troyer, D. Medicetty, S. (2003). "Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia." Stem Cells **21**(1): 50-60.
- Moffett, A. L., Y. W. (2004). "The immunological paradox of pregnancy: a reappraisal." Placenta **25**(1): 1-8.
- Mohamadnejad, M. A., K. Mohyeddin-Bonab, M. Bagheri, M. Bashtar, M. Ghanaati, H. Baharvand, H. Ghavamzadeh, A. Malekzadeh, R. (2007). "Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis." Arch Iran Med **10**(4): 459-66.
- Montanucci, P. B., G. Pescara, T. Pennoni, I. Di Giovanni, F. Calafiore, R. (2011). "New simple and rapid method for purification of mesenchymal stem cells from the human umbilical cord Wharton jelly." Tissue Eng Part A **17**(21-22): 2651-61.
- Moretti, P. H., T. Marten, D. Lavrentieva, A. Majore, I. Hass, R. Kasper, C. (2010). "Mesenchymal stromal cells derived from human umbilical cord tissues: primitive cells with potential for clinical and tissue engineering applications." Adv Biochem Eng Biotechnol **123**: 29-54.
- Morrison, S. J. S., A. C. (2008). "Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life." Cell **132**(4): 598-611.
- Mueller, S. M. G., J. (2001). "Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges." J Cell Biochem **82**(4): 583-90.
- Muller, I. K., S. Holzwarth, C. Isensee, G. Lang, P. Neunhoffer, F. Dominici, M. Greil, J. Handgretinger, R. (2008). "Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation." Blood Cells Mol Dis **40**(1): 25-32.
- Nagaya, N. K., K. Itoh, T. Iwase, T. Murakami, S. Miyahara, Y. Fujii, T. Uematsu, M. Ohgushi, H. Yamagishi, M. Tokudome, T. Mori, H. Miyatake, K. Kitamura, S. (2005). "Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy." Circulation **112**(8): 1128-35.
- Nakagami, H. M., R. Maeda, K. Kikuchi, Y. Ogihara, T. Kaneda, Y. (2006). "Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy." J Atheroscler Thromb **13**(2): 77-81.

- Nakagawa, M. K., M. Tanabe, K. Takahashi, K. Ichisaka, T. Aoi, T. Okita, K. Mochiduki, Y. Takizawa, N. Yamanaka, S. (2008). "Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts." Nat Biotechnol **26**(1): 101-6.
- Nakahata, T. O., M. (1982). "Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors." J Clin Invest **70**(6): 1324-8.
- Nakamura, T. M. M., G. B. Chapman, K. B. Weinrich, S. L. Andrews, W. H. Lingner, J. Harley, C. B. Cech, T. R. (1997). "Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human." Science **277**(5328): 955-9.
- Nakamura, Y. M., Y. Yahata, T. Miyatake, H. Sakai, D. Mochida, J. Hotta, T. Ando, K. (2006). "Expression of CD90 on keratinocyte stem/progenitor cells." Br J Dermatol **154**(6): 1062-70.
- Nanaev, A. K. K., G. Milovanov, A. P. Domogatsky, S. P. Kaufmann, P. (1997). "Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord." Placenta **18**(1): 53-64.
- Naor, D. S., R. V. Ish-Shalom, D. (1997). "CD44: structure, function, and association with the malignant process." Adv Cancer Res **71**: 241-319.
- Nauta, A. J. F., W. E. (2007). "Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells." Blood **110**(10): 3499-506.
- Nekanti, U. D., S. Venugopal, P. Totey, S. Ta, M. (2010). "Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia." Int J Biol Sci **6**(5): 499-512.
- Nekanti, U. R., V. B. Bahirvani, A. G. Jan, M. Totey, S. Ta, M. (2010). "Long-term expansion and pluripotent marker array analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells." Stem Cells Dev **19**(1): 117-30.
- Niwa, H. M., J. Smith, A. G. (2000). "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells." Nat Genet **24**(4): 372-6.
- Noel, D. D., F. Jorgense, C. (2002). "Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair." Curr Opin Investig Drugs **3**(7): 1000-4.
- Notzli, H. C., J. (1997). "Deformation of loaded articular cartilage prepared for scanning electron microscopy with rapid freezing and freeze-substitution fixation." J Orthop Res **15**(1): 76-86.
- Nury, D. N., T. Puceat, M. (2009). "Human embryonic stem cells and cardiac cell fate." J Cell Physiol **218**(3): 455-9.
- Odorico, J. S. K., D. S. Thomson, J. A. (2001). "Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines." Stem Cells **19**(3): 193-204.
- Ofori-Acquah, S. F. K., J. A. (2008). "Activated leukocyte cell adhesion molecule: a new paradox in cancer." Transl Res **151**(3): 122-8.
- Oldershaw, R. A. B., M. A. Lowe, E. T. Bates, N. Grady, L. M. Soncin, F. Brison, D. R. Hardingham, T. E. Kimber, S. J. (2010). "Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes." Nat Biotechnol **28**(11): 1187-94.
- Olivier, E. N. R., A. C. Bouhassira, E. E. (2006). "Differentiation of human embryonic stem cells into bipotent mesenchymal stem cells." Stem Cells **24**(8): 1914-22.
- Oswald, J. B., S. Jorgensen, B. Feldmann, S. Ehninger, G. Bornhauser, M. Werner, C. (2004). "Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro." Stem Cells **22**(3): 377-84.
