

Potentialité des cellules stromales de la gelée de Wharton en ingénierie du cartillage

Loïc Reppel

▶ **To cite this version:**

Loïc Reppel. Potentialité des cellules stromales de la gelée de Wharton en ingénierie du cartillage. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0164 . tel-01751055

HAL Id: tel-01751055
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751055

Submitted on 29 Mar 2018

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

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

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

Loïc REPPEL

Potentialité des Cellules Stromales de la Gelée de Wharton en Ingénierie du Cartilage

Soutenue le 24 octobre 2014

Membres du jury :

Rapporteurs :

M. Moncef GUENOUNOU	**PU-PH, EA2070, IFR53, Université de Reims**
M. Jean-Jacques LATAILLADE	**PU-PH, Hôpital Militaire Percy, Clamart**

Examinateurs :

Mme Nadia JESSEL	**DR1, UMR 1109 INSERM-UDS, Strasbourg**
Mme Chantal FINANCE	**PU-PH, UMR 7565 CNRS-UL, Nancy**
Mme Danièle BENSOUSSAN	**PU-PH, UMR 7365 CNRS-UL, directeur de thèse**
Mme Céline HUSELSTEIN	**MCF, HDR, UMR 7365 CNRS-UL, co-directeur de thèse**

Membre invité:

M. Jean-François STOLTZ	**Professeur Emérite, Université de Lorraine, Nancy**

UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA)

REMERCIEMENTS

A mes Directeurs de thèse :

Madame le Professeur Danièle Bensoussan,

Pour avoir accepté de co-diriger ce travail.

Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée et pour l'étendue de vos connaissances, dans le domaine de la thérapie cellulaire, que vous m'avez apportée quotidiennement. Je tiens également à vous remercier pour votre soutien indéfectible et vos encouragements constants qui m'ont permis d'accéder à un poste Hospitalo-Universitaire.

Que ce travail témoigne de ma sincère reconnaissance et de mon dévouement.

Madame le Docteur Céline Huselstein,

Pour avoir accepté de co-diriger ce travail.

Je vous remercie de m'avoir permis de réaliser un Stage d'Initiation à la Recherche en 2007, puis un Master 2 en 2010, qui m'ont donné l'envie de poursuivre dans cette voie. Je tiens également à vous remercier pour votre disponibilité et votre soutien tout au long de ces dernières années.

Veuillez trouver dans cet ouvrage le témoignage de ma sincère reconnaissance.

A mes juges :

Madame le Docteur Nadia Jessel,

Pour m'avoir fait l'honneur de juger cette thèse.

Soyez assurée de ma sincère reconnaissance ainsi que de mon profond respect.

Madame le Professeur Chantal Finance,

Pour m'avoir fait l'honneur de juger cette thèse.

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à mon comité de suivi de thèse et d'être restée toujours bienveillante à mon égard. Je tiens également à vous remercier pour la qualité de vos enseignements dispensés au cours de mes études de Pharmacie.

Soyez assurée de ma sincère reconnaissance ainsi que de mon profond respect.

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur Jean-François Stoltz,

Pour m'avoir fait l'honneur de juger cette thèse.

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir accueilli au sein de votre équipe de recherche et pour la confiance que vous m'avez accordée au quotidien.

Je vous exprime ici ma profonde gratitude.

A mes rapporteurs :

Monsieur le Professeur Moncef Guenounou,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ce travail.

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance ainsi que de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Jean-Jacques Lataillade,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ce travail.

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à mon comité de suivi de thèse et pour les échanges enrichissants que nous avons pu avoir au cours de nos rencontres.

Je vous exprime ici toute ma reconnaissance ainsi que mon profond respect.

A toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ces travaux

Aux personnels et étudiants du laboratoire (Jessica, Léonore et les autres…)

Pour votre travail, votre disponibilité et votre sympathie.

REMERCIEMENTS

A mes parents

A mes deux sœurs, Chloé et Manon

A mes grands-mères

A tout le reste de la famille

A mes amis

Pour votre soutien et vos encouragements.

Sans vous, rien n'aurait été possible !

Tables des matières

Liste des publications et communications 4
Liste des abréviations 6
Table des figures 9
Liste des tableaux 11

Indroduction générale 12

Etat de l'art 15

I. Les différentes cellules souches humaines 15
A. Les cellules souches totipotentes 16
B. Les cellules souches pluripotentes 16
1. Les cellules souches embryonnaires 16
a. Définition 16
b. Caractérisation 17
c. Aspect réglementaire de leur utilisation en recherche 18
2. Les cellules souches pluripotentes induites 19
a. Définition 19
b. La reprogrammation de cellules somatiques adultes 19
c. Caractérisation 21
C. Les cellules souches multipotentes 22
1. Les cellules souches hématopoïétiques 22
a. Définition 22
b. Caractérisation 23
c. Localisation et domiciliation des CSH chez l'adulte 24
d. Différentes sources de CSH 25
2. Les cellules stromales/souches mésenchymateuses 26
a. Définition et identification 26
b. Localisation, environnement et sources des CSM 27
c. Caractérisation 29
d. Effet immunomodulateur des CSM 33
e. Comportement en culture in vitro 37
f. Effet de l'hypoxie sur la culture in vitro des CSM 37
D. Les cellules souches unipotentes 40
1. Définition 40
2. Les cellules souches épithéliales 40
E. Les cellules souches cancéreuses 41

F. Conclusion 42

II. Les CSM de la gelée de Wharton 44
A. La gelée de Wharton 44
B. Les CSM de la gelée de Wharton 45
1. Découverte 45
2. Isolement et mise en culture des CSM-GW 45
3. Aspects réglementaires du prélèvement 48
4. Cryoconservation des CSM-GW 48
5. Caractérisation des CSM-GW 49
a. Morphologie et comportement en culture in vitro 49
b. Phénotype et expression de marqueurs 52
c. Différenciation in vitro 53
d. Effet immunomodulateur 54
6. Comparaison avec les CSM de la moelle osseuse 55
7. Effet de l'hypoxie sur la culture *in vitro* des CSM-GW 57
C. Influence des paramètres obstétricaux 58
1. Facteurs obstétricaux relatifs à la parturiente 58
2. Facteurs obstétricaux relatifs au travail et à l'accouchement 58
3. Facteurs obstétricaux relatifs au nouveau-né 59
4. Etudes sur les CSM-GW 59
D. Conclusion 60

III. Utilisation des cellules souches en ingénierie tissulaire du cartilage 61
A. Le cartilage articulaire 61
1. Structure, physiologie et physiopathologie 61
2. Fonctions du cartilage 63
3. Lésions du cartilage 63
4. Contexte socio-économique 64
B. Traitements actuels des lésions cartilagineuses 65
1. Traitements pharmacologiques 65
2. Traitements chirurgicaux 65
a. Forages de Pridie et microfractures 65
b. La mosaïcoplastie 66
c. La thérapie cellulaire : transplantation de chondrocytes autologues 67
3. Conclusion 69
C. L'ingénierie tissulaire du cartilage 70

1. L'ingénierie tissulaire 70
a. Définition générale 70
b. L'ingénierie tissulaire du cartilage 71
2. Le choix de la source cellulaire 72
a. Les cellules natives ou chondrocytes 72
b. Cellules plus précoces : les cellules souches pluripotentes 72
c. Cellules plus précoces : les cellules souches multipotentes 73
d. L'utilisation des CSM-GW en ingénierie tissulaire du cartilage 74
3. Le choix du biomatériau 75
a. Nature des biomatériaux 75
b. Principaux mode de fabrication 77
c. Matrice simple ou mixte, monophasique 78
d. Biomatériaux stratifiés, multiphasiques 78
4. Fonctionnalisation du biomatériau 79
a. Fonctionnalisation par voie biochimique 79
b. Fonctionnalisation par stimulations physiques 80

Objectifs de la thèse 81

Résultats 83

I- CARACTERISATION FINE DES CELLULES STROMALES/SOUCHES MESENCHYMATEUSES ISSUES DE LA GELEE DE WHARTON 83

II- POTENTIALITES DES CSM-GW EN INGENIERIE TISSULAIRE DU CARTILAGE 133

III- CADRE REGLEMENTAIRE DE L'UTILISATION DES CSM-GW 153

Discussion générale 162

Conclusions et perspectives 172

Références bibliographiques 175

Liste des publications et communications

Publications :

- **Reppel L**, Caunday O, Bultel S, Stoltz JF, Huselstein C, Bensoussan D. Cellules souches et nouvelle loi de bioéthique française. *Hématologie,* 2012 ; 18 (3) : 175-81.

- Margossian T, **Reppel L**, Makdissy N, Stoltz JF, Bensoussan D and Huselstein C. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly: Comparative phenotype analysis between tissue and in vitro expansion. *Bio-Medical Materials and Engineering,* 2012 ; 22 : 243-254.

- **Reppel L**, Huselstein C, De Isla N, Bensoussan D, Stoltz JF. Wharton's jelly mesenchymal stem cells for cartilage engineering. *ICRS newsletter,* 2012 ; 16 : 26-27.

- **Reppel L**, Margossian T, Yaghi L, Moreau P, Mercier N, Léger L, Hupont S, Stoltz JF, Bensoussan D, Huselstein C. Hypoxic Culture Conditions for Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Wharton's Jelly: A Critical Parameter to Consider in a Therapeutic Context. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 2014, 9 (4): 306-318.

- **Reppel L**, Schiavi J, Charif N, Léger L, Yu H, Stoltz JF, Bensoussan D, Huselstein C. Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Wharton's jelly embedded in Alginate hydrogel: a new stem cell source for Cartilage Tissue Engineering compared to Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Bone marrow. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2014, ***soumis***.

- Léger L, **Reppel L**, Guerci P, Cauchois G, Virion JM, Hupont S, Rahouadj R, Magdalou J, Stoltz JF, Huselstein C, Bensoussan D. Obstetric factors impact proliferation and chondrogenic differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. ***En cours de préparation***.

Communications affichées dans des congrès internationaux avec actes publiés (ACT) :

- **ACT 01** : Schiavi-Tritz J, **Reppel L**, Magdalou J, Stoltz JF, Huselstein C. Improving hBM-MSCs differentiation in a stratified scaffold for osteoarticular repairing, OARSI 2011, San Diego, USA, 15-18 septembre 2011. **Publié** dans *Osteoarthritis & Cartilage* en septembre 2011.

- **ACT 02** : **Reppel L**, Margossian T, Moreau P, Mercier N, Stoltz JF, Huselstein C, Bensoussan D. Impact of oxygen content on characteristics of mesenchymal stem cells isolated from Wharton's jelly, OARSI 2012, Barcelone, Espagne, 26-29 avril 2012. **Publié** dans *Osteoarthritis & Cartilage* en avril 2012.

Communications orales dans des congrès internationaux et nationaux sans acte publié (COM) :

- **COM 01** : **Reppel L**, Moreau P, Mercier N, Stoltz JF, Huselstein C, Bensoussan D. Influence of oxygen concentration during monolayer expansion on characteristics of mesenchymal stem cell from Wharton's jelly. 16ème SarLorLux Meeting, Nancy, France, 28 novembre 2012.

- **COM 02**: **Reppel L**, Yaghi L, Moreau P, Mercier N, Stoltz JF, Bensoussan D, Huselstein C. Mesenchymal stem cells from Wharton's jelly: extended characterization for cartilage engineering. 5th China-France International Symposium of Stem Cells, Kunming, Chine, 14-15 décembre 2013.

Communications affichées dans des congrès internationaux et nationaux sans acte publié (COM) :

- **COM 03** : Margossian T, **Reppel L**, Stoltz JF, Huselstein C, Bensoussan D. In vitro expansion of mesenchymal stem cell from Wharton's Jelly. First European Conference on Mesenchymal Stem Cells, Toulouse, France, 18-20 Novembre 2010.

- **COM 04** : **Reppel L**, Margossian T, Moreau P, Mercier N, Stoltz JF, Huselstein C, Bensoussan D. 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. 6ème Congrès de la Société Française de Bioingénierie Cellulaire et Tissulaire, Reims, France, 28-30 septembre 2011.

- **COM 05** : **Reppel L**, Margossian T, Moreau P, Mercier N, Stoltz JF, Huselstein C, Bensoussan D. Influence de la teneur en oxygène sur les caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton. 7ème Journée Claude HURIET de la Recherche Médicale de la Faculté de Médecine et du CHU de Nancy, Nancy, France, 2 mars 2012.

- **COM 06** : **Reppel L**, Margossian T, Moreau P, Mercier N, Bensoussan D, Stoltz JF, Huselstein C. Wharton's Jelly mesenchymal stem cells characterization during monolayer expansion, 4th Meeting FIRST, Pavie, Italie, 14 mai 2012.

- **COM 07** : Stoltz JF, De Isla N, Decot V, Huselstein C, **Reppel L**, Magdalou J, LI YY, Bensoussan D. Influence of mechanical forces on cells and tissues, 4th Eurosummer school on biorheology and symposium on micro and nanomechanics and mechanobiology of cells, tissues and systems, Varna, Bulgarie, 29 août-2 septembre 2012.

- **COM 08**: Léger L, **Reppel L**, Guerci P, Cauchois G, Virion JM, Hupont S, Rahouadj R, Magdalou J, Stoltz JF, Huselstein C, Bensoussan D. Is there an influence of obstetric factors on proliferation and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly? Congrès de l'European Tissue Repair Society, Reims, France, 23-25 octobre 2013.

Liste des abréviations

ACTC: Actin, alpha, cardiac muscle 1

Alg : Alginate

AMP: Adénosine Mono Phosphate

BMPs : Bone Morphogenetic Proteins

CD : Cluster de Différenciation

CFU-F: Fibroblasts Colony-Forming Unit

CMF : Cytométrie en Flux

COMP : Cartilage Oligo Matrix Protein

CS : Cellule Souche

CSC : Cellule Souche Cancéreuse

CSE : Cellule Souche Embryonnaire

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

CSM : Cellule Stromale/Souche Mésenchymateuse

CSM-MO : Cellule Stromale/Souche Mésenchymateuse de Moelle Osseuse

CSM-GW : Cellule Stromale/Souche Mésenchymateuse de Gelée de Wharton

DMSO : Dimethyl Sulfoxide

EMA : European Medicines Agency

FCH : Facteur de Croissance Hématopoïétique

FGF: Fibroblast Growth Factor

G-CSF: Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GD: Ganglioside

GM-CSF: Granulocyte Macrophage -Colony Stimulating Factor

GRB7: Growth factor Receptor-Bound protein 7

GVHD: Graft versus Host Disease

GW: Gelée de Wharton

HA: Acide Hyaluronique

HES: Hématoxyline-Eosine-Safran

HGF: Hepatocyte Growth Factor

HIF-1: Hypoxia Inducible Factor-1

HLA : Human Leucocyte Antigen

IDO : Indoleamine 2,3-dioxygénase

IFN-γ : Interféron-γ

IGF : Insulin-like Growth Factor

IL : Interleukine

IMC : Indice de Masse Corporelle

IMF: Intensité Moyenne de Fluorescence

iPS : Cellule souche Pluripotente Induite

ISCT : International Society for Cellular Therapy

Klf4: Krüppel-like factor 4

MEC : Matrice Extracellulaire

MO : Moelle Osseuse

MTI : Médicament de Thérapie Innovante

NK : Cellules Natural Killer

Oct : Octamer-binding transcription factor

P : Passage

PGs : Protéoglycanes

PGE2 : Prostaglandines E2

PPARγ : Peroxysome proliferator-activated receptor γ

RLB : Régression Linéaire Bivariée

RLM : Régression Linéaire Multivariée

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Runx2 : Runt-related transcription factor 2

SCF : Stem Cell Factor

SDF-1 : Stroma Derived Factor-1

Sox2 : SRY-box2

SSEA : Stage Specific Embryonic Antigens

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TGF-β : Transforming Gtowth Factor-β

Liste des abréviations

TLR: Toll-like Receptor

TNF-α: Tumor Necrosis Factor-α

TSG-6: TNF-Stimulated gene 6 protein

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Table des figures

Figure 1: Différents potentiels de différenciation des cellules souches au cours du développement embryonnaire. 15
Figure 2 : Principe de la reprogrammation de cellules somatiques adultes. 20
Figure 3: La CSH dans le microenvironnement médullaire (niche hématopoïétique). 25
Figure 4: Culture de cellules souches mésenchymateuses humaines issues de la moelle osseuse. 27
Figure 5: La capacité de trans-différenciation des CSM. 31
Figure 6: Effets des CSM sur les cellules de l'immunité adaptative. 34
Figure 7: Effets des CSM sur les cellules de l'immunité innée. 35
Figure 8 : Coupe histologique transversale d'un cordon ombilical humain. 44
Figure 9 : Isolement et mise en culture des CSM-GW. 47
Figure 10: Représentation du cartilage articulaire au niveau d'une articulation de genou. 61
Figure 11: Représentation schématique de l'organisation macromoléculaire du cartilage articulaire. 62
Figure 12: Principe de la technique des microfractures. 66
Figure 13: Principe de la technique de la mosaïcoplastie. 66
Figure 14: Principe de la transplantation de chondrocytes autologues. 67
Figure 15: Principe de base de l'ingénierie tissulaire. 70
Figure 16: Principe de base de l'ingénierie tissulaire adaptée au cartilage. 71
Figure 17: Représentation schématique des différentes étapes de la chondrogénèse. 73
Figure 18: Architectures de biomatériaux utilisés dans l'ingénierie tissulaire du cartilage. 77
Figure 19 : Représentation schématique des différents objectifs de la thèse. 82
Figure 20: Isolement des CSM-GW par méthode non enzymatique: méthode dite des « explants ». 98
Figure 21 : Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes de pluripotence : Oct-4A, Nanog et Sox2. 99
Figure 22: Maintien du potentiel chondrogénique des CSM-GW au cours de l'amplification (de P1 à P7). 100
Figure 23: Méthode de mesure des micromasses 117
Figure 24: Méthode d'isolement des colorations par le logiciel ImageJ 118
Figure 25: Viabilité et phénotype des CSM avant différenciation cellulaire. 122
Figure 26 : Répartition des temps de doublement des échantillons en P_1 et en P_2. 122

Figure 27: Temps de doublement en P_1 en fonction de l'administration de SYNTOCINON® 123
Figure 28: Temps de doublement en P_2 en fonction de l'asthme..... 123
Figure 29 : Evolution du temps de doublement en fonction de l'âge gestationnel, du poids placentaire et du poids de naissance..... 124
Figure 30 : Temps de doublement en P_2 en fonction du diabète gestationnel..... 124
Figure 31: Influence d'un travail long sur le volume des micromasses..... 125
Figure 32 : Influence d'un accouchement pathologique sur le volume des micromasses 125
Figure 33: Influence du déclenchement sur la synthèse de protéoglycanes..... 126
Figure 34 : Résultats préliminaires montrant l'imprégnation hormonale de la gelée de Wharton et l'expression basale de PPARγ entre les CSM-MO et les CSM-GW. 166
Figure 35 : Etude de l'expression d'HLA-G5 au niveau des CSM-GW par la technique de cytométrie en flux..... 168

Liste des tableaux

Tableau 1: Marqueurs exprimés à la surface des CSH. 23
Tableau 2: Nature et fonctions des principaux marqueurs exprimés à la surface des CSM. .. 29
Tableau 3: Antigènes exprimés ou non à la surface des CSM humaines. 30
Tableau 4 : Effets de l'hypoxie sur les propriétés des CSM. 39
Tableau 5: Comparaison des propriétés des différentes cellules souches humaines. 43
Tableau 6 : Capacités de différenciation *in vitro* des CSM-GW en cellules d'origine non mésodermique. 54
Tableau 7 : Comparaison entre les CSM-GW et les CSM-MO. 56
Tableau 8 : Influence de l'hypoxie sur les CSM-GW en culture *in vitro*. 57
Tableau 9: Utilisation *in vitro* des CSM-GW en ingénierie tissulaire du cartilage. 75
Tableau 10: Avantages et inconvénients de certains biomatériaux utilisés dans l'ingénierie tissulaire du cartilage. 76
Tableau 11 : Liste des amorces utilisées en PCR. 119
Tableau 12: Tableaux descriptifs des populations en fonction des critères obstétricaux retenus. 121
Tableau 13: Résultats de l'analyse de régression linéaire bivariée 127
Tableau 14 : Résultats de l'analyse de régression linéaire multivariée 128

Indroduction générale

Depuis maintenant plusieurs années, les cellules souches associées à une médecine régénératrice, semblent pouvoir apporter de nombreuses solutions thérapeutiques, notamment dans le cadre de pathologies dégénératives. De l'embryon à l'Homme adulte, les sources de cellules souches sont multiples. Selon leur origine et leur mode d'obtention, ces cellules ne possèdent pas toutes les mêmes potentiels de différenciation. Nous verrons qu'en fonction de leurs propriétés et de leur accessibilité, certaines d'entre elles représentent une source attractive de cellules pour l'ingénierie tissulaire du cartilage.

Du fait de leurs capacités d'auto-renouvellement, de différenciation vers les lignées mésodermiques et d'immunomodulation, les cellules stromales/souches mésenchymateuses (CSM) représentent, aujourd'hui, une source cellulaire intéressante pour des applications en thérapie cellulaire et en ingénierie tissulaire. Actuellement, les CSM les plus utilisées, dans ces deux domaines, sont les CSM adultes issues de la moelle osseuse (CSM-MO). Cependant, cette source cellulaire présente certaines limites. En effet, le prélèvement de moelle osseuse est difficilement accessible (douloureux, invasif pour le patient, risque infectieux non négligeable). De plus, la densité de CSM au sein de l'environnement médullaire est relativement faible. Enfin, les CSM provenant de moelle osseuse d'individus âgés présentent des capacités de prolifération et de différenciation altérées. Par conséquent, il est devenu nécessaire, ces dernières années, pour les scientifiques et les cliniciens, d'identifier une source de CSM alternative aux CSM adultes.

Dans cette perspective, les CSM d'origine fœtale présentent un certain nombre d'avantages par rapport aux CSM adultes. Leur prélèvement est simple, sans geste invasif, sûr et indolore pour la mère et l'enfant. Les CSM sont relativement faciles à isoler et possèdent un fort pouvoir d'expansion *in vitro*, permettant ainsi d'obtenir des lots de cellules en quantité suffisante pour de potentielles utilisations thérapeutiques. Parmi ces CSM d'origine fœtale, les CSM issues du cordon ombilical et notamment de la gelée de Wharton semblent offrir des perspectives intéressantes. En plus de répondre aux critères minimums de définition des CSM, les CSM de la gelée de Wharton (CSM-GW) présenteraient un profil plus immature que les CSM adultes. Facilement accessibles, ces cellules ne présentent aucun problème d'ordre éthique. Longtemps considéré comme un déchet opératoire, le cordon ombilical propose une

source potentiellement illimitée de CSM. Enfin, leur faible immunogénicité permettrait d'envisager leur utilisation en situation allogénique.

Dans la première partie de ce travail, nous avons réalisé une large caractérisation des CSM issues de la gelée de Wharton, en réalisant tout d'abord une analyse phénotypique *in situ*, puis, dans un second temps, une caractérisation *in vitro* au cours de leur amplification des passages 1 à 7 (P1 à P7), et en comparaison avec les CSM de la moelle osseuse (CSM-MO) (utilisées comme contrôle). Nous avons également étudié l'impact de la concentration en oxygène, au cours de l'amplification, sur les propriétés des CSM-GW. L'objectif de cette étude est de définir des conditions de culture optimales des CSM-GW dans la perspective d'une utilisation clinique de ces dernières. Parallèlement, nous avons soulevé l'hypothèse que des facteurs obstétricaux peuvent avoir un impact sur l'expansion des CSM-GW et leur potentiel de différenciation chondrocytaire et nous avons souhaité identifier ces paramètres. L'objectif consiste à déterminer s'il est possible de privilégier l'utilisation de certains cordons pour une médecine régénératrice du cartilage.

Suite à un traumatisme ou à une dégénérescence tissulaire telle que la dégénérescence du cartilage, la médecine réparatrice a su se développer et tente d'apporter des solutions thérapeutiques aux patients. Le caractère avasculaire du cartilage empêche une régénération spontanée efficace du tissu, entrainant une perte d'intégrité de ce dernier. Aujourd'hui, un grand nombre de patients souffrent de lésions cartilagineuses et notamment d'arthrose. Les traitements actuels n'ayant pas montré de résultats satisfaisants à long terme, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques devient alors un véritable enjeu non seulement de santé publique mais aussi économique. Dans cette perspective, certaines cellules souches, comme les CSM par exemple, se sont trouvées être d'excellentes candidates à l'ingénierie tissulaire du cartilage. Cette dernière consiste, à partir de cellules ensemencées dans un biomatériau vecteur et/ou tuteur, à préparer *in vitro*, un néo-tissu cartilagineux qui sera réimplanté au niveau d'une lésion chondrale. De par leurs propriétés, les CSM-GW semblent représenter une source prometteuse de CSM pour l'ingénierie tissulaire du cartilage.

Dans la deuxième grande partie de notre travail, nous nous sommes intéressés aux potentialités des CSM-GW en ingénierie tissulaire du cartilage. Ainsi, nous avons proposé, pour la première fois, d'évaluer le potentiel chondrogénique de CSM-GW ensemencées dans une matrice support composée d'un hydrogel d'alginate enrichi en acide hyaluronique. Les

hydrogels ont été construits par une méthode originale de pulvérisation. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la différenciation chondrogénique des CSM-GW cultivées dans un environnement tridimensionnelle et en absence de facteur de croissance. L'évaluation de la différenciation est faite aussi bien au niveau phénotypique qu'au niveau de la synthèse matricielle. Pour conclure sur le fait que les CSM-GW peuvent représenter une réelle source alternative de cellules souches pour l'ingénierie tissulaire du cartilage, nous avons comparé nos résultats avec ceux obtenus avec les CSM-MO.

Enfin, parallèlement à tous ces travaux, avec l'évolution de la nouvelle loi de bioéthique entre 2011 et 2012, nous nous sommes également intéressés aux aspects réglementaires qui encadrent l'utilisation thérapeutique ou scientifique des cellules souches en France. Le changement de statut réglementaire du cordon ombilical, stipulé dans cette nouvelle loi de bioéthique, nous a semblé devoir être explicité dans ce travail.

Etat de l'art

I. Les différentes cellules souches humaines

Les cellules souches (CS) sont des cellules dites « immatures » et « indifférenciées ». Par conséquent, elles sont capables, dans un environnement donné, de se *différencier* en cellules ou organes spécialisés, voire d'engendrer un organisme entier. Ces cellules sont également douées d'une propriété *d'auto-renouvellement*, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de se multiplier à l'identique, notamment en culture *in vitro*. Ainsi, les CS peuvent se diviser de façon symétrique, donnant naissance à deux cellules indifférenciées ou différenciées, ou bien de façon asymétrique, en générant une cellule spécialisée et une cellule immature. Ces stratégies permettent de conserver un stock de cellules immatures tout au long de la vie.

Le domaine des cellules souches est devenu très complexe ces dernières années : les progrès techniques ont permis d'isoler et de caractériser, de l'embryon à l'adulte, de multiples populations de CS. Ces cellules immatures possèdent de nombreuses caractéristiques et peuvent être classées de différentes façons : une classification physiologique, qui suit la succession chronologique des CS au cours de la vie : de l'embryon (qui crée les tissus), au fœtus et à l'adulte, où les tissus ne font que se renouveler ou se réparer en cas de lésion. Il est possible également de classer ces cellules selon leur potentiel de différenciation, s'étendant ainsi de la totipotence à l'unipotence (**Figure 1**). Enfin, dans un contexte pathologique, une catégorie particulière de CS, représentée par les cellules souches cancéreuses, sont à l'origine de la formation des tumeurs malignes au sein de l'organisme.

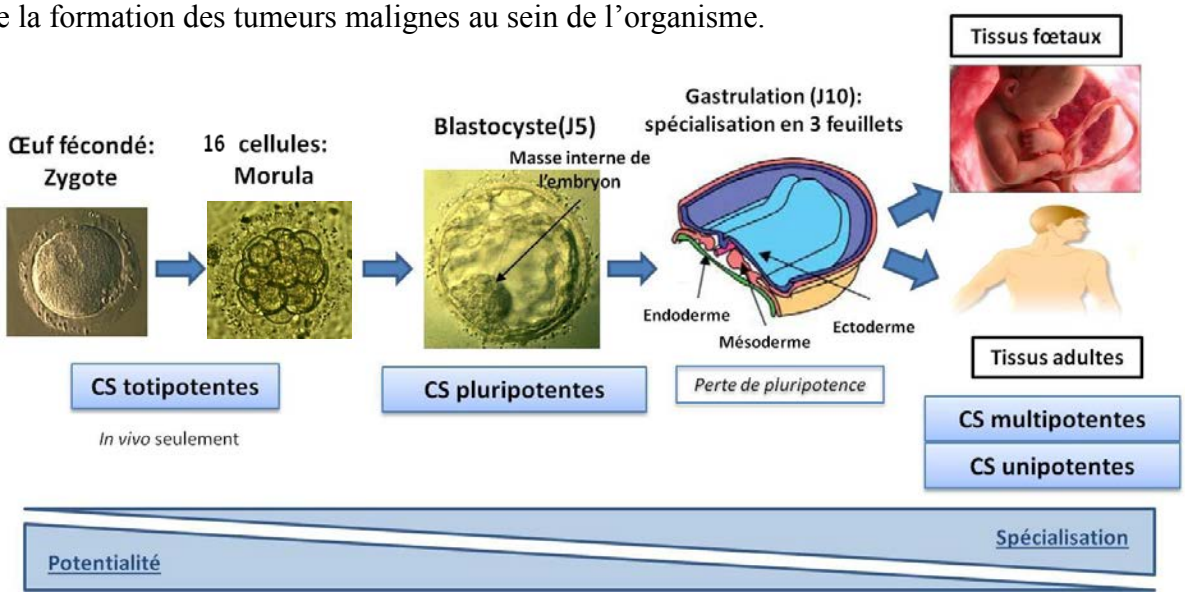


Figure 1: Différents potentiels de différenciation des cellules souches au cours du développement embryonnaire.

A. Les cellules souches totipotentes

L'embryogenèse est par définition le processus qui forme un individu entier à partir d'une seule cellule, le zygote (ou œuf fécondé). Ce zygote et les cellules issues de ses premières divisions (jusqu'au stade de 16 cellules), les blastomères, sont les seules cellules totipotentes de l'organisme (**Figure 1**). Etymologiquement, totipotence signifie « tout pouvoir », indiquant que le génome de ces cellules est organisé de telle manière qu'il peut coder l'information nécessaire à la fabrication d'un organisme entier. Mais encore faut-il que la cellule totipotente soit dans le contexte embryonnaire ; jamais une cellule totipotente ne formera un embryon *in vitro*. De plus, pour des raisons évidentes d'éthiques, ces cellules ne sont pas utilisées en recherche et encore moins à des fins thérapeutiques.

B. Les cellules souches pluripotentes

Les cellules souches pluripotentes ont la capacité de générer (dans les conditions adaptées) n'importe quelle cellule spécialisée et fonctionnelle de l'organisme. Leur capacité plus restrictive que les cellules totipotentes, ne leur permet pas d'aboutir à la création d'un individu complet. Il est possible de les obtenir notamment à partir de la masse cellulaire interne de blastocystes (**Cellules Souches Embryonnaires, CSE**) ou par reprogrammation forcée de cellules différenciées (**Cellules souches Pluripotentes Induites** ou **iPS**). Aujourd'hui, ces cellules représentent un espoir majeur pour des applications cliniques futures en thérapie cellulaire (Duprat *et al.*, 2010).

1. Les cellules souches embryonnaires

a. *Définition*

Dans les années quatre-vingt-dix, une équipe de chercheurs américains met en évidence des cellules souches embryonnaires chez l'homme (Thomson *et al.*, 1998). Au cours de l'embryogénèse et à partir du cinquième jour, l'embryon s'organise en territoires spécialisés, ayant chacun un destin propre : il s'agit du stade blastocyste du développement embryonnaire. Les cellules qui formeront les tissus embryonnaires se regroupent pour former la masse interne du blastocyste au sein d'une cavité bordée par une membrane externe, le trophoblaste. Ce dernier donnera le placenta et les annexes extra-embryonnaires. Les cellules souches embryonnaires sont directement issues de cette masse cellulaire interne (**Figure 1**). Le génome de ces cellules est organisé de façon à coder l'information nécessaire pour former tous les tissus de l'organisme (pluripotence). Ensuite, les cellules de cette masse interne se

spécialisent à leur tour et délimitent trois feuillets : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme (processus de gastrulation). Chacun est à l'origine de certains des futurs tissus de l'organisme. Par exemple, la peau et le tissu nerveux sont issus de l'ectoderme, l'intestin, le foie et le pancréas de l'endoderme et enfin, les cellules musculaires, cartilagineuses ou osseuses sont quant à elles issues du mésoderme.

In vivo, la pluripotence des cellules souches embryonnaires n'existe que pendant une courte durée. La progression du développement embryonnaire conduit inéluctablement à la spécialisation de ces cellules. Cette situation est donc très différente des conditions *in vitro*, où l'objectif est de maintenir les propriétés de pluripotence des cellules afin d'en tirer parti en thérapeutique. C'est la raison pour laquelle, ont été développées des lignées de cellules souches embryonnaires capables de proliférer de façon illimitée en culture tout en conservant leur caractère pluripotent (Thomson *et al.*, 1998).

b. Caractérisation

Les CSE humaines sont essentiellement caractérisées par l'expression de marqueurs spécifiques ainsi que par leur capacité de différenciation. Des analyses du profil transcriptomique de ces cellules ont permis de caractériser l'état indifférencié et pluripotent des CSE humaines (Richards *et al.*, 2004). Ainsi, ces dernières peuvent être caractérisées par différentes catégories de marqueurs (Zhao *et al.*, 2012) qui sont:

- des marqueurs de surface comme SSEA3 et SSEA4 (Stage Specific Embryonic Antigens, qui sont des gangliosides), Tra-1-60 et Tra-1-81 (qui sont des protéoglycannes), CD133, CD117 (c-kit), CD9, *etc*. (qui sont des Clusters de Différenciation, CD) (Thomson *et al.*, 1998; Hoffman and Carpenter, 2005).

- des facteurs de transcription comme Oct-3/4 (Octamer-binding transcription factor), Sox2 (SRY-box 2), Nanog, Klf4 (Krüppel-like factor 4), *etc*. (appelés également « gènes de pluripotence ») (Hoffman and Carpenter, 2005; Zhao *et al.*, 2012).

- des marqueurs intervenant dans les voies de signalisation intra-cellulaire comme SMAD2/3, SMAD1/5/8, β-caténine, *etc*. (Zhao *et al.*, 2012).

- des marqueurs enzymatiques avec de fortes activités phosphatase alcaline et télomérase (Thomson *et al.*, 1998). Cette activité télomérase élevée est directement liée à la grande capacité de prolifération des CSE (Thomson *et al.*, 1998).

Les CSE humaines sont également caractérisées par leur capacité de différenciation :

- Elles peuvent, en culture *in vitro* et dans un environnement adéquat, se différencier en cellules spécialisées d'origines mésodermique (cardiomyocytes, chondrocytes, cellules endothéliales, *etc*.), ectodermique (neurones, oligodendrocytes, *etc*.) ou endodermique (hépatocytes, cellules sécrétrices d'insuline, *etc*.) (Hoffman and Carpenter, 2005).

- Lorsqu'elles sont injectées en sous-cutanée chez la souris immunodéficiente, les CSE induisent la formation de tératomes. Ces tumeurs bénignes représentent la tentative anarchique des CSE de former les trois feuillets embryonnaires; destin naturel de ces cellules (Thomson *et al.*, 1998).

Enfin, elles sont capables de se répliquer indéfiniment en culture *in vitro* tout en conservant, dans des conditions appropriées, leur caractère indifférencié et pluripotent, sans modification de leur caryotype. Des études ont montré qu'après une culture *in vitro* à long terme (≥ 100 passages), les CSE humaines présentent des caryotypes normaux (Buzzard *et al.*, 2004; Rosler *et al.*, 2004).

Ces caractéristiques propres aux CSE humaines peuvent expliquer en partie l'intérêt mais aussi les obstacles de leur utilisation dans des applications cliniques futures.

c. Aspect réglementaire de leur utilisation en recherche

Les CSE proviennent d'embryons surnuméraires créés dans le cadre d'une fécondation *in vitro* et ne faisant plus l'objet d'un projet parental. De ce fait, le premier obstacle à l'utilisation des CSE humaines est d'ordre éthique. En France, suite à la loi de bioéthique de 2011, l'interdiction de la recherche sur les CSE humaines était assortie de dérogations pérennes dans des conditions très strictes (Reppel *et al.*, 2012). En août 2013, une nouvelle loi est promulguée (Loi n° 2013-715 du 6 août 2013), tendant à modifier cette dernière loi de bioéthique en autorisant sous certaines conditions la recherche sur l'embryon et les CSE. Selon l'article L. 2151-5, un protocole de recherche conduit sur un embryon humain ou sur des CSE issues d'un embryon humain ne peut être autorisé par l'Agence de la Biomédecine que si :

- La pertinence scientifique de la recherche est établie;

- La recherche, fondamentale ou appliquée, s'inscrit dans une finalité médicale;
- En l'état des connaissances scientifiques, cette recherche ne peut être menée sans recourir à ces embryons ou ces cellules souches embryonnaires;
- Le projet et les conditions de mise en œuvre du protocole respectent les principes éthiques relatifs à la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires.

Ainsi, ce nouveau texte permet de passer d'un régime "d'interdiction assortie de dérogations" à un régime "d'autorisation encadrée" de la recherche sur les CSE renforçant la légitimité de cette dernière. Très récemment, la décision du 3 mars 2014, publiée au Journal officiel, fait état d'une liste des autorisations accordées aux différentes équipes de recherche, par l'Agence de la Biomédecine.

2. Les cellules souches pluripotentes induites

a. *Définition*

Tout comme les CSE, les cellules souches pluripotentes induites ou cellules iPS possèdent deux caractéristiques majeures: elles sont capables de se multiplier à l'infini et peuvent se différencier en tout type cellulaire. De découverte relativement récente, ces cellules ont été obtenues par reprogrammation de cellules adultes différenciées, tout d'abord de souris, par l'équipe du japonais Yamanaka (Takahashi and Yamanaka, 2006) puis humaines (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). En 2008, le journal « Science » publie son classement des dix avancées scientifiques majeures de l'année et place les nouvelles connaissances sur les cellules iPS en première position (Alberts, 2008). Enfin, quelques années plus tard, en 2012, Yamanaka reçoit le « Prix Nobel de physiologie ou médecine » pour la découverte de ces cellules. Plus faciles à obtenir que les CSE, les cellules iPS ne posent aucun problème d'ordre éthique et semblent offrir des potentialités prometteuses dans de nombreuses applications autologues.

b. *La reprogrammation de cellules somatiques adultes*

La reprogrammation de cellules somatiques adultes consiste à transférer des gènes codants des facteurs de transcription bien particuliers, *via* un vecteur.

Ces gènes utilisés pour la transformation de cellules adultes en cellules pluripotentes sont ceux qui interviennent dès le début de l'embryogénèse. En 2006, après l'identification de vingt-quatre gènes intervenant dans la pluripotence des CSE, l'équipe

japonaise de Yamanaka (Takahashi and Yamanaka, 2006) retient quatre facteurs pour leurs premiers travaux sur la souris : Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc. Un an après ce succès, cette même équipe réalise, avec ces mêmes facteurs, une reprogrammation de fibroblastes humains adultes (Takahashi *et al.*, 2007). En 2007, l'équipe américaine de Thomson J.A. (Yu *et al.*, 2007), effectue également des travaux sur des fibroblastes humains et choisit pour réaliser la reprogrammation, Oct4, Sox2 et deux autres facteurs : Nanog et Lin 28.

L'objectif final de la transfection de ces quatre gènes d'intérêt est de réactiver les gènes endogènes de pluripotence des cellules adultes reprogrammées. Ces gènes sont présents dans les cellules adultes mais leur expression est naturellement inhibée. Parallèlement, l'expression des gènes transfectés doit diminuer progressivement au cours du temps (**Figure 2**) (Stadtfeld and Hochedlinger, 2010).