- Panchision, D. M. (2009). "The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease." J Cell Physiol **220**(3): 562-8.
- Pansky, A. R., B. Tobiasch, E. (2007). "Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells." Clin Lab **53**(1-2): 81-4.
- Parmar, K. M., P. Vergilio, J. A. Sackstein, R. Down, J. D. (2007). "Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(13): 5431-6.
- Pearson, J. L.-O., L. Rojas-Rios, P. Gonzalez-Reyes, A. (2009). "Recent advances in Drosophila stem cell biology." Int J Dev Biol **53**(8-10): 1329-39.

- Pera, M. F. A., J. Houssami, S. Reubinoff, B. Trounson, A. Stanley, E. G. Ward-van Oostwaard, D. Mummery, C. (2004). "Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin." *J Cell Sci* **117**(Pt 7): 1269-80.
- Phinney, D. G. K., G. Isaacson, R. L. Prockop, D. J. (1999). "Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation." *J Cell Biochem* **72**(4): 570-85.
- Pontikoglou, C. D., F. Sensebe, L. Papadaki, H. A. (2011). "Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation." *Stem Cell Rev* **7**(3): 569-89.
- Pountos, I. G., P. V. (2005). "Biology of mesenchymal stem cells." *Injury* **36** Suppl 3: S8-S12.
- Prasad, V. K. L., K. G. Kleiner, G. I. Talano, J. A. Jacobsohn, D. Broadwater, G. Monroy, R. Kurtzberg, J. (2011). "Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study." *Biol Blood Marrow Transplant* **17**(4): 534-41.
- Prat-Vidal, C. R., S. Farre, J. Galvez, C. Llach, A. Molina, C. E. Hove-Madsen, L. Garcia, J. Cinca, J. Bayes-Genis, A. (2007). "Umbilical cord blood-derived stem cells spontaneously express cardiomyogenic traits." *Transplant Proc* **39**(7): 2434-7.
- Priller, J. P., D. A. Klett, F. F. Kempermann, G. Kreutzberg, G. W. Dirnagl, U. (2001). "Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo." *J Cell Biol* **155**(5): 733-8.
- Prindull, G. P., B. Meulen, N. (1978). "Haematopoietic stem cells (CFUc) in human cord blood." *Acta Paediatr Scand* **67**(4): 413-6.
- Puceat, M. (2008). "Protocols for cardiac differentiation of embryonic stem cells." *Methods* **45**(2): 168-71.
- Puceat, M. B., A. (2007). "Embryonic stem cells: from bench to bedside." *Clin Pharmacol Ther* **82**(3): 337-9.
- Qi, H. A., D. J. Williams, S. M. La Pean, A. Pan, W. Verfaillie, C. M. (2003). "Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6): 3305-10.
- Qu, Z. M., S. Fang, G. (2009). "[Clinical study on treatment of bone nonunion with MSCs derived from human umbilical cord]." *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* **23**(3): 345-7.
- Quirici, N. S., D. Bossolasco, P. Servida, F. Lumini, C. Deliliers, G. L. (2002). "Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies." *Exp Hematol* **30**(7): 783-91.
- Rachakatla, R. S. P., M. M. Ayuzawa, R. Edwards, S. M. Marini, F. C. Weiss, M. L. Tamura, M. Troyer, D. (2008). "Combination treatment of human umbilical cord matrix stem cell-based interferon-beta gene therapy and 5-fluorouracil significantly reduces growth of metastatic human breast cancer in SCID mouse lungs." *Cancer Invest* **26**(7): 662-70.
- Raio, L. C., A. Ghezzi, F. Passi, A. Karousou, E. Viola, M. Vigetti, D. De Luca, G. Bolis, P. (2005). "Hyaluronan content of Wharton's jelly in healthy and Down syndrome fetuses." *Matrix Biol* **24**(2): 166-74.
- Rasmusson, I. R., O. Sundberg, B. Le Blanc, K. (2005). "Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms." *Exp Cell Res* **305**(1): 33-41.
- Rege, T. A. and J. S. Hagood (2006). "Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses." *Biochim Biophys Acta* **1763**(10): 991-9.
- Rege, T. A. P., M. A. Gomez, C. Grenett, H. E. Murphy-Ullrich, J. E. Hagood, J. S. (2006). "Thy-1, via its GPI anchor, modulates Src family kinase and focal adhesion kinase phosphorylation and subcellular localization, and fibroblast migration, in response to thrombospondin-1/hep I." *Exp Cell Res* **312**(19): 3752-67.

- Ren, G. S., J. Zhang, L. Zhao, X. Ling, W. L'Huillie, A. Zhang, J. Lu, Y. Roberts, A. I. Ji, W. Zhang, H. Rabson, A. B. Shi, Y. (2009). "Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression." *Stem Cells* **27**(8): 1954-62.
- Resta, R. Y., Y. Thompson, L. F. (1998). "Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73." *Immunol Rev* **161**: 95-109.
- Rey, A. (2003). "Are stem cells well named?" *Med Sci (Paris)* **19**: 645.
- Reyes, M. D., A. Jahagirdar, B. Koodie, L. Marker, P. H. Verfaillie, C. M. (2002). "Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow." *J Clin Invest* **109**(3): 337-46.
- Reyftmann, L. D., H. Hamamah, S. Puceat, M. Hedon, B. (2004). "[Embryonic stem cells: a position for the obstetrician and gynaecologist. Part one]." *Gynecol Obstet Fertil* **32**(10): 866-71.
- Richards, M. F., C. Y. Bongso, A. (2010). "Comparative evaluation of different in vitro systems that stimulate germ cell differentiation in human embryonic stem cells." *Fertil Steril* **93**(3): 986-94.
- Rickard, D. J. K., M. Hefferan, T. E. Sarkar, G. Spelsberg, T. C. Riggs, B. L. (1996). "Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow." *J Bone Miner Res* **11**(3): 312-24.
- Rimmer, S. J., C. Zhao, B. Collier, J. Gilmore, L. Sabnis, S. Wyman, P. Sammon, C. Fullwood, N. J. MacNeil, S. (2007). "Epithelialization of hydrogels achieved by amine functionalization and co-culture with stromal cells." *Biomaterials* **28**(35): 5319-31.
- Roberts, S. J. H., D. Buttery, L. D. Shakesheff, K. M. (2008). "Clinical applications of musculoskeletal tissue engineering." *Br Med Bull* **86**: 7-22.
- Rogers, J. J. Y., H. E. Adkison, L. R. Lucas, P. A. Black, A. C., Jr. (1995). "Differentiation factors induce expression of muscle, fat, cartilage, and bone in a clone of mouse pluripotent mesenchymal stem cells." *Am Surg* **61**(3): 231-6.
- Rogers, M. L. B., A. Zola, H. Rush, R. A. (2008). "CD 271 (P75 neurotrophin receptor)." *J Biol Regul Homeost Agents* **22**(1): 1-6.
- Rohwedel, J. M., V. Bober, E. Arnold, H. H. Hescheler, J. Wobus, A. M. (1994). "Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents." *Dev Biol* **164**(1): 87-101.
- Romanov, Y. A. S., V. A. Smirnov, V. N. (2003). "Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord." *Stem Cells* **21**(1): 105-10.
- Roobrouck, V. D. C., C. Jacobs, S. A. Ulloa-Montoya, F. Crippa, S. Sohni, A. Roberts, S. J. Luyten, F. P. Van Gool, S. W. Sampaolesi, M. Delforge, M. Luttun, A. Verfaillie, C. M. (2011). "Differentiation potential of human postnatal mesenchymal stem cells, mesoangioblasts, and multipotent adult progenitor cells reflected in their transcriptome and partially influenced by the culture conditions." *Stem Cells* **29**(5): 871-82.
- Rosova, I. D., M. Capoccia, B. Link, D. Nolta, J. A. (2008). "Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells." *Stem Cells* **26**(8): 2173-82.
- Rouas-Freiss, N. G., R. M. Menier, C. Dausset, J. Carosella, E. D. (1997). "Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11520-5.
- Roux, P. P. B., P. A. (2002). "Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor." *Prog Neurobiol* **67**(3): 203-33.
- Rowland, B. D. P., D. S. (2006). "KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer." *Nat Rev Cancer* **6**(1): 11-23.
- Roy, N. S. C., C. Singh, S. K. Yang, L. Beal, M. F. Goldman, S. A. (2006). "Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes." *Nat Med* **12**(11): 1259-68.

- Rubenstein, J. D. K., J. K. Henkelman, R. M. (1996). "Effects of compression and recovery on bovine articular cartilage: appearance on MR images." *Radiology* **201**(3): 843-50.
- Sadej, R. I., K. Rajfur, Z. Ostapkowicz, A. Kohler, J. Skladanowski, A. C. Mitchell, B. S. Spychala, J. (2008). "Tenascin C interacts with ecto-5'-nucleotidase (eN) and regulates adenosine generation in cancer cells." *Biochim Biophys Acta* **1782**(1): 35-40.
- Sadej, R. S., J. Skladanowski, A. C. (2006). "Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of human melanoma." *Melanoma Res* **16**(3): 213-22.
- Sagrinati, C. R., E. Lazzeri, E. Lasagni, L. Romagnani, P. (2008). "Stem-cell approaches for kidney repair: choosing the right cells." *Trends Mol Med* **14**(7): 277-85.
- Salehinejad, P. A., N. B. Ali, A. M. Omar, A. R. Mohit, M. Janzamin, E. Samani, F. S. Torshizi, Z. Nematollahi-Mahani, S. N. (2012). "Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **48**(2): 75-83.
- Salem, H. K. T., C. (2010). "Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status." *Stem Cells* **28**(3): 585-96.
- Salgado, A. J. C., O. P. Reis, R. L. (2004). "Bone tissue engineering: state of the art and future trends." *Macromol Biosci* **4**(8): 743-65.
- Salingcarnboriboon, R. Y., H. Tsuji, K. Obinata, M. Amagasa, T. Nifuji, A. Noda, M. (2003). "Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property." *Exp Cell Res* **287**(2): 289-300.
- Salmi, M. J., S. (1995). "Different forms of human vascular adhesion protein-1 (VAP-1) in blood vessels in vivo and in cultured endothelial cells: implications for lymphocyte-endothelial cell adhesion models." *Eur J Immunol* **25**(10): 2803-12.
- Sarugaser, R. L., D. Baksh, D. Hosseini, M. M. Davies, J. E. (2005). "Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors." *Stem Cells* **23**(2): 220-9.
- Sato, K. O., K. Oh, I. Meguro, A. Hatanaka, K. Nagai, T. Muroi, K. Ozawa, K. (2007). "Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells." *Blood* **109**(1): 228-34.