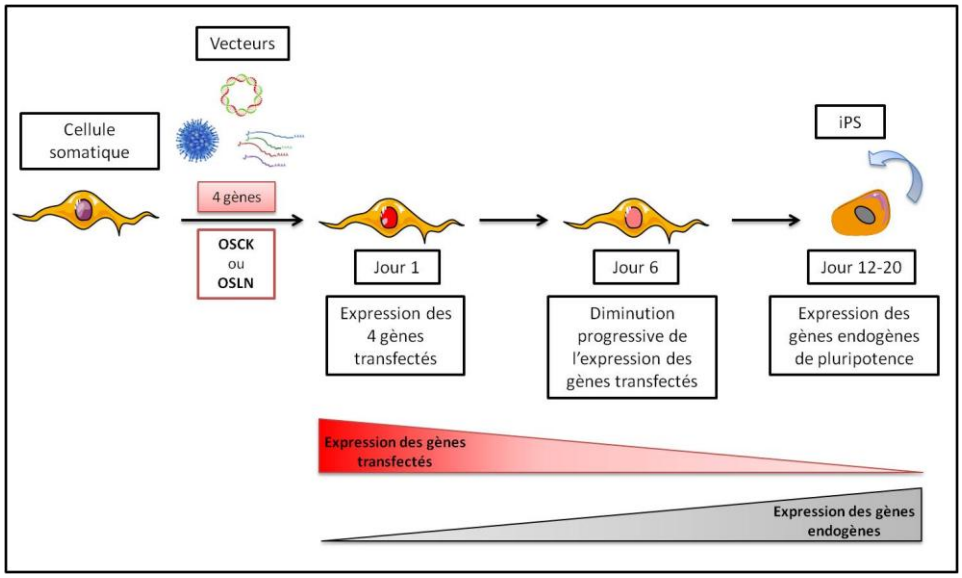


Figure 2 : Principe de la reprogrammation de cellules somatiques adultes.
Après transfection des quatre gènes d'intérêts, la reprogrammation consiste à réactiver les gènes endogènes de pluripotence. L'expression des gènes transfectés diminue progressivement et parallèlement, les gènes endogènes sont réactivés. (OSCK : Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 et OSLN : Oct4, Sox2, Lin 28, Nanog).

Ces gènes de reprogrammation ont été initialement introduits dans les cellules adultes par l'intermédiaire de vecteurs intégratifs que sont les rétrovirus et les lentivirus. Par définition, ces vecteurs conduisent à l'intégration des transgènes au sein du génome des cellules. Cette intégration assure une bonne efficacité de reprogrammation mais également un

risque de mutagénèse insertionnelle non négligeable (Lowry and Plath, 2008). C'est la raison pour laquelle, certaines équipes se sont intéressées à d'autres vecteurs, non intégratifs, qui n'altèrent pas l'ADN des cellules reprogrammées. Des adénovirus (Stadtfeld *et al.*, 2008) ou encore des plasmides (Okita *et al.*, 2008) ont ainsi été utilisés comme vecteur, induisant cependant une efficacité de reprogrammation moindre (Stadtfeld and Hochedlinger, 2010). L'efficacité de reprogrammation est évaluée par le taux de cellules induites. Aujourd'hui, les chercheurs se tournent de plus en plus vers d'autres techniques de reprogrammation efficaces et qui réduisent le risque de mutagénèse insertionnelle. Dans ce contexte, ont été injectées, dans les cellules adultes, non pas les transgènes mais le produit de leur synthèse : les ARN messagers. De cette façon, les modifications du génome sont évitées et le risque de cancérogénèse est diminué. Les ARN messagers déclenchent bien le changement d'identité des cellules (bonne efficacité de reprogrammation) mais, contrairement aux transgènes, ils sont détruits rapidement (Warren *et al.*, 2010). Cependant, l'efficacité de cette méthode repose sur des cycles répétés de transfection qui peuvent s'avérer néfastes pour le maintien de l'intégrité de certaines cellules somatiques adultes (Bayart and Cohen-Haguenauer, 2013).

Très récemment, une équipe japonaise a réussi à reprogrammer des cellules somatiques adultes murines en appliquant un stress particulier sur ces dernières. Ces cellules adultes ont été incubées dans une solution acide (pH = 5,7) à 37°C pendant 25 minutes puis mises en culture *in vitro*. Au bout de 7 jours, les cellules ré-expriment des gènes embryonnaires et possèdent des propriétés de pluripotence (Obokata *et al.*, 2014). Cependant, ces résultats restent très controversés car pour l'instant, aucune équipe n'est parvenue à les reproduire.

Chez l'Homme, les cellules iPS sont obtenues principalement à partir de fibroblastes cutanés (Awe *et al.*, 2013) mais peuvent également être générées à partir de kératinocytes issus de biopsie cutanée (Aasen *et al.*, 2008) ou encore de cellules progénitrices sanguines (Loh *et al.*, 2009).

c. *Caractérisation*

L'objectif principal de cette reprogrammation de cellules adultes est de maintenir dans le temps le caractère pluripotent des cellules. Les cellules iPS une fois obtenues doivent répondre à un certain nombre de critères (Maherali and Hochedlinger, 2008). Ces paramètres sont ceux qui caractérisent les cellules souches embryonnaires et qui ont été décrits précédemment. L'intégrité génomique des cellules iPS peut être contrôlée par

des techniques de séquençage. Ce contrôle d'éventuelles mutations induites semble nécessaire en vue d'une potentielle utilisation thérapeutique de ce type de cellules.

C. Les cellules souches multipotentes

La multipotence caractérise les cellules souches d'origine adulte ou fœtale qui sont capables de générer plusieurs types de cellules. Leur capacité de différenciation est plus limitée que les cellules décrites précédemment. Ces cellules multipotentes sont déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique (d'origine ectodermique, endodermique ou mésodermique). Les CS multipotentes adultes sont présentes dans le corps humain, au niveau de niches tissulaires, et participent à la régénération des tissus en fonction des signaux envoyés par l'environnement. Par exemple, les **Cellules Souches Hématopoïétiques** (**CSH**) sont à l'origine de toutes les cellules du sang ou encore les **Cellules Souches Mésenchymateuses** appelées aussi **Cellules Stromales Mésenchymateuses** (**CSM**) qui donneront naissance aux futures cellules cartilagineuses, osseuses, musculaires et adipeuses. Contrairement aux cellules pluripotentes, les CS multipotentes ont une capacité de prolifération limitée en culture *in vitro* (sénescence cellulaire). Ces cellules ont déjà montré leur réel intérêt en thérapie cellulaire (CSH) et offrent de belles perspectives quant à leur utilisation en médecine régénératrice.

1. Les cellules souches hématopoïétiques

a. *Définition*

Les CSH sont le point de départ de l'hématopoïèse qui a lieu, chez l'adulte, au niveau de la moelle osseuse (MO) (niche hématopoïétique). Elles assurent la production permanente des différentes lignées cellulaires sanguines, permettant à ces dernières un renouvellement constant. Elles sont capables de se différencier en précurseurs myéloïdes et lymphoïdes qui sont à l'origine de toutes les cellules hématopoïétiques (globules rouges, plaquettes, polynucléaires, macrophages et lymphocytes). La capacité d'auto-renouvellement des CSH permet à partir d'un stock limité de cellules d'assurer l'hématopoïèse d'un individu pendant toute sa vie. Ainsi, dans les conditions physiologiques, l'homéostasie du tissu sanguin est assurée.

b. *Caractérisation*

Les CSH ne sont pas identifiables morphologiquement. Néanmoins, elles se définissent par un certain nombre de marqueurs de surface (Wognum *et al.*, 2003; Shizuru *et al.*, 2005) (**Tableau 1**).

Tableau 1: Marqueurs exprimés à la surface des CSH.
(- : fonction mal connue ; CD : Cluster de Différenciation ; MEC : Matrice Extra Cellulaire)

Marqueurs exprimés à la surface des CSH	Nature/Fonctions
CD34	Glycoprotéine/Adhérence et migration
CD133 ou AC133	Glycoprotéine/-
CD90 ou Thy-1	Glycoprotéine/Adhérence et migration
CD117 ou c-kit	Protéine/récepteur cytokines (SCF : Stem Cell Factor)
CXCR4	Protéine/récepteur cytokines (SDF-1 : Stroma-derived factor-1)
VLA (-4 et -5)	Protéine/intégrines (adhérence aux protéines de la MEC)

Les CSH se définissent également par l'absence de différents marqueurs de surface tels que CD38, CD10, CD14, CD15, *etc*.

Ces marqueurs phénotypiques sont indispensables pour identifier et purifier une population de CSH dite « $CD34^+$ ». Des anticorps monoclonaux dirigés contre ces marqueurs ont été développés afin d'effectuer un tri cellulaire à grande échelle et d'obtenir une population cellulaire la plus pure possible. Cette purification s'inscrit dans le but d'utiliser ces CSH comme produit de thérapie cellulaire.

Outre leur caractérisation phénotypique, les CSH peuvent être caractérisées par certains paramètres :

- Elles sont multipotentes et donc, capables de se différencier en précurseurs myéloïdes et lymphoïdes qui sont à l'origine de toutes les cellules sanguines.

- Elles sont transplantables, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de reconstituer à long terme l'ensemble du système hématopoïétique d'un individu greffé.

- Elles peuvent être amplifiées de façon limitée en culture *in vitro* et en présence de facteurs de croissance hématopoïétiques (intérêt majeur dans les greffes).

- L'auto-renouvellement des CSH *in vivo* et *in vitro* est limité dans le temps. Au cours des divisions cellulaires, les télomères se raccourcissent conduisant les cellules sénescentes vers l'apoptose. Pour cette raison et contrairement aux CSE, il est impossible de créer des lignées de CSH.

- *In vivo*, la majorité des CSH sont dans un état de quiescence, en phase G0 du cycle cellulaire (Berardi *et al.*, 1995).

- Les CSH sont très sensibles à diverses cytokines intervenant dans la prolifération, la différenciation, la migration et l'adhérence cellulaire (Barbosa *et al.*, 2011).

c. *Localisation et domiciliation des CSH chez l'adulte*

Chez l'adulte, l'hématopoïèse se déroule au niveau de la moelle osseuse et c'est à ce niveau que naturellement les CSH constituent une véritable niche hématopoïétique. Ce microenvironnement médullaire (**Figure 3**) apporte aux CSH :

- ✓ les facteurs de communication intercellulaire permettant d'attirer ces dernières vers cet environnement (chimiokines) : phénomène de Homing.

- ✓ Les molécules d'adhésion permettant l'adhésion des CSH à cet environnement.

- ✓ Les facteurs de croissance hématopoïétiques (FCH) qui assurent la survie, la prolifération et la différenciation des CSH.

Les chimiokines sont des protéines induisant la mobilité cellulaire. Si une cellule exprime à sa surface un récepteur pour une chimiokine, elle est alors capable de migrer dans le sens du gradient le plus élevé de cette chimiokine. Ces molécules jouent un rôle déterminant dans la localisation tissulaire (phénomène de « homing »). Les CSH expriment un

récepteur à chimiokine (CXCR4) et sont donc attirées dans la moelle osseuse par SDF-1, chimiokine produite par les cellules stromales médullaires (Peled *et al.*, 1999). Ainsi, la localisation des CSH dans la moelle osseuse nécessite une attraction permanente de ces dernières par la chimiokine SDF-1. Une fois les CSH attirées dans la niche hématopoïétique, elles adhèrent aux cellules stromales ainsi qu'aux protéines de la matrice extracellulaire (MEC) (fibronectine, laminine, *etc.*) grâce à des molécules d'adhésion (N-cadhérine, intégrines : VLA-4, VLA-5, *etc.*) (Gigant *et al.*, 2001) (**Figure 3**). Enfin, pour survivre, proliférer et se différencier vers une lignée cellulaire donnée, les CSH doivent être stimulées par des FCH.

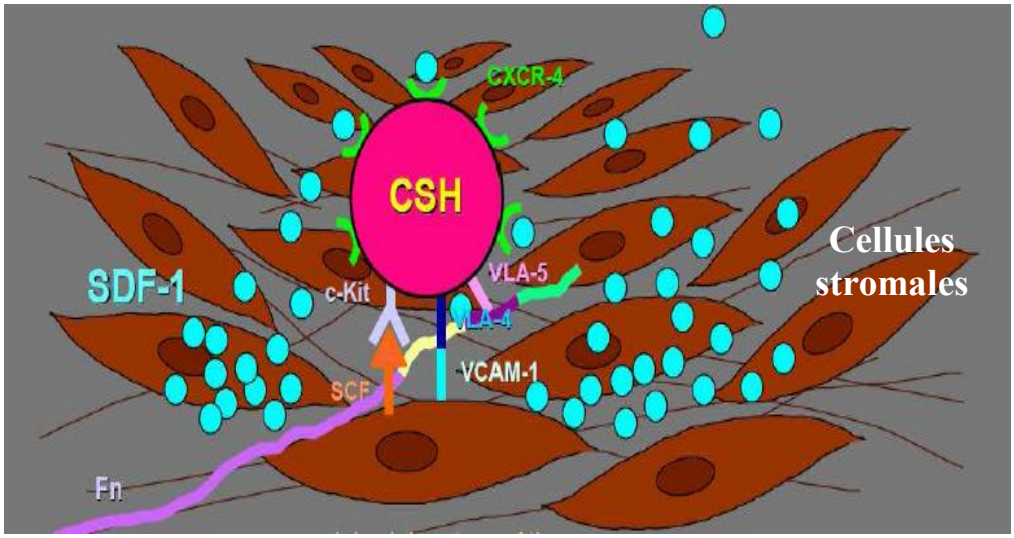


Figure 3: La CSH dans le microenvironnement médullaire (niche hématopoïétique).
(Fn : fibronectine)

d. *Différentes sources de CSH*

c.1. Sources adultes

La moelle osseuse : au sein de la moelle osseuse, les CSH cohabitent étroitement avec des cellules stromales qui constituent le tissu de soutien de l'hématopoïèse (Dazzi *et al.*, 2006). Depuis plusieurs dizaines d'années, des études sur ces cellules stromales ont également montré leur propriété de cellules souches multipotentes. Au niveau médullaire, les CSH représentent entre 0,5 et 1% des cellules mononucléées (Wognum *et al.*, 2003). Il est donc nécessaire, lors du prélèvement de moelle, de pouvoir faire un tri cellulaire afin d'obtenir une population dite « $CD34^+$ » la plus pure possible. La moelle osseuse reste encore une source importante de CSH pour les greffes allogéniques.

Le sang périphérique : dans les conditions physiologiques, le sang périphérique n'est pas une source de CSH, moins de 0,1% des cellules du sang périphérique expriment le marqueur CD34. Grâce à certains facteurs de croissance (G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor, par exemple), il est possible de mobiliser les CSH de la moelle osseuse vers le sang périphérique. Les CSH, une fois dans le sang périphérique, deviennent alors beaucoup plus accessibles et constituent aujourd'hui, la source principale des CSH en vue de leur utilisation dans les greffes autologues.

c.2. Source fœtale

Le sang de cordon ombilical : les CSH peuvent également être d'origine fœtale puisqu'en effet, elles ont été identifiées au niveau du sang de cordon ombilical ou sang placentaire (Weissman and Shizuru, 2008). Cette source cellulaire présente de nombreux avantages dans la constitution de greffons allogéniques. En effet, l'immaturité du système immunitaire du tissu fœtal, confère aux CSH une plus faible immunogénicité (Wu *et al.*, 1999). Ces dernières années, l'utilisation du sang placentaire, comme source de greffons de CSH allogéniques, a connu un essor important, notamment du fait de l'utilisation des doubles greffes d'unités de sang placentaire.

2. Les cellules stromales/souches mésenchymateuses

a. Définition et identification

Les CSM se définissent comme des cellules stromales/souches multipotentes capables d'auto-renouvellement (certes limité dans le temps) et de différenciation vers différents types cellulaires spécialisés (d'origine mésodermique). Ainsi, les CSM participent activement à l'homéostasie et donc à la régénération des tissus d'origine mésenchymateuse de l'organisme. Résidant dans de nombreux tissus, les sources disponibles de CSM sont multiples et incluent à la fois les tissus adultes et les tissus fœtaux.

Les CSM ont été identifiées et isolées pour la première fois à partir de la moelle osseuse par l'équipe de A. Friedenstein. En cultivant des cellules stromales de moelle osseuse, l'apparition de colonies de cellules de type fibroblastique ou Fibroblasts Colony-Forming Unit (CFU-F, **figure 4**), adhérentes au plastique et pouvant se différencier en ostéoblastes a été observée (Friedenstein *et al.*, 1976). Par la suite, d'autres équipes ont montré la capacité de ces cellules à se différencier, *in vitro,* vers d'autres cellules d'origine mésodermique : chondrocytes, adipocytes, myoblastes (Pittenger *et al.*, 1999; Colter *et al.*,

2001). En 1991, le terme de « cellules souches mésenchymateuses » est introduit par A. Caplan. (Caplan, 1991).

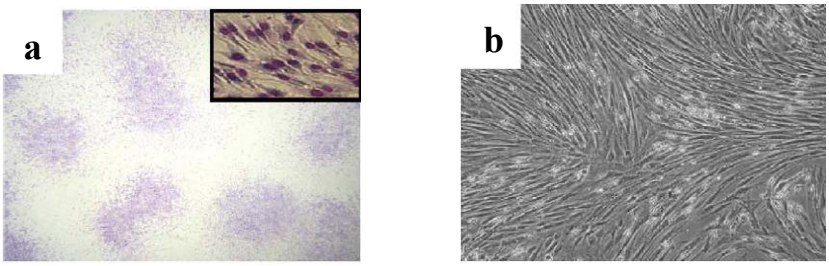


Figure 4: Culture de cellules souches mésenchymateuses humaines issues de la moelle osseuse.
(a) Fibroblasts Colony-Forming Unit (CFU-F) après coloration au Giemsa. (b) Morphologie des CSM à confluence (X40) (Photographies d'après (Roux et al., 2011)

b. Localisation, environnement et sources des CSM

In vivo, dans l'organisme, au niveau des différents tissus, les cellules souches sont hébergées au sein de structures particulières : les niches. Ces niches représentent un environnement stable pour les cellules souches. Elles sont responsables du maintien de l'homéostasie tissulaire, c'est-à-dire, de l'équilibre entre les différents types de cellules qui composent un tissu. Ces niches sont constituées de cellules, d'une matrice extracellulaire, de chimiokines, de cytokines, de molécules d'adhésion et de facteurs de croissance, formant ainsi un véritable microenvironnement. Ce dernier possède la capacité d'héberger indéfiniment les cellules souches, d'assurer leur auto-renouvellement et leur différenciation (Ma *et al.*, 2009). La pression partielle en oxygène au sein de ces niches joue un rôle déterminant sur le maintien des propriétés des cellules souches. Au niveau de la niche médullaire des CSM par exemple, de faibles pressions en oxygène ont été mesurées (entre 1 et 6% d'O_2). Cet environnement hypoxique permet de maintenir l'état indifférencié des cellules et donc leur caractère « souche » (Mohyeldin *et al.*, 2010).

b.1. Sources adultes

La moelle osseuse : c'est au niveau de la moelle osseuse que les CSM ont été identifiées pour la première fois (Friedenstein *et al.*, 1976). Elles représentent approximativement entre 0,001% et 0,01% des cellules mononucléées médullaires (Pittenger *et al.*, 1999). Malgré leur faible densité, la source médullaire reste la source de CSM la plus

utilisée aujourd'hui. En effet, leur isolement et leur prolifération *in vitro* sont relativement aisés. Cependant, le prélèvement de moelle osseuse reste un geste invasif et douloureux pour le donneur. De plus, des études ont montré que leurs capacités de prolifération et de différenciation diminuent avec l'âge du donneur (Fossett *et al.*, 2012; Zaim *et al.*, 2012).

Par la suite, les CSM ont été isolées à partir du tissu adipeux (Fraser *et al.*, 2006), du sang périphérique (Cao and Dong, 2005), du poumon (Griffiths *et al.*, 2005), du cœur (Beltrami *et al.*, 2003), de la membrane synoviale, de l'os trabéculaire, du périoste, du muscle squelettique ou encore de la pulpe dentaire (Chen *et al.*, 2008; Rastegar *et al.*, 2010). Plus récemment, des auteurs ont mis en évidence la présence de CSM dans le sang menstruel (Rossignoli *et al.*, 2013).

b.2. Sources fœtales

Le cordon ombilical : deux régions du cordon ombilical ont montré la présence de CSM : le sang de cordon (sang contenu dans la veine ombilicale) (Bieback *et al.*, 2004) et surtout la gelée de Wharton (tissu conjonctif entourant les vaisseaux ombilicaux) (Wang *et al.*, 2004). Cette dernière source sera détaillée de façon précise dans un chapitre dédié. Les prélèvements de sang de cordon sont pauvres en CSM, le taux d'isolement est faible et la capacité de prolifération des CSM est inférieure à celle des CSM de la gelée de Wharton (Zeddou *et al.*, 2010; Secunda *et al.*, 2014). Ce sont les raisons pour lesquelles, le sang de cordon sera plutôt destiné à l'isolement des CSH allogéniques et la gelée de Wharton à l'isolement des CSM.

Des CSM ont également pu être isolées à partir du placenta (In 't Anker *et al.*, 2004), du liquide amniotique (In 't Anker *et al.*, 2003) ou encore de la membrane amniotique (Wolbank *et al.*, 2010).

Ces CSM d'origine fœtale présentent un certain nombre d'avantages par rapport aux CSM adultes. Leur prélèvement est simple, sans geste invasif, sûr et indolore pour la mère et l'enfant. Les CSM sont relativement faciles à isoler et possèdent un fort pouvoir d'expansion *in vitro*, permettant ainsi d'obtenir des lots de cellules en quantité suffisante pour de potentielles utilisations thérapeutiques. En comparaison avec les CSM adultes, des études montrent que les CSM d'origine fœtale possèdent des capacités de prolifération et de différenciation augmentées ainsi qu'une durée de vie supérieure (Hass *et al.*, 2011).

c. *Caractérisation*

Dans un souci d'harmonisation, le comité de l'ISCT (International Society for Cellular Therapy) a proposé des standards de caractérisation des CSM (Dominici *et al.*, 2006), établissant des critères minimums de définition :

- ✓ L'adhérence cellulaire au plastique dans des conditions de culture *in vitro*.

- ✓ L'expression de certains marqueurs de surface tels que CD73, CD90, CD105 (**Tableau 2**) et l'absence d'expression des marqueurs CD34, CD45, CD14 ou CD11B, CD79A ou CD19 et HLA-DR (>95% des cellules en culture).

- ✓ La capacité de différenciation en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes (cellules d'origine mésodermique)

Tableau 2: Nature et fonctions des principaux marqueurs exprimés à la surface des CSM.
(CD : Cluster de Différenciation ; AMP : Adénosine Mono Phosphate ; TGF : Transforming Growth Factor)

Marqueurs exprimés à la surface des CSM	Nature/Fonctions
CD73	Protéine : Ecto-5'-nucléotidase/ Hydrolyse de l'AMP Intervient dans la régulation de la différenciation ostéo-/chondrocytaire des CSM (Ode *et al.*, 2013)
CD90 (Thy-1)	Glycoprotéine/Adhérence et migration *(fonction encore mal connue)*
CD105 (Endoglin)	Glycoprotéine/ Récepteur au TGF-β III (Pontikoglou *et al.*, 2011)

Des critères supplémentaires peuvent venir compléter ceux cités ci-dessus afin de réaliser une caractérisation fine de ces CSM :

- ✓ Un fort potentiel d'amplification en culture *in vitro*. Cependant, cet auto-renouvellement des CSM est limité (sénescence cellulaire). Après un certain temps de culture, le taux de prolifération et la capacité de différenciation des cellules diminuent (Banfi *et al.*, 2000).

- ✓ Un potentiel clonogénique, c'est-à-dire la capacité de former des clones de cellules en culture *in vitro* (CFU-F) (**Figure 4**).

- ✓ *Ex vivo*, grâce à la sécrétion de cytokines spécifiques, les CSM possèdent la capacité de former un support stromal (ou couche nourricière) qui favorise l'amplification des progéniteurs hématopoïétiques (Majumdar *et al.*, 2000).

- ✓ L'expression d'un panel d'antigènes de surface détectés par la technique de cytométrie en flux (Pittenger and Martin, 2004; Chamberlain *et al.*, 2007; Pontikoglou *et al.*, 2011) (**Tableau 3**). L'expression des marqueurs de surface peut légèrement varier d'une source de CSM à une autre (Baksh *et al.*, 2007).

Tableau 3: Antigènes exprimés ou non à la surface des CSM humaines.
L'expression des marqueurs de surface est différente d'une espèce à une autre. Le niveau d'expression de SSEA-3,-4 reste très faible par rapport à celui des cellules embryonnaires (Gang et al., 2007). (CD : Cluster de Différenciation ; GD : Ganglioside ; TGFR : Récepteur au Transforming Growth Factor ; SSEA : Stage Specific Embryonic Antigen ; HLA : Human Leucocyte Antigen)

Antigènes exprimés à la surface des CSM humaines	Antigènes non exprimés à la surface des CSM humaines
CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD44, CD49a,b,c,e, CD51, CD54, CD58, CD71, Stro-1, GD2, CD102, CD106, CD119, CD120, CD123, CD124, CD126, CD127, CD140b, CD146, CD164, CD166, CD200, TGFb1R, TGFbIIR, HLA-A, B, C, SSEA-3, SSEA-4	**CD34, CD45, CD14, HLA-DR, CD3, CD4, CD6, CD9, CD10, CD11, CD15, CD18, CD21, CD25, CD31, CD36, CD38, CD40, CD49, CD50, CD56, CD62, CD80, CD86, CD95, CD117, CD133, SSEA-1, c-kit**

- ✓ La capacité à se différencier *in vitro* en cellules d'origine non mésodermique. Des études ont montré des possibilités de différenciation en neurones ou en cardiomyocytes (Sanchez-Ramos *et al.*, 2000; Planat-Benard *et al.*, 2004).

Cependant, cette notion est largement controversée par certains auteurs. Ces derniers expliquent qu'il reste difficile d'affirmer que les CSM soient capables d'engendrer des types cellulaires n'appartenant pas au mésoderme (Phinney and Prockop, 2007).

- ✓ Une capacité de trans-différenciation *in vitro*, c'est-à-dire la possibilité pour une cellule souche, partiellement ou totalement différenciée, de se transformer en un autre type cellulaire. Des ostéoblastes obtenus après différenciation de CSM de moelle osseuse ont été capables de trans-différenciation en adipocytes et en chondrocytes (Song and Tuan, 2004). Longtemps mal élucidé, ce phénomène de trans-différenciation serait dû à une dédifférenciation de la cellule mature en une cellule de nouveau capable de différenciation (Ullah *et al.*, 2013) (**Figure 5**). *In vivo*, le phénomène de trans-différenciation reste encore très controversé (Uccelli *et al.*, 2008).

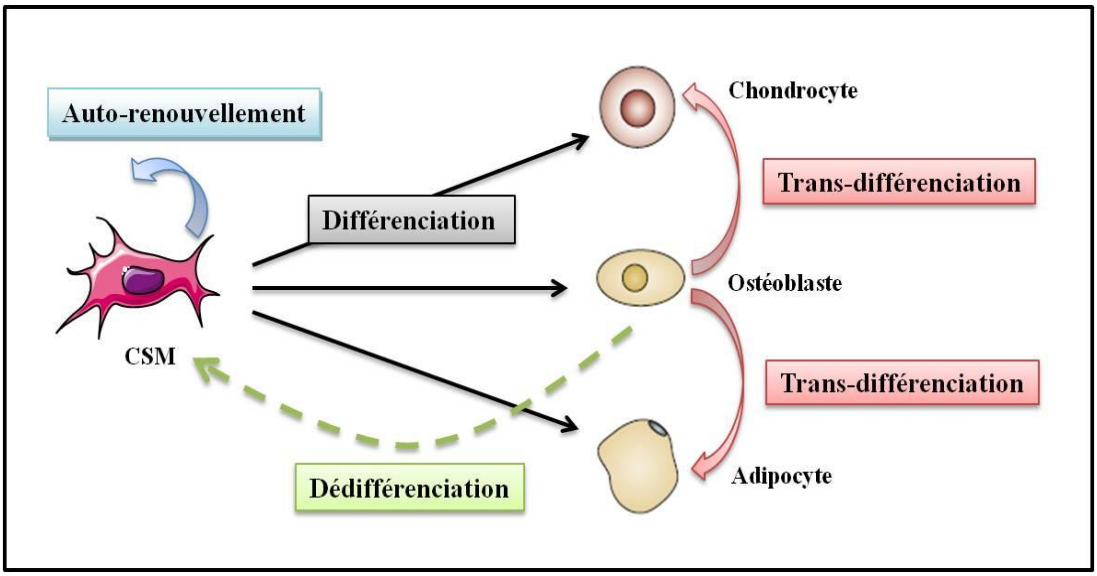


Figure 5: La capacité de trans-différenciation des CSM.
Cette figure montre la capacité de différenciation des CSM en cellules d'origine mésodermique (flèches noires). Elle représente également la potentialité pour une CSM, partiellement ou totalement différenciée, de se transformer en un autre type cellulaire in vitro (flèches rouges). Cette trans-différenciation serait due à une dédifférenciation de la cellule mature en une cellule de nouveau capable de différenciation (flèche verte).

- ✓ Une majorité de cellules (90%) à l'état de quiescence (phase G0/G1 du cycle cellulaire) au niveau de leur niche tissulaire. Les CSM ne s'activent, c'est-à-dire prolifèrent et se différencient, qu'en cas d'atteintes tissulaires.

- ✓ Une forte activité paracrine caractérisée par la sécrétion de nombreux facteurs trophiques anti-apoptotiques, anti-fibrotiques, pro-angiogéniques, *etc*. qui favorisent les mécanismes de réparation tissulaire (Maumus *et al.*, 2013). Cette activité paracrine est médiée à la fois par la synthèse et la sécrétion de nombreux facteurs solubles que sont les cytokines et les facteurs de croissance (Yoon *et al.*, 2013) mais également *via* la sécrétion de vésicules extra-cellulaires. Ces vésicules extra-cellulaires sont représentées essentiellement par les exosomes et les micro-vésicules qui permettent la communication inter-cellulaire et participent également à la régénération tissulaire (Maumus *et al.*, 2013). Les vésicules extra-cellulaires sont composées d'une bicouche phospholipidique, peuvent être de différentes tailles et transporter diverses molécules telles que des protéines, des ARN messagers, des microARN ou encore des lipides. Les exosomes sont caractérisés par leur taille (entre 30 et 120 nm) et l'expression de protéines, d'une part communes à tous les exosomes (CD9, CD63, CD81, Alix, Tsg101, *etc.*), et d'autre part spécifiques des cellules dont ils sont issus. Ainsi, les exosomes sécrétés par les CSM, expriment à leur surface des marqueurs caractéristiques tels que CD29, CD44, CD73 ou CD105 (Yu *et al.*, 2014). Plusieurs études ont montré que le sécrétome des CSM semble posséder les mêmes effets bénéfiques, en termes de réparation tissulaire, que les cellules dont il provient (Baglio *et al.*, 2012).

- ✓ L'expression à la surface des CSM de récepteurs à chiomiokines, de molécules d'adhésion de la famille des intégrines, des immunoglobulines, des métalloprotéinases, qui interviennent dans la mobilité cellulaire et donc, dans les phénomènes de « homing » (Karp and Leng Teo, 2009). Ce mécanisme conduit à l'attraction des CSM de la moelle osseuse vers les sites lésés de l'organisme (Rastegar *et al.*, 2010). Lors d'un stress tissulaire (ischémie, inflammation, *etc*.), les différents signaux de danger qui sont libérés semblent influencer le recrutement des CSM.

- ✓ L'absence d'activité télomérase détectable dans les CSM de moelle osseuse cultivées *in vitro* (Zimmermann *et al.*, 2003). Cependant, plus récemment, une étude a montré que, contrairement aux cellules somatiques (fibroblastes) dans lesquelles aucune activité télomérase n'est détectée, une faible activité est observée au sein des CSM (Jeon *et al.*, 2011). D'une façon générale, le maintien de la longueur des

télomères est assuré au sein de la cellule par une télomérase active. Cette activité est étroitement liée à la capacité proliférative des cellules (Blagoev, 2009). Elle est ainsi présente dans les cellules à fort potentiel prolifératif telles que les cellules cancéreuses ou les CSE. Au cours des divisions des CSM, la longueur des télomères diminue, conduisant inéluctablement au vieillissement cellulaire.

d. Effet immunomodulateur des CSM

Les effets immunomodulateurs des CSM ont été aussi bien démontrés *in vitro* qu'*in vivo*. Les CSM possèdent des propriétés immunosuppressives très vastes liées à la fois aux contacts cellules-cellules ainsi qu'à la production de facteurs solubles inductibles qui inhibent l'activation des principaux effecteurs de l'immunité. Depuis quelques années, un certain nombre d'études commence à élucider les mécanismes d'action intervenant dans l'interaction des CSM avec les différents effecteurs de l'immunité adaptative et innée.

Les effets des CSM sur les cellules de l'immunité adaptative sont nombreux. Les CSM ont la capacité de protéger les lymphocytes T (Tαβ) de l'apoptose tout en inhibant leur activation et leur prolifération en réponse à de nombreux stimuli (Benvenuto *et al.*, 2007). De nombreuses molécules solubles interviennent dans cet effet : les prostaglandines E2 (PGE2), les molécules HLA-G solubles (sHLA-G), les cytokines immunosuppressives comme l'interleukine-10 (IL-10) et le transforming growth factor-β (TGF-β), etc. Les CSM favorisent la différenciation des lymphocytes Tαβ en lymphocytes régulateurs (Treg). De plus, les CSM semblent freiner la différenciation terminale des lymphocytes B en cellules matures productrices d'anticorps (Rafei *et al.*, 2008). Enfin, les CSM inhibent la différenciation des monocytes en cellules dendritiques ainsi que la maturation de ces dernières de façon dépendante des PGE2, de l'IL-6 et de l'IL-10 (Nauta *et al.*, 2006). Les cellules dendritiques produisent moins d'IL-12 (cytokine pro-inflammatoire) et ainsi, leur capacité à activer les lymphocytes T est diminuée (**Figure 6**) (Menard and Tarte, 2011).

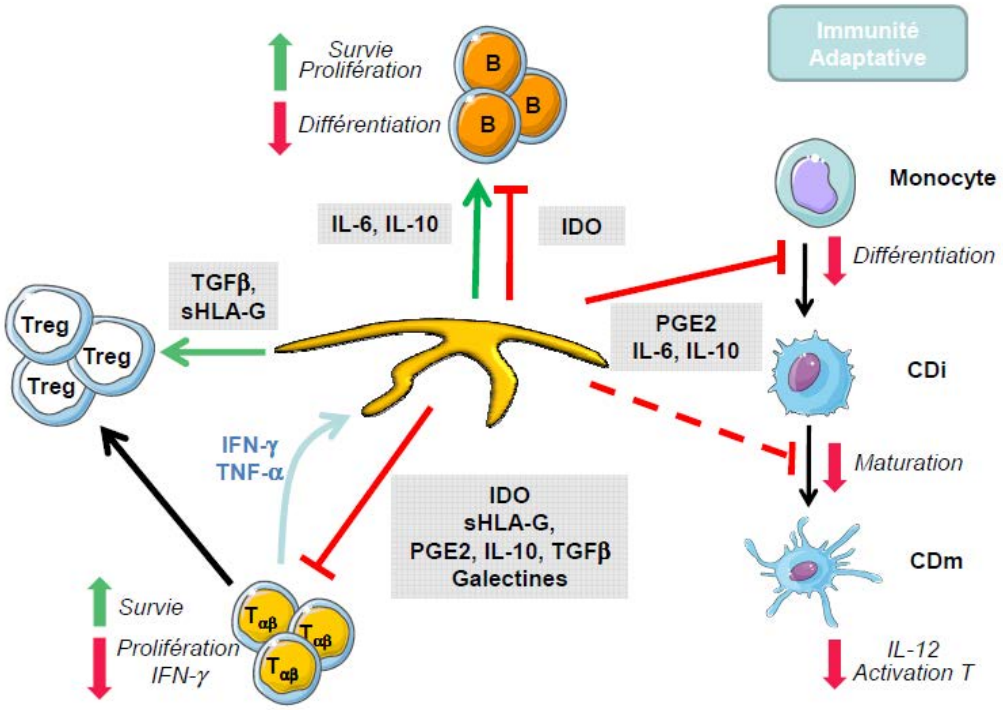


Figure 6: Effets des CSM sur les cellules de l'immunité adaptative.
Les CSM permettent la survie des lymphocytes Tαβ tout en inhibant leur prolifération et leur synthèse d'IFN-γ via la production d'une combinaison de facteurs solubles et membranaires dont la plupart sont induits par l'IFN-γ et le TNF-α produits par les lymphocytes T activés. Elles favorisent également la différenciation des lymphocytes Tαβ en lymphocytes T régulateurs (Treg) via la synthèse de TGF-β et de HLA-G soluble. Par ailleurs, en l'absence de facteurs inflammatoires, les CSM permettent la survie et la prolifération des lymphocytes B par la production des facteurs de croissance IL-6 et IL-10, tout en inhibant leur différenciation terminale en plasmocytes producteurs d'anticorps via des mécanismes mal identifiés. Enfin, les CSM inhibent la différenciation des monocytes en cellules dendritiques (CD) immatures et la maturation de ces dernières de façon dépendante des PGE2, de l'IL-6 et de l'IL-10. (CDi : cellule dendritique immature ; CDm : cellule dendritique mature ; IDO : indoleamine 2,3-dioxygénase = enzyme immunosuppressive ; IFN-γ : interféron-γ ; TNF-α : tumor necrosis factor-α) (d'après Ménard and Tarte, 2011).

Les cellules de l'immunité innée sont également des cibles potentielles du pouvoir d'immunomodulation des CSM. Ces dernières ont été décrites comme inhibant la prolifération et la cytotoxicité des cellules *natural killer* (NK) en réduisant leur production d'IFN-γ en réponse à l'action concertée de plusieurs facteurs solubles (Aggarwal and Pittenger, 2005). Les capacités de prolifération, de cytotoxicité et de sécrétion d'IFN-γ des lymphocytes Tγδ sont également inhibées par les PGE2 produites par les CSM (Martinet *et al.*, 2009). L'action des CSM sur les macrophages est encore mal connue. Par l'intermédiaire

des PGE2, les CSM inhiberaient la production d'IL-12 et de TNF-α (cytokines pro-inflammatoires) et augmenteraient la sécrétion d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) des macrophages (Kim and Hematti, 2009). Enfin, alors que la survie des polynucléaires neutrophiles est augmentée par les CSM, ces dernières inhibent la migration et le « burst » oxydatif de ces polynucléaires *via* la synthèse respectivement d'IL-6 et de TSG-6 (TNF-stimulated gene 6 protein = protéine anti-inflammatoire) (Menard and Tarte, 2011) (**Figure 7**).