- Schieker, M. P., C. Haasters, F. Schieker, J. Docheva, D. Bocker, W. Guelkan, H. Neth, P. Jochum, M. Mutschler, W. (2007). "Human mesenchymal stem cells at the single-cell level: simultaneous seven-colour immunofluorescence." *J Anat* **210**(5): 592-9.
- Schieker, M. P., C. Reitz, K. Hemraj, I. Neth, P. Mutschler, W. Milz, S. (2004). "The use of four-colour immunofluorescence techniques to identify mesenchymal stem cells." *J Anat* **204**(2): 133-9.
- Schimming, R. M., D. (2002). "Endoglin (CD105) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity." *Head Neck* **24**(2): 151-6.
- Schor, N. F. (2005). "The p75 neurotrophin receptor in human development and disease." *Prog Neurobiol* **77**(3): 201-14.
- Schugar, R. C. C., S. M. Wescoe, K. E. Schmidt, B. T. Askew, Y. Nance, J. J. Evron, J. M. Peault, B. Deasy, B. M. (2009). "High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue." *J Biomed Biotechnol* **2009**: 789526.
- Schuldiner, M. Y., O. Itskovitz-Eldor, J. Melton, D. A. Benvenisty, N. (2000). "Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(21): 11307-12.
- Schwartz, R. E. R., M. Koodie, L. Jiang, Y. Blackstad, M. Lund, T. Lenvik, T. Johnson, S. Hu, W. S. Verfaillie, C. M. (2002). "Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells." *J Clin Invest* **109**(10): 1291-302.
- Sekiya, I. L., B. L. Vuoristo, J. T. Cui, J. G. Prockop, D. J. (2004). "Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs)." *J Bone Miner Res* **19**(2): 256-64.
- Selmani, Z. N., A. Gaiffe, E. Obert, L. Tiberghien, P. Rouas-Freiss, N. Carosella, E. D. Deschaseaux, F. (2009). "HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells." *Transplantation* **87**(9 Suppl): S62-6.

- Sewell WA, C. M., Hegen M. (1997). "CD45 workshop panel report In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors." Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.: 499-502.
- Shake, J. G. G., P. J. Baumgartner, W. A. Senechal, G. Meyers, J. Redmond, J. M. Pittenger, M. F. Martin, B. J. (2002). "Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects." Ann Thorac Surg **73**(6): 1919-25; discussion 1926.
- Shamblott, M. J. A., J. Wang, S. Bugg, E. M. Littlefield, J. W. Donovan, P. J. Blumenthal, P. D. Huggins, G. R. Gearhart, J. D. (1998). "Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13726-31.
- Shay, J. W. W., W. E. (2011). "Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells." FEBS Lett **584**(17): 3819-25.
- Shih, I. M. (1999). "The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology." J Pathol **189**(1): 4-11.
- Shima, H. T., K. Iwasaki, H. Yoshihara, H. Gomei, Y. Hosokawa, K. Arai, F. Takahashi, T. Suda, T. (2009). "Reconstitution activity of hypoxic cultured human cord blood CD34-positive cells in NOG mice." Biochem Biophys Res Commun **378**(3): 467-72.
- Shin, H. J., S. Mikos, A. G. (2003). "Biomimetic materials for tissue engineering." Biomaterials **24**(24): 4353-64.
- Shu, S. N. W., L. Wang, J. H. Zhan, Y. T. Chen, H. S. Wang, Y. (2004). "Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells." World J Gastroenterol **10**(19): 2818-22.
- Sieveking, D. P. N., M. K. (2009). "Cell therapies for therapeutic angiogenesis: back to the bench." Vasc Med **14**(2): 153-66.
- Silvan, U. D.-T., A. Arluzea, J. Andrade, R. Silio, M. Arechaga, J. (2009). "Hypoxia and pluripotency in embryonic and embryonal carcinoma stem cell biology." Differentiation **78**(2-3): 159-68.
- Simon, M. C. K., B. (2008). "The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(4): 285-96.
- Smadja-Joffe, F. M., M. Le Bousse-Kerdiles, C. Delpech, B. Leibovitch, M. P. Dufour, F. Jasmin, C. (1992). "Increased synthesis of extracellular spleen glycosaminoglycans in an experimental myeloproliferative syndrome." Leukemia **6**(10): 1011-9.
- Smith, A. (2006). "A glossary for stem-cell biology." Nature **441**: 1060.
- Sobolewski, K. B., E. Chyczewski, L. Jaworski, S. (1997). "Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly." Biol Neonate **71**(1): 11-21.
- Soderdahl, T. K.-M., B. Heins, N. Edsbacke, J. Bjorquist, P. Cotgreave, I. Jernstrom, B. (2007). "Glutathione transferases in hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells." Toxicol In Vitro **21**(5): 929-37.
- Sorrentino, B. P. (2004). "Clinical strategies for expansion of haematopoietic stem cells." Nat Rev Immunol **4**(11): 878-88.
- Stavropoulos, M. E. M., I. Barberi, T. (2009). "Differentiation of multipotent mesenchymal precursors and skeletal myoblasts from human embryonic stem cells." Curr Protoc Stem Cell Biol **Chapter 1**: Unit 1F 8.
- Stenderup, K. J., J. Clausen, C. Kassem, M. (2003). "Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells." Bone **33**(6): 919-26.
- Stochaj, U. F., K. Mathes, W. Mannherz, H. G. (1989). "5'-Nucleotidases of chicken gizzard and human pancreatic adenocarcinoma cells are anchored to the plasma membrane via a phosphatidylinositol-glycan." Biochem J **262**(1): 33-40.