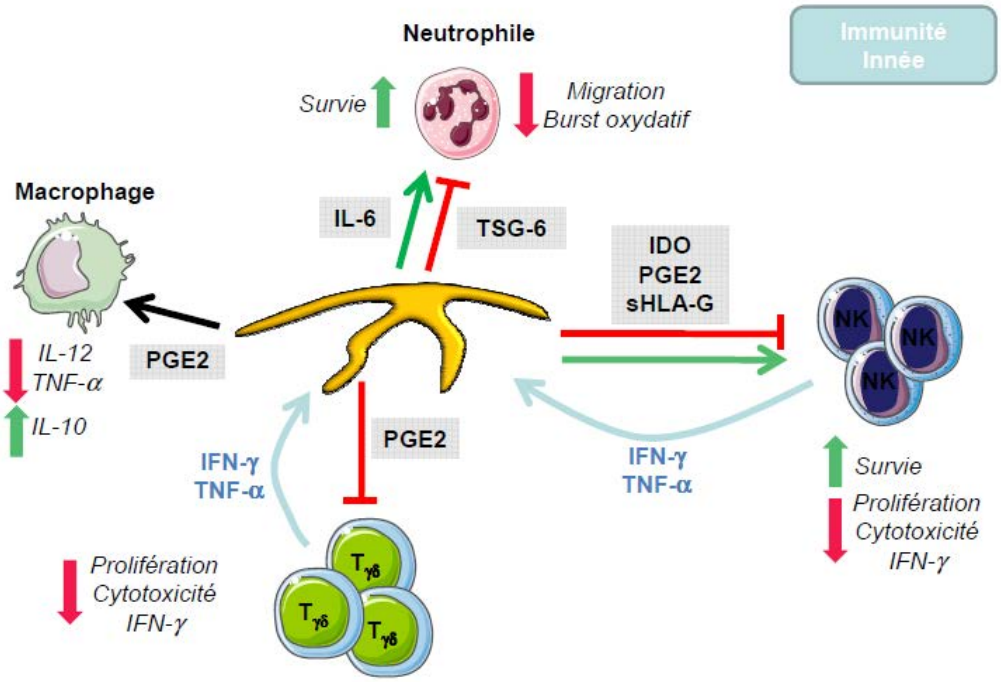


Figure 7: Effets des CSM sur les cellules de l'immunité innée.
Les CSM inhibent la prolifération, la cytotoxicité et la synthèse d'IFN-γ par les lymphocytes Tγδ et les cellules NK qui produisent l'IFN-γ et le TNF-α indispensables à l'induction de ce phénotype inhibiteur. Par ailleurs, les CSM modifient le profil d'activation des macrophages qui produisent moins de cytokines pro-inflammatoires et plus d'IL-10 en réponse aux PGE2. Enfin, alors que la survie des polynucléaires neutrophiles est augmentée par les CSM, ces dernières inhibent la migration et le burst oxydatif de ces polynucléaires via la synthèse respectivement d'IL-6 et de TSG-6 (TNF-stimulated gene 6 protein) (d'après Ménard et Tarte, 2011).

Plus récemment, des travaux ont mis en évidence un rôle essentiel des CSM dans la détection et la régulation de l'inflammation. Ces cellules sont capables d'adopter un phénotype pro-inflammatoire (MSC1) ou anti-inflammatoire (MSC2) en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent et en interférant avec les réponses immunitaires innées ou acquises (Bernardo and Fibbe, 2013). Cette polarisation des CSM est possible grâce à la stimulation des récepteurs TLR (Toll-like receptor) présents à la surface de ces dernières (Waterman *et al.*, 2010). Ces récepteurs sont activés par des molécules associées aux agents pathogènes, tels que le lipopolysaccharide (TLR4) ou des ARN viraux (TLR3) (Keating, 2012). Au cours de la phase précoce de l'inflammation, les CSM adoptent un profil pro-inflammatoire MSC1, *via* la stimulation des TLR4 et la sécrétion de chimiokines, permettant ainsi la stimulation du système immunitaire, et notamment l'activation des lymphocytes T. Les CSM se retrouvent alors exposées à un environnement riche en cytokines pro-inflammatoires, telles que IFN-γ et TNF-α. A partir d'un certain niveau d'exposition à ces dernières, les CSM changent de phénotype et adoptent un profil anti-inflammatoire (MSC2) en sécrétant des molécules immuno-suppressives telles que IDO, PGE2, *etc*. qui favorisent l'émergence des lymphocytes régulateurs. De façon analogue, les CSM sont capables d'influencer la polarisation des monocytes vers des macrophages pro-inflammatoires (M1) ou anti-inflammatoires (M2) (Bernardo and Fibbe, 2013). Ainsi, cette balance entre effets pro- et anti-inflammatoires, modulée en partie par les CSM, permet de maintenir un équilibre entre la défense de l'organisme et l'homéostasie tissulaire.

In vivo, les propriétés immunosuppressives des CSM ont également été prouvées. En effet, des CSM allogéniques injectées chez le primate prolongent la survie d'un greffon de peau allogénique (Bartholomew *et al.*, 2002). Dans un modèle murin de lupus érythémateux disséminé, l'injection de CSM a amélioré la maladie en inhibant les lymphocytes T et B autoréactifs (Deng *et al.*, 2005). Enfin, certaines études ont montré l'intérêt des CSM en immunothérapie. Chez l'animal, l'administration de CSM induit la tolérance d'organes lors d'allogreffes et montre un rôle bénéfique comme traitement préventif de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) (Tisato *et al.*, 2007). Chez l'homme, l'injection de CSM dans le traitement de la GVHD, de haut grade cortico-résistante, a montré des résultats très encourageants et a apporté la preuve de l'efficacité clinique de ces cellules en matière d'immunosuppression. La GVHD est une complication fréquente et très sévère de l'allogreffe de CSH. Elle se caractérise par une destruction des tissus du receveur reconnus comme étrangers par les effecteurs immuns présents dans le greffon. La principale étude

publiée à ce jour chez 55 patients atteints de GVHD sévère cortico-résistante 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 à peine 10 % attendus avec les autres thérapeutiques disponibles (Le Blanc *et al.*, 2008). Plus récemment, ces résultats ont été étendus à une cohorte de 37 patients pédiatriques et ont également montré l'efficacité de plusieurs injections de CSM dans le traitement de la GVHD aiguë cortico-résistante (Ball *et al.*, 2013).

La faible immunogénicité caractérise également les CSM. En effet, ces dernières n'expriment pas les antigènes HLA de classe II (comme HLA-DR, par exemple), ni les molécules de co-stimulation, telles que CD40, CD80 et CD86, qui induisent en situation allogénique, l'activation et la survie des lymphocytes T allo-réactifs.

Ces propriétés immunomodulatrices des CSM offrent des perspectives intéressantes quant à leur utilisation en situation allogénique et dans les pathologies auto-immunes.

e. Comportement en culture in vitro

Les CSM possèdent un fort pouvoir d'expansion *in vitro*, certes limité dans le temps, mais permettant d'obtenir des cellules en quantité suffisante pour des utilisations thérapeutiques. La littérature scientifique a connu ces dernières années, l'émergence de données suggérant la possibilité d'une transformation maligne des CSM lors de culture *in vitro* à long terme (Rosland *et al.*, 2009). Cependant, cette même équipe a montré, peu de temps après, que cette potentielle transformation des CSM est en fait due à une contamination croisée par des lignées de cellules cancéreuses (Torsvik *et al.*, 2010). Certaines équipes ont également démontré la présence d'anomalies génétiques dans les CSM en culture. Ces anomalies, en particulier des aneuploïdies, ont été observées sans qu'il n'y ait pour autant des transformations cellulaires *in vitro* ni de formations tumorales *in vivo* (Tarte *et al.*, 2010; Sensebe *et al.*, 2012).

f. Effet de l'hypoxie sur la culture in vitro des CSM

Au sein de la niche médullaire, le microenvironnement physiologique des CSM est pauvre en O_2 (hypoxique), avec une pression en oxygène comprise entre 1 et 6% (Mohyeldin *et al.*, 2010). Afin de se rapprocher au mieux des conditions physiologiques et de tenter d'améliorer les propriétés des CSM, l'hypoxie a été incorporée dans les systèmes de

culture cellulaire *in vitro*. Plusieurs études mettent en évidence un bénéfice significatif en terme de prolifération et une inhibition de la sénescence des CSM quand ces dernières sont soumises à un environnement hypoxique (Tsai *et al.*, 2011).

Lors d'une exposition à des conditions d'hypoxie, la réponse de la cellule est régulée par l'activation d'une protéine hétérodimérique HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) formée d'une chaîne alpha et d'une chaîne béta. Cette protéine joue le rôle de facteur de transcription et régule l'expression de plus de 200 gènes intervenant dans l'érythropoïèse, l'apoptose, la prolifération, la différenciation ou encore l'expression de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et l'angiogénèse (Forristal *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2011). HIF-1 alpha est présent uniquement en situation d'hypoxie. Lors d'un retour aux conditions de normoxie, les protéines HIF-1 alpha se trouvant dans le noyau sont dégradées par le protéasome nucléaire.

De nombreuses études ont montré des effets significatifs de l'hypoxie sur les propriétés des CSM de la moelle osseuse (CSM-MO), notamment sur leur prolifération et leurs capacités de différenciation (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Effets de l'hypoxie sur les propriétés des CSM.
L'effet sur l'ostéogénèse reste controversé.
(CFU-F : Fibroblasts Colony-Forming Unit)

Propriétés	**Effet de l'hypoxie** (par rapport à la normoxie)	**Références**
Prolifération	Augmentation	(Grayson *et al.*, 2007)
Capacités clonogéniques	Augmentation Nombre et taille des CFU-F	(Basciano *et al.*, 2011)
Chondrogénèse	Augmentation	(Robins *et al.*, 2005) (Markway *et al.*, 2010)
Ostéogénèse	Diminution Augmentation	(Potier *et al.*, 2007) (Fehrer *et al.*, 2007) (Hung *et al.*, 2012) (Wagegg *et al.*, 2012)
Adipogénèse	Diminution	(Hung *et al.*, 2012) (Wagegg *et al.*, 2012)
Senescence **Longueur des télomères** **Activité télomérase**	Inhibition Maintien Induction	(Tsai *et al.*, 2011)
Expression de facteurs de pluripotence	Induction Oct-4, Nanog	(Hung *et al.*, 2012)

D'autres travaux montrent que l'amplification de CSM-MO en hypoxie améliore leur capacité de différenciation chondrogénique (Adesida *et al.*, 2012). Des auteurs mettent également en évidence le fait que l'amplification de CSM du tissu adipeux en hypoxie améliore leur potentiel ostéogénique et adipogénique (Valorani *et al.*, 2012).

D. Les cellules souches unipotentes

1. Définition

Les cellules souches unipotentes possèdent une capacité d'auto-renouvellement et de différenciation vers un seul type de cellule spécialisée. Ainsi, elles permettent le renouvellement permanent du tissu dans lequel elles se trouvent. Elles se localisent dans les tissus adultes au niveau du foie, des gonades, des muscles et dans certains épithéliums de la muqueuse intestinale, de la cornée, de la peau et du follicule pileux. La connaissance de ces CS unipotentes est moins développée que celle des CS décrites précédemment. En effet, du fait de leur potentiel de différenciation extrêmement limité ainsi que leur relative difficulté à être isolées, d'autres sources de CS ont été envisagées.

2. Les cellules souches épithéliales

L'homéostasie du tissu épithélial est maintenue grâce à la présence de cellules souches capables de se diviser à l'identique et de se spécialiser vers des cellules de leur tissu d'origine. Ces cellules souches épithéliales sont capables de remplacer les cellules lésées suite à une altération tissulaire. Elles se localisent au niveau de la muqueuse intestinale, du follicule pileux, de la peau, de la cornée ou encore des glandes sébacées (Blanpain *et al.*, 2007). L'épithélium de l'intestin est complètement renouvelé environ tous les cinq jours alors qu'au contraire, celui du follicule pileux est renouvelé toutes les quatre semaines.

L'équipe du Professeur Yann Barrandon a démontré, il y a quelques années, la présence de cellules souches au niveau des follicules pileux de mammifères. Ces cellules sont capables de proliférer aisément en culture *in vitro*. A partir d'une seule de ces cellules, prélevée dans une vibrisse de rat, d'innombrables descendantes ont été obtenues, capables, une fois transplantées sous l'épiderme d'un fœtus de souris, de participer à la constitution, puis au fonctionnement normal de milliers de follicules pileux (Oshima *et al.*, 2001). Nichées dans une zone précise du follicule appelée le renflement, elles sont capables de migrer vers la surface pour constituer les glandes sébacées, ou vers le bas pour former la papille du poil. En outre, ces cellules souches sont capables de quitter leur niche lorsque l'épiderme environnant est lésé pour participer à sa cicatrisation. De ce fait, la frontière entre unipotence et multipotence est parfois difficile à définir pour ces CS du follicule pileux.

Les cellules souches épidermiques sont situées dans la couche la plus profonde de l'épiderme, au niveau de la couche basale. Elles permettent un renouvellement permanent

de la population kératinocytaire. Ces cellules souches de la peau ont pu être isolées *in vitro* à partir de cultures de kératynocytes. Une fois isolées, ces cellules ont montré un fort pouvoir de prolifération et une capacité à synthétiser un épiderme *in vitro* (Zouboulis *et al.*, 2008). Ces cellules ont ainsi été utilisées à des fins de réparation épidermique et ont transformé le pronostic des grands brûlés. Elles permettent également d'étudier le vieillissement de la peau *in vitro* constituant ainsi, un modèle cellulaire intéressant pour l'industrie dermatologique. De plus, elles constituent un modèle d'essai attrayant pour des substances pharmaceutiques ou cosmétiques.

E. Les cellules souches cancéreuses

Initialement identifiées dans les leucémies puis décrites dans de nombreux types de cancers solides, les cellules souches cancéreuses (CSC) sont à l'origine de l'hétérogénéité et de l'organisation hiérarchique des tumeurs malignes. Les CSC ont été mises en évidence après xénogreffe de sous-populations cellulaires ($CD34^+/CD24^-$) issues d'une tumeur humaine (cancer du sein) injectées à une souris immunodéprimée. Une fois réimplantée chez l'animal, cette sous-population cellulaire est capable de recréer une nouvelle tumeur hétérogène (Al-Hajj *et al.*, 2003). En effet, il a été démontré que ces cellules possèdent un potentiel tumorigène plus important que celui des autres cellules cancéreuses (Clarke *et al.*, 2006).

En nombre limité et étroitement enchâssées dans le microenvironnement tumoral, les CSC présentent des caractéristiques communes avec les CS normales, telles que l'auto-renouvellement et la capacité de donner naissance, par division asymétrique, à des cellules cancéreuses engagées dans la différenciation (progéniteurs et cellules différenciées). A l'instar des CS normales, au sein de leur niche, la majorité des CSC sont dans un état de quiescence. L'expression d'un certain nombre de marqueurs à la surface des CSC, certes non spécifiques, a permis l'identification de ces dernières (Clevers, 2011). La CSC se forme suite à des mutations génétiques au niveau d'une cellule souche, d'un progéniteur ou même d'une cellule différenciée « normale » au sein d'un tissu donné. Les facteurs environnementaux semblent également intervenir dans ce processus (Clarke *et al.*, 2006; Sugihara and Saya, 2013).

Du fait de leur propriété de CS normale et notamment de leur état de quiescence au sein de la niche tumorale, les CSC présentent une certaine chimiorésistance. Elles seraient ainsi responsables des rechutes fréquentes observées après un traitement anticancéreux conventionnel par chimiothérapie. La fréquence de ces rechutes, après ce type de traitement, conduit la communauté médicale et scientifique à considérer que le ciblage exclusif des

cellules tumorales reste insuffisant. En considérant la niche tumorale dans son ensemble, microenvironnement et CSC, plusieurs stratégies thérapeutiques sont envisageables afin de réduire les risques de récidives (Sugihara and Saya, 2013). Aujourd'hui, ces nouvelles approches font l'objet de plusieurs projets de recherche translationnelle. L'objectif principal est d'induire l'apoptose des CSC afin de limiter la croissance tumorale et surtout de prévenir les rechutes et la dissémination tumorale. Pour cela, le ciblage directement des CSC, ou encore la suppression des interactions qui existent entre la CSC et son microenvironnement, pourraient être réalisés. Il serait également intéressant de promouvoir la sortie des CSC de leur état de quiescence afin de les rendre chimiosensibles (Sugihara and Saya, 2013).

F. Conclusion

Aujourd'hui, les cellules souches humaines représentent un outil de recherche et un espoir thérapeutique majeur. Leurs capacités d'auto-renouvellement et de prolifération *in vitro* permettraient de constituer des lots de cellules, de grade clinique, en quantité suffisante pour une utilisation thérapeutique. Par ailleurs, leur potentiel de différenciation permettrait d'utiliser ces CS à des fins de réparation tissulaire et de médecine régénératrice suite à une lésion tissulaire accidentelle ou pathologique. Les différentes populations de CS humaines possèdent des caractéristiques propres (**Tableau 5**) qui permettent d'envisager leur utilisation en recherche et en thérapeutique à plus ou moins long terme. D'après les différentes propriétés des CSM, ces cellules semblent constituer une véritable source cellulaire attractive pour la thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire, notamment celle du cartilage.

Tableau 5: Comparaison des propriétés des différentes cellules souches humaines.
(+++ : très importante ; ++ : importante ; + : faible ; - : nulle).

	Cellules souches pluripotentes		**Cellules souches multipotentes**		**Cellules souches unipotentes**
Caractéristiques	**CSE**	**iPS**	**CSH**	**CSM**	
Accessibilité	Facile (lignées)	Facile	Facile	Facile	Plus difficile (biopsie cutanée, par exemple)
Quantité	Potentiellement illimitée	Potentiellement illimitée	Importante	Importante	Importante
Plasticité	+++	+++	+	++	-
Potentiel régénérateur	Pluripotent	Pluripotent	Multipotent	Multipotent	Unipotent
Capacités de prolifération et d'amplification in vitro	Grande et illimitée	Grande et illimitée	Limitée (sénescence cellulaire)	Limitée (sénescence cellulaire)	Limitée (sénescence cellulaire)
Risque tumorigène	Réel (si injectées non différenciées)	Réel (si injectées non différenciées) + mutagénèse insertionnelle	Non	*A priori* non	Inconnu
Risque immunitaire	Présent (HLA compatible)	Absent	Présent (compatibilité HLA la plus fine possible) Moins exigeant pour le sang placentaire	Faible	Présent si allogreffes (HLA compatible)
Débat éthique	Vif	Absent	Absent	Absent	Absent

II. Les CSM de la gelée de Wharton

A. La gelée de Wharton

La gelée de Wharton a été décrite pour la première fois par Thomas Wharton, médecin anatomiste anglais, en 1656. Durant la grossesse, le cordon ombilical représente le lien entre la mère et le fœtus. Le cordon ombilical est composé de deux artères et d'une veine, entourées par une matrice gélatineuse : un tissu conjonctif appelé gelée de Wharton, et recouvert par un épithélium amniotique. Au sein de cette gelée de Wharton, deux zones particulières ont été décrites : la région péri-vasculaire (autour des vaisseaux) et une région située en dessous de l'épithélium amniotique (subamnios) (Kim *et al.*, 2013). Histologiquement, il est difficile de distinguer ces deux zones (**Figure 8**). Le rôle principal de la gelée de Wharton est d'empêcher la compression et la torsion des vaisseaux ombilicaux qui assurent le flux sanguin entre la mère et le fœtus, tout en maintenant une importante mobilité (Can and Karahuseyinoglu, 2007). Cette fonction est directement liée à la structure particulière de la matrice extracellulaire. La gelée de Wharton, dérivée du mésoblaste extra-embryonnaire, est une structure avasculaire et très hydratée. Elle contient des cellules fibroblastiques entourées d'une matrice extracellulaire composée d'un réseau de collagènes et de nombreux polysaccharides notamment des glycosaminoglycanes et principalement de l'acide hyaluronique (Can and Karahuseyinoglu, 2007).

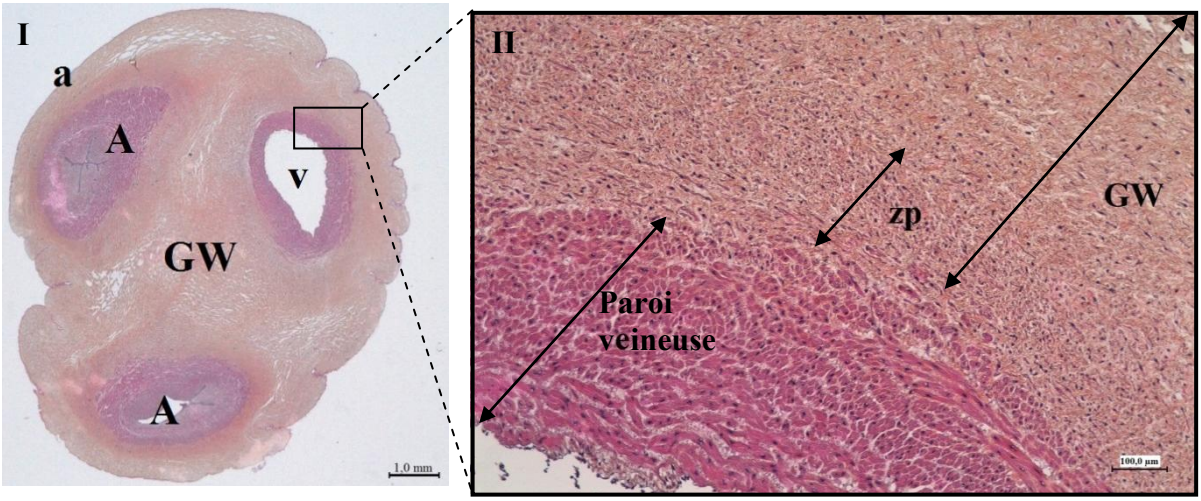


Figure 8 : Coupe histologique transversale d'un cordon ombilical humain.
I : Image au macroscope, objectif x1 ; coloration à l'Hématoxyline Eosine Safran (HES). II : Image au microscope optique, objectif x10 ; coloration à l'HES. (A : artères ; v : veine ; GW : gelée de Wharton ; a : épithélium amniotique ; zp : zone péri-vasculaire) (d'après des données personnelles).

B. Les CSM de la gelée de Wharton

1. Découverte

Dès 1991, des cellules fibroblastiques ont été isolées et caractérisées au sein de la gelée de Wharton (McElreavey *et al.*, 1991). Par la suite, des études ont montré que ces cellules possédaient les propriétés caractéristiques des CSM, définies par le comité de l'ISCT (Wang *et al.*, 2004). L'origine de ces cellules au sein de la gelée de Wharton est encore discutée. La première hypothèse serait que les CSM fœtales auraient migré au cours du développement embryonnaire et auraient colonisé la gelée de Wharton. La seconde possibilité repose sur le fait que ces cellules seraient des CSM primitives provenant du mésenchyme et présentes dans la matrice du cordon ombilical dès le début de sa formation (Kim *et al.*, 2013). Des travaux restent à mener pour définir précisément l'origine des CSM de la gelée de Wharton (CSM-GW).

2. Isolement et mise en culture des CSM-GW

Actuellement, aucune méthode d'isolement n'a été standardisée ni aucune région de la gelée de Wharton n'a été privilégiée pour isoler les CSM-GW. Ces cellules peuvent être isolées à partir de trois régions : la zone inter-vasculaire, la zone péri-vasculaire (Baksh *et al.*, 2007) et au niveau du subamnios (Troyer and Weiss, 2008). Des études, relativement récentes, ont montré des différences, à la fois en terme de densité cellulaire, mais également au niveau de l'expression de certains marqueurs de surface (tels que CD146 ou CD73), entre ces cellules issues des différentes régions de la gelée de Wharton (Schugar *et al.*, 2009). Plus récemment, une équipe anglaise a isolé et caractérisé des CSM provenant de différentes régions de la matrice du cordon ombilical. Ces caractéristiques (immunophénotypage, prolifération et différenciation cellulaires) propres à chaque région ont été comparées avec celles de CSM prélevées sur l'ensemble d'un cordon sans distinction de zones. L'étude a montré qu'il n'y a aucune différence en termes de prolifération et de profil phénotypique entre les CSM prélevées au niveau des différentes régions. De plus, les cellules obtenues à partir de l'ensemble du cordon présentent des capacités de différenciation équivalentes voire supérieures à celles des CSM isolées à partir des différentes zones. Ainsi, les auteurs de ce travail concluent sur le fait que l'isolement des CSM, à partir de l'ensemble de la matrice du cordon ombilical, présente certains avantages (facilité technique, rapidité, quantité de matrice, rendement) et permet d'obtenir des CSM répondant aux critères minimums de caractérisation (Mennan *et al.*, 2013).

A l'heure actuelle, deux grandes techniques d'isolement des CSM-GW ont été décrites :

- La méthode non-enzymatique ou méthode dite « des explants » fut la première technique employée par McElreavey *et al.* en 1991 (**Figure 9**). Cette technique repose sur les capacités de migration et d'adhérence au plastique des CSM-GW. Après le retrait des vaisseaux ombilicaux et de l'épithélium amniotique, la gelée de Wharton est isolée puis découpée en morceaux de petites tailles (2 à 3 mm^3). Les morceaux de gelée sont déposés dans des plaques six puits, en contact avec un milieu de culture, puis incubés dans des conditions optimales. Spontanément, les CSM-GW migrent au fonds des puits et commencent à se multiplier (Mitchell *et al.*, 2003).

Récemment, une équipe belge a isolé des CSM-GW à partir de morceaux de cordon entier (sans retrait des vaisseaux ombilicaux). Après une incision longitudinale du cordon, ce dernier est placé en culture, au contact du plastique pendant cinq jours. Au premier passage, l'analyse phénotypique des cellules montre la présence de deux populations cellulaires : des CSM et des cellules endothéliales ($CD31^+$) provenant des vaisseaux ombilicaux. Au second passage, cette population de cellules endothéliales a complètement disparu. Ainsi, ces auteurs proposent une technique rapide, simple et reproductible d'isolement des CSM-GW (De Bruyn *et al.*, 2011). Dans ce même objectif de développer une méthode d'isolement rapide et moins laborieuse, Hendijani *et al.* a également travaillé sur des morceaux de cordon entier. Plusieurs incisions ont été réalisées dans la matrice ombilicale afin d'exposer une plus grande surface de tissu au milieu de culture. Après une dizaine de jours, les CSM-GW ont migré, adhéré au plastique et commencé à se multiplier *in vitro* (Hendijani *et al.*, 2014).

- La méthode enzymatique consiste à digérer les morceaux de gelée de Wharton grâce à l'action d'enzymes telles que la collagénase qui peut être utilisée seule ou associée à la hyaluronidase et/ou à la trypsine (Wang *et al.*, 2004) (**Figure 9**). La digestion se fait à 37°C durant une période pouvant aller de 30 minutes à 16 heures selon les protocoles (Can and Karahuseyinoglu, 2007). Après l'arrêt de la digestion, la suspension est filtrée, rincée puis centrifugée. Le culot cellulaire obtenu est ensuite placé en culture.

Une autre technique consiste à récupérer les vaisseaux ombilicaux avec leur gelée de Wharton environnante. Ces vaisseaux sont ensuite ligaturés et exposés à la

collagénase. De cette façon, cette méthode permet d'isoler les CSM-GW de la zone perivasculaire (Sarugaser *et al.*, 2005).

En 2007, une équipe isole des CSM-GW après digestion à la collagénase de morceaux de cordon entier sans le retrait des vaisseaux ombilicaux. Cette méthode a pour objectif de réduire les manipulations et d'accélérer le processus d'isolement des cellules (Lund *et al.*, 2007).

Enfin, plus récemment, une méthode associe digestion enzymatique et dissociation mécanique. Après digestion enzymatique, le mélange est homogénéisé mécaniquement à l'aide d'un homogénéisateur (Tong *et al.*, 2010).

Avec la méthode non-enzymatique, les CSM-GW présentent une viabilité et un taux de prolifération supérieurs aux CSM-GW isolées par la méthode enzymatique (Salehinejad *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 2013). La digestion enzymatique permet d'isoler, dès le départ, un plus grand nombre de cellules (Salehinejad *et al.*, 2012). En revanche, la méthode enzymatique diminue la viabilité cellulaire, modifie la taille des cellules et leur granulométrie et peut affecter l'expression de certains marqueurs de surface tels que CD73 ou CD90 (Salehinejad *et al.*, 2012).

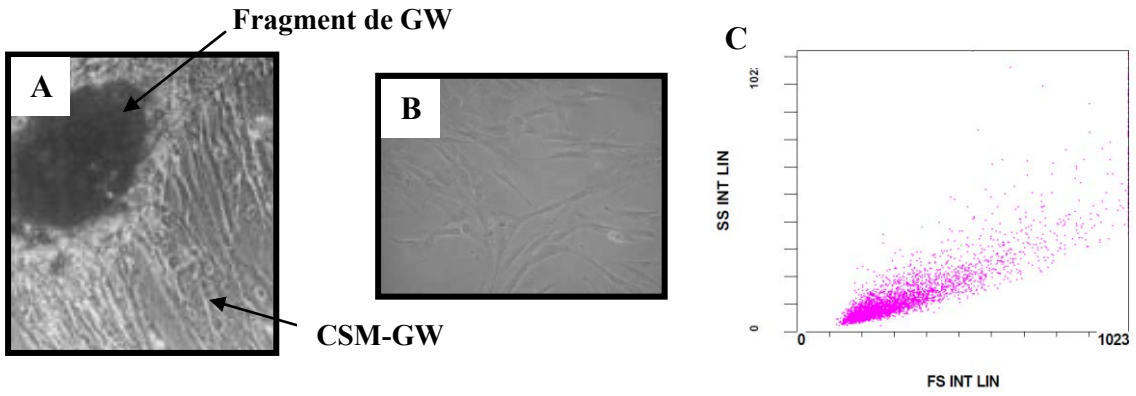


Figure 9 : Isolement et mise en culture des CSM-GW.
(A) Isolement des CSM-GW par la méthode non-enzymatique ou méthode dite « des explants ». Les CSM-GW migrent au fond des puits, adhérent au plastique et se multiplient autour du fragment de GW (d'après (McElreavey et al., 1991)). (B) Isolement des CSM-GW par la méthode enzymatique. Les CSM-GW présentent une morphologie de type fibroblastique (d'après (Wang et al., 2004)). (C) Morphologie des CSM-GW isolées par la méthode non-enzymatique, et évaluées par cytométrie en flux au premier passage. FS correspond à la taille des cellules et SS à la granularité. La gelée de Wharton a été prélevée au niveau de 3 régions : inter-vasculaire, péri-vasculaire et subamnios (d'après des données personnelles).

Au moment de l'isolement, des CSM-GW, des globules rouges et des cellules non adhérentes sont placés en culture. La capacité d'adhérence au plastique des CSM-GW et l'utilisation d'un milieu de culture spécifique permettent l'enrichissement de la population cellulaire. Une étude montre qu'après deux ou trois passages, il est possible d'obtenir une population homogène de CSM-GW caractérisée par une analyse phénotypique (Seshareddy *et al.*, 2008).

Ces techniques d'isolement, décrites précédemment, ont été réalisées sur un tissu ombilical frais. D'après une récente revue de la littérature, l'isolement des CSM-GW peut également être réalisé sur des fragments de gelée de Wharton cryoconservés. Cependant, les auteurs ont démontré une viabilité cellulaire (Da-Croce *et al.*, 2013) ainsi qu'un rendement d'isolement (Roy *et al.*, 2014) plus faibles, en comparaison avec les techniques réalisées sur un tissu frais. De plus, l'isolement des CSM-GW sur un tissu cryoconservé reste controversé puisqu'une étude, très récente, a montré l'impossibilité d'isoler ces cellules à partir d'un tel tissu (Chatzistamatiou *et al.*, 2014).

3. Aspects réglementaires du prélèvement

Avant la décision du 16 mai 2012 (n° 2012-249) résultant de la loi de bioéthique de 2011 (loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la Bioéthique), le cordon ombilical et par extension la gelée de Wharton étaient considérés comme des déchets opératoires, dont le don était encadré par un régime de « non-opposition ». À présent, la gelée de Wharton est considérée comme une source à part entière de CSM et de ce fait, le prélèvement de cellules du cordon (ou du placenta) ne peut avoir lieu qu'à des fins thérapeutiques ou scientifiques, en vue d'un don anonyme et gratuit, et à la condition que la femme, durant sa grossesse, ait donné son consentement par écrit au prélèvement et à l'utilisation de ces cellules (Art. L. 1241-1). Des informations sur les finalités de ce don lui sont données de façon précise. Ce consentement est révocable sans forme et à tout moment tant que le prélèvement n'est pas intervenu (Reppel *et al.*, 2012).

4. Cryoconservation des CSM-GW

L'utilisation des CSM-GW en recherche et potentiellement en thérapeutique, nécessite de pouvoir stocker ces cellules à plus ou moins long terme. La reproductibilité et l'efficacité de différents protocoles de cryoconservation ont été testées sur ces cellules. La viabilité à la décongélation a également été évaluée après 3 à 8 semaines de congélation (Balci and Can, 2013). Généralement, les cellules sont suspendues dans une solution de

cryoconservation (habituellement, 10% de diméthylsulfoxide (DMSO) dans 90% de sérum de veau fœtal (SVF) ou de milieu de culture enrichi en SVF) et subissent une congélation lente correspondant à une descente en température de un degré par minute et ceci jusqu'à -80°C. Les cellules y sont conservées pendant 24 heures avant d'être transférées dans l'azote liquide à -196°C. Grâce à cette méthode, les taux de viabilité à la décongélation sont d'environ 90% (Fong *et al.*, 2010; Balci and Can, 2013). En revanche, une étude antérieure a montré une perte de viabilité des cellules à la décongélation d'environ 50% (Karahuseyinoglu *et al.*, 2007). Cette variabilité de viabilité entre les CSM-GW après décongélation reste inexpliquée. D'autre part, la congélation ne semble présenter aucun effet délétère sur l'expression des marqueurs de surface de ces cellules (Seshareddy *et al.*, 2008; Balci and Can, 2013). Une étude, relativement récente, a montré que la cryoconservation des CSM-GW, durant deux semaines, n'a aucun effet néfaste sur le phénotype, le cycle cellulaire, la prolifération et la capacité de différenciation (neuronale) des CSM-GW (Zhang *et al.*, 2011). Tous ces travaux décrivent l'effet de la cryoconservation des CSM-GW à court ou moyen terme sur leurs propriétés fondamentales. Encore peu d'études s'intéressent à l'effet de la cryoconservation à long terme des CSM qui serait, certainement, la technique de conservation la plus utilisée dans un contexte thérapeutique. Les CSM issues du tissu adipeux, congelées pendant une durée de 6 mois, conservent leurs capacités de prolifération et de différenciation mésodermique (Gonda *et al.*, 2008). Très récemment, des auteurs ont mis en évidence le fait que des CSM-MO cryoconservées pendant 24 mois présentent, après décongélation, un très bon taux de viabilité (supérieur à 90%) et conservent leurs propriétés de prolifération et de différenciation (Matsumura *et al.*, 2013). A ce jour et à notre connaissance, aucune étude n'a montré l'effet de la cryonservation à long terme des CSM-GW sur leurs propriétés fondamentales.

5. Caractérisation des CSM-GW

En plus des propriétés caractéristiques des CSM (définies par le comité de l'ISCT) que possèdent ces cellules de la gelée de Wharton (Wang *et al.*, 2004), ces dernières présentent certaines spécificités.

a. *Morphologie et comportement en culture in vitro*

- *Morphologie :*

Comme énoncé précédemment, les CSM-GW possèdent une morphologie de type fibroblastique et adhèrent au plastique en culture *in vitro* (**Figure 9**).

- *Prolifération et amplification :*

A l'instar de toutes les cellules souches, les CSM-GW sont douées d'auto-renouvellement. Elles possèdent un fort potentiel d'amplification en culture *in vitro* et sont capables de proliférer au-delà de 15 passages avant même que les premiers signes de sénescence cellulaire n'apparaissent (Troyer and Weiss, 2008). Lorsque les CSM-GW sont laissées en culture jusqu'à atteindre 100% de confluence, ces dernières perdent leur inhibition de contact. Elles forment alors des colonies tridimensionnelles et le tapis cellulaire est susceptible de se décrocher de son support (Seshareddy *et al.*, 2008). Ces conditions empêchent d'obtenir une suspension cellulaire homogène entre les passages et donc de poursuivre l'amplification des cellules.

Au cours de l'amplification *in vitro*, l'intégrité protéomique et génomique des CSM-GW est modifiée.

Une étude a suivi l'évolution du profil protéomique des CSM-GW entre le deuxième et le douzième passage afin de mettre en évidence les protéines potentiellement responsables de la croissance rapide et de l'amplification à long terme de ces cellules (Angelucci *et al.*, 2010). Des protéines anti-oxydantes telles que la thioredoxine, la peroredoxine et les glutathion transférases préservent les CSM-GW des altérations oxydatives qui ont lieu au cours de l'amplification. De plus, l'étude a permis de démontrer que plusieurs protéines impliquées dans les phénomènes de différenciation et de prolifération (Shootin1, Adenylate kinase 5 isoenzyme et Plasminogen activator-inhibitor 2) ne sont plus exprimées après le deuxième passage, traduisant ainsi, une probable diminution progressive des capacités des CSM-GW dès le troisième passage (Angelucci *et al.*, 2010). En revanche, après le douzième passage, de nouvelles protéines telles que ERO1-like protein alpha (ERO1A), Aspartyl-tRNA synthetase et Prolyl-4-hydroxylase sont synthétisées par les CSM-GW. L'enzyme ERO1A est responsable de la production d'espèces réactives de l'oxygène au sein de la cellule au cours du stress oxydant. L'Aspartyl-tRNA synthetase, quant à elle, est une enzyme qui interagit avec une protéine inhibitrice de la prolifération cellulaire. L'expression tardive de ces protéines traduirait donc une perte d'intégrité cellulaire et une entrée progressive de la cellule dans un processus de sénescence (Angelucci *et al.*, 2010).

Très récemment, le suivi du profil génomique ou transcriptomique des CSM-GW a été réalisé après quatre et douze passages par analyse « microarray » (Gatta *et al.*, 2013). De la même façon que l'étude précédente, l'objectif de cette dernière était d'identifier

des marqueurs, cette fois-ci génétiques, associés à la croissance et à l'amplification à long terme de ces cellules. Sur un total de 30968 transcrits analysés au cours de l'amplification, au terme du douzième passage, 157 gènes se sont révélés être surexprimés alors que l'expression de 440 gènes a été diminuée par rapport au quatrième passage (Gatta *et al.*, 2013). Ces gènes surexprimés interagissent entre eux sous forme de réseaux. Le principal réseau généré par cette analyse s'articule principalement autour de deux gènes clés que sont IL1 et AKT. L'expression du gène IL1, étroitement liée au processus inflammatoire, traduit une réponse de défense cellulaire face aux altérations et au stress oxydant. Cette réponse a pour but de prévenir la mort de la cellule (apoptose). L'expression du gène AKT, quant à elle, est principalement associée à la différenciation et à la maturation cellulaire. Parallèlement, le principal réseau d'interaction des gènes sous-exprimés est centré autour d'un gène clé : le gène P53. Ces gènes sous-exprimés interviennent principalement dans la prolifération, la réponse au stress oxydant et dans la multipotence cellulaire. Ainsi, les principaux gènes identifiés au cours de cette étude, pourraient être utilisés comme des bio-marqueurs afin d'évaluer la qualité de la culture des CSM-GW (Gatta *et al.*, 2013).

Comme les CSM adultes, les CSM-GW peuvent développer, en culture *in vitro* à long terme (après 30 passages), certaines altérations chromosomiques telles qu'une trisomie du chromosome 10 par exemple (Wang *et al.*, 2013). Toutefois, ces anomalies génomiques ont été observées sans qu'il n'y ait pour autant de formations tumorales *in vivo*, après injection de ces cellules chez la souris immunodéprimée (Wang *et al.*, 2013).

- *Capacité clonogénique :*

Les CSM-GW possèdent un potentiel clonogénique avec la capacité de former des colonies de cellules de type fibroblastique en culture *in vitro* (CFU-F) (Nekanti *et al.*, 2010).

- *Support stromal :*

Enfin, comme les CSM adultes, grâce à leur activité paracrine, qui sera décrite ultérieurement, les CSM-GW peuvent constituer un support stromal (ou couche nourricière) en co-culture *in vitro*, afin de favoriser l'amplification d'autres cellules et notamment des progéniteurs hématopoïétiques $CD34^+$ (Milazzo *et al.*, 2014).

b. Phénotype et expression de marqueurs

Par définition, les CSM-GW expriment les marqueurs de surface caractéristiques des CSM. Elles expriment également des marqueurs mésenchymateux tels que la Vimentine ou l'αSMA (Smooth Muscle Actin) (La Rocca *et al.*, 2009). En général, par rapport aux CSM de la moelle osseuse, les CSM-GW expriment plus faiblement CD106 et HLA-ABC (El Omar *et al.*, 2014) alors que l'expression de CD117, CD146 (Baksh *et al.*, 2007), FLK-1 (récepteur du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)) ou encore de CD44 (récepteur de l'acide hyaluronique) est augmentée (Weiss *et al.*, 2006). L'expression de certains récepteurs à chimiokines (comme CCR3 par exemple) confère à ces cellules la capacité de migrer vers les sites lésés de l'organisme (El Omar *et al.*, 2014).

Certains marqueurs embryonnaires de pluripotence tels qu'Oct4, Sox2, Nanog, Rex-1, SSEA-1, SSEA-4, Tra-1-60 et Tra-1-80 ont été retrouvés à de faibles niveaux d'expression au sein des CSM-GW (Carlin *et al.*, 2006; Fong *et al.*, 2007), suggérant ainsi, un profil plus immature de ces cellules par rapport aux CSM adultes, et donc, de potentielles capacités de différenciation supérieures. D'après des études semi-quantitatives, l'expression d'Oct4 par les CSM-GW reste très faible par rapport aux CSE mais demeure supérieure à celle des cellules somatiques adultes. Le rôle exact et l'activité d'Oct4 au sein des CSM-GW est encore très controversé dans la littérature scientifique. En effet, en 2009, une étude a démontré que le promoteur du gène de pluripotence Oct4 était méthylé dans les CSM-GW, le rendant ainsi inactif (He *et al.*, 2009).

En culture *in vitro*, après plusieurs passages (15), les CSM-GW sont capables de maintenir la longueur de leurs télomères (La Rocca *et al.*, 2009), évoquant ainsi une télomérase active. Cependant, une étude très récente, a montré qu'après 30 passages, la longueur des télomères est significativement diminuée par rapport à celle observée en début de culture (Wang *et al.*, 2013). Cette même étude a également évalué l'expression génique de hTERT, qui correspond à la sous-unité catalytique de la télomérase humaine. Ainsi, les CSM-GW expriment faiblement hTERT aux cours des premiers passages (jusqu'à 3 passages), puis cette expression diminue au cours de la culture *in vitro*, et devient indétectable aux passages tardifs (après 30 passages) (Wang *et al.*, 2013).

Le profil cytokinique des CSM-GW montre que ces dernières sécrètent, par rapport aux CSM de la moelle osseuse, davantage de facteurs de croissance hématopoïétiques (G-CSF (Granulocyte - Colony Stimulating Factor), GM-CSF (Granulocyte Macrophage -

Colony Stimulating Factor), d'interleukines (IL-6, IL-8), *etc*. Ainsi, les CSM-GW pourraient constituer un support stromal pour la culture des progéniteurs hématopoïétiques meilleur que les CSM-MO (Magin *et al.*, 2009). L'activité paracrine des CSM-GW peut également se traduire par la sécrétion de cytokines, telles que l'IL-10, le TGF-β, le VEGF, l'angiopoïétine-1, ou de chimiokines (CXCL1, CXCL2, CXCL5, *etc.*) qui favorisent l'angiogénèse et interviennent dans des mécanismes de réparation tissulaire (Shohara *et al.*, 2012; El Omar *et al.*, 2014)

En plus des marqueurs mésenchymateux, les CSM-GW expriment des marqueurs du neuroectoderme (Nestin, NSE, GFAP) ainsi que des marqueurs de l'endoderme (GATA-4, -5, -6, HNF4α, cytokeratin -8, -18, -19) (La Rocca *et al.*, 2009). L'expression de ces molécules reflète la possible capacité des CSM-GW à se différencier vers des cellules d'origine non mésodermique.

c. Différenciation in vitro

Dans un environnement donné, sous l'influence de facteurs de croissance et/ou ensemencées dans une matrice support, les CSM-GW sont capables de se différencier, *in vitro*, en adipocytes, chondrocytes, ostéocytes (Karahuseyinoglu *et al.*, 2007) mais également en cardiomyocytes, en cellules musculaires squelettiques, en cellules endothéliales (Can and Karahuseyinoglu, 2007), en odontoblastes (Li *et al.*, 2013) ou encore en cellules du nucleus pulposus (Ruan *et al.*, 2012). Elles possèdent également la particularité de se différencier, *in vitro*, en cellules d'origine non mésodermique (ectodermique ou endodermique) (**Tableau 6**). En général, quelle que soit la voie de différenciation utilisée, la cellule obtenue correspond plutôt à un précurseur ou à une cellule qui s'apparente à la cellule désirée (exemple : « neuron-like cells »). D'une équipe scientifique à une autre, certaines capacités de différenciation des CSM-GW peuvent varier. Ces divergences s'expliquent par l'utilisation de protocoles, de facteurs de croissance ou de conditions de culture différents. Par exemple, très récemment, Ragni *et al.* a mis en évidence la difficulté d'obtenir une différenciation adipogénique avec des CSM-GW (Ragni *et al.*, 2013). Une autre étude a montré, qu'au cours de la différenciation adipogénique, les CSM-GW produisent des vacuoles lipidiques de petite taille par rapport à celles obtenues avec les CSM-MO (Mennan *et al.*, 2013).

Tableau 6 : Capacités de différenciation *in vitro* des CSM-GW en cellules d'origine non mésodermique.

Types cellulaires	Références
Neurones dopaminergiques	(Fu *et al.*, 2006)
Neurones cholinergiques	(Liang *et al.*, 2013)
Oligodendrocytes	(Zhang *et al.*, 2010)
Cellules épithéliales	(Aljitawi *et al.*, 2013)
Cellules des glandes sudoripares	(Xu *et al.*, 2012)
Cellules sécrétrices d'insuline	(Wang, H. W. *et al.*, 2011)
Hépatocytes	(Prasajak and Leeanansaksiri, 2013)
Cellules sécrétrices d'hormones stéroïdes	(Wei *et al.*, 2012)
Cellules germinales	(Huang, P. *et al.*, 2010)

d. Effet immunomodulateur

Les propriétés immunes des CSM-GW ont été décrites pour la première fois par Weiss *et al.* en 2008 (Weiss *et al.*, 2008). *In vitro*, à l'instar des CSM de la moelle osseuse ou du tissu adipeux, les CSM-GW présentent des propriétés immunomodulatrices. Ces dernières possèdent une faible immunogénicité, inhibent la prolifération des lymphocytes T activés, augmentent la production de lymphocytes T régulateurs et enfin, semblent freiner la différenciation terminale des lymphocytes B en cellules matures productrices d'anticorps (McGuirk and Weiss, 2011). Les CSM-GW n'expriment pas les antigènes HLA de classe II (comme HLA-DR par exemple), ni les molécules de co-stimulation, telles que CD40, CD80 et CD86. En revanche, elles expriment HLA-G (antigène HLA de classe I), l'IL-6 et VEGF :

molécules intervenant dans les propriétés d'immunomodulation des CSM (Weiss *et al.*, 2008; La Rocca *et al.*, 2009). Quelques études ont comparé les propriétés immunomodulatrices des CSM-GW par rapport à celles des CSM-MO. Les CSM-GW produisent davantage de TGF-β et d'IL-10 et semblent exprimer de façon plus importante la molécule HLA-G (Liu *et al.*, 2012). L'inhibition de la prolifération des lymphocytes T activés serait plus forte au contact des CSM-GW qu'à celui des CSM-MO (Kim *et al.*, 2013). Ainsi, les CSM-GW seraient moins immunogènes que les CSM-MO et présenteraient des propriétés immunomodulatrices au moins équivalentes (Yoo *et al.*, 2009). Récemment, La Rocca *et al.* a démontré, pour la première fois, que des molécules immunomodulatrices telles que HLA-G ou TGF-β par exemple, exprimées par des CSM-GW indifférenciées, sont également retrouvées au niveau de ces mêmes cellules, après différenciation mésodermique *in vitro*. Ainsi, suite à l'acquisition d'un phénotype mature, les cellules dérivées des CSM-GW conservent leurs propriétés immunologiques (La Rocca *et al.*, 2013).

In vivo, peu de travaux ont évalué les propriétés immunomodulatrices des CSM-GW. Actuellement et à notre connaissance, seulement deux études cliniques utilisent des CSM-GW, en injection intraveineuse, dans le traitement de la GVHD sévère cortico-résistante (http://clinicaltrials.gov) (dernière consultation en juillet 2014). Récemment, une étude clinique chinoise a montré l'effet bénéfique de l'injection de CSM-GW dans le traitement d'une pathologie auto-immune, la thrombocytopénie immune primaire (Ma *et al.*, 2012).

6. Comparaison avec les CSM de la moelle osseuse

Aujourd'hui, un certain nombre d'arguments permettent d'envisager les CSM-GW comme une source alternative de CSM, au dépend des CSM-MO. Le tableau suivant présente les principales différences et similitudes existantes entre ces deux sources cellulaires (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Comparaison entre les CSM-GW et les CSM-MO.

Sources des CSM / Critères	Moelle osseuse	Gelée de Wharton
Prélèvement	Potentiellement douloureux Potentiellement iatrogène	Non douloureux Non iatrogène
Abondance	Limitée	Potentiellement illimitée
Contrainte éthique	Aucune	Aucune
Taux de réussite à l'isolement	100% *(données personnelles)*	100% *(données personnelles)*
Fréquence cellulaire	$1/10^5$ cellules mononucléées *(données personnelles)*	10^{4-6} cellules / cm de cordon ombilical *(données personnelles)*
Impact de l'âge du donneur sur les propriétés	Oui *(Fossett et al., 2012)*	Non
Prolifération **Amplification *in vitro*** **Clonogénicité**		Supérieure *(Troyer and Weiss, 2008)*
Faible expression de marqueurs de pluripotence	Non	Oui *(Fong et al., 2007)*
Différenciation mésodermique	Oui	Oui Adipogénèse difficile *(Ragni et al., 2013)*
Différenciation non mésodermique		Supérieure
Immunogénicité **Immunomodulation**		Inférieure Supérieure *(Kim et al., 2013)*
Type d'utilisation	Autologue Allogénique	⇩ Allogénique +++

7. Effet de l'hypoxie sur la culture *in vitro* des CSM-GW

A l'heure actuelle, très peu d'études se sont intéressées à l'effet de l'hypoxie sur les propriétés des CSM-GW en culture *in vitro*. A notre connaissance, seuls deux articles, relativement récents, ont étudié l'impact d'un environnement pauvre en oxygène (entre 2 et 3% d'O_2) sur certaines caractéristiques des CSM-GW. Les résultats significatifs sont rapportés dans le tableau suivant (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Influence de l'hypoxie sur les CSM-GW en culture *in vitro*.
(GRB7: growth factor receptor-bound protein 7 ; ACTC: actin, alpha, cardiac muscle 1 ; Runx2: runt-related transcription factor 2 ; VEGF: vascular endothelial growth factor ; HGF: hepatocyte growth factor)

Propriétés	**Effet de l'hypoxie** (par rapport à la normoxie)	**Références**
Prolifération	Augmentation	(Nekanti *et al.*, 2010)
Expression génique	Augmentation de gènes précoces du caractère souche : Lin28, GRB7… Augmentation de gènes précoces de la lignée mésodermique : Desmine, ACTC, Runx2…	(Nekanti *et al.*, 2010)
Expression des marqueurs de surface	Diminution de CD73, CD90, CD105	(Majumdar *et al.*, 2013)
Activité paracrine	Augmentation de la sécrétion de facteurs de croissance : VEGF et HGF	(Majumdar *et al.*, 2013)

Ainsi, l'hypoxie semble avoir un effet bénéfique sur la prolifération et le maintien de l'état indifférencié des CSM-GW.

C. Influence des paramètres obstétricaux

D'un point de vue obstétrical, plusieurs travaux ont montré que le fœtus et ses annexes sont influencés par le déroulement de la grossesse ou encore les habitudes de la mère : le placenta des femmes fumeuses, par exemple, est beaucoup plus souvent calcifié et localement infarci en fin de grossesse comparé à un placenta de femme non fumeuse (Delcroix *et al.*, 2007). Certaines pathologies d'origine circulatoire peuvent également produire un effet similaire. Les facteurs obstétricaux retrouvés dans la littérature sont nombreux, et se différencient en 3 principaux groupes : relatifs à la parturiente, au travail et à l'accouchement, au nouveau-né.

1. Facteurs obstétricaux relatifs à la parturiente

Certains auteurs ont retrouvé des corrélations entre les facteurs maternels et les tissus fœtaux, notamment les vaisseaux ombilicaux, le placenta et le sang placentaire (Delcroix *et al.*, 2007; Blanco *et al.*, 2011; Omori *et al.*, 2012). Ces auteurs ont utilisé les facteurs suivants : l'âge maternel, l'indice de masse corporelle (IMC) de la mère, la parité (c'est-à-dire le nombre d'enfants dont la mère a déjà accouché), et certaines pathologies liées à grossesse (l'hypertension artérielle, la prééclampsie définie comme une hypertension artérielle avec protéinurie positive apparaissant à partir du 2ème trimestre de grossesse, le diabète gestationnel défini comme une intolérance au glucose avec hyperglycémie apparaissant pendant la grossesse, ainsi que des pathologies inflammatoires).

D'autres facteurs sont pris en compte dans un suivi de grossesse, notamment les facteurs socio-économiques, les antécédents médicaux-chirurgicaux personnels et familiaux de la patiente, son statut sérologique (maladies virales transmissibles par le sang, rubéole, toxoplasmose, groupe sanguin rhésus), ses éventuelles addictions, une prise médicamenteuse liée à une affection au long cours ou encore certains traitements spécifiques et nécessaires pendant la grossesse.

2. Facteurs obstétricaux relatifs au travail et à l'accouchement

Les études de Hoenicka *et al.*, Omori *et al.* et Blanco *et al.* prennent en considération la voie d'accouchement (accouchement par voie basse ou par césarienne), la durée du travail ainsi qu'une éventuelle souffrance fœtale (Hoenicka *et al.*, 2008; Blanco *et al.*, 2011; Omori *et al.*, 2012). Cependant, de nombreux autres évènements sont observés

pendant le travail et l'accouchement : les constantes maternelles, le rythme cardiaque et le bien-être fœtal, l'ouverture de la poche des eaux et la couleur du liquide amniotique, la présentation fœtale, la contractilité utérine et les éventuelles thérapeutiques mises en œuvre.

3. Facteurs obstétricaux relatifs au nouveau-né

Les facteurs étudiés dans la littérature relatifs au nouveau-né sont l'âge gestationnel au moment de la naissance (correspondant aux semaines d'aménorrhée de la parturiente), le poids de naissance, le sexe, un retard de croissance intra-utérin (défini comme un poids de naissance rapporté à l'âge gestationnel inférieur au 3ème percentile) et le pH du cordon (Javed *et al.*, 2008; Ebina *et al.*, 2012; Omori *et al.*, 2012). Lors de la prise en charge du nouveau-né à la naissance, le personnel médical prend en compte d'autres facteurs comme l'adaptation à la vie extra-utérine (qu'elle soit aisée ou non, ce qui implique éventuellement d'autres gestes), la taille et le périmètre crânien de l'enfant, la douleur néonatale s'il y a eu des gestes ou une souffrance pendant l'accouchement, la régulation thermique en autonomie et l'alimentation. Enfin un examen clinique et neurologique précis est réalisé et consigné.

4. Etudes sur les CSM-GW

A ce jour et à notre connaissance, peu d'études ont étudié l'influence des paramètres obstétriques sur les propriétés des CSM-GW et notamment, sur leur potentiel de différenciation.

En 2009, Penolazzi *et al.* évalue l'impact de cinq paramètres obstétricaux sur la différenciation vers la voie ostéogénique : l'âge maternel, le nombre de semaines d'aménorrhées, le mode de délivrance, le sexe du nouveau-né et le poids de naissance. Ces travaux démontrent que la différenciation ostéogénique des CSM-GW est meilleure (augmentation de l'expression de marqueurs spécifiques) lorsque ces dernières sont issues de cordons ombilicaux provenant d'enfants nés à terme (Penolazzi *et al.*, 2009).

Plus récemment, une équipe a comparé le potentiel de différenciation ostéogénique et adipogénique des CSM-GW obtenues à partir de mères en bonne santé ou atteintes de diabète gestationnel. Les auteurs ont observé une variation de l'expression de certains marqueurs de surface cellulaire entre les deux groupes (l'expression de CD90, par exemple, est diminuée pour les CSM-GW issues de mères diabétiques. Par ailleurs, les résultats indiquent que, contrairement aux cellules des mères en bonne santé, les CSM-GW des mères diabétiques montrent, de façon significative, une capacité plus élevée à s'engager

vers l'adipogenèse. Ces auteurs suggèrent alors que l'organisme maternel pourrait être responsable d'un « pré-engagement » des CSM-GW (Pierdomenico *et al.*, 2011).

Enfin, en 2013, Messerli *et al.*, a démontré que le nombre de semaine d'aménorrhée, et donc une naissance à terme ou prématurée, n'ont aucune influence sur la capacité de différenciation neurogliale des CSM-GW (Messerli *et al.*, 2013). En revanche, la prééclampsie semble avoir un effet bénéfique sur cette capacité de différenciation (Joerger-Messerli *et al.*, 2014).

D. Conclusion

D'après les chiffres de l'INSEE de 2014, 810 000 naissances vivantes ont eu lieu en 2013 en France. Par conséquent, le cordon ombilical représente une source potentiellement illimitée de CSM. Contrairement à la moelle osseuse, son prélèvement est facile (non invasif) et ne présente aucun risque pour le donneur. Le don du cordon ombilical est à présent encadré juridiquement (nécessité de consentement) mais ne présente aucune contrainte d'ordre éthique. En plus du nombre important de cordons potentiellement disponibles, la forte capacité d'amplification des CSM-GW en culture *in vitro* permet d'obtenir une grande quantité de cellules. Il s'agit d'une condition indispensable dans une perspective d'utilisation clinique et de production de lots contrôlés de cellules. Leur capacité d'immunomodulation ainsi que leur potentiel de différenciation permettent d'envisager leur utilisation en situation allogénique et en médecine régénératrice. Au regard de leurs propriétés, les CSM-GW représentent aujourd'hui une véritable source alternative de CSM, par rapport aux CSM-MO, en thérapie cellulaire ainsi qu'en ingénierie tissulaire

III. Utilisation des cellules souches en ingénierie tissulaire du cartilage

A. Le cartilage articulaire

1. Structure, physiologie et physiopathologie

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif complexe, hautement spécialisé et caractérisé par ses propriétés mécaniques, résultant d'une combinaison complexe de mécanismes de tension, de forces de cisaillement et de compression. Interposé entre deux surfaces osseuses et en regard du liquide synovial, il permet le glissement de ces dernières grâce à un coefficient de friction extrêmement faible (**Figure 10**). Le cartilage articulaire est composé d'un seul type cellulaire (le chondrocyte), et d'une abondante MEC spécifique. Il s'agit d'un tissu non innervé et non vascularisé, ce qui explique sa faible capacité de régénération.

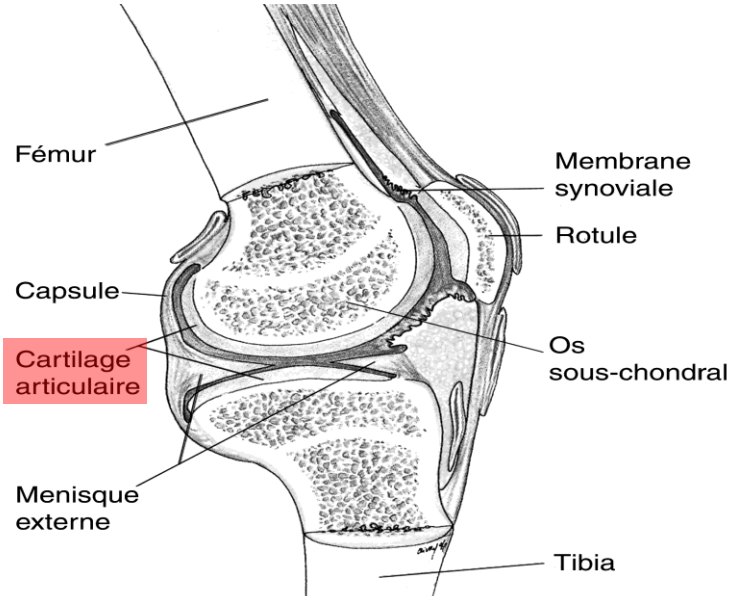


Figure 10: Représentation du cartilage articulaire au niveau d'une articulation de genou.
(d'après la thèse de Wang Y, 2007).

La MEC d'un tissu cartilagineux mature se compose de collagènes, de protéoglycanes (PGs), de petites protéines, d'ions et d'eau. Les propriétés fonctionnelles du cartilage reposent essentiellement sur l'organisation hétérogène de ces constituants matriciels, en particulier l'orientation des fibres de collagènes et la distribution des PGs. En se basant sur ces éléments, il est possible de distinguer quatre zones allant de la surface articulaire jusqu'à l'os sous-chondral (**Figure 11**) (Hayes *et al.*, 2007; Johnstone *et al.*, 2013).

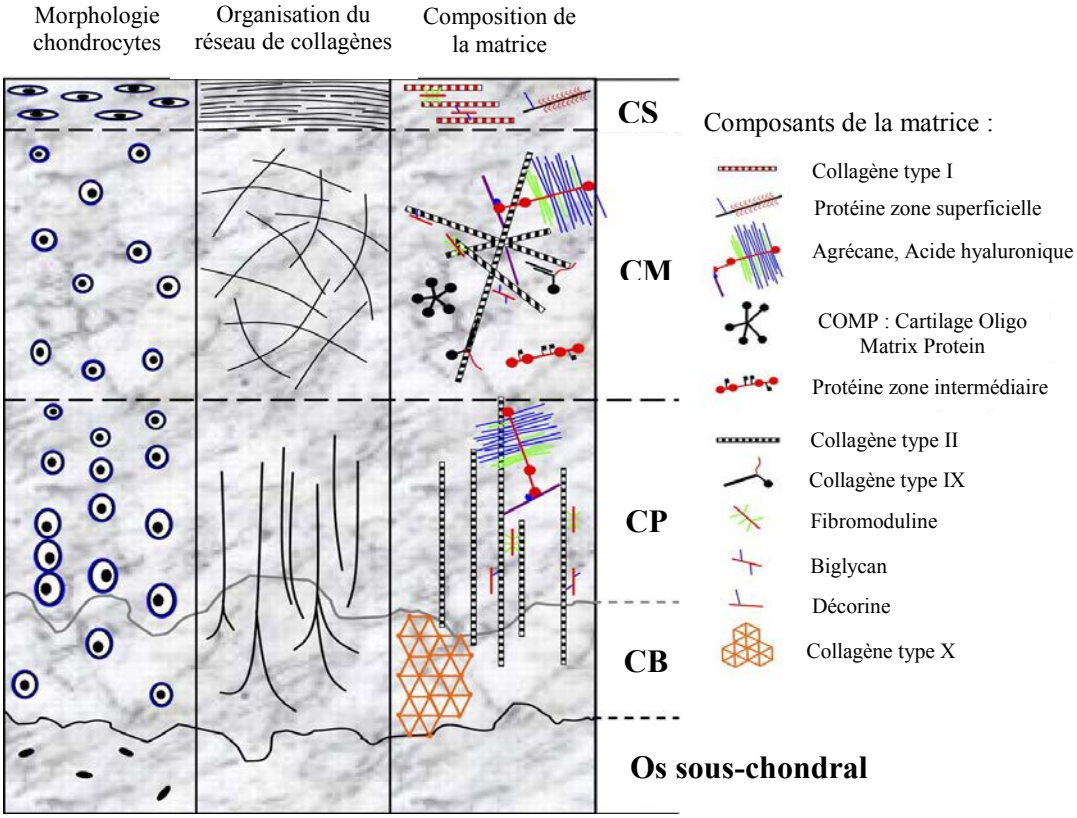


Figure 11: Représentation schématique de l'organisation macromoléculaire du cartilage articulaire.
(CS : couche superficielle ; CM : couche moyenne ou transitionnelle ; CP : couche profonde ; CB : couche basale ou calcifiée) (d'après Hayes et al., 2007).

Les petites protéines telles que la COMP (Cartilage Oligo Matrix Protein) se trouvent également dans la MEC. Elles semblent jouer un rôle important dans les interactions entre les chondrocytes et leur matrice et plus spécifiquement dans le maintien de l'intégrité du réseau de collagène.

Les chondrocytes synthétisent leur MEC mais également les enzymes (métalloprotéases, hyaluronidases,…) capables de la dégrader, permettant ainsi un remodelage du tissu cartilagineux. Les chondrocytes garantissent également l'équilibre entre la synthèse de cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10) et celle de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF-α). Ces cellules assurent donc l'homéostasie du cartilage, c'est-à-dire la balance entre l'anabolisme et le catabolisme. L'homéostasie est influencée par des facteurs solubles (hormones, vitamines, cytokines, facteurs de croissance) et par l'environnement physico-chimique des chondrocytes et les contraintes mécaniques qui y sont associées. Lorsque l'équilibre est rompu, au profit du catabolisme, une dégénérescence du tissu apparaît et le cartilage devient pathologique. C'est le cas de l'arthrose par exemple.

L'inflammation constitue un élément régulateur important de la genèse et de l'évolution de l'arthrose (Rannou *et al.*, 2010). L'arthrose est une maladie multifactorielle associée à quatre facteurs de risques que sont l'hérédité, l'obésité, les traumatismes, l'hypersollicitation articulaire, et surtout le vieillissement.

2. Fonctions du cartilage

Le cartilage articulaire sert à absorber les contraintes liées aux mouvements et au poids du corps. La composition de sa matrice extracellulaire permet de résister aux contraintes en se déformant face aux forces subies. Les pressions exercées à la surface des cartilages articulaires varient en fonction de la localisation et du poids de l'individu, de sa tension musculaire et de son activité physique. Des mesures *in vivo* ont montré qu'en position debout, la pression moyenne s'exerçant sur la hanche d'un patient est de 0,7 MPa (MégaPascal). Lors d'exercices physiques, cette contrainte atteint 5-10 MPa périodique au niveau de la hanche, soit une charge équivalente à 3-8 fois le poids du corps (Bergmann *et al.*, 2001). Enfin, cette contrainte peut dépasser 20 MPa lors de mouvements physiques intenses comme par exemple un saut. Ces contraintes mécaniques résultent d'une combinaison complexe de mécanismes de tension, de forces de cisaillement et de compression ; le phénomène de compression étant le plus important (Wong *et al.*, 2001). Ces contraintes mécaniques agissent non seulement sur la matrice extracellulaire mais aussi sur le métabolisme des chondrocytes. Ainsi, il a été montré que dans des conditions extrêmes, telles que l'immobilisation, les capacités de synthèse des chondrocytes ainsi que l'épaisseur du cartilage diminuaient. De même, dans les zones soumises à des contraintes maximales, l'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme du cartilage peut être perturbé, ce qui conduit à l'apparition de pathologies dégénératives telles que l'arthrose (Kerin *et al.*, 2002).

3. Lésions du cartilage

Le caractère avasculaire du tissu explique que les capacités de réparation cartilagineuse sont faibles. Les lésions peuvent être d'origine traumatique ou dégénérative (cas de l'arthrose). Elles peuvent être superficielles ou profondes. Les possibilités de cicatrisation varient en fonction de l'étendue de la lésion, de son siège et de la profondeur. Les lésions localisées dans le cartilage superficiel apparaissent, pour la plupart, sous forme de fissures. Ces dernières n'atteignent pas l'os sous-chondral et par conséquent, ne génèrent aucune réparation tissulaire. En revanche, les lésions profondes atteignant l'os sous chondral, qui lui est vascularisé, entrainent un recrutement des cellules sanguines et une réparation

tissulaire de type fibrocartilage (Shapiro *et al.*, 1993). Ce dernier, retrouvé dans l'arthrose, possède alors des propriétés structurelles et fonctionnelles différentes de celles rencontrées dans le cartilage hyalin natif. Les chondrocytes sont capables de remplacer une perte en agrécanne au stade précoce, mais sont dépassés lorsque le maillage collagénique est détruit. La fragmentation du réseau de collagène peut être considérée comme le point de non-retour dans la pathologie arthrosique. De plus, le tissu cartilagineux étant un tissu non innervé, la dégradation tissulaire se fait de façon insidieuse. La symptomatologie n'apparait généralement que tardivement dans le développement de la maladie (Getgood *et al.*, 2009).

4. Contexte socio-économique

Le développement de nouvelles thérapeutiques pour les maladies ostéoarticulaires, caractérisées par une altération progressive du cartilage, avec perte des propriétés mécaniques, est un enjeu médical et économique de premier plan. L'arthrose, maladie dégénérative du cartilage, arrive au tout premier rang des maladies articulaires (Le Pen *et al.*, 2005; Musumeci *et al.*, 2014). Cette pathologie à la fois chronique et évolutive, dont la prévalence peut dépasser 90% chez les personnes de plus de 70 ans, altère leur qualité de vie, et constitue une des principales causes de consultation médicale, de consommation médicamenteuse et de handicap. L'arthrose est la première cause d'incapacité physique et de douleurs persistantes. Il existe environ 5 millions de patients souffrant d'une arthrose symptomatique en France. La fréquence de cette pathologie, qui ne pourra aller qu'en augmentant du fait de l'allongement de l'espérance de vie, constituera un problème majeur de santé publique pour les années à venir. Ceci souligne l'importance de son diagnostic et de son dépistage précoces, et la nécessité de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour prévenir ou traiter les stades peu avancés de cette pathologie associée au vieillissement.

Actuellement, certaines stratégies thérapeutiques, reposant sur des traitements pharmacologiques, chirurgicaux ou de thérapie cellulaire sont utilisés afin d'éviter ou de retarder la pose d'une prothèse totale.

B. Traitements actuels des lésions cartilagineuses

1. Traitements pharmacologiques

Ces traitements correspondent aux traitements symptomatiques de l'arthrose, comprenant des anti-arthrosiques d'action lente (Chondroïtine sulfate, Diacéréine, Hyaluronate de sodium), des anti-inflammatoires (non stéroïdiens et corticoïdes) et des antalgiques permettant d'enrayer l'inflammation et de soulager la douleur, sans une véritable action sur la progression de la maladie arthrosique.

2. Traitements chirurgicaux

Ces approches chirurgicales concernent le traitement des lésions cartilagineuses localisées du sujet adulte jeune (< 50 ans). Elles sont généralement contre-indiquées dans le cas d'une dégénération cartilagineuse massive (arthrose évoluée). Ces traitements sont nécessaires afin d'éviter le risque de voir se développer chez le sujet atteint de lésions cartilagineuses, une arthrose précoce difficile à traiter par des moyens autres que la pose de prothèse totale. Il est donc important d'intervenir aussi rapidement que possible afin d'éviter que le cercle vicieux du phénomène arthrosique se mette en œuvre. Hormis des techniques palliatives comme le lavage articulaire, certaines techniques chirurgicales permettent une réparation toute relative du cartilage, avec la formation d'un fibrocartilage.

a. *Forages de Pridie et microfractures*

Cette technique consiste à effectuer des forages au poinçon ou à la mèche dans la perte de substance cartilagineuse tous les 2 à 3 mm sur une profondeur de 3 à 4 mm (**Figure 12**). L'objectif étant de perforer la lame sous-chondrale et de stimuler l'os sous-chondral (tissu vascularisé), de manière à recruter les cellules souches de la moelle osseuse sous-jacente à l'os. Ainsi, ces CS stimulées vont favoriser l'apparition d'un fibrocartilage permettant de combler la perte de substance depuis la profondeur jusqu'en superficie. Cependant, cette technique n'a pas montré de résultats très satisfaisants à long terme puisqu'elle génère un fibrocartilage (Von Keudell *et al.*, 2011).

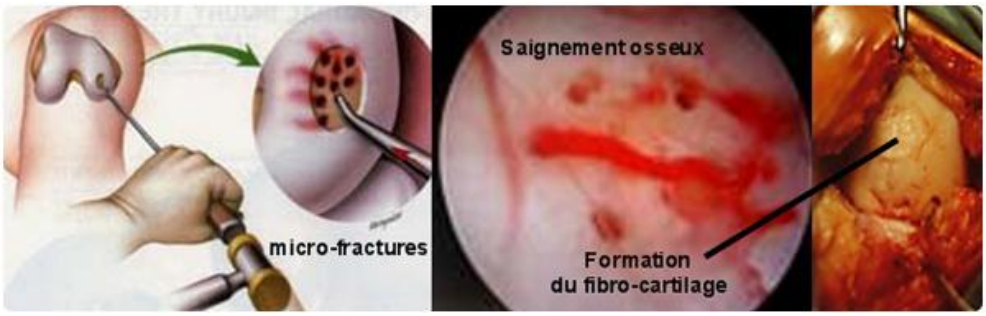


Figure 12: Principe de la technique des microfractures.
L'objectif est de perforer la lame sous-chondrale et de stimuler l'os sous-chondral, de manière à recruter les cellules souches de la moelle osseuse sous-jacente à l'os. Ainsi, ces CS stimulées vont favoriser l'apparition d'un fibrocartilage permettant de combler la perte de substance. (d'après www.kneesurgeonbristol.co.uk).

b. *La mosaïcoplastie*

Cette technique consiste à prélever des petites carottes ostéochondrales, à un endroit du genou où le prélèvement n'a pas de conséquences, c'est-à-dire au niveau d'une zone non portante. Ces greffons autologues sont ensuite insérés dans la lésion de façon à reconstituer une surface cartilagineuse (Hangody *et al.*, 1998) (**Figure 13**). Cette approche possède des avantages notamment liés à son faible coût, à la faible morbidité et à l'apport de tissu cartilagineux et autologue vivant. Néanmoins, cette technique a ses limites liées en particulier à la localisation et à la taille des lésions (Hangody *et al.*, 2008). L. Hangody a cependant proposé récemment d'étendre cette technique aux pertes de substance cartilagineuse du tibia, de la rotule et de la trochlée

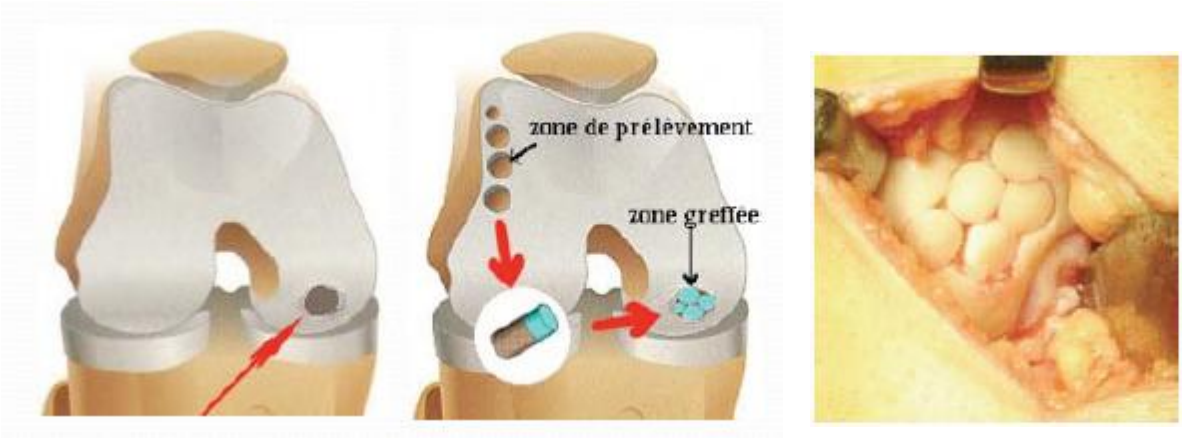


Figure 13: Principe de la technique de la mosaïcoplastie.
Cette technique consiste à prélever des petites carottes ostéochondrales, au niveau d'une zone non portante du genou. Ces greffons autologues sont ensuite insérés dans la lésion de façon à reconstituer une surface cartilagineuse (d'après Hangody et al., 2008).

Ces traitements ne sont pas satisfaisants à long terme car ils ne permettent pas la synthèse d'un néo-tissu de remplacement fonctionnel. En effet, le tissu cicatriciel se révèle être davantage un fibrocartilage au sein duquel le chondrocyte se dédifférencie et adopte un phénotype fibroblastique. Par conséquent, ce tissu cicatriciel ne possède pas les caractéristiques morphologiques, fonctionnelles et biomécaniques du tissu natif.

c. La thérapie cellulaire : transplantation de chondrocytes autologues

Le principe de cette technique est la mise en culture de chondrocytes matures prélevés chez le receveur qui sont ensuite réinjectés dans la perte de substance cartilagineuse. L'étanchéité est assurée par un couvercle de périoste (Brittberg *et al.*, 1994) (**Figure 14**) ou plus récemment grâce à l'intégration des cellules au sein d'une matrice ou d'une membrane.

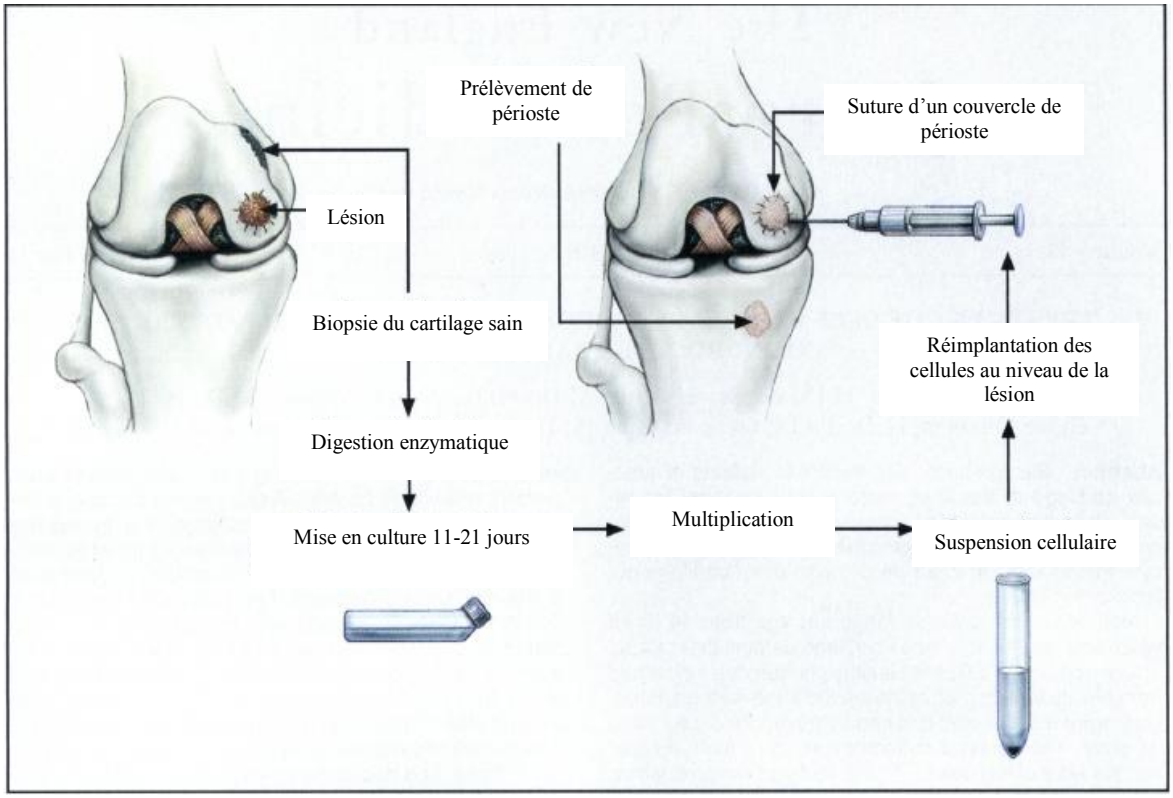


Figure 14: Principe de la transplantation de chondrocytes autologues.
Des chondrocytes sont prélevés chez le patient dans une zone saine du cartilage puis mis en culture et amplifiés in vitro. Ils sont ensuite réinjectés dans la perte de substance cartilagineuse. L'étanchéité est assurée par un couvercle de périoste (d'après Brittberg et al., 1994).