- Struys, T. M., M. Martens, W. Donders, R. Wolfs, E. Lambrichts, I. (2011). "Ultrastructural and immunocytochemical analysis of multilineage differentiated human dental pulp- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells." Cells Tissues Organs **193**(6): 366-78.
- Sun, L. W., D. Liang, J. Zhang, H. Feng, X. Wang, H. Hua, B. Liu, B. Ye, S. Hu, X. Xu, W. Zeng, X. Hou, Y. Gilkeson, G. S. Silver, R. M. Lu, L. Shi, S. (2010). "Umbilical cord mesenchymal stem cell



- transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum* **62**(8): 2467-75.
- Sun, Z. M. L., H. L. Geng, L. Q. Wang, X. B. Yao, W. Liu, X. Ding, K. Y. Han, Y. S. Yang, H. Z. Tang, B. L. Tong, J. Zhu, W. B. Wang, Z. Y. (2010). "HLA-matched sibling transplantation with G-CSF mobilized PBSCs and BM decreases GVHD in adult patients with severe aplastic anemia." *J Hematol Oncol* **3**: 51.
- Swart, G. W. (2002). "Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration." *Eur J Cell Biol* **81**(6): 313-21.
- Synnestvedt, K. F., G. T. Comerford, K. M. Louis, N. Karhausen, J. Eltzhig, H. K. Hansen, K. R. Thompson, L. F. Colgan, S. P. (2002). "Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia." *J Clin Invest* **110**(7): 993-1002.
- Tachezy, M. Z., H. Marx, A. H. Gebauer, F. Rawnaq, T. Kaifi, J. T. Sauter, G. Izbicki, J. R. Bockhorn, M. (2011). "ALCAM (CD166) expression as novel prognostic biomarker for pancreatic neuroendocrine tumor patients." *J Surg Res* **170**(2): 226-32.
- Taghizadeh, R. R. C., K. J. Cetrulo, C. L. (2011). "Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications." *Placenta* **32 Suppl 4**: S311-5.
- Takahashi, K. T., K. Ohnuki, M. Narita, M. Ichisaka, T. Tomoda, K. Yamanaka, S. (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." *Cell* **131**(5): 861-72.
- Takahashi, K. Y., S. (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." *Cell* **126**(4): 663-76.
- Takakura, M. K., S. Kanaya, T. Tanaka, M. Inoue, M. (1998). "Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer." *Cancer Res* **58**(7): 1558-61.
- Takeda, J. S., S. Bell, G. I. (1992). "Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues." *Nucleic Acids Res* **20**(17): 4613-20.
- Taupin, P. (2006). "Autologous transplantation in the central nervous system." *Indian J Med Res* **124**(6): 613-8.
- Taura, D. and M. S. Noguchi, M. Hosoda, K. Mori, E. Okada, Y. Takahashi, K. Homma, K. Oyamada, N. Inuzuka, M. Sonoyama, T. Ebihara, K. Tamura, N. Itoh, H. Suemori, H. Nakatsuji, N. Okano, H. Yamanaka, S. Nakao, K. (2009). "Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells." *FEBS Lett* **583**(6): 1029-33.
- Thomas, E. D. (2000). "Landmarks in the development of hematopoietic cell transplantation." *World J Surg* **24**(7): 815-8.
- Thompson, L. F. E., H. K. Ibla, J. C. Van De Wiele, C. J. Resta, R. Morote-Garcia, J. C. Colgan, S. P. (2004). "Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia." *J Exp Med* **200**(11): 1395-405.
- Thomson, J. A. I.-E., J. Shapiro, S. S. Waknitz, M. A. Swiergiel, J. J. Marshall, V. S. Jones, J. M. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." *Science* **282**(5391): 1145-7.
- Thomson, T. M. R., W. J. Chesa, P. G. Green, S. H. Mena, A. C. Old, L. J. (1988). "Expression of human nerve growth factor receptor on cells derived from all three germ layers." *Exp Cell Res* **174**(2): 533-9.
- Toh, W. S. L., E. H. Richards, M. Cao, T. (2010). "In vitro derivation of chondrogenic cells from human embryonic stem cells." *Methods Mol Biol* **584**: 317-31.
- Tokoyoda, K. H., A. E. Nakayama, T. Radbruch, A. (2010). "Organization of immunological memory by bone marrow stroma." *Nat Rev Immunol* **10**(3): 193-200.
- Toma, C. P., M. F. Cahill, K. S. Byrne, B. J. Kessler, P. D. (2002). "Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart." *Circulation* **105**(1): 93-8.

- Tong, C. K. V., S. Tan, B. C. Abdullah, M. Vidyadaran, S. Seow, H. F. Ramasamy, R. (2011). "Generation of mesenchymal stem cell from human umbilical cord tissue using a combination enzymatic and mechanical disassociation method." *Cell Biol Int* **35**(3): 221-6.
- Torsney, E. C., R. Parums, D. Collis, M. Arthur, H. M. (2002). "Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo." *Inflamm Res* **51**(9): 464-70.
- Tremoleda, J. L. F., N. R. Khan, N. S. Wojtacha, D. Christodoulou, I. Tye, B. J. Racey, S. N. Collishaw, S. Sottile, V. Thomson, A. J. Simpson, A. H. Noble, B. S. McWhir, J. (2008). "Bone tissue formation from human embryonic stem cells in vivo." *Cloning Stem Cells* **10**(1): 119-32.
- Tritz-Schiavi, J. C., N. Henrionnet, C. de Isla, N. Bensoussan, D. Magdalou, J. Benkirane-Jessel, N. Stoltz, J. F. Huselstein, C. (2010). "Original approach for cartilage tissue engineering with mesenchymal stem cells." *Biomed Mater Eng* **20**(3): 167-74.
- Tropepe, V. C., B. L. Chiasson, B. J. Horsford, D. J. Elia, A. J. McInnes, R. R. van der Kooy, D. (2000). "Retinal stem cells in the adult mammalian eye." *Science* **287**(5460): 2032-6.
- Trounson, A. (2006). "The production and directed differentiation of human embryonic stem cells." *Endocr Rev* **27**(2): 208-19.
- Troyer, D. L. W., M. L. (2008). "Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population." *Stem Cells* **26**(3): 591-9.
- Tsagias, N. K., I. Karagiannis, V. Eleftheriadou, M. Koliakos, G. G. (2011). "Isolation of mesenchymal stem cells using the total length of umbilical cord for transplantation purposes." *Transfus Med* **21**(4): 253-61.
- Tuli, R. L., W. J. Tuan, R. S. (2003). "Current state of cartilage tissue engineering." *Arthritis Res Ther* **5**(5): 235-8.
- Turnpenny, L. B., S. Spalluto, C. M. Piper, K. Cameron, I. T. Wilson, D. I. Hanley, N. A. (2003). "Derivation of human embryonic germ cells: an alternative source of pluripotent stem cells." *Stem Cells* **21**(5): 598-609.
- Ujhazy, P. B., E. S. Pietkiewicz, J. M. Kitano, H. Skaar, J. R. Ehrke, M. J. Mihich, E. (1996). "Evidence for the involvement of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in drug resistance." *Int J Cancer* **68**(4): 493-500.
- Ulloa-Montoya, F. V., C. M. Hu, W. S. (2005). "Culture systems for pluripotent stem cells." *J Biosci Bioeng* **100**(1): 12-27.
- Vacanti, J. P. L., R. (1999). "Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation." *Lancet* **354** Suppl 1: S132-4.
- Valensi-Kurtz, M. L., S. Cohen, M. A. Aharonowiz, M. Cohen-Kupiec, R. Sheinin, A. Ashery, U. Reubinoff, B. Weil, M. (2010). "Enriched population of PNS neurons derived from human embryonic stem cells as a platform for studying peripheral neuropathies." *PLoS One* **5**(2): e9290.
- Van Bokkelen, G. (2011). "Company profile: Athersys." *Regen Med* **6**(1): 39-43.
- Van Hoof, D. D. A., K. A. German, M. S. (2009). "Derivation of insulin-producing cells from human embryonic stem cells." *Stem Cell Res* **3**(2-3): 73-87.
- Vidarsson, H. H., J. Sartipy, P. (2010). "Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes for in vitro and in vivo applications." *Stem Cell Rev* **6**(1): 108-20.
- Vojtassak, J. D., L. Kubes, M. Bakos, D. Jarabek, L. Ulicna, M. Blasko, M. (2006). "Autologous biograft and mesenchymal stem cells in treatment of the diabetic foot." *Neuro Endocrinol Lett* **27** Suppl 2: 134-7.
- Volmer, J. B. T., L. F. Blackburn, M. R. (2006). "Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated adenosine production is tissue protective in a model of bleomycin-induced lung injury." *J Immunol* **176**(7): 4449-58.
- von Bonin, M. S., F. Goedecke, A. Richter, K. Wuschek, N. Holig, K. Platzbecker, U. Illmer, T. Schaich, M. Schetelig, J. Kiani, A. Ordemann, R. Ehninger, G. Schmitz, M. Bornhauser, M. (2009). "Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium." *Bone Marrow Transplant* **43**(3): 245-51.

- Wada, T. H., M. Minami, I. Tooi, N. Amagai, Y. Nakatsuji, N. Aiba, K. (2009). "Highly efficient differentiation and enrichment of spinal motor neurons derived from human and monkey embryonic stem cells." *PLoS One* **4**(8): e6722.
- Wagner, W. H., A. D. Zenke, M. (2010). "Different facets of aging in human mesenchymal stem cells." *Tissue Eng Part B Rev* **16**(4): 445-53.
- Wagner, W. R., C. Wein, F. Diehlmann, A. Frankhauser, M. Schubert, R. Eckstein, V. Ho, A. D. (2007). "Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors." *Stem Cells* **25**(10): 2638-47.
- Wakitani, S. N., M. Tensho, K. Okabe, T. Machida, H. Ohgushi, H. (2007). "Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees." *J Tissue Eng Regen Med* **1**(1): 74-9.
- Walkup, M. H. G., D. A. (2006). "Hepatic stem cells: in search of." *Stem Cells* **24**(8): 1833-40.
- Wang, H. S. H., S. C. Peng, S. T. Huang, C. C. Wei, H. M. Guo, Y. J. Fu, Y. S. Lai, M. C. Chen, C. C. (2004). "Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord." *Stem Cells* **22**(7): 1330-7.
- Wang, J. M. K., S. Pye, D. Haboubi, N. al-Nakib, L. (1994). "Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers." *J Natl Cancer Inst* **86**(5): 386-8.