Le premier temps consiste, sous arthroscopie à faire un prélèvement de cartilage sain dans une zone non portante du genou à l'aide d'une curette. Ce prélèvement est adressé à un laboratoire de culture cellulaire agréé, pour y subir une mise en culture. Les chondrocytes sont ainsi amplifiés pendant deux à trois semaines. Le site receveur est ensuite préparé et débridé. Un lambeau de périoste est prélevé et suturé sur les bords de la lésion. Enfin, les chondrocytes amplifiés en culture (plusieurs millions de cellules) sont injectés sous le lambeau périosté étanche. Les chondrocytes se mettent alors à synthétiser une matrice cartilagineuse permettant de combler la lésion. De bons résultats ont été obtenus sur une période de deux à dix ans surtout chez les jeunes patients (Marlovits *et al.*, 2006). Cependant, cette technique présente certains inconvénients. Il s'agit en effet, d'une opération onéreuse et lourde à mettre en place aussi bien pour le patient que pour le clinicien. De plus, il existe un risque que les chondrocytes, cultivés en monocouche, se dédifférencient et perdent leur phénotype (Domm *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'arthroscopie révèle l'apparition d'une zone hypertrophique au niveau de l'implantation après quelques mois (Marlovits *et al.*, 2006).

Actuellement, seule la spécialité ChondroCelect®, correspondant à des chondrocytes autologues amplifiés *ex vivo*, est autorisée par l'Agence Européenne du Médicament (EMA) en tant que médicament de thérapie innovante.

D'ici la fin de l'année 2014, la spécialité Chondrosphere® devrait obtenir son autorisation de mise sur le marché européenne comme médicament de thérapie innovante. Cette spécialité correspond à des sphéroïdes formés de chondrocytes autologues et ensemencés dans une matrice pour transplantation en vue de réparer le cartilage. Il s'agit d'une nouvelle génération de transplantation de chondrocytes autologues se rapprochant progressivement de l'ingénierie tissulaire du cartilage. Cette stratégie associant des cellules intégrées dans un support tridimensionnel correspond aux prémices de l'ingénierie tissulaire. Ces nouvelles techniques permettent une meilleure répartition spatiale des chondrocytes et tentent de maintenir le phénotype des chondrocytes en culture *in vitro*.

3. Conclusion

Le choix du traitement des lésions cartilagineuses sera défini en fonction de plusieurs paramètres :

- L'inefficacité ou non d'un traitement pharmacologique bien conduit.
- L'âge du patient présentant des lésions cartilagineuses.
- La localisation et l'étendue de la perte de substance cartilagineuse.
- Le degré d'usure du tissu cartilagineux.

Actuellement, il n'existe pas de prise en charge satisfaisante des lésions du cartilage, permettant une régénération d'un tissu cartilagineux hyalin et fonctionnel. C'est la raison pour laquelle les scientifiques et les cliniciens se sont orientés à la fois, vers une thérapie cellulaire utilisant des cellules plus précoces que sont les cellules souches, et surtout vers une ingénierie tissulaire du cartilage. En avril 2014, l'EMA a rendu des avis positifs sur le classement de deux médicaments de thérapie innovante impliqués dans le traitement des pathologies ostéo-articulaires. Il s'agit, tout d'abord, de MBM cell® qui correspond à une fraction nucléée préparée à partir de moelle osseuse autologue pour le traitement de lésions d'ostéoarthrose et de lésions ostéochondrales. Ce produit est classé comme « Tissue Engineered medicinal product ». Le second médicament de thérapie innovante classé par l'EMA est ARTECH® qui correspond à une suspension de cellules souches mésenchymateuses cultivées *in vitro* et associées à l'acide hyaluronique pour le traitement de defects cartilagineux. Ce produit est classé comme « Combined Tissue Engineered medicinal product ». Avec cette dernière approche, l'association cellules/matrice se rapproche progressivement de l'ingénierie tissulaire du cartilage.

C. L'ingénierie tissulaire du cartilage

1. L'ingénierie tissulaire

a. *Définition générale*

Si certains tissus et organes se régénèrent naturellement à la suite d'un accident (la peau, le foie, le tissu musculaire, *etc*.), la plupart des tissus ne se régénère pas et le procédé naturel de réparation conduit à un tissu cicatriciel. Depuis le milieu des années 80, l'ingénierie tissulaire vise à développer, *in vitro*, des substituts biologiques qui vont restaurer, maintenir ou améliorer la fonction des tissus endommagés. Cette voie de recherche clinique et fondamentale repose sur l'ensemencement de cellules dans des matrices utilisées comme support d'adhésion, supports qui peuvent aussi véhiculer des molécules biologiquement actives (**Figure 15**) (Pelttari *et al.*, 2009). Pour parvenir à la reconstruction du néo-tissu, l'ingénierie tissulaire fait appel à de nombreuses disciplines telles que la science des matériaux, la biologie moléculaire et cellulaire, l'ingénierie chimique ou encore la médecine. Les domaines d'application sont vastes, puisque l'ingénierie tissulaire pourrait être utilisée dans des pathologies cardiovasculaires, génito-urinaires, musculaires ou encore ostéoarticulaires. Il s'agit véritablement d'une stratégie thérapeutique innovante qui pourrait pallier certains problèmes liés à la transplantation (manque d'organes de remplacement, problème d'histocompatibilité).

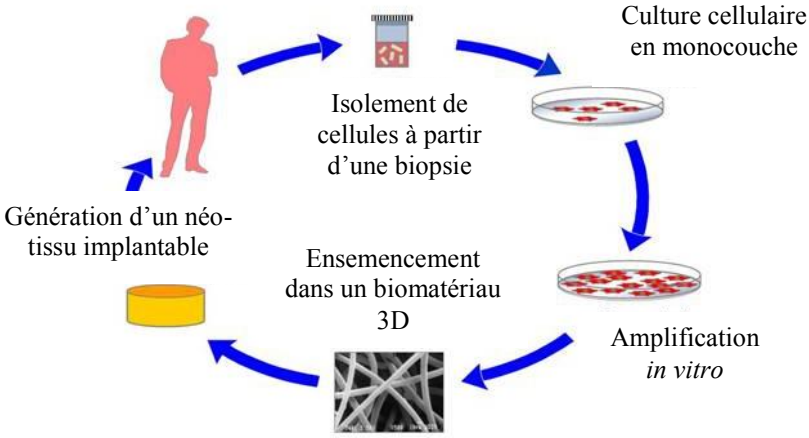


Figure 15: Principe de base de l'ingénierie tissulaire.
L'ingénierie tissulaire est composée de plusieurs étapes : l'isolement des cellules à partir d'une biopsie tissulaire, l'expansion de ces dernières lors de culture en monocouche, l'ensemencement des cellules dans un biomatériau-tuteur tridimensionnel et la fonctionnalisation de l'ensemble afin d'obtenir un néo-tissu implantable au niveau d'une lésion (d'après Pelttari et al., 2009).

b. *L'ingénierie tissulaire du cartilage*

L'ingénierie tissulaire constitue une voie de recherche prometteuse pour la réparation des lésions chondrales. Elle s'inspire des connaissances de l'ingénierie et des sciences de la vie dans le but de produire un néo-tissu cartilagineux fonctionnel. Ce néo-tissu sera réimplanté, chez le patient, afin de combler les lésions du tissu natif et maintenir ou améliorer ses fonctions au niveau articulaire. Différents paramètres interviennent dans les étapes de l'ingénierie tissulaire, notamment le choix des cellules, le choix des biomatériaux ou matrices support et la nature de la fonctionnalisation de ce biomatériau (**Figure 16**) (Chung and Burdick, 2008).

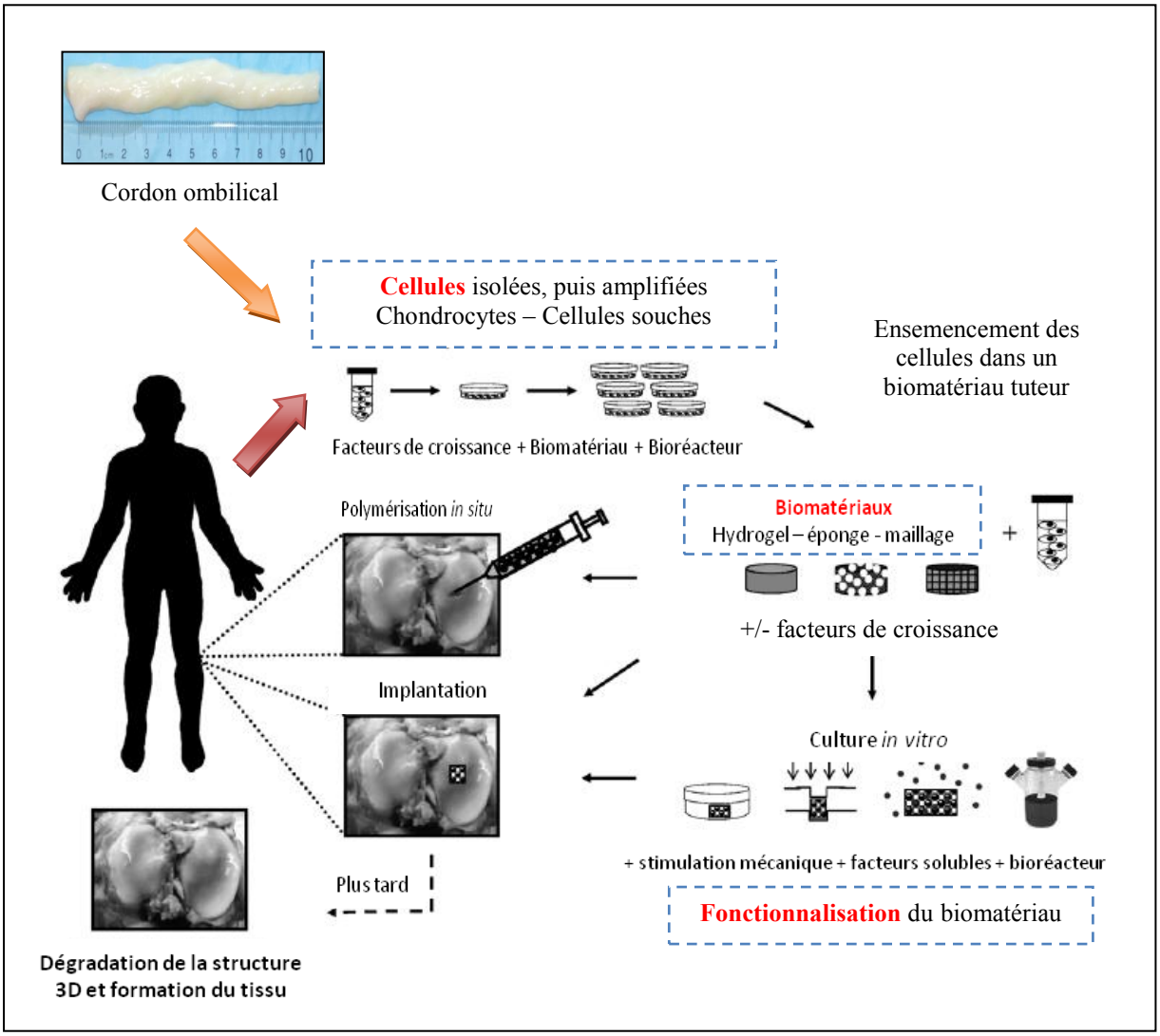


Figure 16: Principe de base de l'ingénierie tissulaire adaptée au cartilage.
(d'après Chung et al., 2008). (Flèche rouge : situation autologue ; flèche orange : situation allogénique).

2. Le choix de la source cellulaire

a. *Les cellules natives ou chondrocytes*

Le chondrocyte autologue, cellule native du tissu cartilagineux, s'est révélé être au départ la cellule de choix pour l'ingénierie tissulaire. En effet, en plus de ne poser aucun problème de rejet immunitaire après l'implantation, le chondrocyte autologue est capable de produire une matrice cartilagineuse riche en agrécannes et en collagène de type II. Cependant, le nombre limité de cellules obtenues par prélèvement autologue et le risque potentiellement iatrogène de ce prélèvement, ont rendu l'utilisation de ces cellules limitée. De plus, lors de leur amplification en monocouche, les chondrocytes se dédifférencient et adoptent un phénotype fibroblastique (Domm *et al.*, 2002). La synthèse matricielle en est alors modifiée.

Récemment, afin d'obtenir un plus grand nombre de cellules, une équipe a utilisé, dans le cadre d'un essai clinique, des chondrocytes allogéniques (Dhollander *et al.*, 2012). Cependant, dans un tel contexte, la disponibilité des donneurs est limitée et le risque de transmission de pathogènes existe. De plus, la qualité du tissu cartilagineux néoformé reste encore à être déterminée. C'est la raison pour laquelle, une autre source cellulaire plus primitive a été envisagée : les cellules souches et notamment les cellules souches mésenchymateuses qui semblent représenter une véritable alternative aux chondrocytes.

b. *Cellules plus précoces : les cellules souches pluripotentes*

Certaines études se sont intéressées au caractère pluripotent des CSE humaines et à leur capacité à se différencier vers le chondrocyte. Les CSE ont été cultivées *in vitro* seules ou associées à une matrice support afin d'induire leur différenciation chondrocytaire. Les cellules spécialisées ont ensuite été implantées dans des modèles animaux présentant des lésions cartilagineuses. En fonction du protocole utilisé, ces travaux ont montré des résultats très aléatoires concernant l'efficacité de différenciation ainsi que la qualité de la réparation cartilagineuse (Toh *et al.*, 2011). Outre les considérations éthiques et le risque tumorigène, la stabilité et la reproductibilité de la différenciation chondrogénique des CSE reste problématique dans la perspective d'une potentielle utilisation thérapeutique de ces dernières. En 2012, une équipe réalise une étude avec des cellules iPS et démontre le potentiel de ces dernières dans la réparation cartilagineuse (Diekman *et al.*, 2012). Cependant, en dehors des considérations éthiques, les cellules iPS présentent les mêmes inconvénients que les CSE (Johnstone *et al.*, 2013).

c. *Cellules plus précoces : les cellules souches multipotentes*

Une autre population de CS, les CSM, a été envisagée. Leur propriété de multipotence et leur capacité de différenciation vers les cellules d'origine mésodermique, et notamment le chondrocyte, font de ces cellules, d'excellentes candidates à la thérapie régénératrice du cartilage. Leur faible immunogénicité permettant d'envisager une utilisation allogénique, leur activité paracrine (participant à la réparation tissulaire) ainsi que l'absence de considérations éthiques liées à leur origine, expliquent l'intérêt que suscitent ces cellules en médecine régénératrice depuis maintenant près de vingt ans (Vinatier *et al.*, 2009). De plus, elles possèdent un fort pouvoir d'expansion *in vitro*, permettant ainsi d'obtenir des lots de cellules en quantité suffisante pour des utilisations en ingénierie tissulaire du cartilage.

Sous l'influence de stimuli biochimiques ou mécaniques, les CSM sont capables de se différencier en chondrocytes. Le suivi de la différenciation chondrocytaire ou chondrogénèse de ces CSM se fait par l'étude de l'expression de certains gènes d'intérêt ou de certaines protéines matricielles (**Figure 17**). Elle peut également être évaluée par l'évolution de l'expression des marqueurs de surface (CD) observée au cours de la différenciation (Lee *et al.*, 2009).

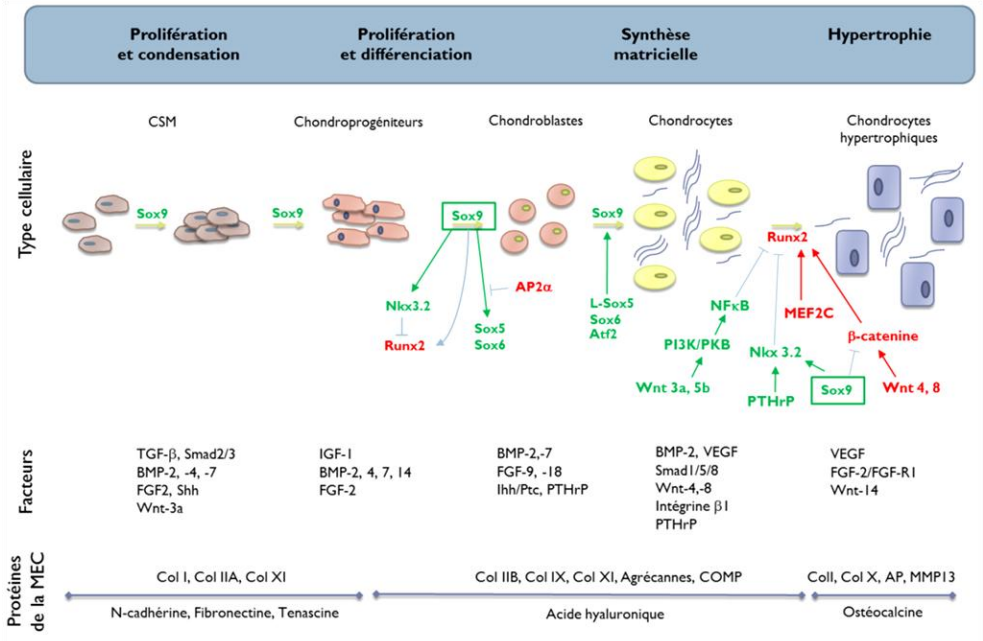


Figure 17: Représentation schématique des différentes étapes de la chondrogénèse.
La chondrogénèse se divise en 4 étapes : la phase de condensation, de différenciation, de maturation (synthèse matricielle) et de différenciation terminale (hypertrophie). Chacune de ces étapes se caractérise par l'expression de certains facteurs de transcription ou certaines protéines matricielles (d'après (Huselstein et al., 2012)).

In vitro, l'objectif est de contrôler la chondrogénèse et d'orienter les CSM vers un phénotype de chondrocyte, qui synthétise une matrice cartilagineuse dont la composition macromoléculaire est proche de celle retrouvée dans le cartilage hyalin physiologique. Aujourd'hui, cet objectif est un enjeu majeur dans l'utilisation des CSM en ingénierie tissulaire du cartilage. En effet, plusieurs études ont montré une tendance relativement fréquente des CSM, notamment d'origine adulte, à s'orienter plus ou moins rapidement vers un phénotype de chondrocyte hypertrophique (Johnstone *et al.*, 2013). Ce dernier synthétise alors une MEC différente de celle présente dans le cartilage hyalin, aussi bien d'un point de vue biologique que mécanique.

Aujourd'hui, les CSM de la moelle osseuse sont les cellules souches les plus utilisées en ingénierie tissulaire du cartilage aussi bien dans des études *in vitro* qu'*in vivo* chez l'animal (Georgi *et al.*, 2014). Cependant, le prélèvement de moelle osseuse reste un geste douloureux, invasif et n'est pas sans risque pour le patient. De plus, il a été montré que la fréquence d'isolement de ces cellules est relativement faible (Pittenger *et al.*, 1999). La plupart des patients concernés par des lésions cartilagineuses (notamment l'arthrose), ont un âge avancé. Aussi, il a été démontré que les capacités de prolifération et de différenciation des CSM-MO, issues de patients âgés, sont altérées (Fossett *et al.*, 2012; Zaim *et al.*, 2012). Par conséquent, l'utilisation des CSM-MO dans un contexte autologue présente certaines limites. Ainsi, il devient nécessaire d'identifier des sources alternatives de CSM.

d. L'utilisation des CSM-GW en ingénierie tissulaire du cartilage

Grâce à leurs propriétés telles que la facilité d'obtention, leur faible immunogénicité, leur forte capacité d'expansion *in vitro* ou encore leur potentiel de différenciation chondrogénique, les CSM-GW semblent être une source prometteuse de CSM pour l'ingénierie tissulaire de cartilage. Quelques études ont déjà permis de mettre en évidence la capacité de ces cellules à s'orienter vers un phénotype chondrocytaire lorsque ces dernières sont cultivées, *in vitro*, dans une matrice tridimensionnelle et en présence de facteurs de croissance (**Tableau 9**). Les CSM-GW sont ensemencées dans des biomatériaux d'origine naturelle ou synthétiques et cultivées entre 3 et 4 semaines dans un milieu chondrogénique enrichi en facteurs de croissance. Au terme de la culture, les cellules expriment des gènes et des protéines matricielles spécifiques du tissu cartilagineux.

Tableau 9: Utilisation *in vitro* des CSM-GW en ingénierie tissulaire du cartilage.

Biomatériaux	Fonctionnalisation	Références
Acide polyglycolique	TGF-β1	(Wang, L. *et al.*, 2009)
Alcool polyvinylique-Polycaprolactone	TGF-β3 BMP-2	(Nirmal and Nair, 2013)
Collagène type 1	TGF-β1	(Chen *et al.*, 2013)
Acide poly-L-lactique	TGF-β1	(Wang, L. *et al.*, 2011)

3. Le choix du biomatériau

Destinés à une application clinique, les biomatériaux doivent répondre à certaines exigences et doivent posséder, entre autres, des propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité.

D'origine naturelle ou synthétique, homogène ou hétérogène, monophasique ou multiphasique, le biomatériau constitue une matrice tridimensionnelle. Cette dernière doit se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques et mimer la structure naturelle du cartilage afin que les cellules produisent un néo-cartilage fonctionnel. Le biomatériau joue un rôle essentiel dans le maintien du phénotype des chondrocytes et dans l'induction de la différenciation des CSM en chondrocytes (Kemppainen and Hollister, 2010).

a. Nature des biomatériaux

Les biomatériaux utilisés dans l'ingénierie tissulaire du cartilage peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Parmi les composés synthétiques, nous pouvons citer les polymères d'acides polylactique et polyglycolique, de polyéthylène glycol, de polycaprolactone et de polyméthacrylate de méthyle. Les supports d'origine naturelle se composent de collagène de type I, de fibrine, de gélatine, d'acide hyaluronique ou encore de polymères polysaccharidiques tels que l'alginate. Le tableau 10 regroupe les avantages et les inconvénients de ces principaux polymères (**Tableau 10**) (Puppi *et al.*, 2010; Musumeci *et al.*, 2014).

Tableau 10: Avantages et inconvénients de certains biomatériaux utilisés dans l'ingénierie tissulaire du cartilage.
(d'après Puppi et al., 2010; Musumeci et al., 2014).

Biomatériaux	Avantages	Inconvénients
Naturels	Faible toxicité, faible coût, recyclable, adhésion cellulaire+++, biodégradable	Faible stabilité mécanique, thermique et chimique. Risque infectieux. Possible perte des propriétés biologiques lors de la formulation
Collagène de type I	Peu immunogène, adhésion cellulaire+++, propriétés mécaniques++, Biocompatibilité	Biodégradation rapide, répartition des cellules -
Alginate	Biodégradable, injectable, intégration cellulaire ++, biocompatible	Stabilité mécanique --, difficulté à stériliser, impuretés
Acide hyaluronique	Non immunogène, interactions avec cellules/matrice ++, production à grande échelle (Ferm. bact.)	Résistance mécanique -, tissu formation --
Hydroxyapatite	Biocompatibilité, ostéoconductivité, ostéoinductivité	Solubilité -- : formation de cristaux
Synthétiques	Large variétés, propriétés physiques, chimiques et mécaniques+++, peu immunogène, risque infectieux---	Coût élevé, potentiellement toxique, peu de données sur réponses biologiques

L'alginate (Alg), d'origine végétale, est un copolymère polyanionique, formé par des chaines de polysaccharides constituées de groupes acide guluronique et mannuronique. Il est soluble dans les solutions aqueuses et forme un gel stable. Ce polymère constitue un modèle de référence pour des études de morphologie cellulaire, de synthèse des protéoglycanes et de collagènes mais aussi, de mécanobiologie des chondrocytes articulaires. Bien que l'alginate de sodium ne soit pas un composant naturel de la matrice extracellulaire, il présente une structure similaire à celle des glycosaminoglycanes du cartilage (Wang, X. *et al.*, 2009). Plusieurs études ont déjà montré que des hydrogels à base d'alginate constituaient des modèles de culture tridimensionnels pertinents pour induire la chondrogénèse des CSM (Ma *et al.*, 2003; Tritz-Schiavi *et al.*, 2010)

L'acide hyaluronique (HA) est un des composants de la MEC du cartilage natif. Pour l'ingénierie tissulaire, il permet d'améliorer la prolifération des cellules et leur attachement au biomatériau grâce à des récepteurs membranaires. Il possède non seulement des propriétés rhéologiques remarquables en solution notamment en terme de viscoélasticité, mais il a aussi une action bénéfique sur l'activité de prolifération et de synthèse des chondrocytes (Gigant-Huselstein *et al.*, 2004). Ce biomatériau, extrait de tissu animal, peut être utilisé seul (Jakobsen *et al.*, 2009) ou combiné avec d'autres biomatériaux. Intégré dans

un système de culture tridimensionnel, il a été montré que l'HA favorisait la différenciation chondrogénique des CSM (Chung and Burdick, 2009; Chung *et al.*, 2014).

b. Principaux mode de fabrication

Les biomatériaux employés actuellement se présentent sous plusieurs formes : hydrogels, éponges ou maillages (**Figure 18**) (Chung and Burdick, 2008).

D'un point de vue mécanique, les hydrogels présentent l'avantage d'utiliser l'eau de la même façon que le cartilage. Sous l'action de compression, l'eau sort de l'hydrogel, ce qui permet à ce dernier d'absorber le choc. Puis, une fois la contrainte relâchée, l'eau reprend sa place dans le matériau et celui-ci retrouve son volume initial. D'un point de vue biologique, les hydrogels offrent un environnement 3D suffisamment poreux pour permettre le transport des nutriments, le contact entre les cellules ainsi que la prolifération et la différenciation cellulaire.

Ils peuvent se présenter sous forme de biomatériau injectable, sous forme de billes ou de moules après polymérisation. Dernièrement, notre équipe a développé un hydrogel à base d'alginate pulvérisé sur un support, afin d'obtenir une colonisation homogène des cellules au sein du biomatériau (Tritz *et al.*, 2010). Cette technique originale permet de pulvériser une suspension biomatériau/cellules, couche par couche, et de reproduire ainsi une organisation zonale.

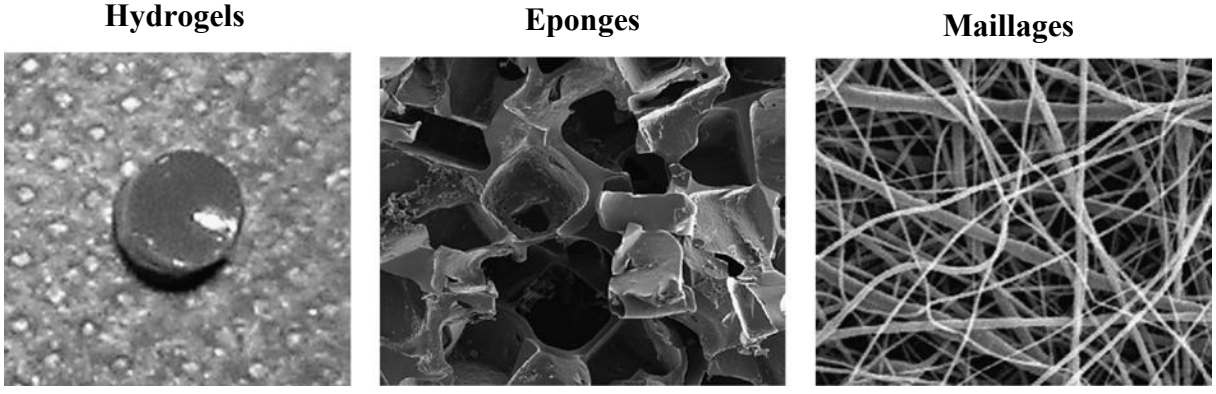


Figure 18: Architectures de biomatériaux utilisés dans l'ingénierie tissulaire du cartilage.
Les biomatériaux se retrouvent essentiellement sous la forme d'hydrogels, d'éponges ou de mailles (d'après Chung et al., 2008).

c. *Matrice simple ou mixte, monophasique*

Les biomatériaux naturels ou synthétiques, peuvent être utilisés soit individuellement, soit en association pour former des matrices mixtes. De cette façon, les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des biomatériaux peuvent être améliorées. Récemment, une équipe a synthétisé un nouveau biomatériau, composé de collagène, d'hydroxyapatite (Hap) et de chondroïtine sulfate, ensemencé en CSM. Ce dernier a montré des propriétés mécaniques et chondrogéniques supérieures à celles rencontrées avec une matrice uniquement composée de collagène (Ohyabu et al., 2009). Notre équipe a montré que la présence d'HA au sein d'un biomatériau peut permettre de stimuler les activités biologiques des chondrocytes. Afin de bénéficier des avantages rhéologiques et biologiques de l'HA, ils l'ont associé à des hydrogels d'alginate (Gigant-Huselstein *et al.*, 2004; Tritz-Schiavi *et al.*, 2010).

d. *Biomatériaux stratifiés, multiphasiques*

A l'heure actuelle, les approches développées en ingénierie tissulaire du cartilage reposent sur l'utilisation d'un biomatériau unique ensemencé en cellules (chondrocytes ou CSM) qui ne reproduit pas les différentes couches observées au sein du tissu (Wang, X. *et al.*, 2009). Leur utilisation se limiterait donc aux réparations superficielles du cartilage. Afin d'étendre les potentialités de l'ingénierie tissulaire aux lésions profondes, la construction de nouveaux biomatériaux est apparue. Ces derniers deviennent stratifiés et multiphasiques afin de mimer l'organisation zonale du cartilage et de reproduire, *in fine,* la composition naturelle du tissu (Liu *et al.*, 2013).

Deux grandes stratégies concernant une construction zonale sont décrites dans la littérature (Klein *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013):

- La première consiste à ensemencer des cellules différentes dans des couches de biomatériau de composition identique. Dans cette approche, les cellules, de phénotypes différents, vont synthétiser une MEC spécifique. En 2003, Kim *et al.* a utilisé des sous-populations chondrocytaires issues des différentes couches cartilagineuses (superficielle, moyenne, profonde) dans un polymère synthétique (Kim *et al.*, 2003).

- La seconde consiste à ensemencer des cellules identiques (chondrocytes ou CSM) dans des couches de biomatériaux de composition différente. La spécificité du

biomatériau doit guider la différenciation des cellules vers un phénotype spécifique (Zhou *et al.*, 2011). Ainsi, Kon *et al.* a mis au point un biomatériau triphasique composé de collagène de type I et d'hydroxyapatite en proportion différente en fonction des strates. Les auteurs tentent ainsi, de mimer la MEC cartilagineuse et sous-chondrale (Kon *et al.*, 2009).

Quel que soit le type de biomatériau, il est souvent nécessaire de le fonctionnaliser afin d'orienter la différenciation cellulaire ou de permettre la synthèse d'une matrice extracellulaire proche de celle observée *in vivo*.

4. Fonctionnalisation du biomatériau

Cette fonctionnalisation du système cellules/matrices se fait par l'apport de stimulations biochimiques et/ou physiques et en présence de facteurs environnementaux particuliers. Elle tente ainsi de reproduire les conditions naturelles dans lesquelles se trouve le tissu cartilagineux. La fonctionnalisation permet aux cellules d'orienter leur différenciation (pour les CSM) mais aussi d'améliorer l'activité métabolique et par conséquent, la synthèse matricielle des cellules résidentes.

a. *Fonctionnalisation par voie biochimique*

De nombreux facteurs biochimiques tels que les facteurs de croissance, les vitamines (acide ascorbique), les hormones (dexaméthasone), jouent un rôle essentiel dans le maintien du phénotype des chondrocytes et l'induction de la différenciation des CSM en chondrocytes. Parmi ces facteurs de croissance, la superfamille du TGF-β (Transforming Growth Factor-β) comportant les TGF-β, les BMPs (Bone Morphogenic Proteins), les activines et les inhibines ont montré des effets chondroinductifs importants sur les CSM et améliorent la synthèse de la MEC (Chen *et al.*, 2014). Bien que le TGF-β1 (Elder *et al.*, 2009) et la BMP-2 (Freyria et al., 2008) possèdent des propriétés chondrogéniques notables, le TGF-β3 a montré une plus grande capacité à induire la chondrogénèse des CSM et à augmenter l'expression du collagène de type II et des agrécanes (Chen *et al.*, 2011). Les facteurs de croissance peuvent être utilisés seuls, en combinaison ou de façon alternative afin d'améliorer la synthèse matricielle. Une étude relativement récente a montré que la combinaison de 3 facteurs (TGF-β3, BMP-2 et IGF-1 (Insulin Growth Factor-1) favorisée davantage la chondrogénèse des CSM et la production du collagène de type II, en comparaison avec l'utilisation de TGF-β3 seul, TGF-β3 + BMP-2 ou TGF-β3 + IGF-1 (Abukawa *et al.*, 2013).

Des études très récentes ont montré que la transfection de gènes codant pour ces facteurs de croissance (TGF-β1, IGF-1, *etc*.) au niveau de CSM augmentait leur capacité de différenciation chondrogénique (Ahmed and Hincke, 2014; Chen *et al.*, 2014).

b. Fonctionnalisation par stimulations physiques

Le cartilage est soumis en permanence à plusieurs types de contraintes mécaniques. La contrainte principale est la compression, engendrant, elle-même, d'autres contraintes (flux de liquides, contraintes de cisaillement, d'étirement et pressions hydrostatiques) (Greene *et al.*, 2010; Ahmed and Hincke, 2014). La composition et l'organisation du cartilage lui procurent des propriétés de résistance mécanique importantes face aux sollicitations subies. De plus, ces contraintes mécaniques ont un effet bénéfique sur la qualité du tissu cartilagineux. En revanche, si ces contraintes sont en excès (obésité, vieillissement, accident), le cartilage, incapable de se régénérer efficacement, peut devenir pathologique. Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire du cartilage, trois principaux types de contraintes mécaniques sont utilisés dans le but de fonctionnaliser le système cellules/matrice. Il s'agit de la compression, de la pression hydrostatique et du cisaillement au sein de bioréacteurs (Chung and Burdick, 2008; Chen *et al.*, 2014). La compression est la contrainte la plus importante au niveau de l'articulation et par conséquent, la plus étudiée *in vitro* (Steinmetz and Bryant, 2011). Il a été montré que la compression dynamique appliquée sur différentes constructions cellulaires, stimulait la différenciation ainsi que l'activité de biosynthèse des cellules (Xie *et al.*, 2007). Cette compression dynamique augmenterait également les propriétés mécaniques des biosystèmes cellules/matrice (Huang, A. H. *et al.*, 2010). De nombreuses stimulations physiques apportées au système cellules/matrice telles que la compression dynamique (Jung *et al.*, 2009), le cisaillement (Schatti *et al.*, 2011), le flux liquidique (Alves da Silva *et al.*, 2011), la pression hydrostatique (McMahon *et al.*, 2008), des ultrasons à faible intensité (Ebisawa *et al.*, 2004) ou encore un champ électromagnétique pulsé (Esposito *et al.*, 2013) a permis de stimuler la différenciation chondrogénique des CSM.

En plus des contraintes mécaniques, il a été montré que des facteurs environnementaux comme l'hypoxie, influence la capacité chondrogénique des CSM. En effet, l'environnement hypoxique, retrouvé physiologiquement au sein du cartilage, améliore, en culture *in vitro*, la différenciation chondrocytaire de CSM ensemencées dans une matrice tridimensionnelle (Duval *et al.*, 2012).

Objectifs de la thèse

Dans la première partie de ce travail, nous avons réalisé une large caractérisation des CSM issues de la gelée de Wharton, tout d'abord *in situ*, puis, dans un second temps, *in vitro* au cours de leur amplification et en comparaison avec les CSM-MO. Nous avons également étudié l'impact de la concentration en oxygène, au cours de l'amplification, sur les propriétés des CSM-GW. L'objectif de cette étude est de définir des conditions de culture optimales des CSM-GW dans la perspective d'une utilisation clinique de ces dernières.

Parallèlement, nous avons soulevé l'hypothèse que des facteurs obstétricaux peuvent avoir un impact sur l'expansion des CSM-GW et leur potentiel de différenciation chondrocytaire et nous avons souhaité identifier ces paramètres. L'objectif consiste à déterminer s'il est possible de privilégier l'utilisation de certains cordons pour une médecine régénératrice du cartilage.

Dans la deuxième grande partie de notre travail, nous nous sommes intéressés aux potentialités des CSM-GW en ingénierie tissulaire du cartilage. Ainsi, nous avons proposé, pour la première fois, d'évaluer le potentiel chondrogénique de CSM-GW ensemencées dans une matrice support composée d'un hydrogel d'alginate enrichi en acide hyaluronique. Les hydrogels ont été construits par une méthode originale de pulvérisation. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la différenciation chondrogénique des CSM-GW cultivées dans un environnement tridimensionnel, en absence de facteur de croissance et en comparaison avec les CSM-MO.

Enfin, parallèlement à tous ces travaux, nous nous sommes également intéressés aux aspects réglementaires qui encadrent l'utilisation thérapeutique ou scientifique des cellules souches en France.

Toutes les études que nous avons menées, au cours de ma thèse, et notamment celles qui se sont intéressées au potentiel chondrogénique des CSM-GW, ont été réalisées en parallèle (**Figure 19**). C'est la raison pour laquelle, certaines conditions de cultures utilisées pour la différenciation chondrocytaire (en particulier la teneur en oxygène) peuvent être différentes d'une étude à l'autre.

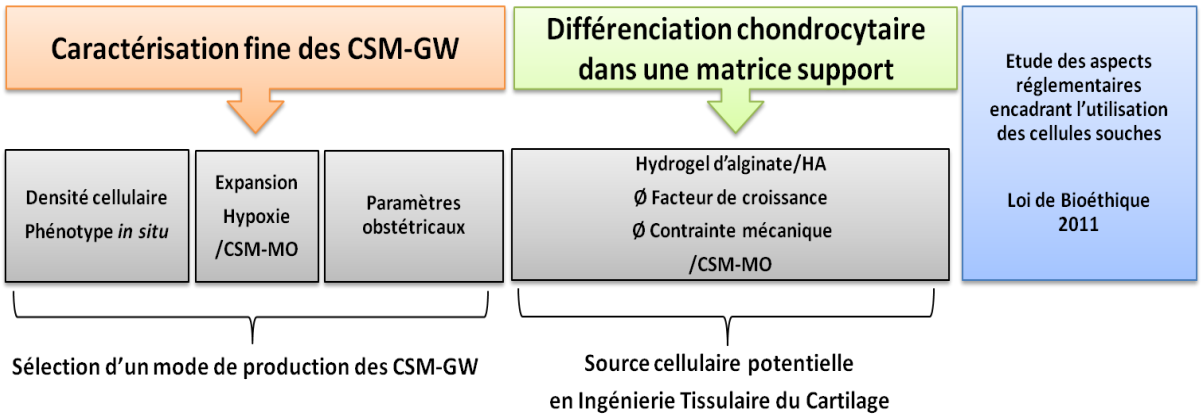


Figure 19 : Représentation schématique des différents objectifs de la thèse.
Comme le montre ce schéma, toutes les études menées au cours de ma thèse ont été réalisées en parallèle.

Résultats

I- CARACTERISATION FINE DES CELLULES STROMALES/SOUCHES MESENCHYMATEUSES ISSUES DE LA GELEE DE WHARTON

ARTICLE 1:

Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly: Comparative phenotype analysis between tissue and *in vitro* expansion.

Talar Margossian, Loïc Reppel, Norman Makdissy, Jean-François Stoltz, Danièle Bensoussan, Céline Huselstein.

Bio-Medical Materials and Engineering, 2012, 22: 243-254.

Ce travail a été réalisé, au sein de notre équipe de recherche, lors de ma première année de thèse d'Université. Il a également été intégré dans le travail de la thèse d'Université de Talar Margossian intitulée : « Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses du sang placentaire et de la gelée de Wharton », soutenue le 25 mars 2013. Il a pour objectif la caractérisation phénotypique *in situ* des cellules stromales présentes au sein de la gelée de Wharton. Un isolement de ces cellules stromales a également été réalisé par une méthode de digestion enzymatique afin d'estimer la densité cellulaire par centimètre de cordon ombilical. Ce travail m'a permis de m'initier et de mettre en pratique le marquage *in situ* et de me familiariser avec les différentes techniques d'isolement des cellules de la gelée de Wharton. Ce marquage *in situ* a ensuite été observé par microscopie confocale grâce à la collaboration de la « PlaTeforme d'Imagerie et de Biophysique Cellulaire et Tissulaire IBISA » (FR3209 CNRS – PTIBC IBISA Nancy, France).