- Wang, J. M. K., S. Pye, D. van Agthoven, A. J. Krupinski, J. Hunter, R. D. (1993). "A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues." *Int J Cancer* **54**(3): 363-70.
- Wang, L. T., I. Seshareddy, K. Weiss, M. L. Detamore, M. S. (2009). "A comparison of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for cartilage tissue engineering." *Tissue Eng Part A* **15**(8): 2259-66.
- Wang, L. Z., X. Zhou, T. Ma, D. Chen, S. Zhi, X. Yin, L. Shao, Z. Ou, Z. Zhou, P. (2008). "Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells." *J Cancer Res Clin Oncol* **134**(3): 365-72.
- Wang, S. Q., X. Zhao, R. C. (2012). "Clinical applications of mesenchymal stem cells." *J Hematol Oncol* **5**(1): 19.
- Wang, T. X., Z. Jiang, W. Ma, A. (2006). "Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell." *Int J Cardiol* **109**(1): 74-81.
- Watt, S. M. B., H. J. Rappold, I. Chan, J. Y. Lee-Prudhoe, J. Jones, T. Zannettino, A. C. Simmons, P. J. Doyonnas, R. Sheer, D. Butler, L. H. (1998). "CD164, a novel sialomucin on CD34(+) and erythroid subsets, is located on human chromosome 6q21." *Blood* **92**(3): 849-66.
- Watt, S. M. W., J. Genevier, H. Fawcett, J. Simmons, D. L. Hatzfeld, A. Nesbitt, S. A. Coombe, D. R. (1993). "The heparin binding PECAM-1 adhesion molecule is expressed by CD34+ hematopoietic precursor cells with early myeloid and B-lymphoid cell phenotypes." *Blood* **82**(9): 2649-63.
- Weiss, M. L. A., C. Medicetty, S. Seshareddy, K. B. Weiss, R. J. VanderWerff, I. Troyer, D. McIntosh, K. R. (2008). "Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells." *Stem Cells* **26**(11): 2865-74.
- Weiss, M. L. M., S. Bledsoe, A. R. Rachakatla, R. S. Choi, M. Merchav, S. Luo, Y. Rao, M. S. Velagaleti, G. Troyer, D. (2006). "Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease." *Stem Cells* **24**(3): 781-92.
- Werkmeister, E. and D. d. I. Dumas, N. Marchal, L. Stoltz, J. F. (2008). "Interest of multimodal imaging in tissue engineering." *Biomed Mater Eng* **18**(4-5): 329-33.
- Werkmeister, E. d. I., N. Marchal, L. Stoltz, J. F. Dumas, D. (2008). "Interest of second harmonic generation imaging for diagnosis in thick and opaque tissue." *Biorheology* **45**(3-4): 375-83.
- Werkmeister, E. d. I., N. Netter, P. Stoltz, J. F. Dumas, D. (2009). "Collagenous extracellular matrix of cartilage submitted to mechanical forces studied by second harmonic generation microscopy." *Photochem Photobiol* **86**(2): 302-10.

- Wernig, M. M., A. Cassady, J. P. Jaenisch, R. (2008). "c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts." *Cell Stem Cell* **2**(1): 10-2.
- Werr, J. X., X. Hedqvist, P. Ruoslahti, E. Lindbom, L. (1998). "beta1 integrins are critically involved in neutrophil locomotion in extravascular tissue In vivo." *J Exp Med* **187**(12): 2091-6.
- Westerweel, P. E. V., M. C. (2008). "Directing myogenic mesenchymal stem cell differentiation." *Circ Res* **103**(6): 560-1.
- Wheeler, E. F. B., M. (1992). "Spatiotemporal patterns of expression of NGF and the low-affinity NGF receptor in rat embryos suggest functional roles in tissue morphogenesis and myogenesis." *J Neurosci* **12**(3): 930-45.
- Wiesmann, A. B., H. J. Mentrup, C. Wiesmann, H. P. (2006). "Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation." *Head Face Med* **2**: 8.
- Wikstrom, P. L., I. F. Stattin, P. Egevad, L. Bergh, A. (2002). "Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer." *Prostate* **51**(4): 268-75.
- Witkowska-Zimny, M. W., K. Walkiewicz, A. E. Pojda, Z. Przybylski, J. Lewandowska-Szumiel, M. (2012). "Effect of substrate stiffness on differentiation of umbilical cord stem cells." *Acta Biochim Pol* **59**(2): 261-4.
- Wong, S. H. H., L. Chevalier, S. Philip, A. (2000). "Endoglin expression on human microvascular endothelial cells association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF-beta signalling receptors." *Eur J Biochem* **267**(17): 5550-60.
- Wright, W. E. P., M. A. Rainey, W. E. Byrd, W. Shay, J. W. (1996). "Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells." *Dev Genet* **18**(2): 173-9.
- Wu, K. H. Z., B. Lu, S. H. Feng, B. Yang, S. G. Du, W. T. Gu, D. S. Han, Z. C. Liu, Y. L. (2007). "In vitro and in vivo differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells." *J Cell Biochem* **100**(3): 608-16.
- Xu, H. H. Z., L. Detamore, M. S. Takagi, S. Chow, L. C. (2010). "Umbilical cord stem cell seeding on fast-resorbable calcium phosphate bone cement." *Tissue Eng Part A* **16**(9): 2743-53.
- Xu, R. H. C., X. Li, D. S. Li, R. Addicks, G. C. Glennon, C. Zwaka, T. P. Thomson, J. A. (2002). "BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast." *Nat Biotechnol* **20**(12): 1261-4.
- Yamamoto, M. C., L. Johkura, K. Asanuma, K. Okouchi, Y. Ogiwara, N. Sasaki, K. (2006). "Branching ducts similar to mesonephric ducts or ureteric buds in teratomas originating from mouse embryonic stem cells." *Am J Physiol Renal Physiol* **290**(1): F52-60.
- Yamanaka, S. (2009). "Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation." *Nature* **460**(7251): 49-52.
- Yang, C. C. S., Y. H. Ko, M. H. Hsu, S. Y. Cheng, H. Fu, Y. S. (2008). "Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord." *PLoS One* **3**(10): e3336.
- Yang, X. F. H., X. He, J. Zhang, L. H. Su, X. J. Dong, Z. Y. Xu, Y. J. Li, Y. Li, Y. L. (2011). "High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells." *J Biomed Sci* **18**: 59.
- Yehezkel, S. R.-S., A. Segev, Y. Tzukerman, M. Shaked, R. Huber, I. Gepstein, L. Skorecki, K. Selig, S. (2011). "Reprogramming of telomeric regions during the generation of human induced pluripotent stem cells and subsequent differentiation into fibroblast-like derivatives." *Epigenetics* **6**(1): 63-75.
- Yoshida, S. S., S. Nagoshi, N. Fukuda, K. Matsuzaki, Y. Okano, H. Tsubota, K. (2006). "Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea." *Stem Cells* **24**(12): 2714-22.
- Yoshimura, H. M., T. Nimura, A. Yokoyama, A. Koga, H. Sekiya, I. (2007). "Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle." *Cell Tissue Res* **327**(3): 449-62.

- Young, H. E., and Black, A.C., Jr (2004). "Adult stem cells." Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol **276**(75\_102).
- Young, H. E. S., T. A. Bray, R. A. Hudson, J. Floyd, J. A. Hawkins, K. Thomas, K. Austin, T. Edwards, C. Cuzzourt, J. Duenzl, M. Lucas, P. A. Black, A. C., Jr. (2001). "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 **264**(1): 51-62.
- Young, R. G. B., D. L. Weber, W. Caplan, A. I. Gordon, S. L. Fink, D. J. (1998). "Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair." J Orthop Res **16**(4): 406-13.
- Yu, J. V., M. A. Smuga-Otto, K. Antosiewicz-Bourget, J. Frane, J. L. Tian, S. Nie, J. Jonsdottir, G. A. Ruotti, V. Stewart, R. Slukvin,, II Thomson, J. A. (2007). "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." Science **318**(5858): 1917-20.
- Yu, J. X. Z., X. T. Liao, Y. Q. Zhang, Q. Y. Chen, H. Lin, M. Kumar, S. (2003). "Relationship between expression of CD105 and growth factors in malignant tumors of gastrointestinal tract and its significance." World J Gastroenterol **9**(12): 2866-9.
- Zannettino, A. C. B., H. J. Niutta, S. Watt, S. M. Benton, M. A. Simmons, P. J. (1998). "The sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hematopoiesis." Blood **92**(8): 2613-28.
- Zhang, P. L., X. Wang, H. (2009). "Clinical transplantation of a tissue-engineered airway." Lancet **373**(9665): 718; author reply 718-9.
- Zhang, S. G., J. Sun, A. Xu, D. Qian, J. Lin, J. Zhao, Y. Hu, H. Li, Y. Wang, K. Zou, Y. (2006). "Comparison of various kinds of bone marrow stem cells for the repair of infarcted myocardium: single clonally purified non-hematopoietic mesenchymal stem cells serve as a superior source." J Cell Biochem **99**(4): 1132-47.
- Zhang, X. S., P. Przyborski, S. Cooke, M. Armstrong, L. Lako, M. Stojkovic, M. (2006). "Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos." Stem Cells **24**(12): 2669-76.
- Zhang, Z. L., H. Shi, M. Xu, R. Fu, J. Lv, J. Chen, L. Lv, S. Li, Y. Yu, S. Geng, H. Jin, L. Lau, G. K. Wang, F. S. (2012). "Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve liver function and ascites in decompensated liver cirrhosis patients." J Gastroenterol Hepatol **27 Suppl 2**: 112-20.
- Zhang, Z. Y. T., S. H. Chong, M. S. Schantz, J. T. Fisk, N. M. Choolani, M. A. Chan, J. (2009). "Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells." Stem Cells **27**(1): 126-37.
- Zhao, T. Z., Z. N. Rong, Z. Xu, Y. (2010). "Immunogenicity of induced pluripotent stem cells." Nature **474**(7350): 212-5.
- Zhou, P. Z., X. Zhou, T. Chen, S. Li, X. Wang, L. Yin, L. Shao, Z. Ou, Z. (2007). "Overexpression of Ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix." Cancer Biol Ther **6**(3): 426-31.
- Zhu, H. M., N. Klein, A. Barsky, L. W. Weinberg, K. Barr, M. L. Demetriou, A. Wu, G. D. (2006). "The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix." Stem Cells **24**(4): 928-35.
- Zoller, M. (1997). "Joint features of metastasis formation and lymphocyte maturation and activation." Adv in Cancer Res **65**: 215-47.
- Zucchini, A. D. Z., G. Brando, B. Canonico, B. (2001). "Cd90." J Biol Regul Homeost Agents **15**(1): 82-5.