METHODOLOGIE :

Les cordons ombilicaux ($n \geq 3$) ont été recueillis par la Maternité Régionale Universitaire du CHU de Nancy entre 2010 et 2011. L'acheminement de ces derniers vers le laboratoire est encadré par une convention signée entre la faculté de médecine, la maternité et le CHU. A cette époque, ces derniers sont encore considérés comme des déchets opératoires

dont le don est soumis au régime de « non opposition » et ne nécessite pas le consentement des mères donneuses.

L'analyse phénotypique *in situ* est réalisée sur des coupes transversales de cordons ombilicaux. La recherche des marqueurs caractérisant les CSM, tels que CD73, CD90, CD105, CD146, CD164 et CD166, CD271 est effectuée à l'aide d'anticorps spécifiques couplés à un fluorochrome. Parallèlement, un marquage fluorescent de l'actine est réalisé afin de visualiser et confirmer la présence de cellules au sein du tissu ombilical. L'émission de fluorescence a ensuite été détectée par microscopie confocale.

Afin d'évaluer la densité cellulaire présente au sein du tissu ombilical, les cellules de la gelée de Wharton ont été isolées par une méthode enzymatique sur des morceaux de cordons ombilicaux de longueur connue. Après retrait des vaisseaux ombilicaux, la gelée de Wharton est isolée puis digérée à l'aide de la collagénase de type 1 pendant 16°C à 37°C. Les cellules obtenues sont ensuite comptées et ensemencées dans des boites de culture *in vitro*. Après 24 heures, les cellules qui ont adhéré au support (caractéristique des CSM), sont décollées à l'aide de la trypsine, puis de nouveau comptées.

RESULTATS ET CONCLUSIONS :

L'analyse phénotypique *in situ* a permis, d'une part, de démontrer la présence de cellules exprimant les marqueurs mésenchymateux au sein du tissu ombilical et d'autre part, de distinguer deux zones au niveau de ce dernier : une zone péri-vasculaire et une zone inter-vasculaire. Au sein de chacune des zones, l'expression de certains marqueurs peut varier. En effet, la proportion de cellules exprimant CD271, CD105, CD166 et surtout CD73 semble plus faible au niveau péri-vasculaire. En revanche, dans cette zone, un plus grand nombre de cellules $CD146^+$ est détecté. Dans cet article, publié en 2012, nous avons émis l'hypothèse que cette différence phénotypique *in situ* pouvait être prédictive du comportement des cellules en culture *in vitro*.

Après digestion enzymatique de la gelée de Wharton, $7,80 \pm 0,20. 10^5$ cellules par centimètre de cordon ont pu être isolées. Les cellules sont ensuite mises en culture *in vitro* pendant 24 heures. Les cellules adhérentes sont ensuite détachées de leur support et $6,64 \pm 0,18. 10^5$ cellules par centimètre de cordon ont été recueillies. Ainsi, sur une longueur moyenne de 25 cm de cordon ombilical, il serait possible d'obtenir jusqu'à 17 millions de cellules stromales adhérentes.

Bio-Medical Materials and Engineering 22 (2012) 243–254
DOI 10.3233/BME-2012-0714
IOS Press

Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly: Comparative phenotype analysis between tissue and *in vitro* expansion

Talar Margossian [a,c,d], Loic Reppel [a,c], Norman Makdissy [d], Jean-François Stoltz [a,b,c], Danièle Bensoussan [a,b,c] and Céline Huselstein [a,c,*]

[a] *CNRS, UMR, Biopôle – Campus Santé, Vandoeuvre-lès-Nancy, France*
[b] *CHU de Nancy, Unité de Thérapie Cellulaire et Tissulaire, CHRU Nancy Brabois, Vandoeuvre-lès-Nancy, France*
[c] *Lorraine University, Nancy, France*
[d] *Reviva Regenerative Medicine Center, Middle East Institute of Health, Bsalim, Lebanon*

Abstract. Mesenchymal stem cells (MSCs) are useful multipotent stem cells that are found in many tissues. While MSCs can usually be isolated from adults via bone marrow aspiration (BM-MSCs), MSCs derived from the discarded umbilical cord, more precisely from Wharton's jelly (WJ), offer a low-cost and pain-free collection method of MSCs that may be cryogenically stored, and are considered extremely favorable for tissue engineering purpose. The aim of this study was to analyze the harvested number of cells per centimeter of human umbilical cord (UC) and carry out the phenotype of these WJ-MSCs after explant or enzymatic methods. Fresh UCs were obtained from full-term births, and processed within 6 hours from partum to obtain the WJ-MSCs. UC sections were analyzed in confocal microscopy to analyze cells phenotype *in situ*. Others UC components were treated either by enzymatic method or by explant method to obtain isolated cells and to analyze cells phenotype until the end of the first passage. We have successfully generated MSCs from UC by using explant and enzymatic methods. Using microscopy confocal, we identified the expression of some MSCs markers *in situ* of Wharton's jelly tissue as well as in perivascular region. Our comparative study, between explant and enzymatic digestion, indicated, that WJ expressed most of MSCs markers in both conditions, but a remarkable variation of cell phenotype expression was distinguished after primary culture comparing to directly isolated cells by enzymatic digestion. We also studied the expression of CD271, which showed to be weakly expressed *in situ* on fresh fragment of WJ.

Keywords: Human umbilical cord (UC), mesenchymal stem cells (MSCs), Wharton's jelly (WJ)

AUTHOR COPY

1. Introduction

Currently, the most commonly source of adult mesenchymal stem cells (MSCs) which represent a great therapeutic potential due to their capacity of self-renewal and multilineage differentiation was the bone marrow (BM) [1,2]. It has been applied for cell based therapies for a wide range of potential clinical applications [3–7]. However, there is a need to identify alternative MSCs source according to the

*Address for correspondence: Céline Huselstein, PhD, Cells and Tissue Engineering, UMR CNRS 7561, Faculty of Medicine, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France. E-mail: celine.huselstein@univ-nancy.fr.

0959-2989/12/$27.50 © 2012 – IOS Press and the authors. All rights reserved

limited number of BM-MSCs available for autologous use, the associated donor morbidity, the invasive procedures of aspiration of BM, and the significant decrease of frequency and differentiation potential of BM-MSCs with age [8,9]. A recently reported potential alternative tissue source of MSCs is the connective tissues (Wharton's jelly (WJ)) of human umbilical cord (UC) [10–12]. The UC contains two arteries and one vein, which are surrounded by mucoid connective tissues called Wharton's jelly. WJ possesses desirable characteristics such as a large, rapidly available donor pool, non-invasive and painless collection procedure, and ethically non-controversial source of MSCs. They are believed to be more primitive than MSCs derived from other tissue sources [13], and might be endowed with superior plasticity properties and a greater expansion capability [3,13]. Recently, Filiz et al. showed that there was a significant positive correlation between Wharton's jelly weight and newborn birth weight, demonstrating that as birth weight increased, the amount of WJ increased [14]. As other data displayed that sections of UC, such as WJ, contain MSCs, we purposed that large amounts of MSCs could be isolated from WJ.

The phenotypic stromal cells in the WJ are fibroblast-like cells [15]. In *in vitro* culture, they have immune properties and surface markers similar to MSCs derived from bone marrow [16]. WJ-MSCs do not express the hematopoietic markers CD45, CD34, CD14 or CD11. They also do not express the co-stimulatory molecules CD80, CD86 or CD40 or the adhesion molecules CD31 (platelet/endothelial cell adhesion molecule [PECAM]-1), CD18 (leukocyte function-associated antigen-1 [LFA-1]) or CD56 (neuronal cell adhesion molecule-1), but they can express CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), CD44, CD90 (Thy-1), CD71 and Stro-1 as well as the adhesion molecules CD106 (vascular cell adhesion molecule [VCAM]-1), CD166 (activated leukocyte cell adhesion molecule [ALCAM]), intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and CD29 (integrin β1 chain) [16]. Recently, the low-affinity nerve growth factor receptor CD271 and CD146 were described for prospective isolation of MSCs [17,18]. However, up until now, the question of which was the optimal method for efficiently isolating MSCs from umbilical cords remained unanswered. Currently, two main techniques are used to isolate MSCs from WJ. The first one, the explant culture, is based on the migratory ability of the cells whereas the second one consists on an enzymatic digestion of the tissue [16]. Previously, the network of glycoprotein microfibrils and collagen fibrils in the WJ has been studied [19], and it has been showed that the interlaced collagen fibers and small, woven bundles are arranged to form continuous soft skeleton that encases the umbilical vessels [20]. Thus, collagenase digestion can be used to cut collagen's triple helix. Once cut, other proteases can degrade denatured collagen, leading to accelerated degradation of other proteins in the extracellular matrix and ultimately the release of cells from tissue [21]. Therefore, some studies used a panel of enzymes to induce the release of cells (collagenase/trypsin or collagenase/hyaluronidase/trypsin) [22–24]. If all these methods make it possible to obtain cells from WJ, their effectiveness can be variable. The choice of enzyme blend is critical for successful cells isolation and it can influence cells yield, viability, integrity, and function [24]. Recently, Salehinejad et al. shown that the kind of isolation methods used (explant culture or enzymatic digestion) affected cell number and proliferation capacity. Thus, enzymatic digestion yields a higher cell density than explant method while this last method allowed a higher cell proliferation rate [24]. However several adhesion molecules expressed by WJ-MSCs have a function in signal transduction as in viability or proliferation. For example, β1 integrins play a major role in communication between the cytoplasm and extracellular space. Integrins control a whole host of cellular functions through inside-out and outside-in signalling including cell motility, survival, differentiation and proliferation as well as ECM (Extracellular matrix) remodeling [25,26]. CD73 is expressed in many different tissues with an intracellular localization being described [27]. A role for the enzyme as a proliferative factor has been proposed and the protein is involved in the control of cell growth, maturation, and differentiation processes [28]. In this study, we attempted to analyze the harvested number

AUTHOR COPY

of cells per centimeter of human umbilical cord (UC) and the evolution of the efficiency of the isolation procedure on cell markers expression (adhesion molecules (CD44, CD105), integrin marker (CD29) and other mesenchymal stem cells markers (CD73, CD90, CD146, CD164, CD166, CD271)). Cells phenotype will be performed from human full-term umbilical cords WJ-MSCs inside *ex vivo* WJ fragment and on cells obtained after enzymatic digestion or explant methods.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of UCs and cell isolation

Fresh human umbilical cords (UCs) were received from maternity hospital (Nancy, France) with the consent of the parents after birth and stored in Hanks' balanced salt solution (HBSS, Sigma, France, ref. H2387). The UCs were processed within 6 h after delivery. Under sterile conditions, UCs were disinfected with alcohol 70% for 30 s and cleared extensively with normal saline. The washing was repeated until UCs were cleaned from blood or blood clots. In order to avoid any contamination of the cultures by the endothelial cells, these last are withdrawn from the vein according to the method of Jaffe et al. [29].

At the external surface of the UC horizontal sections are engraved with a sterile scalpel. The cord vessels (arteries and vein) were removed from cord segments, and the exposed Wharton's jelly (WJ) tissue was cut into small pieces (Fig. 1A–H). After having been minced into 1–2 mm^3 fragments, WJ tissues were incubated with 1 mg/ml collagenase type I (Gibco, France) for 16 h at 37°C for enzymatic isolation [10]. Following digestion, the mixture was then centrifuged at 1258*g* for 15 min. To enumerate the amount of cells harvested, the pellets were counted using Trypan Blue stain after 16 and 40 h.

For explant culture, WJ tissues were placed in 6-well plates and cultured in alpha modified Eagle's medium (αMEM; Lonza, Belgium) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 1 µg/ml amphoterin B (Fig. 1G). The culture plate was placed in an incubator with saturated humidity at about 37°C containing 5% (v/v) CO_2 during 7 days.

AUTHOR COPY

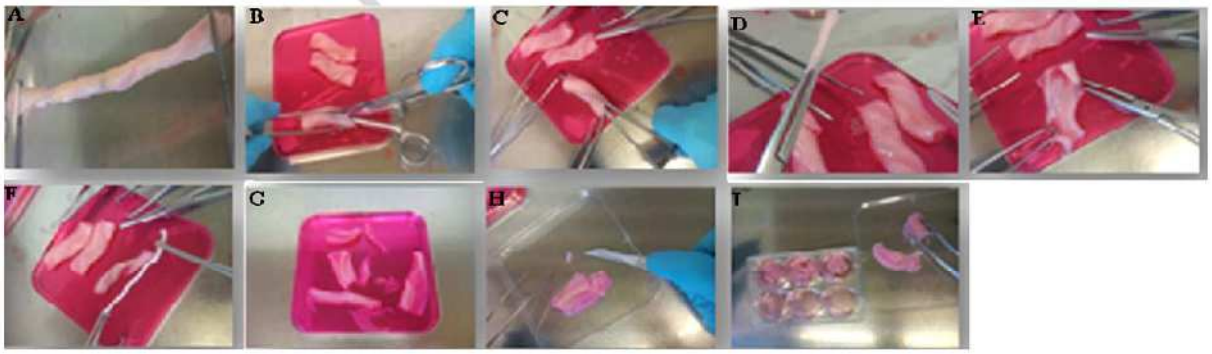


Fig. 1. Isolation of Wharton's jelly from human umbilical cord. (A) Cord removed from T75 flask and washed with alcohol. (B) Insertion of the clamp into the umbilical vein. (C) Longitudinal incision in the wall of the cord. (D and E) Detachment of the umbilical vein. (F) Withdraw of umbilical arteries. (G) Pieces of Wharton's jelly after removal of arteries and vein. (H) Cut into small pieces of 2–3 mm. (I) Distribution of pieces in six well plates. (Colors are visible in the online version of the article; http://dx.doi.org/10.3233/BME-2012-0714.)

Table 1
The markers characteristics

Antigen	Clone	Conjugation	Isotype	Reference
IgG1 control	MIB-1	FITC	Mouse IgG1	DakoCytomation X 0927
IgG1 control	MOPC-21	PE	Mouse IgG1	BD 555749
IgG2a control	G155-178	PE	Mouse IgG2a	BD 555574
CD29	4B4LDC9LDH8	FITC	Mouse IgG1	CYTO-STAT 6604105
CD34	8G12	PE	Mouse IgG1	BD 555822
CD44	J173	FITC	Mouse IgG1	BC IM1219U
CD45	T29/33	FITC	Mouse IgG1	DakoCytomation F 0861
CD73	AD2	PE	Mouse IgG1	BD 550257
CD90	5E10	PE	Mouse IgG1	BD 555596
CD105	1G2	PE	Mouse IgG1	BC A07414
CD146	F4-35H7	PE	Mouse IgG1	Biocytex 5050-PE-100T
CD164	N6B6	PE	Mouse IgG2a	BD 551298
CD166	3A6	PE	Mouse IgG1	BD 559263
CD271	ME20.4-1.H4	PE	Mouse IgG1	Miltenyi Biotec 130-091-885
HLA-DR	B8.12.2	FITC	Mouse IgG1	BC IM0463U

2.2. *In situ analysis*

For phenotype analysis, WJ tissue sections were incubated during 1 h at room temperature with different antibodies conjugated only with phycoerythrin (PE) and then washed with PBS. The markers were: CD34, CD73, CD90, CD164, CD166, CD271, CD105 and CD146 (Table 1). After washing with PBS, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde, and then permeabilized with 0.5% Triton X-100 solution (Sigma, France). Alexa Fluor 488 Phalloïdin was incubated for 20 min with samples. Finally, the samples were washed twice with PBS. Confocal Microscopy was used to analyze antibodies binding. For all labeling, fluorescence emission was detected using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). For the image series, a Leica TCS SP2 equipped with an acousto-optical beamsplitter (AOBS) was used. Excitation was achieved by the 488 and 545 nm lines from an Ar laser for, Alexa Fluor 488 and phycoerythrin labeling, respectively. All photomultipliers used were adjusted to the same sensitivity (gain/offset).

2.3. *Cell culture expansion*

The cells from enzymatic digestion were washed, seeded at 1000 cells/cm^2 in polystyrene tissue culture flasks (Iwaki brand, Japan), and cultured in growth medium containing αMEM (Lonza, Belgium) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 1 µg/ml amphoterin B. Culture was maintained in a humidified atmosphere with 5% CO_2 at 37°C. After 3 days of culture, the medium was replaced and non-adherent cells were removed. The medium was then changed twice per week. Once 80% confluence had been reached, adherent cells were analyzed using flow cytometry. The experiment was performed in triplicate.

2.4. *Immunophenotyping*

To determine the typical cell surface epitope profile after enzymatic digestion and after the first passage, standard flow cytometer techniques (FACSCalibur; BD Biosciences, France) were used. Briefly,

AUTHOR COPY

at 80% confluence, adherent cells were scratched by scraping and were incubated for 45 min at room temperature with fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE). The markers characteristics are mentioned in Table 1.

2.5. Statistical analysis

Statistical tests and graphical representations were performed using graphPad Prism 5 software. All data are presented as means ± standard error means (SEM) of three independent experiments. Significant statistical differences were calculated using two ways ANOVA. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. If significance existed, a post-hoc analysis was performed using the Bonferonni posttests to evaluate significance for all experiments.

3. Results

3.1. Isolation of adherent cells after enzymatic digestion

With 100% harvesting efficiency by enzyme digestion method, cells from UC fragments ($n = 8$) were seeded at a density of 1000 cells/cm^2. Adherent cells with fibroblastic morphology could be observed as early 24 h. The median size of UC was 25 cm (range 15–35). We defined the theoretical number of cells per cm of UC by counting the nucleated cells after 16 h of collagenase digestion and the adherent cells after 24 h in monolayer culture. We obtained $7.80 \pm 0.20 \times 10^5$ and $6.64 \pm 0.18 \times 10^5$ cells per cm of UC after 16 and 40 h, respectively (Fig. 2a). Correlated measurements of FSC and SSC, obtained by flow cytometry, showed that enzymatic digestion induced modifications of cell size and granularity, respectively, compared with cells obtained by explant method (Fig. 2b).

3.2. In situ detection of mesenchymal markers in umbilical cord Wharton's jelly tissue and perivascular region

The characterization of mesenchymal marker expression in the UC has been revealed using Confocal Microscopy. Actin was used to visualize and confirm the presence of cells in both Wharton's jelly and perivascular region. Fragments from UC were immunostained and analyzed for surface marker expression CD34, CD45, CD73, CD90, CD146, CD164, CD166 and CD271 (Fig. 3). In WJ, we observed high expression of various MSCs markers specially CD73, CD90 and CD166. The expression of CD164 was lower at the cells surface in WJ. The other markers such as CD105, CD271 and CD146 were weakly detected in cells contained in WJ. In contrast, in perivascular regions, CD73 and CD105 were absent, and CD271 was hardly detectable comparing to in WJ regions. The expression of CD146 was higher. Moreover, the cells exhibited lower level expression of CD164 but kept the same level expression of CD90.

3.3. Immunophenotypic characterization of adherent cells

To determine the cell surface marker expression of WJ-MSCs after enzymatic digestion, we extracted cells from 3 different human umbilical cords and characterized them by flow cytometry for P0 and P1. Figure 4(a) shows that UC-derived cells exhibit positive surface expression of integrin marker (CD29), matrix markers (CD44, CD90), stromal marker (CD166), endothelial marker (CD146) and other MSCs

AUTHOR COPY

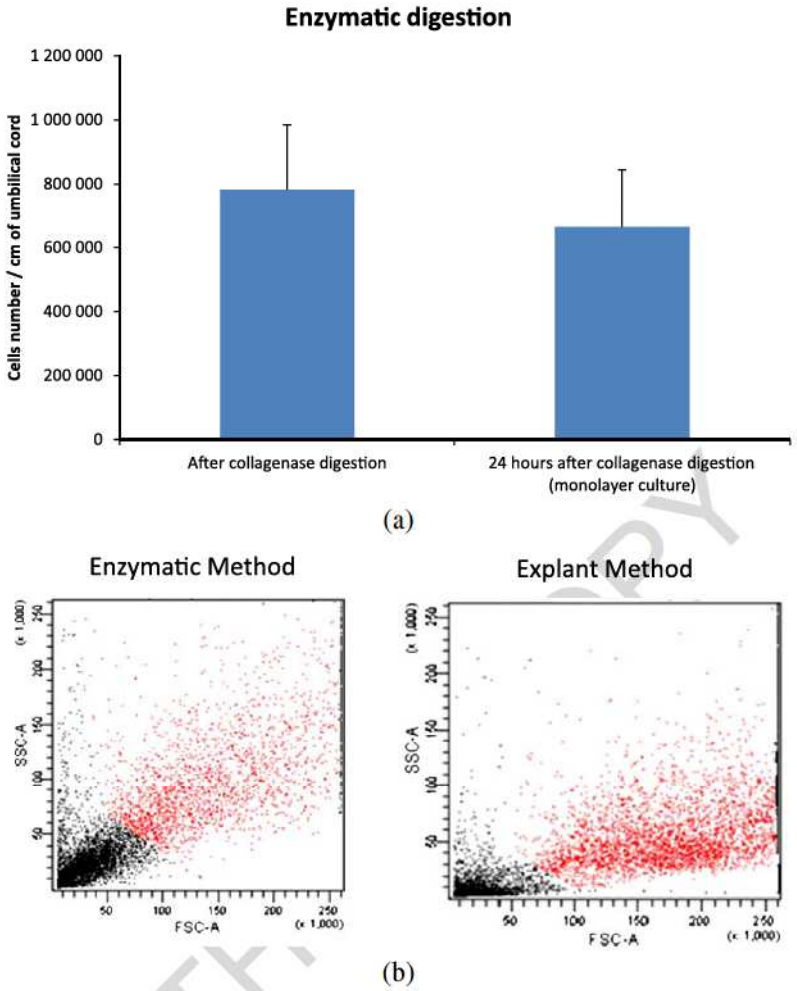
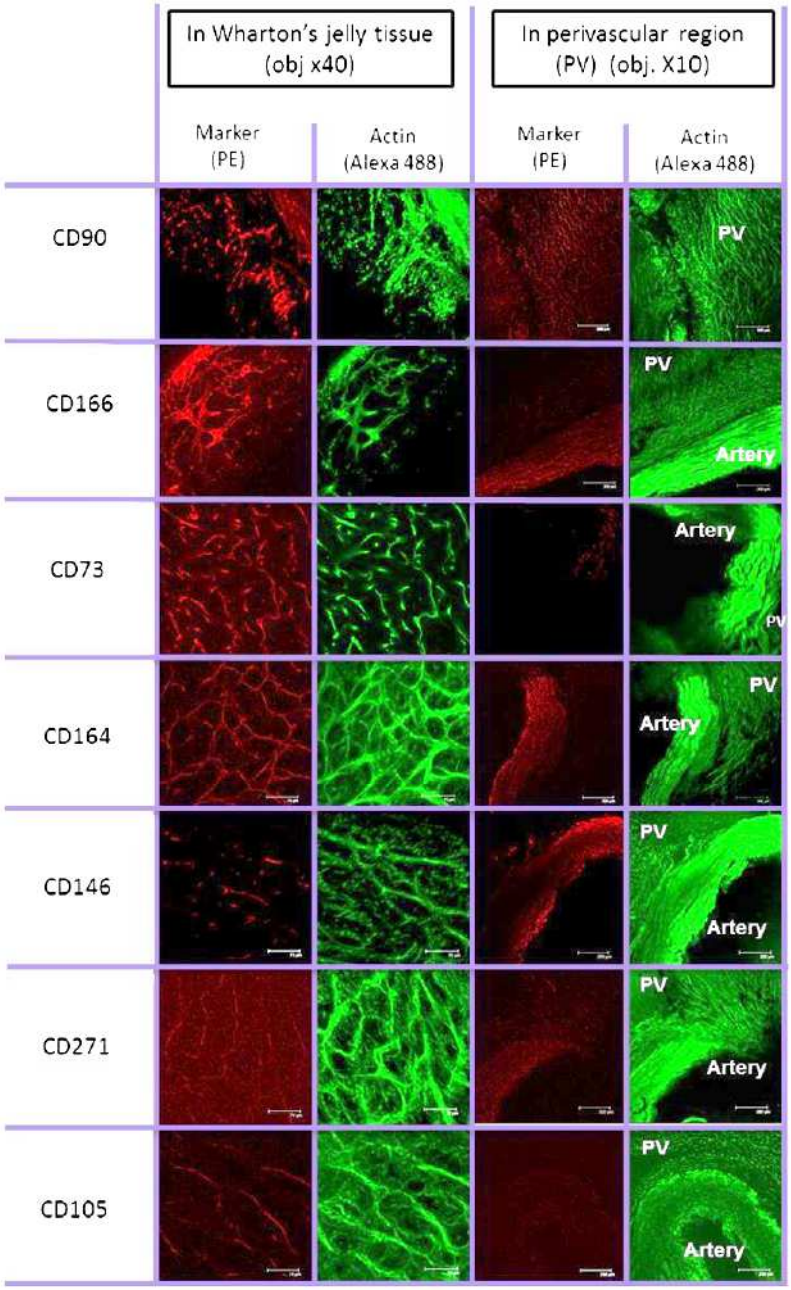


Fig. 2. Amount and morphology of cells harvested from the Wharton's jelly of umbilical cord. The number of total cells per cm of UC was counted 16 h after the beginning of digestion and the yield of adherent cells after 40 h (a). Cells morphology was analyzed by flow cytometry (b). Forward-scattered light (FSC) is proportional to cell-surface area or size and Side-scattered light (SSC) is proportional to cell granularity or internal complexity. (Colors are visible in the online version of the article; http://dx.doi.org/10.3233/BME-2012-0714.)

markers (CD73, CD105) which are known to be expressed on MSCs, but not hematopoietic lineage marker (CD34) nor HLA-class II. The differences in cell surface expression directly after digestion and after growth in culture for one passage existed. In comparison to directly isolated cells after 16 h with collagenase digestion (P0), the cells analyzed after expansion in culture (P1) showed a significant increase in expression levels of CD29 (57.7 ± 13.3%), CD44 (54.9 ± 3.9%), CD73 (49.2 ± 7.7%), CD90 (53.4 ± 17%), CD105 (49.9 ± 6.2%), CD146 (17.3 ± 6.4%), CD164 (19.8 ± 9.9%) and CD166 (42.8±9.8%). On the other side, no significant change was observed for the expression of CD34, CD271 and HLA-DR which remained negative (Fig. 4(a)).

Therefore, by flow cytometry, using explant method we analyzed the expression markers of 3 other samples at P1. The explant isolation, like enzymatic digestion, yielded cells that highly expressed CD90 (95.5%), CD29 (86.6%), CD44 (82%), CD73 (77.3%), CD166 (73.1%) and moderately expressed



	In WJ	In PR
CD146	+/-	++
CD271	+	+/-
CD105	+	+/-
CD164	++	+
CD90	+++	++
CD166	+++	+
CD73	+++	-

WJ : Wharton's Jelly

PR : Perivascular Region

Fig. 3. *In situ* analysis of WJ-MSC using confocal microscopy. If CD90 receptor was expressed in a homogeneous way between Wharton's jelly and perivascular region, others have a heterogeneous distribution between these 2 localizations (CD166, CD271, CD105, CD146 and CD73).

CD105 (42.3%), CD146 (27.2%) and CD164 (17.3%). Finally, no significant difference in expression level of cell surface markers could be observed between those cells obtained by explant isolation comparing to the primary culture after enzymatic digestion (Fig. 4(b)).

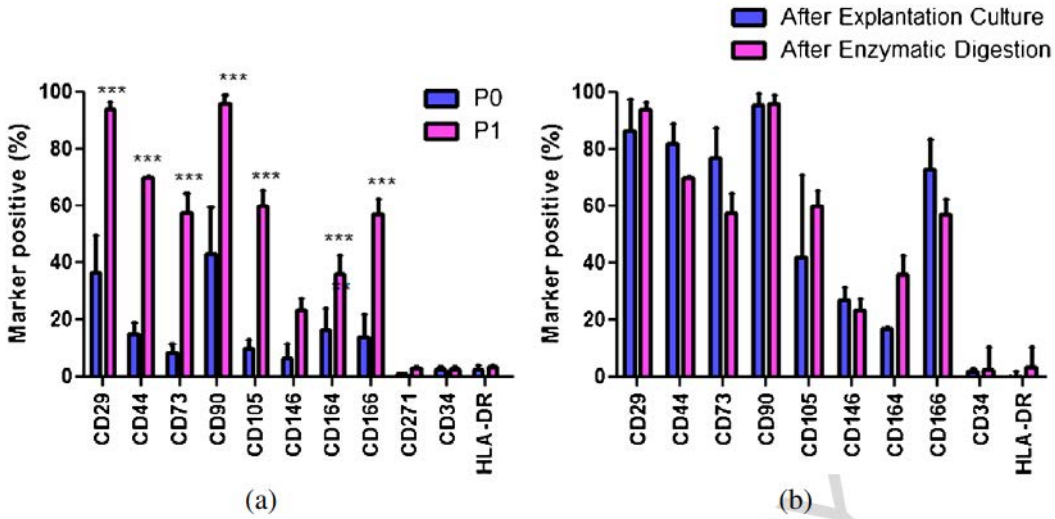


Fig. 4. Immunophenotypes of mesenchymal cells derived from Wharton's jelly. (a) Analysis of surface marker expression on umbilical cord mesenchymal cells by flow cytometry during monolayer culture (P0 and P1). All cells were positive for CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD164 and CD166 but negative for CD34, CD271 and HLA-DR. (b) Comparison of expression of MSC markers in both isolation conditions after first passage. No significant differences were observed in the level of expression of these markers for both conditions. $N = 3$, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. (Colors are visible in the online version of the article; http://dx.doi.org/10.3233/BME-2012-0714.)

4. Discussion

Earlier studies have demonstrated that Wharton's jelly MSCs are a cell-based therapy because of their key characteristic such as long-term self-renewal, rapidly available donor pool, non-invasive and painless collection procedure, easily obtained and culturing without raising ethical issues. They are believed to be more primitive that MSCs derived from other tissue sources [13].

View that MSCs derived from Wharton's jelly can differentiate into several lineages, including adipose cells, chondrocytes, osteoblasts, neuronal cells, endothelial cells, cardiomyocytes, hepatocyte-like and pancreas beta cells, they have been considered as an example of multipotent or even pluripotent stem cells [3,10]. Considering tissue repair, the therapeutic potential of cells expressing MSCs markers is well described [30,31]. Noting that bone marrow makes it possible to obtain 1–10 MSCs in a total of 10^6 bone marrow mononuclear cells, umbilical cord matrix could be an excellent postnatal tissue source to harvest higher number of mesenchymal stromal cells to use them in regenerative medicine [32]. Several methods for WJ-MSCs isolation were described in literature. Briefly, cells could be obtained with or without enzymatic digestion. The explant method allowed obtaining WJ-MSCs without enzymatic digestion. It consists on a "plate and wait" procedure, simply, based on the spontaneous, physical migration of the mesenchymal cells from their native matrix [33,34]. The other one consists on an enzymatic digestion of the tissue. Most studies used collagenase digestion alone or in association with different proteases to accelerated degradation of extracellular matrix proteins [21]. In this study, we attempted to analyze the evolution of the efficiency of the isolation procedure on cell phenotype. First, whatever the isolation method (explant and enzymatic method), MSCs were successfully isolated and expanded from all tissues. Explant method allowed obtaining cells with relative ease, simplicity and speed. The collagenase digestion method was longer than explant method and induced more risk of contamination. According to Salehinejad et al., enzymatic digestion methods decreased cell viability due to lytic activity and the different sensitivity of collagenases [24]. In this study, by using collagenase digestion method,

AUTHOR COPY

Table 2
Studies reporting the nucleated cell harvested from umbilical cord after enzymatic digestion

Enzymatic procedure		Nucleated cell/cm of UC	References
Enzymatic digestion with *only collagenase*	Collagenase type I (1 mg/ml) for 16 h	7.80×10^5	Present study
	Collagenase type B (1 µg/ml) for 4 h	2.6×10^4	[38]
	Collagenase (1 mg/ml) for 18–24 h	$2.5–25 \times 10^4$	[12]
	Collagenase type B (1 mg/ml) for 3 h	9×10^4	[24]
Enzymatic digestion with *a panel of enzymes*	Collagenase type I (2.7 mg/ml), hyaluronidase (0.7 mg/ml), trypsin (2.5%) for 3 h	0.95×10^6	[22]
	Collagenase type II (0.075%) for 30 min, trypsin (0.125%) for 30 min	1×10^6	[23]
	Collagenase type II (0.4%) and DNAse (0.01%) for 30 min	0.5×10^6	[37]
	Hyaluronidase, collagenase, trypsin for 45–60 min	$1.5–1.7 \times 10^4$	[36]
	Hyaluronidase (1.5 mg/ml), liberase purified enzyme blend (0.5 mg/ml) for 30 min	$1.5–2.0 \times 10^4$	[51]
	Collagenase type B (1 mg/ml) for 3 h, trypsin (2.5%) for 15 min	$0.5–1 \times 10^4$	[24]
	Collagenase type I (1 mg/ml) for 3 h, hyaluronidase (300 µg/ml) for 2 h, trypsin (2.5%) for 15 min	0.25×10^4	[24]

we have successfully generated MSCs from UC (100%) and compared its efficiency to others. We reported that UC contains $7.80 \pm 0.20 \times 10^5$ cells per cm of digested tissue. The isolated cell yield was in the average of what other studies already reported (range: 1.5×10^4 to 1×10^6 cells per cm of UC; Table 2) [10,12,22,23,35–38]. Although the specificity of the protocol induces a considerable variation amongst cells, it is realistic to claim that the harvesting ratio of WJ-MSCs could be several millions of cells. If the entire length of the UC was digested using the process described here, after 16 h, we could obtain until 20 millions of cells.

Not surprisingly, we successfully demonstrated that, whatever the cells isolation method, UC-MSCs shared most of the characteristics with BM-MSCs, including fibroblastic morphology but it seems that cells morphology obtained by enzymatic digestion is different than by explant method. Before to investigate the influence of cells isolation method on cells phenotype, we sought to determine in umbilical cord whether human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs) would express the same phenotypical characteristic compared to Wharton's jelly cells. Experimentally it is important to note that CD73 was negative in the perivascular region and a low level of CD105, CD164, CD166 and CD271 was observed (Fig. 3). Thus, these findings are in accordance with Schugar et al., who reported similar results in the detection of CD73, CD105 and CD164 which are just a few of numerous markers shown to be present on MSCs [39]. Despite the presence of some markers in WJ and perivascular regions, to confer the multipotentiality of the cells, expressions of these markers alone are not sufficient. Some authors have studied the CD271 and CD146 markers as specific indicators of the MSCs from adult bone marrow [17,40,41]. Until recently, CD271 has been described as the most selective marker for the characterization and purification of human bone marrow MSCs [42], but appears to be absent from other cells like expanded synovial progenitor cells [43]. In our study, by comparing *in situ* and *in vitro* culture (P0 and P1), we distinguished that CD271 was expressed on *in situ* immunostained Wharton's jelly fragments, in contrast to their absence after enzymatic digestion. Ikuo et al. showed also the absence of CD271 in Wharton's jelly after isolation of cells by explant methods [44]. Secondly, likewise to Baksh et al., we found that CD146 was highly expressed in perivascular region but not in Wharton's jelly [45]. This

AUTHOR COPY

marker is considered as an adhesion marker of endothelial cells but has been, also, identified as a MSCs marker [46,47]. Meirelles et al. thought that its expression on MSCs is related to probable perivascular niche of MSCs [48]. Ours results can be explained by the heterogeneity of MSCs populations in UC matrix. There are probably subpopulations of MSCs: the first one expresses CD146 whereas the second one, in perivascular region, does not express this marker. It is then possible that differentiation potential of MSCs from WJ or perivascular region is different.

Finally, after collagenase digestion, the expression level of most of all mesenchymal markers, such as CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD164 and CD166 was significantly higher at P1 comparing to the primary culture (P0). This rapid increase may be due of the presence of cells that have been stripped of their surface markers following enzyme treatment (Fig. 4(a)). Schugar et al. found that a collagenase-based digestion applied to the whole UC will consistently isolate a specific cell population expression high levels of MSCs surface markers and moderate levels of CD146 (40–50%). Conversely, mechanical or explant culture yields cell populations high in endothelial marker CD146 (100%). In sum, it is not surprising to see that isolated cells by enzymatic digestion showed higher expression levels of MSCs markers when expanded in culture (P1) comparing to the primary culture, as in addition to being characteristic of MSCs, these surface markers are also well known as both cell adhesion and signaling molecules [49].

Therefore, the explant isolation, like the enzymatic digestion showed non-significant differences between the expressions of levels after primary culture (Fig. 4(b)). Nevertheless, it is important to indicate that the expressions level of some MSCs markers (CD44, CD73 and CD166) are a bit higher using explant method in which we conclude that the use of a protease, such as collagenase can disturb the detection level of these markers. According to Mafi et al., a factor accounting for the variability in the expression of adult MSCs surface markers could be the different stages during cell proliferation and culture where the markers have been accessed [50]. Our current knowledge regarding umbilical cord Wharton's jelly stem cells showed that the most efficient method to release the highest yield cells is *via* enzymatic digestion of the extracellular matrix of Wharton jelly. These cells can be isolated in large numbers, approximately 7.80×10^5 cells per centimeter of the umbilical cord. Although the explant method provides easier and less cumbersome steps in processing sample, yet it limits the ability to determine the initial seeding volume and possessed lower harvested yield of the cells. In contrast, we and other authors showed that digestion method can affected on the expression level on some MSCs surface markers and restrain their expression level [39]. Absence of hematopoietic marker CD34, and HLA-DR was already observed at P0, and remained negative after first passage for both conditions. Finally we showed that cells expressing mesenchymal markers CD105, CD73, CD90 and CD166 are present *in situ* an *in vitro* after first passage in both enzymatic and explant method.

There are many issues still to be addressed with respect to use of MSCs for clinical applications. Given the high frequency of MSCs markers in Wharton's jelly using explant method, we believe that this rich human mesenchymal stem cell source must be deeply characterized over passages for further utility in any regeneration uses to ensure safety and efficacy.

5. Conclusion

Wharton's jelly cells, like bone marrow stromal cells and other mesenchymal cells, are plastic adherent. In summary, this present study describes the isolation of abundant MSCs from Wharton's jelly of human umbilical cord by enzymatic digestion. Thus, reporting to BM-MSCs, we demonstrated that UC-MSCs share most of the characteristics, including morphology and immunophenotyping, whatever

AUTHOR COPY

the kind of isolation method. With explant method, MSCs were isolated and expanded from the tissues with relative ease, simplicity and speed.

Finally these desirable characteristics with the distinct advantages of UC, such painless procedure to donors, its accessibility, unexpensive source of cells, no strict ethical requirement of their collection, free risk harvesting procedure and possible source for allogeneic cell therapy, we suggest that UC should be a promising alternative source of MSCs to BM.

Acknowledgements

This work was supported by the PIR-CNRS "vieillissement-longévité" and the "Conseil Regional de Lorraine". The authors gratefully acknowledge the Core Facility Imaging PTIBC IBISA, NANCY (FR 3209 CNRS).

AUTHOR COPY

References

[1] M.F. Pittenger et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science* **284**(5411) (1999), 143–147.
[2] Y. Jiang et al., Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow, *Nature* **418**(6893) (2002), 41–49.
[3] R. Anzalone et al., New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity, *Stem Cells Dev.* **19**(4) (2010), 423–438.
[4] L. Wang et al., 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) (2009), 2259–2266.
[5] P.C. Tsai et al., The therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in the treatment of rat liver fibrosis, *Liver Transp.* **15**(5) (2009), 484–495.
[6] R.W. Chan, M.L. Rodriguez and P.S. McFetridge, The human umbilical vein with Wharton's jelly as an allogeneic, acellular construct for vocal fold restoration, *Tissue Eng. Part A* **15**(11) (2009), 3537–3546.
[7] K. Le Blanc et al., Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study, *Lancet* **371**(9624) (2008), 1579–1586.
[8] J.D. Kretlow et al., Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells, *BMC Cell Biol.* **9** (2008), 60.
[9] M.Y. Chen et al., Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Exp. Hematol.* **37**(5) (2009), 629–640.
[10] H.S. Wang et al., Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord, *Stem Cells* **22**(7) (2004), 1330–1337.
[11] K.E. Mitchell et al., Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia, *Stem Cells* **21**(1) (2003), 50–60.
[12] R. Sarugaser et al., Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors, *Stem Cells* **23**(2) (2005), 220–229.
[13] D.L. Troyer and M.L. Weiss, Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population, *Stem Cells* **26**(3) (2008), 591–599.
[14] A.A. Filiz et al., Positive correlation between the quantity of Wharton's jelly in the umbilical cord and birth weight, *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* **50**(1) (2011), 33–36.
[15] K.D. McElreavey et al., Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord, *Biochem. Soc. Trans.* **19**(1) (1991), 29S.
[16] M.L. Weiss and D.L. Troyer, Stem cells in the umbilical cord, *Stem Cell Rev.* **2**(2) (2006), 155–162.
[17] N. Quirici et al., Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies, *Exp. Hematol.* **30**(7) (2002), 783–791.
[18] M. Crisan et al., A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs, *Cell Stem Cell* **3**(3) (2008), 301–313.
[19] F.A. Meyer, Z. Laver-Rudich and R. Tanenbaum, Evidence for a mechanical coupling of glycoprotein microfibrils with collagen fibrils in Wharton's jelly, *Biochim. Biophys. Acta* **755**(3) (1983), 376–387.
[20] E. Vizza et al., The collagen skeleton of the human umbilical cord at term. A scanning electron microscopy study after 2N–NaOH maceration, *Reprod. Fertil. Dev.* **8**(5) (1996), 885–894.
[21] R.C. McCarthy et al., Tissue dissociation enzymes for isolating human islets for transplantation: factors to consider in setting enzyme acceptance criteria, *Transplantation* **91**(2) (2011), 137–145.

[22] N. Tsagias et al., Isolation of mesenchymal stem cells using the total length of umbilical cord for transplantation purposes, *Transfus. Med.* **21**(4) (2011), 253–261.
[23] L.L. Lu et al., Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials, *Haematologica* **91**(8) (2006), 1017–1026.
[24] P. Salehinejad et al., 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) (2012), 75–83.
[25] D. Docheva et al., Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system, *J. Cell. Mol. Med.* **11**(1) (2007), 21–38.
[26] A.L. Berrier and K.M. Yamada, Cell–matrix adhesion, *J. Cell. Physiol.* **213**(3) (2007), 565–573.
[27] H. Zimmermann, 5′-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects, *Biochem. J.* **285** (1992), 345–365.
[28] J. Turnay et al., 5-nucleotidase activity in cultured cell lines. Effect of different assay conditions and correlation with cell proliferation, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **25**(11) (1989), 1055–1061.
[29] E.A. Jaffe et al., Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria, *J. Clin. Invest.* **52**(11) (1973), 2745–2756.
[30] P. Bianco, P.G. Robey and P.J. Simmons, Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays, *Cell Stem Cell* **2**(4) (2008), 313–319.
[31] B.M. Abdallah and M. Kassem, Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications, *Gene Ther.* **15**(2) (2008), 109–116.
[32] M. Reyes and C.M. Verfaillie, Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **938** (2001), 231–233; discussion 233–235.
[33] G. La Rocca et al., 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) (2009), 267–282.
[34] P. Huang et al., Differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells into germ-like cells *in vitro*, *J. Cell. Biochem.* **109**(4) (2010), 747–754.
[35] Y.A. Romanov, V.A. Svintsitskaya and V.N. Smirnov, Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord, *Stem Cells* **21**(1) (2003), 105–110.
[36] M.L. Weiss et al., Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease, *Stem Cells* **24**(3) (2006), 781–792.
[37] C.K. Tong et al., Generation of mesenchymal stem cell from human umbilical cord tissue using a combination enzymatic and mechanical disassociation method, *Cell Biol. Int.* **35**(3) (2011), 221–226.
[38] S. Karahuseyinoglu et al., Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: *in situ* and *in vitro* surveys, *Stem Cells* **25**(2) (2007), 319–331.
[39] R.C. Schugar et al., High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue, *J. Biomed. Biotechnol.* **2009** (2009), 789526.
[40] D. Jarocha, E. Lukasiewicz and M. Majka, Adventage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105+ and CD271+ cells, *Folia Histochem. Cytobiol.* **46**(3) (2008), 307–314.
[41] V.L. Battula et al., Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271 and mesenchymal stem cell antigen-1, *Haematologica* **94**(2) (2009), 173–184.
[42] H.J. Buhring et al., Novel markers for the prospective isolation of human MSC, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1106** (2007), 262–271.
[43] A. Karystinou et al., Distinct mesenchymal progenitor cell subsets in the adult human synovium, *Rheumatology (Oxford)* **48**(9) (2009), 1057–1064.
[44] I. Ishige et al., Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord, *Int. J. Hematol.* **90**(2) (2009), 261–269.
[45] D. Baksh, R. Yao and R.S. Tuan, Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow, *Stem Cells* **25**(6) (2007), 1384–1392.
[46] A. Ouhtit et al., Towards understanding the mode of action of the multifaceted cell adhesion receptor CD146, *Biochim. Biophys. Acta* **1795**(2) (2009), 130–136.
[47] D.T. Covas et al., Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts, *Exp. Hematol.* **36**(5) (2008), 642–654.
[48] S. Meirelles Lda et al., Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells, *Cytokine Growth Factor Rev.* **20**(5, 6) (2009), 419–427.
[49] A.C. Boquest et al., 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) (2005), 1131–1141.
[50] R. Mafi et al., Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculoskeletal applications – a systematic review of the literature, *Open Orthop. J.* **5** (Suppl. 2) (2011), 242–248.
[51] P. Montanucci et al., 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) (2011), 2651–2661.

AUTHOR COPY

ARTICLE 2:

Hypoxic Culture Conditions for Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Wharton's Jelly: A Critical Parameter to Consider in a Therapeutic Context.

Loïc Reppel, Talar Margossian, Layale Yaghi, Philippe Moreau, Nathalie Mercier, Léonore Léger, Sébastien Hupont, Jean-François Stoltz, Danièle Bensoussan, Céline Huselstein.

Current Stem Cell Research & Therapy, 2014, 9 (4): 306-318.

Ce travail a été réalisé au cours de mes deux premières années de thèse et a permis de réaliser une caractérisation étendue des CSM-GW au cours de leur expansion en culture *in vitro*, des passages 1 à 7 (P1 à P7), et en comparaison avec les CSM-MO (utilisées comme contrôle). Nous avons également étudié l'impact de la concentration en oxygène, au cours de l'expansion, sur les propriétés des CSM-GW. Les différents paramètres étudiés sont la capacité proliférative, l'auto-renouvellement, le phénotype, le potentiel de différenciation vers la lignée mésodermique ainsi que l'expression d'une molécule immuno-modulatrice HLA-G. L'objectif de cette étude est de définir des conditions de culture optimales des CSM-GW dans la perspective d'une utilisation clinique de ces dernières. Ce travail a fait l'objet de plusieurs collaborations. Tout d'abord, l'étude de l'expression génique d'HLA-G a été réalisée en lien avec le Docteur Philippe Moreau du service de recherches en hémato-immunologie (CEA) de l'hôpital Saint-Louis à Paris. L'étude de l'expression des gènes de pluripotence a pu être réalisée grâce à la collaboration des Docteurs Wattenhofer-Donze et Puccio (IGBMC, Illkirch, France) qui ont apporté leur expertise dans ce domaine. Ensuite, la technique de détection de l'activité télomérase m'a été transmise par le Docteur Nathalie Mercier du laboratoire INSERM U1116 de la faculté de médecine de Nancy. Enfin, l'exploration des colorations histologiques a pu être réalisée grâce à la « PlaTeforme d'Imagerie et de Biophysique Cellulaire et Tissulaire IBISA » (FR3209 CNRS – PTIBC IBISA Nancy, France).

METHODOLOGIE :

Les cordons ombilicaux ($n \geq 3$) ont été recueillis comme décrit pour le premier article. En revanche, dans le but de diminuer le risque de contamination par des cellules endothéliales de la veine ombilicale ou des cellules de l'épithélium amniotique, une méthode d'isolement mécanique légèrement différente a été réalisée. Contrairement à la méthode d'isolement

décrite dans le premier article, ici, l'épithélium amniotique, représenté par une fine membrane transparente est enlevé. De plus, la veine ombilicale est retirée dans son ensemble et aucune incision n'est réalisée dans cette dernière. Les différentes étapes de la méthode sont détaillées dans la figure suivante (**Figure 20**).

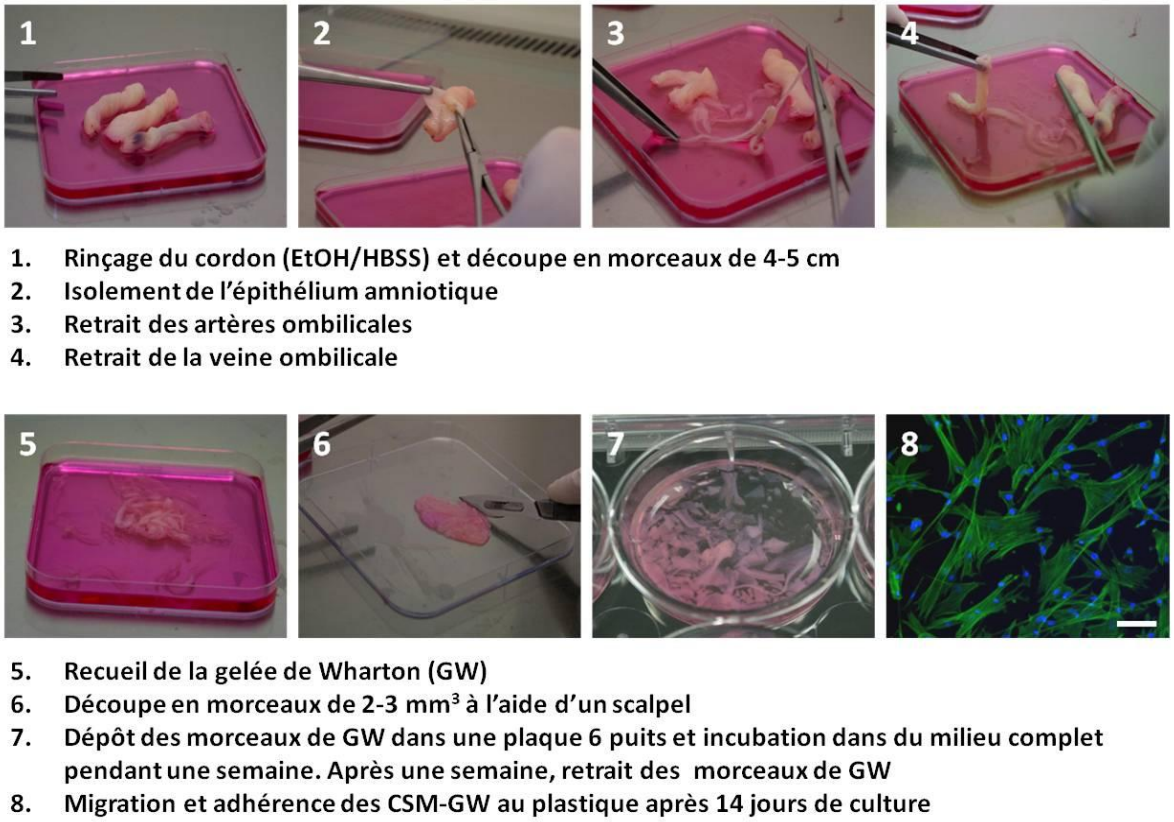


Figure 20: Isolement des CSM-GW par méthode non enzymatique: méthode dite des « explants ».
Image 8 : Indentification des cellules adhérentes après 14 jours de culture. Marquage de l'actine par la phalloïdine couplée à Alexa Fluor 488 (vert) et marquage des noyaux par le DAPI (bleu). L'émission de fluorescence a été détectée par microscopie de fluorescence (DMI3000B, Leica ; objectif X10). Echelle : 100µm.

Une fois isolées, les CSM-GW sont cultivées et amplifiées *in vitro* en normoxie (21 % O2) ou en hypoxie (5% O_2) jusqu'au septième passage. Différents paramètres sont alors évalués à P1, P3, P5 et P7, tels que le doublement de population et le temps de culture, la capacité clonogénique, l'expression de gènes de pluripotence, l'activité télomérase, le phénotype ou encore l'expression d'HLA-G. La différenciation mésodermique est réalisée uniquement en normoxie et en présence de milieux de cultures spécifiques. Les différenciations adipogéniques et ostéogéniques sont réalisées en monocouche durant 21 jours alors que la différenciation chondrocytaire est évaluée à partir d'un système de culture en

micromasse durant 28 jours. Au terme de cette dernière différenciation, nous avons pu évaluer la synthèse matricielle par quantification des images de colorations histologiques. Les CSM-MO sont utilisées comme contrôle à un passage précoce (P1) et avancé (P5).

RESULTATS ET CONCLUSIONS :

Dans un premier temps, notre travail a permis de mettre en évidence des différences entre les CSM-GW et les CSM-MO en termes de prolifération et de différenciation adipogénique. En effet, l'activité télomérase et l'expression du gène de pluripotence Oct-4 (**Figure 21**), respectivement associées à la capacité proliférative et à l'auto-renouvellement cellulaire, se sont révélées être, pour un même passage (P1 et/ou P5), plus importantes au niveau des CSM-GW. De plus, nous avons constaté, aussi bien à l'échelle transcriptionnelle que cellulaire, qu'il est difficile d'orienter les CSM-GW vers une différenciation adipogénique contrairement aux CSM-MO.

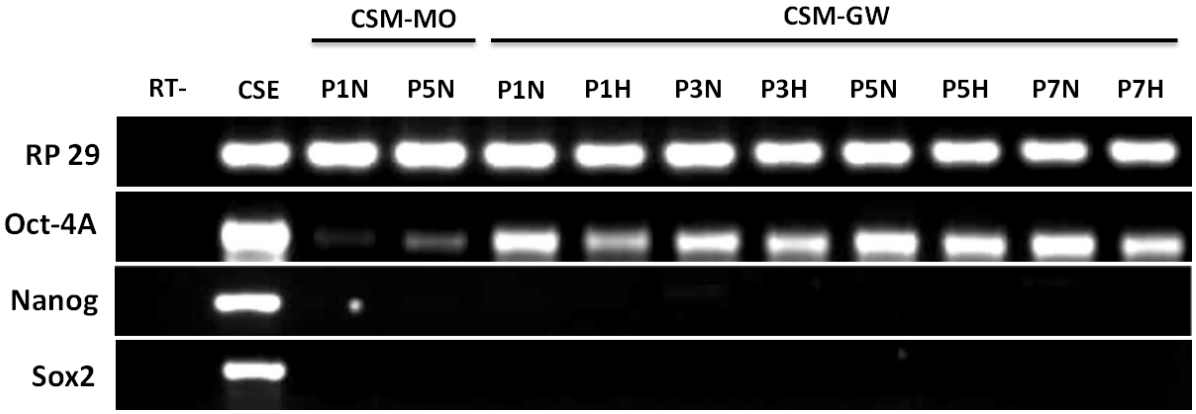


Figure 21 : Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes de pluripotence : Oct-4A, Nanog et Sox2.
Quels que soient le passage, les conditions de culture ou la source de CSM, aucune expression de Nanog et de Sox2 n'est détectée au niveau des CSM. En revanche, les CSM-GW expriment davantage Oct-4A par rapport aux CSM-MO à P1 ($p<0,05$) et P5. Il est à noter que cette expression reste faible par rapport à celle retrouvée au niveau des CSE (Cellules Souches Embryonnaires).

Ensuite, nous avons montré que l'hypoxie possède un effet bénéfique sur le potentiel de prolifération, la capacité clonogénique et dans une moindre mesure, sur l'expression d'HLA-G des CSM-GW au cours de leur amplification *in vitro*. De plus, nous avons rapporté, pour la première fois, que les conditions hypoxiques, lors de l'expansion des CSM-GW, contribuent à une augmentation de la synthèse matricielle au cours de la différenciation chondrogénique.

Enfin, cette étude a permis une large caractérisation des CSM-GW au cours des différents passages. Ainsi, nous avons montré une augmentation de la prolifération cellulaire à P3 et P5 par rapport à P1. Parallèlement, l'activité télomérase se trouve également augmentée à P3 et P5 par rapport à P1 et confirme le lien entre une activité télomérase active et la capacité proliférative des cellules. Contrairement à la différenciation ostéogénique qui semble diminuer à P7, cette étude a montré, par des colorations histologiques ainsi qu'un marquage immuno-fluorescent du collagène de type 2, un maintien de la capacité de différenciation chondrogénique des CSM-GW au cours des passages (jusqu'à P7) (**Figure 22**). L'analyse des gènes d'intérêt impliqués dans la chondrogénèse a également été effectuée au cours des passages. Cependant, l'expression de ces gènes retrouvée au niveau des micromasses contrôles (probablement due à une différenciation chondrogénique induite par un environnement de culture tridimensionnel) a rendu difficile l'analyse de ces données transcriptionnelles.

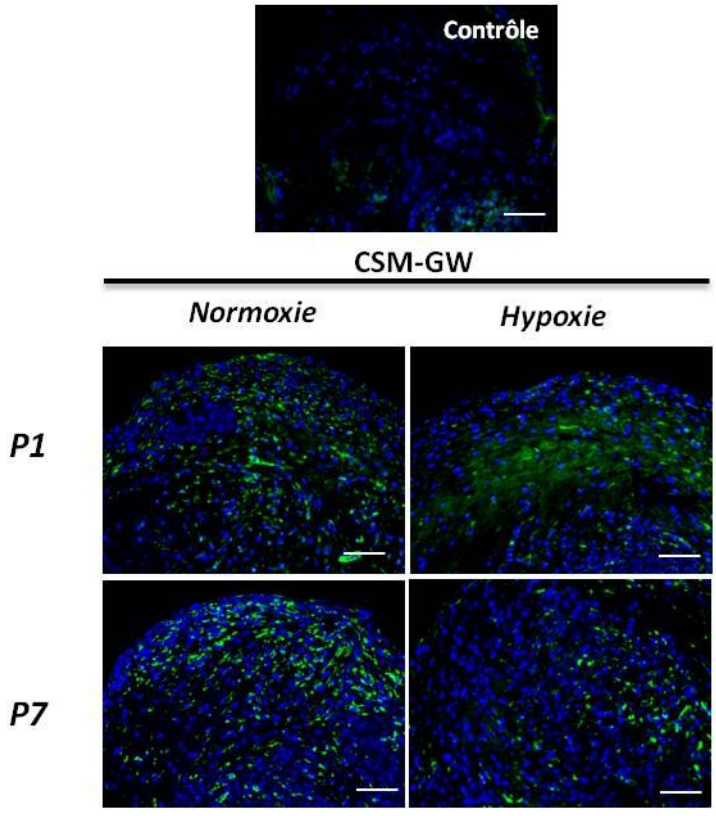


Figure 22: Maintien du potentiel chondrogénique des CSM-GW au cours de l'amplification (de P1 à P7).
Marquage immuno-fluorescent du collagène de type 2 (vert). Marquage des noyaux au DAPI (bleu). L'émission de fluorescence a été détectée par microscopie de fluorescence (DMI 3000B, Leica ; objectif X10). Echelle : 100µm.

En conclusion, notre travail a démontré que les CSM-GW peuvent représenter une source alternative de CSM avec un potentiel de prolifération jusqu'à P7 plus important que celui des CSM-MO. Les capacités de différenciations mésodermiques sont conservées, comparées aux CSM-MO, sauf pour la différenciation adipogénique. Des variations sur les différenciations ostéogéniques et chondrogéniques sont observées en fonction des passages. Enfin, l'hypoxie, au cours de l'amplification, est un paramètre à prendre en considération au regard du potentiel de prolifération et de différenciation chondrocytaire des CSM-GW.

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

306 *Current Stem Cell Research & Therapy,* **2014,** *9,* **306-318**

Hypoxic Culture Conditions for Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Wharton's Jelly: A Critical Parameter to Consider in a Therapeutic Context

Loïc Reppel[1,2,3,*], Talar Margossian[1,3], Layale Yaghi[4,5], Philippe Moreau[4,5], Nathalie Mercier[3,6], Léonore Leger[1,3], Sébastien Hupont[7], Jean-François Stoltz[1,2,3], Danièle Bensoussan[1,2,3] and Céline Huselstein[1,3]

[1]UMR 7365 CNRS – Université de Lorraine, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), Biopôle, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France; [2]CHU de Nancy, Unité de Thérapie Cellulaire et Tissulaire, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France; [3]Université de Lorraine, 54000 Nancy, France; [4]Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Institut des Maladies Emergentes et des Thérapies Innovantes, Service de Recherches en Hémato-Immunologie, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris, France; [5]Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris-Cité, UMR E5, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris, France; [6]INSERM U1116, Faculté de Médecine, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France; [7]FR3209 CNRS-Université de Lorraine, PlaTeforme d'Imagerie et de Biophysique Cellulaire et tissulaire (PTIBC IBISA), Biopôle, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Abstract: Mesenchymal Stromal/Stem Cells from human Wharton's jelly (WJ-MSC) are an abundant and interesting source of stem cells for applications in cell and tissue engineering. Their fetal origin confers specific characteristics compared to Mesenchymal Stromal/Stem Cells isolated from human bone marrow (BM-MSC). The aim of this work was to optimize WJ-MSC culture conditions for their subsequent clinical use. We focused on the influence of oxygen concentration during monolayer expansion on several parameters to characterize MSC. Our work distinguished WJ-MSC from BM-MSC in terms of proliferation, telomerase activity and adipogenic differentiation. We also showed that hypoxia had a beneficial effect on proliferation potential, clonogenic capacity and to a lesser extent, on HLA-G expression of WJ-MSC during their expansion. Moreover, we reported for the first time an increase in chondrogenic differentiation when WJ-MSC were expanded under hypoxia. In an allogeneic therapeutic context, production of clinical batches requires generating high numbers of MSC whilst maintaining the cells' properties. Considering our results, hypoxia will be an important parameter to take into account. In addition, the clinical use of WJ-MSC would provide significant numbers of cells with maintenance of their proliferation and differentiation potential, particularly their chondrogenic potential. Due to their chondrogenic differentiation potential, WJ-MSC promise to be an interesting source of MSC for cell therapy or tissue engineering for cartilage repair and/or regeneration.

Keywords: Bone marrow, differentiation, expansion, hypoxia, mesenchymal stromal/stem cells, Wharton's jelly.

INTRODUCTION

Due to their capacity for self-renewal, their ability to differentiate into multiple lineages [1] and their immunomodulatory properties [2, 3], Mesenchymal Stromal/Stem Cells (MSC) are promising tools for new tissue and cell engineering developments for regenerative medicine and other clinical applications. Moreover, a strong paracrine activity of these cells has been described [4-6]. MSC synthesize and secrete many soluble mediators, including cytokines, chemokines and growth factors [7], which, along with their secretory phenotypes, provide a microenvironment for various mechanisms, including tissue repair [8, 9], homing ability [10], trophic role [11, 12] and also contribute to the immunoregulatory properties (of these cells).

Bone marrow is usually regarded as the most common source of adult MSC [13]. However, bone marrow collection is a painful and invasive procedure with the possibility of donor site damage. In addition, it has been demonstrated that the number of available bone marrow MSC (BM-MSC) is quite low in this compartment (0.001% to 0.01% of all bone marrow mononuclear cells) [1], and their differentiation potential and proliferation capacity decrease with age [14, 15]. Consequently, the use of autologous BM-MSC for tissue repair, which in some indications concerns elderly patients, has certain limits. Thus, identifying alternative sources of MSC would be very helpful.

In 1991, fibroblast-like cells were isolated from Wharton's jelly [16], the mucoid connective tissue of the human umbilical cord. These cells have MSC properties [17, 18] according to the minimal criteria proposed by the Interna-

*Address correspondence to this author at the UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), Biopôle de l'Université de Lorraine, Campus biologie-santé, Faculté de Médecine, Avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandoeuvre- lès -Nancy, France; Tel: 03 83 15 79 38; Fax: 03 83 15 37 56; E-mail: loic.reppel@univ-lorraine.fr

2212-3946/14 $58.00+.00 **© 2014 Bentham Science Publishers**

tional Society for Cellular Therapy [19]. Mesenchymal Stromal/Stem Cells from human Wharton's jelly (WJ-MSC) adhere to plastic, express MSC surface markers (such as CD73, CD90, CD105) but not hematopoietic markers (CD34, CD45) nor class II human leukocyte antigen (HLA-DR). They are able to differentiate into cells of mesodermal origin, including adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages [20]. Moreover, they are sometimes associated with an intermediate phenotype between embryonic and adult stem cells. But, unlike the embryo, the umbilical cord is not an ethically controversial source of stem cells. Briefly, WJ-MSC maintain long telomeres even after multiple passages [21], suggesting presence of telomerase activity also reported in embryonic stem cells. In addition, they show low expression of pluripotent stem cell markers (Oct-4, Nanog, Sox2) [21, 22]. Hence, they represent an abundant and interesting source of stem cells for applications in cell and tissue engineering [23]. Compared to BM-MSC, their fetal origin confers specific characteristics. Since their first identification, a limited number of studies have been performed, especially aiming to characterize WJ-MSC during their *in vitro* expansion.

In this study, we report a wide, systematic characterization of WJ-MSC during monolayer expansion, from passage 1 to passage 7, and a comparison with standard BM-MSC. Different analyses were performed at membrane, molecular and functional levels. We focused primarily on proliferative capacity, self-renewal, differentiation potential and immunomodulatory properties exclusively related to HLA-G. As most stem cells require low oxygen environments, since hypoxia seems to play a regulatory role in the maintenance of stemness [24, 25], we also studied, during monolayer expansion, the impact of two different oxygen concentrations on all the previously mentioned parameters, including mesodermal differentiation. The originality of this study is based on the fact that cell expansion was carried out either in normoxic and hypoxic conditions, whereas cell differentiation was always performed in normoxia (Fig. **1**).

The conclusions of this work should allow us to define the optimal culture conditions of WJ-MSC for clinical use.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and Culture of WJ-MSC

Human umbilical cords were collected at the Regional Maternity of Nancy after the mothers' informed consent and complied with national legislation regarding human samples collection, manipulation and personal data protection. Umbilical cord samples were collected in 2011 and were regarded as surgical waste. Therefore, following the opinion of an ethics committee of Nancy Hospital, no authorization of this committee was necessary for umbilical cords collection. Umbilical cord samples were rinsed with 70% ethanol and Hanks' balanced salt solution (HBSS). To perform MSC isolation, the umbilical cord vessels were removed and Wharton's jelly aseptically cut into small pieces (2 to 3 mm^3) which were plated in a six-well plate with complete medium (Minimal Eagle Medium (α-MEM; Lonza, Walkersville, MD, USA) with 10% fetal bovine serum, glutamine 2 mM, penicillin 100 IU/mL, streptomycin 100 µg/mL and amphotericin B 2.5 µg/mL). They were incubated at 37°C under a humidified atmosphere with 5% CO_2 in either 21% O_2 (normoxia) or 5% O_2 (hypoxia). In hypoxia, the cells were incubated in a tri-gas incubator (MCO-18M, Sanyo) with humidified gas mixtures of composition 5% O_2, 5% CO_2 and 95% N_2. After 7 days of contact with plastic surface, as enough

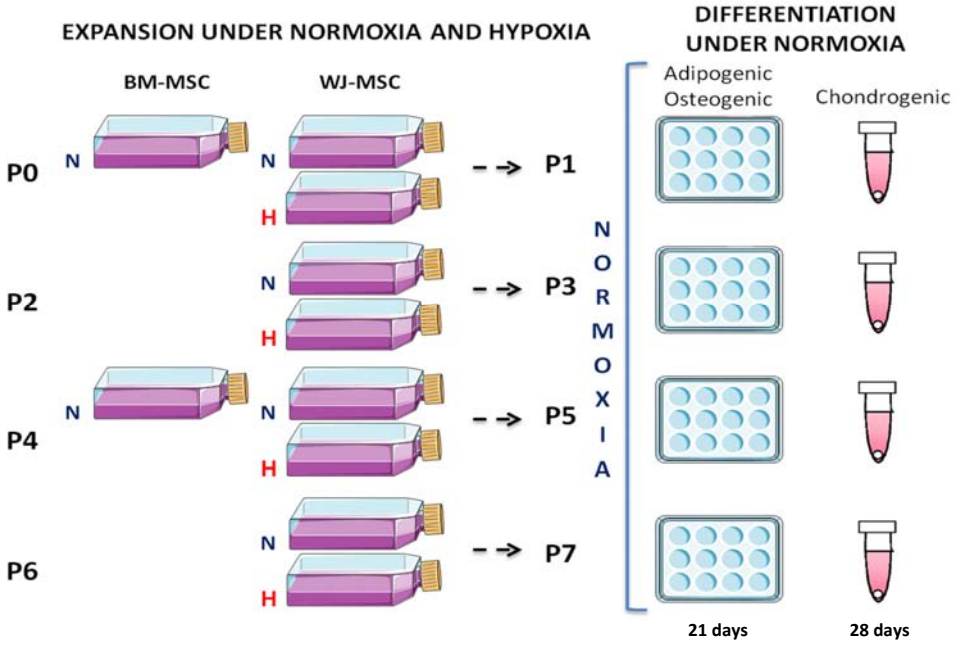


Fig. (1). Illustration of protocols used to evaluate mesodermal differentiation potential of MSC after expansion under normoxic or hypoxic conditions. Adipogenic and osteogenic differentiation was performed in monolayer cultures during 21 days. For chondrogenic differentiation, cells were grown as high-density pellets during 28 days. Abbreviations: P, passage; N, normoxia; H, hypoxia; BM-MSC, bone marrow mesenchymal stromal/stem cells; WJ-MSC, Wharton's Jelly mesenchymal stromal/stem cells.

adherent cells were obtained the pieces were removed, the medium replaced and cultures continued until cell subconfluence (80-90%). After 2 weeks, WJ-MSC were harvested with 0.25% Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and grown up to passage 7 (P7). At each passage, MSC were counted and seeded at 1000 cells/cm^2. Different parameters were evaluated at P1, P3, P5 and P7.

Isolation and Culture of BM-MSC

BM-MSC were isolated from human bone marrow obtained from total hip or knee replacement surgery after the patients' informed consent and complied with national legislation regarding human samples collection, manipulation and personal data protection. Bone marrow obtained from total hip or knee replacement surgery was also considered as surgical waste and no authorization of an ethics committee was required for its collection. Bone marrow was aspirated and diluted in HBSS. Then, nuclear cells were counted and the cell suspension was seeded at 50 000 nuclear cells/cm^2 with complete medium. BM-MSC were cultivated up to subconfluence, (P0), and harvested with Trypsin-EDTA. They were seeded with complete medium at 1 000 cells/cm^2 and grown until P5. BM-MSC were only used as a standard control at an early and a late passage, P1 and P5 respectively.

Culture of JEG-3 and U251MG Cell Lines

JEG-3 human choriocarcinoma cell line (positive control for HLA-G expression) was from ATCC (Molsheim, France). U251MG human glioblastoma cell line (negative control for HLA-G expression) was provided by Dr H. Wiendl (Department of Neurology, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany) and was initially from Dr N. de Tribolet's laboratory (Neurosurgical Service, Centre Hospitalier Universitaire, Vaudois, Lausanne, Switzerland). Both cell lines were maintained in DMEM medium supplemented with Glutamax-I (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 10% heat-inactivated FCS, fungizone (250µg/L, Invitrogen) and gentamicin (10mg/L, Invitrogen).

Cumulative Population Doubling and Culture Time

The proliferation potential of WJ-MSC during monolayer expansion was determined by the population doubling (PD), according to the following formula: PD = [log10(NH)-log10(NI)]/log10(2), where NH is the Harvested cell Number and NI is the Inoculum cell Number [26]. The cumulative population doubling was calculated by adding the PD for each passage to the PD of the previous passages. Cells were expanded to approximately 80-90% confluence, detached with 0.25% trypsin/EDTA, counted and reseeded at the same concentration of 1000 cells/cm^2 up to P7. The culture time between each passage was also determined but according to the WJ-MSC isolation technique, PD and culture time were evaluated from P1 to P7.

Clonogenicity Assays

For colony-forming-unit fibroblast (CFU-F) assays, WJ-MSC were seeded in a six-well plate, at 10 cells/cm^2 and in triplicates. They were cultured in complete medium for 10 days in either normoxic or hypoxic conditions. Then, they were washed with PBS, stained with Cristal Violet solution (Sigma) and rinsed with water. CFU-Fs of more than 50 cells were scored and data expressed as total colony number per 100 cells.

Telomerase Activity

MSC were collected, rinsed with PBS and stored at -80°C. Telomerase activity was measured using a quantitative telomerase detection kit (Allied Biotech, Inc., Vallejo, CA, USA) as previously described [27]. Briefly, frozen cells were suspended in ice-cold lysis buffer, incubated on ice for 30 min, and centrifuged at 12 000 g for 30 min. at 4°C. The supernatant was used to measure activity and determine protein content. The real-time PCR was performed with 0.40 µg of protein. As a negative control, each sample was also tested after heat inactivation. A control template standard curve allowed the calculation of the amount of template with telomeric repeat generated by telomerase. Telomerase activity was expressed as a percent of the positive control (HeLa cells activity value set to 100%).

Immunofluorescence Staining

To perform phenotypic analysis, MSC were stained as previously described [28] and 10 000 events were counted by FACSCanto I flow cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). The expression of MSC markers (CD73-PE, CD90-PE, CD105-PE, CD166-PE, CD29-FITC and CD44-FITC), hematopoietic lineage markers (CD34-PE, CD45-FITC) and immunogenicity markers (HLA-DR-FITC) were assessed.

HLA-G protein expression was studied by indirect staining and evaluated both by flow cytometry and confocal microscopy. Confocal observations of samples were carried out with a LEICA TCS SPX AOBS CLSM. Images at a 0.305 micrometer sidelength square pixel size were obtained for each case in 512 x 512 matrices at x40 magnification (numerical aperture = 0.8) of the CLSM. Fluorescence emissions were recorded within an Airy disk confocal pinhole setting (Airy 1). Cells were washed in PBS, fixed in paraformaldehyde 3% for 30 min. and permeabilized by incubation at 4°C for 10 min. with 0.1% Triton X-100 (Sigma). Anti-human HLA-G mouse IgG1 monoclonal antibody 4H84 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), which has been reported to react with all HLA-G isoforms (soluble and membrane-bound isoforms), was applied for 30 min. at 4°C. After a washing step, cells were incubated with the anti-mouse Alexa Fluor 488 secondary antibody 1:100 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 30 min. at 4°C. For confocal observation, cells were cultivated in 8-well Lab-Tek® (Nunc, Rochester, NY, USA) and nuclei were stained by To-pro-3 (10 µM; Invitrogen). Negative and isotype controls were performed. Choriocarcinoma cells JEG-3 were used as a positive control.

Mesodermal Differentiation Potential

Differentiation potential of WJ-MSC was evaluated in normoxia (37°C, 5% CO_2) with WJ-MSC cells expanded either in normoxia or hypoxia (Fig. **1**). Osteogenic and chondrogenic differentiation potential was assessed at P1, P3, P5, and P7 and adipogenic differentiation potential at P1 and P5. BM-MSC expanded in normoxic conditions were used as

controls at P1 and P5. Adipogenic and osteogenic differentiations were performed according to the manufacturer's instructions (Differentiation Media BulletKits, Lonza). To induce osteogenesis, MSC were seeded at 3.1 x 10^3 cells/cm^2 in complete medium in a 12-well plate. After 24 hours, the Osteogenesis Induction Medium (Lonza) was added to the adherent cells, the medium was replaced twice a week and the differentiation was carried on until 21 days. MSC control consisted in cultivating the cells with only basal medium. At day 21, calcium mineralization was assessed by coloration with Alizarin Red (Sigma). Cells were washed in PBS and fixed in 70% ethanol for 30 min. at 4°C followed by two wash steps in H_2O. Cells were stained in 40mM Alizarin Red pH 4.2 for 5 min. at room temperature, rinsed in H_2O, and then air dried. Red staining was observed by light microscopy.

For chondrogenic differentiation, cells were transferred into 15mL conical tubes and grown as high-density pellets (2.5 x 10^5 cells) for 28 days in chondrogenic medium. First, cells were cultured in the complete medium for 24 hours. Then, the complete medium was replaced by serum-free chondrogenic medium containing DMEM-high glucose (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with glutamine 2 mM, penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 µg/mL, amphotericin B 2.5 µg/mL, 1% Insulin-Transferrin-Selenium (BD Biosciences), 0.1 µM dexamethasone (Sigma), 50 µg/ml ascorbate-2-phosphate (Sigma), 100µg/ml sodium pyruvate (Sigma), 40 µg/ml L-proline (Sigma) and 10 ng/ml transforming growth factor β1 (TGF-β1) (Gibco). The medium was changed twice a week. MSC control consisted in culturing the cells with only basal medium. After 28 days, matrix protein synthesis was evaluated by histochemical analysis. The pellets were fixed with PBS-buffered 4% paraformaldehyde, dehydrated, embedded in paraffin blocks and cut into 5 µm thick sections. Total Collagen and proteoglycans were stained by Sirius red and Alcian Blue, respectively. Staining quantification was performed. Images of samples were carried out with a LEICA MacroFluo Z16APOA. Images at a 1.51 micrometer sidelength square pixel size were obtained for each case in 2088x1560 matrices at x2 microscope main objectif magnification and x1.8 macro zoom magnification (combined numerical aperture = 0.15). Transmitted Light images were recorded within 61% of brightness with a LEICA DFC310FX color camera and treated by image analysis software ImageJ to calculate the red or blue percentage area.

For adipogenic differentiation, MSC were seeded at 2.1 x 10^4 cells/cm^2 in complete medium in a 12-well plate and in 8-well Lab-Tek® (Nunc). At 100% confluence, three cycles of induction/maintenance were performed. Each cycle consisted in feeding MSC with supplemented Adipogenesis Induction Medium (Lonza) and culturing for 3 days, followed by 1-3 days of culture in supplemented Adipogenic Maintenance Medium (Lonza). After 3 complete cycles, MSC were incubated with Adipogenic Maintenance Medium until 21 days and the medium was replaced twice a week. MSC control consisted in culturing the cells with only Adipogenic Maintenance Medium. After 21 days, a fluorescent staining with AdipoRed™ (Lonza) was performed to detect lipid droplets. Cells seeded in 8-well Lab-Tek® were washed with PBS and incubated with 2 µl AdipoRed™ per ml PBS for 15 min. Fluorescence was observed by confocal microscopy.

RNA Extraction and Reverse Transcriptase (RT) to cDNA

MSC were rinsed with PBS and harvested by scraping on ice. Total RNA was extracted by RNeasy Plus mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA yield was evaluated by spectrophotometry and RNA quality was analyzed by electrophoresis through a 1% agarose gel. Then, RNA was reverse transcripted to cDNA using iScript™ cDNA Synthesis Kit. To exclude the possibility of contaminating genomic DNA, RNA samples were also performed without RT.

Polymerase Chain Reactions

Quantitative PCR was performed using QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) and a Light Cycler system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) during 45 cycles to quantitatively analyze gene expression. Values were normalized to expression of RP29 mRNA. Table **1** lists the specific primers used.

To study HLA-G mRNA expression, qPCR were performed in a Thermocycler ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) during 40 cycles using TaqMan Univ PCR Master Mix, a predeveloped TaqMan assay reagent GAPDH as a endogenous control (VIC reporter and TAMRA quencher) and a HLA-G-specific probe located in exon 5 (FAM reporter and TAMRA quencher) (Applied Biosystems), which target all HLA-G mRNAs [29]. Quantification was carried out relative to amounts of HLA-G transcripts in HLA-G positive JEG-3 (assigned a value of 1) using the comparative CT method: $\Delta C_T = C_{T\ HLA\text{-}G} - C_{T\ GAPDH}$; $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\ sample} - \Delta C_{T\ JEG\text{-}3}$; relative HLA-G expression = $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Semi-quantitative PCR was also performed using QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) and a Light Cycler system (Roche Diagnostics) during 38 cycles. Amplification products were resolved in 2% agarose gel, stained with GelRed (FluoProbes, Montluçon, France), and photographed using GBOX (Syngene, Frederick, MD, USA). Densitometry measurements of PCR products were achieved using image analysis software ImageJ.

Statistical Analysis

Statistical tests and graph representations were performed using graphPad Prism 5 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). All the data are presented as means ± standard error means (SEM) of three independent experiments with cells from different donors (umbilical cord and bone marrow). Significant statistical differences were calculated using one- or two-way ANOVA (analysis of variance). A p-value less than 0.05 was considered significant for the ANOVAs. If significance existed, a *post-hoc* analysis was performed using the Bonferonni post-tests to evaluate significance for all experiments.

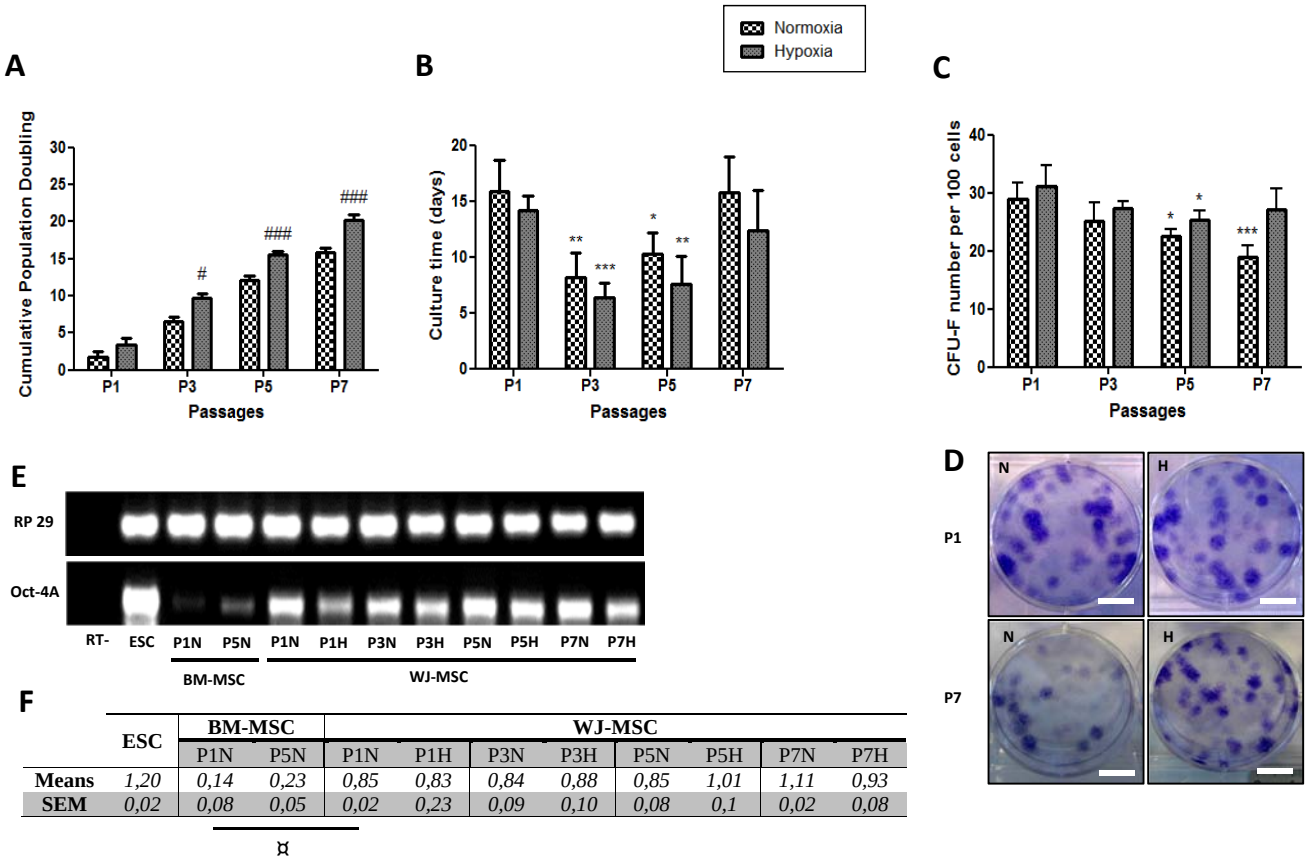
RESULTS

Proliferation and Self-Renewal of WJ-MSC

The proliferative potential of WJ-MSC was evaluated from cumulative population doubling (Fig. **2A**), culture time between each passage (Fig. **2B**) and clonogenic capacity through CFU-F number (Fig. **2C**, **2D**). Under hypoxia

Table 1. List of PCR primers used for the present study.

Name	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	TM (°)
RP29	AAGATGGGTCACCAGCAGCTCTACTG	AGACGCGGCAAGAGCGAGAA	60
GAPDH	GAGAAGGCTGGGGCTCATTT	AGTGATGGCATGGACTGTGG	60
Oct-4A	ACCTGGAGTTTGTGCCAGGGTT	CTCCCCTGCCCCCACCCTTT	60
Nanog	GATGGGAGGAGGGGAGAGGA	TTTGGAAGCTGCTGGGGAAG	60
Sox2	TTTCACGTTTGCAACTGTCC	AGTCTCCAAGCGACGAAAAA	60
HLA-G	CTGGTTGTCCTTGCAGCTGTAG	CCTTTTCAATCTGAGCTCTTCTTTCT	60
Runx2	CCCGTGGCCTTCAAGGT	CGTTACCCGCCATGACAGTA	56
Osteocalcin	GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT	TCAGCCAACTCGTCACAGTC	62
PPAR γ	TTCAGAAATGCCTTGCAGTG	CCAACAGCTTCTCCTTCTCG	58
Lipoproteinlipase	GCCGACCAAAGAAGAGATTTT	ATGAGGTGGCAAGTGTCCTC	55



F

	ESC	BM-MSC		WJ-MSC							
		P1N	P5N	P1N	P1H	P3N	P3H	P5N	P5H	P7N	P7H
Means	*1,20*	*0,14*	*0,23*	*0,85*	*0,83*	*0,84*	*0,88*	*0,85*	*1,01*	*1,11*	*0,93*
SEM	*0,02*	*0,08*	*0,05*	*0,02*	*0,23*	*0,09*	*0,10*	*0,08*	*0,1*	*0,02*	*0,08*

¤

Fig. (2). Proliferation and self-renewal capacity of WJ-MSC under normoxia and hypoxia during passages. **(A)** Cumulative population doubling. **(B)** Culture time. **(C)** Clonogenic capacity evaluated by CFU-F numbers. **(D)** Representative images of CFU-F; scale bar = 1 cm. **(E)** RT-PCR analysis of Oct-4A, the marker of pluripotency and self-renewal capacity. RP29 RNA was used as an internal control. BM-MSC were used as a standard control in **(E)** experiments. **(F)** Densitometry measurements of PCR products were achieved using image analysis software ImageJ. The values are expressed by the ratio Oct4A/RP29. The results are expressed as mean ± SEM ($n \geq 3$). # $p<0.05$ and ### $p<0.001$ (hypoxia *vs* normoxia for a same passage). *$p<0.05$, **$p<0.01$ and ***$p<0.001$ (Px *vs* P1 for a same culture condition). ¤$p<0.05$ (WJ-MSC *vs* BM-MSC for a same passage). Abbreviations: P, passage; CFU-F, colony forming unit-fibroblast; N, normoxia; H, hypoxia; BM-MSC, bone marrow mesenchymal stromal/stem cells; WJ-MSC, Wharton's Jelly mesenchymal stromal/stem cells; ND, non-detectable activity; RT-, RNA samples perform without reverse transcriptase; ESC, embryonic stem cells.

conditions, from P3 (p<0.05) and up to P7 (p<0.001), WJ-MSC significantly displayed higher cumulative population doubling compared to those cultured under normoxia conditions. The culture time was significantly lower at P3 and P5 compared to P1, especially in hypoxia (p<0.01). Clonogenic capacity significantly decreased during monolayer expansion only under normoxic conditions. The mean CFU-F number, observed at P1 and P7, were 29 ± 2.7 and 19 ± 1.9 (p<0.001), respectively. On the other hand, in hypoxia, no significant decrease in clonogenic capacities was observed during passages, except transiently at P5 compared to P1 (p<0.05).

Regardless of passage or culture conditions, no expression of Nanog and Sox2 pluripotency transcription factors was detected (data not shown). Oct-4A, an other pluripotency gene that is also involved in self-renewal capacity [30], was expressed in a higher proportion of WJ-MSC than of BM-MSC at P1 (p<0.05) although expression was low compared with that of embryonic stem cells (ESC). According to densitometry measurements, no significant difference was detected between normoxia and hypoxia (Fig. **2E**, **2F**).

Telomerase activity (TA) is often associated with actively proliferating cells [31]. As shown in Fig. (**3**), the TA of WJ-MSC was low compared to the positive control (HeLa cells), but significantly higher than the TA of BM-MSC at P5 (p<0.01). TA was significantly higher at P3 compared to P1, regardless of exposure to oxygen during culture (p<0.01) and at P5 compared with P1 in hypoxia (p<0.05). At P7, TA decreased. No significant difference between normoxic and hypoxic conditions during expansion was observed. As negative controls, each sample extract underwent telomerase inactivation by heat treatment leading to a loss of detectable telomerase activity.

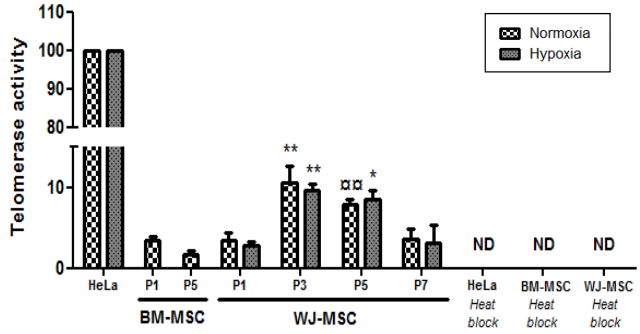


Fig. (3). Telomerase activity expressed as a percentage of the positive control (HeLa cell activity value set to 100%). Telomerase activity of HeLa cells in normoxia = 0.155 ± 0.003 amoles/µg. Telomerase activity of HeLa cells in hypoxia = 0.143 ± 0.03 amoles/µg. Inactivation of telomerase by heat treatment induced a loss of detectable telomerase activity (heat block). BM-MSC were used as a standard control. The results are expressed as mean ± SEM (n ≥ 3). *p<0.05, **p<0.01 (Px *vs* P1 for a same culture condition). ¤¤p<0.01 (WJ-MSC *vs* BM-MSC for a same passage). Abbreviations: P, passage; BM-MSC, bone marrow mesenchymal stromal/stem cells; WJ-MSC, Wharton's Jelly mesenchymal stromal/stem cells; ND, non-detectable activity.

Phenotype Profile of WJ-MSC

Flow cytometry showed that regardless of the number of passages or culture conditions, WJ-MSC were negative for the hematopoietic markers (CD34, CD45) and HLA-DR (Fig. **4A**). Less than 5% expressed these surface markers. However, as with BM-MSC, during passages and regardless of culture conditions, WJ-MSC were positive for mesenchymal markers such as CD73, CD90, CD105, CD166 (Fig. **4B**) and also for CD44 and CD29 (data not shown). Only percentages of positive cells for CD105 seemed to decrease under low oxygen content. To confirm this trend, we provided the mean fluorescent intensity and we showed that CD105 expression was down regulated in hypoxia and significantly at P3 (p<0.05). Flow cytometry analysis demonstrated the HLA-G expression of WJ-MSC compared to isotype control, but no difference of expression was observed between normoxia and hypoxia conditions at P3. This expression remained low compared to the positive control (Fig. **4C**).

HLA-G mRNA and Protein Expression

At both transcript and protein levels, HLA-G expressed by WJ-MSC was low compared to the human choriocarcinoma cell line JEG-3 (known for high expression of HLA-G) used as a positive control. Although mRNA levels were close to or below the negative control U251MG, hypoxia seemed to increase HLA-G mRNA expression of WJ-MSC, especially at P3 (Fig. **5A**). HLA-G protein expression was further investigated at this relevant passage (P3) by immunofluorescence staining. Although confocal observation showed a weak staining of few cells in hypoxia compared to normoxia, no significant difference was obtained. (Fig. **5B**).

Osteogenic and Chondrogenic Differentiation Potential

After hypoxic or normoxic expansion, osteogenic and chondrogenic differentiation was induced only under normoxic conditions during 21 days and 28 days, respectively. Osteogenic differentiation was evaluated by the matrix calcium mineralization as shown by Alizarin red staining (Fig. **6**). To study chondrogenic differentiation, matrix protein synthesis was detected after 28 days of induction. Proteoglycans and total collagen were stained by Alcian blue (Fig. **7A**) and Sirius red (Fig. **7B**), respectively and staining quantification was performed (Fig. **7C**, **7D**). According to this histological labeling, chondrogenic differentiation was maintained during passages, whereas osteogenic differentiation seemed to be more marked at passage 3 and to decrease at passage 7. Alcian blue and Sirius red quantification showed that hypoxia expansion promoted chondrogenic differentiation and especially at P1 and P5 (p<0,01). At transcript level, osteogenic markers (RunX2 and osteocalcin (OTC)) were expressed during passages but both seemed to decrease at passage 7, confirming the histological findings (Fig. **6M-6N**). Regardless of expansion conditions, osteogenic differentiation capacity of WJ-MSC was maintained. Alcian blue staining and osteogenic differentiation exhibited no difference between WJ-MSC and the standard control BM-MSC.

Adipogenic Differentiation Potential

Adipogenic differentiation was assessed by detection of lipid droplets, after 21 days of induction under normoxic conditions, by a fluorescent staining with AdipoRed™ (Fig. **8A-8H**). Regardless of culture conditions, WJ-MSC adipogenic differentiation was less evident than in BM-MSC.

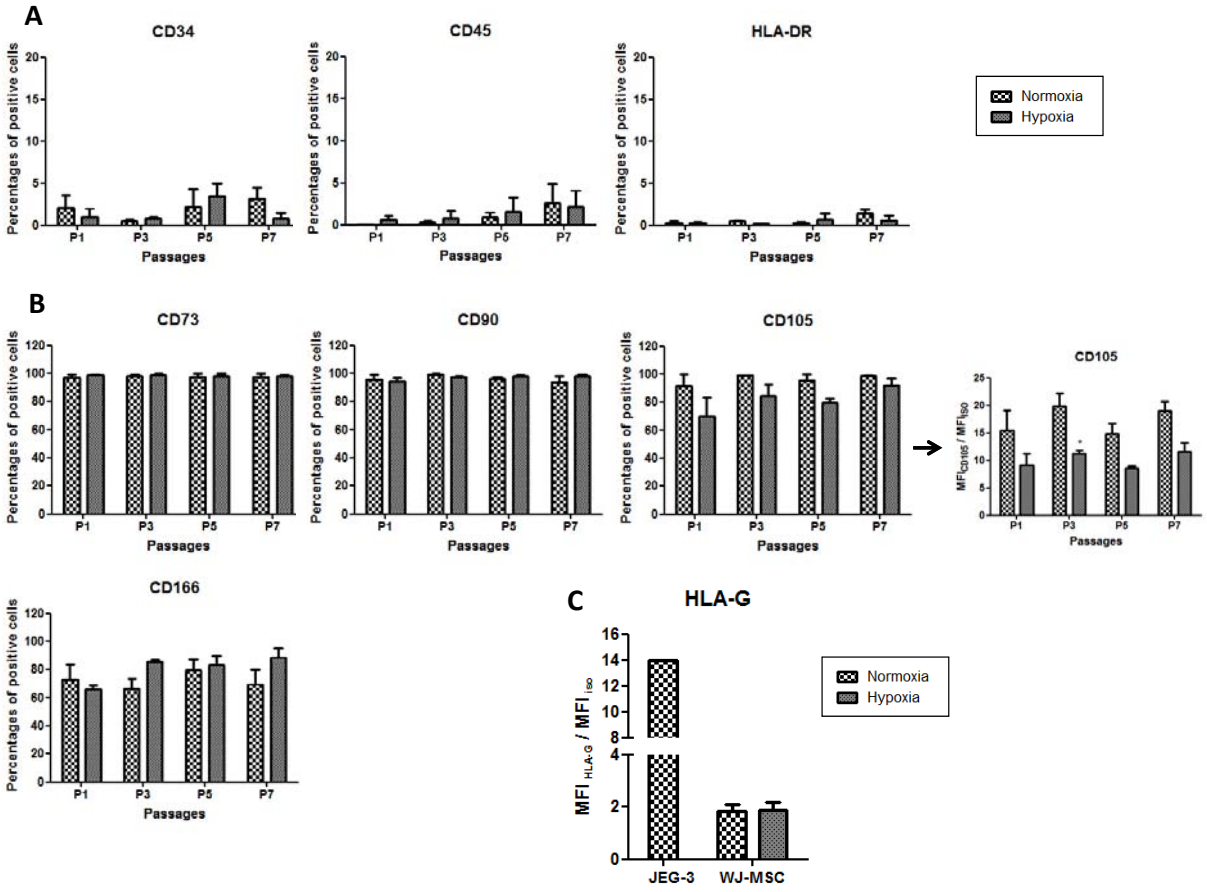


Fig. (4). Immunophenotypic analysis of WJ-MSC by flow cytometry during monolayer expansion in normoxia and hypoxia. **(A)** hematopoietic markers and Major Histocompatibility Complex class II molecule. **(B)** mesenchymal surface markers. The results are shown as percentages of positive cells and means fluorescent intensities (MFI), only for CD105 marker. CD105 expression level is expressed by the ratio of MFI with anti-CD105 antibody and MFI with isotype control. **(C)** HLA-G expression at P3. HLA-G expression level is expressed by the ratio of MFI with anti-HLA-G antibody and MFI with isotype control. The results are expressed as mean ± SEM. (*n* = 3). Abbreviations: MFI, mean fluorescence intensity; P, passage; JEG-3, Choriocarcinoma cells; WJ-MSC, Wharton's Jelly mesenchymal stromal/stem cells.

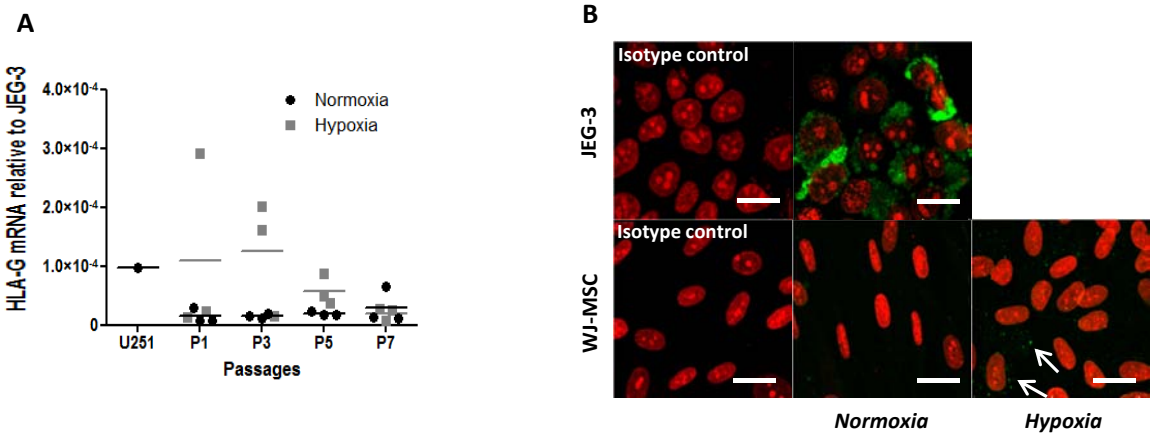


Fig. (5). HLA-G mRNA and protein expression. **(A)** HLA-G mRNA expression by qRT-PCR analysis at P1 to P7 under normoxia and hypoxia. JEG-3 cells were used as a positive control and U251 cells as a negative control. HLA-G protein expression evaluated by immunofluorescence at P3 under normoxia and hypoxia, then observed by confocal microscopy **(B)**. **(B)** Cells were labeled with anti-human HLA-G mouse IgG1 monoclonal antibody 4H84 and anti-mouse Alexa Fluor 488 secondary antibody (green), nuclei were stained by To-pro-3 (red); scale bar = 25 µm. The results are expressed as mean ± SEM (*n* = 3). Abbreviations: P, passage; JEG-3, Choriocarcinoma cells; WJ-MSC, Wharton's Jelly mesenchymal stromal/stem cells. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper).

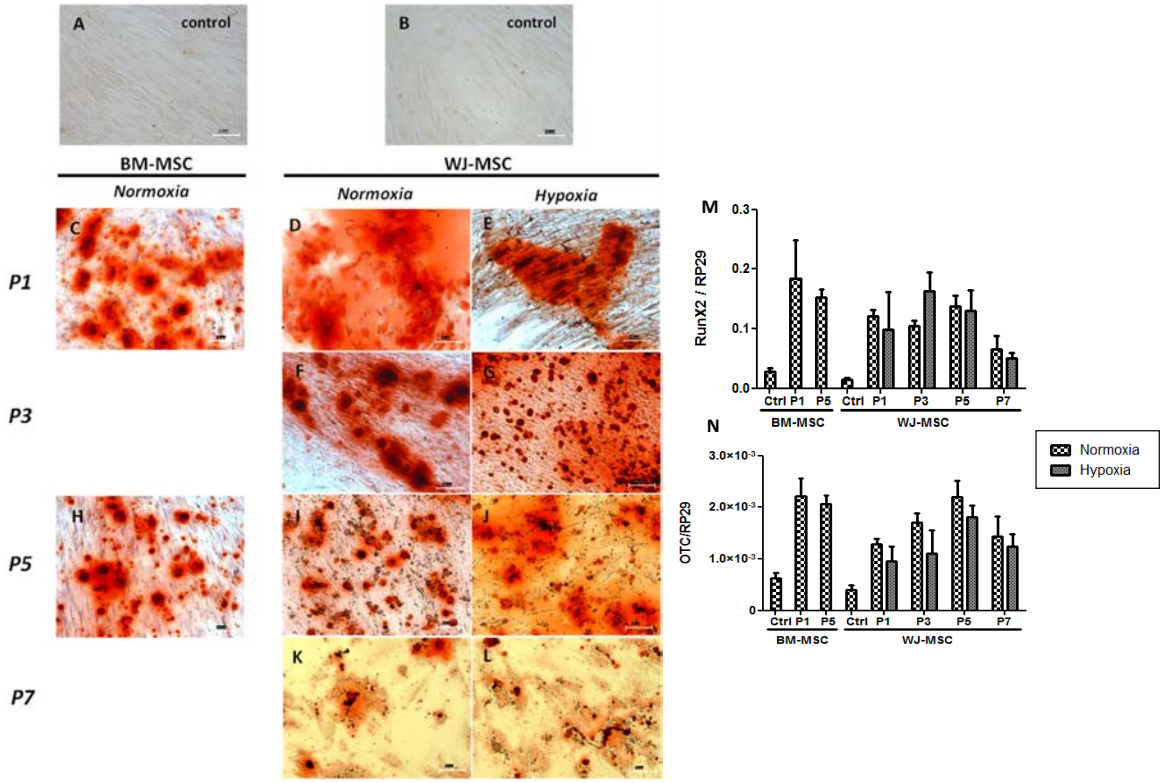


Fig. (6). Osteogenic potential of WJ-MSC. Evaluation of calcium mineralization after 21 days of osteogenic differentiation (monolayer) by coloration with Alizarin Red and observation by light microscopy. WJ-MSC were expanded either in normoxic and hypoxic conditions and differentiated in normoxia at P1 **(D, E)**, P3 **(F, G)**, P5 **(I, J)** and P7 **(K, L)**. BM-MSC were used as a standard control **(C, H)**. Control cultures (nonosteogenic conditions) were stained in parallel **(A, B)**. All representative images are shown at a magnification of X100. **(M, N)** RunX2 and OTC mRNA relative expression by qRT-PCR analysis. Values were normalized to expression of RP29 mRNA. The results are expressed as mean ± SEM (n = 3). Abbreviations: P, passage; BM-MSC, bone marrow mesenchymal stromal/stem cells; WJ-MSC, Wharton's Jelly mesenchymal stromal/stem cells; OTC, osteocalcin. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper).

In addition, the low oxygen content during WJ-MSC expansion seemed to inhibit their adipogenic differentiation potential. Gene expression involved in adipogenesis (peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPARγ) and lipoprotein lipase (LPL)) was analyzed by qRT-PCR which confirmed these results (Fig. **8I**-**8J**). After induction, the expression of PPARγ and LPL mRNA in WJ-MSC was significantly lower than in BM-MSC at passage 1 (p<0.01) and passage 5 (p<0.05). At passage 5, WJ-MSC-PPARγ expression significantly decreased only when cells were expanded in hypoxic conditions (p<0.05). At passage 1, WJ-MSC-LPL expression was significantly lower after cell expansion in hypoxia (p<0.01).

DISCUSSION

Wharton's jelly is an alternative and attractive source of MSC for the development of new approaches in cell and tissue engineering. The aim of this work was to optimize WJ-MSC culture conditions and thereby define optimal conditions for clinical use. Moreover, our study allowed an extended characterization of WJ-MSC during passages and under two culture conditions: normoxia and hypoxia. Thus, we thoroughly studied the impact of oxygen concentration, during monolayer expansion, on the maintenance of WJ-MSC properties.

Our work identified differences between WJ-MSC and BM-MSC, particularly concerning proliferation and adipogenic differentiation. Baksh *et al.* have previously demonstrated the higher proliferative potential of WJ-MSC compared to BM-MSC [13]. This may be related to an increase in self-renewal as well as in telomerase activity. Transcription factor Oct-4 is known to be directly implicated in self-renewal [30]. We observed the expression of Oct-4 both in normoxic and hypoxic conditions, which is consistent with previous reports [26, 32], although Oct-4 expression remained weak compared with that of embryonic stem cells. However, Oct-4 expression was more marked (significant at P1) in WJ-MSC than in BM-MSC which argues for their more immature profile compared to adult MSC. Pluripotency is characterized by the expression of pluripotent stem cell markers including Oct-4 but also Nanog and Sox2. Unlike some studies which demonstrated Nanog and Sox2 expression by WJ-MSC [21, 33], we did not find any evidence of expression of these two transcription factors in WJ-MSC, regardless of the number of passages or culture conditions. However, these results do not favor pluripotency but confirm Oct-4 is also involved in self-renewal.

Telomerase, related to the proliferative potential of cells [31], is expressed in most human tumor tissue and in embryonic stem cells [34]. It is not found in normal tissue except

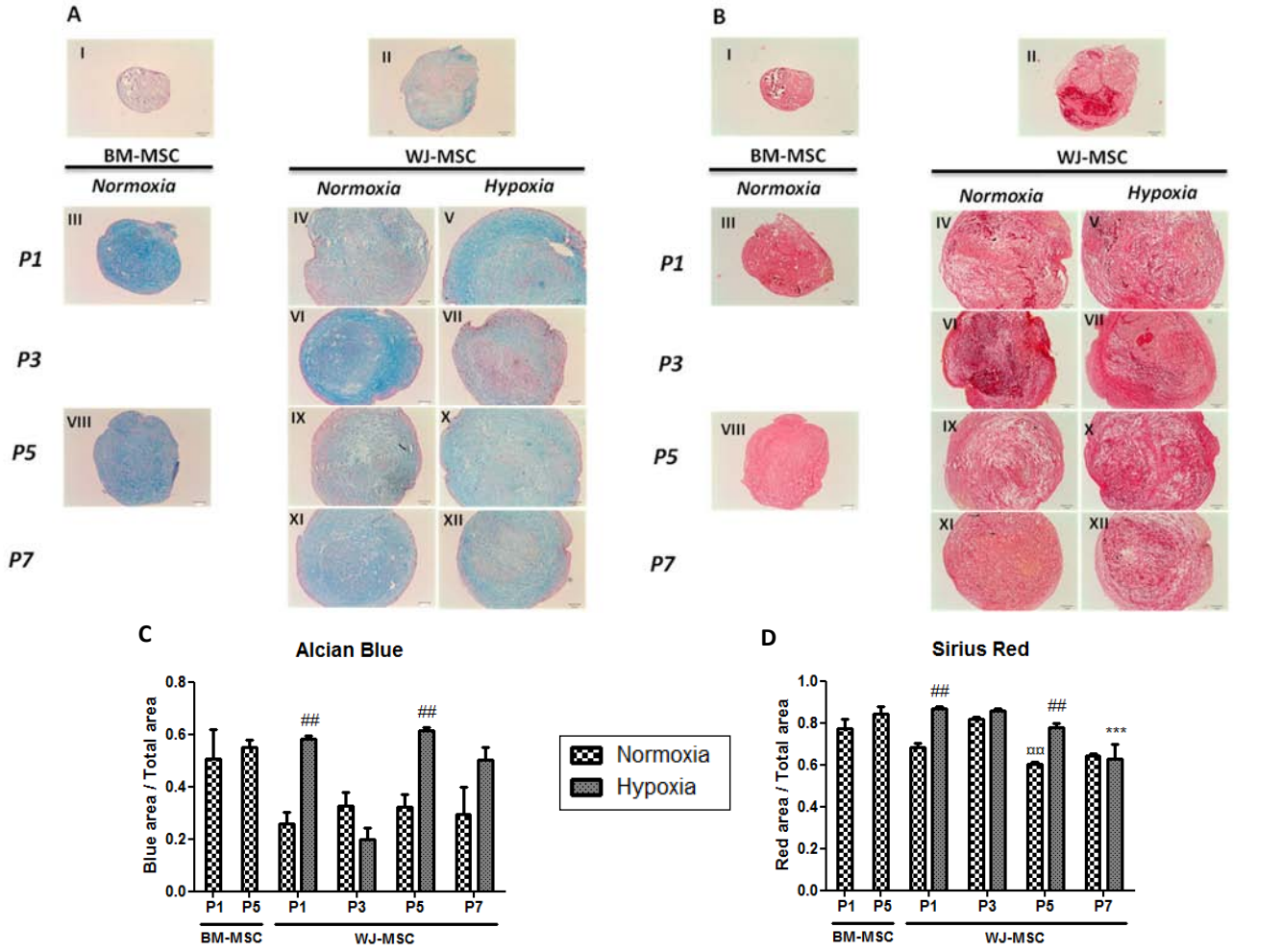


Fig. (7). Chondrogenic potential of WJ-MSC. Evaluation of matrix protein synthesis after 28 days of chondrogenic differentiation (pellet) and observation by LEICA MacroFluo Z16APOA at x2 microscope main objectif magnification and x1.8 macro zoom magnification (combined numerical aperture = 0.15). Proteoglycans and total collagen were stained by Alcian blue **(A)** and Sirius red **(B)** respectively. WJ-MSC were expanded either in normoxic or hypoxic conditions and differentiated in normoxia at P1 (IV,V), P3 (VI,VII), P5 (IX,X) and P7 (XI,XII). BM-MSC were used as a standard control (III,VIII). Control cultures (nonchondrogenic conditions) were stained in parallel (I,II); scale bar = 100 µm. **(C)** Alcian blue quantification. **(D)** Sirius red quantification. The results are expressed as mean ± SEM (*n* = 3). ## p<0.01 (hypoxia vs normoxia for a same passage). ***p<0.001 (Px vs P1 for a same culture condition). ¤¤p<0.01 (WJ-MSC vs BM-MSC for a same passage). Abbreviations: P, passage; BM-MSC, bone marrow mesenchymal stromal/stem cells; WJ-MSC, Wharton's Jelly mesenchymal stromal/stem cells. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper).

that of the germline. The TA of adult stem cells is very low [35] or not detectable [36]. A high TA is specifically associated with immortal cells, including cancer cells, whereas a low TA results in cellular senescence and growth arrest [37]. According to our results, despite a relatively low TA compared to HeLa cells, WJ-MSC have a significantly more marked TA at P5 than BM-MSC do. However, our results revealed no difference in TA under normoxic and hypoxic conditions, although an influence of hypoxia has been reported with BM-MSC when cultured under 1% O_2, by Tsai *et al.* [38]. In addition to the impact of oxygen, other factors are known to be involved in TA regulation [39]. Molecular mechanisms such as protein phosphorylation for example [40], but also some steroid hormones such as estrogen can have an effect on TA regulation. Indeed, some studies have shown that 17β-estradiol up-regulated TA [41, 42]. Several decades ago, a plasma estrogen peak was reported in pregnant women just before delivery [43]. More recently, Tekkatte *et al.* demonstrated the presence of estradiol in umbilical cord blood serum [44]. Its presence might interfere with MSC from Wharton's jelly and influence their TA. Moreover, it has been shown that addition of 17β-estradiol increased BM-MSC proliferation [45]. This could explain why WJ-MSC have a higher proliferative potential than BM-MSC. Therefore, the increased TA of WJ-MSC may not be enhanced by hypoxia, since hormonal impregnation might mask the effect of hypoxia. In addition, it may be that TA cannot be increased beyond a certain threshold unlike in tumor cells. However, TA of WJ-MSC remains very low compared to that of abnormal cells, which argues for the safety of WJ-MSC. The present work also demonstrated that Oct-4 expression and telomerase activity of WJ-MSC are related to higher self-renewal and proliferation capacities compared to BM-MSC.

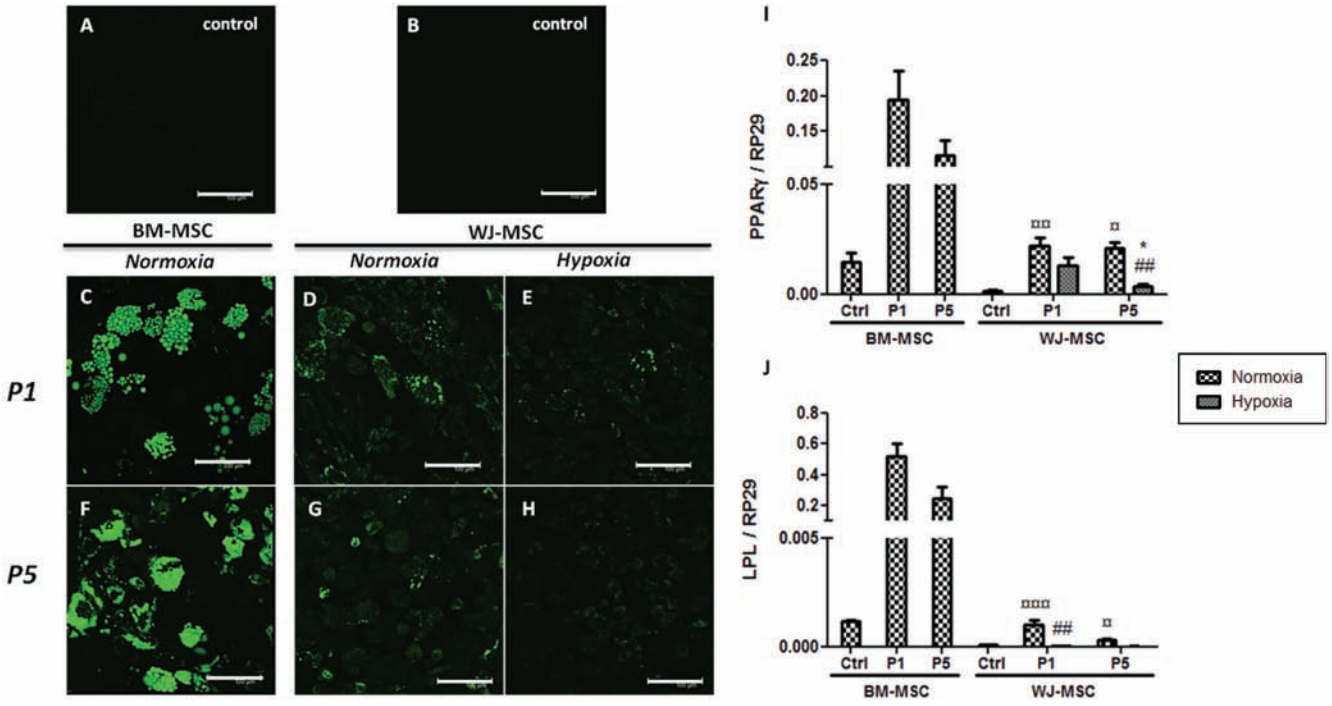


Fig. (8). Adipogenic potential of WJ-MSC. Detection of lipid droplets after 21 days of adipogenic differentiation (monolayer) by fluorescent staining with AdipoRed™ (green) and observation by confocal microscopy. WJ-MSC were expanded either in normoxic or hypoxic conditions and differentiated in normoxia at P1 **(D, E)** and P5 **(G, H)**. BM-MSC were used as a standard control **(C, F)**. Control cultures (nonadipogenic conditions) were stained in parallel **(A, B)**; scale bar = 100 µm. **(I, J):** PPARγ and LPL mRNA relative expression by qRT-PCR analysis. Values were normalized to expression of RP29 mRNA. The results are expressed as mean ± SEM (n = 3). *p<0.05 (Px *vs* P1 for a same culture condition). ¤p<0.05, ¤¤p<0.01 and ¤¤¤p<0.001 (WJ-MSC *vs* BM-MSC for a same passage). ##p<0.01 (hypoxia vs normoxia for a same passage). Abbreviations: BM-MSC, bone marrow mesenchymal stromal/stem cells; WJ-MSC, Wharton's Jelly mesenchymal stromal/stem cells; PPARγ, peroxisome proliferator-activated receptor-γ; LPL, lipoprotein lipase; Ctrl, control; P, passage. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper).

Moreover, our study demonstrated that, at both cellular and molecular levels, regardless of culture conditions, adipogenic differentiation was more difficult to induce in WJ-MSC than in BM-MSC. This is inconsistent with some publications that described adipogenic differentiation of WJ-MSC [13, 21, 46]. However, recently, Ragni *et al.* shown that MSC potential towards adipogenic lineage can be greatly affected by tissue of origin and, more likely, by type of source, either adult or fetal [47]. Peroxysome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) is a transcription factor that plays a central role in adipocyte gene expression and its activation stimulates adipogenesis [48, 49]. It was reported recently that 17β-estradiol interferes with PPARγ and down-regulates adipocyte-specific gene expression, resulting in adipogenesis inhibition [48]. As previously mentioned, 17β-estradiol impregnation could explain repressed adipogenesis of WJ-MSC. Finally, 17β-estradiol has a positive effect on TA [42] and MSC proliferation, but down-regulates adipogenesis through inhibition of PPARγ actions. This is why it would be interesting to know whether estradiol in umbilical cord blood serum interferes with and influences the properties of WJ-MSC.

Our study also showed an influence of hypoxic conditions on proliferative and clonogenic capacities, surface markers, HLA-G expression, adipogenic and chondrogenic differentiation of WJ-MSC. However, no effect was observed on TA, pluripotency gene expression and osteogenic differentiation. Our results also confirmed that hypoxia has a beneficial effect on proliferative and clonogenic capacities of WJ-MSC during their expansion. The effect of hypoxic conditions on proliferation and clonogenic capacity was previously reported with BM-MSC [50] and also with WJ-MSC [51, 52], although TA and Oct-4 up-regulation could not be detected. A recent study showed that hypoxia promotes the activation of cell cycle by up-regulating of cyclins or CDKs in adult MSC [53]. Meanwhile, other works demonstrated that CDK inhibitors such as p16, p21 and/or p27 were down-regulated in hypoxic conditions [53, 54]. In a therapeutic context, it is important to generate high numbers of MSC during *in vitro* expansion in order to produce clinical batches of cells. Therefore hypoxia is an important parameter to consider.

In the present study, we highlighted that hypoxia had a negative impact on CD105 expression but no effect on other marker expression. Up to now, controversial results were reported. Nekanti *et al.* showed no difference in mesenchymal markers expression between normoxia and hypoxia [51] whereas a recent study, demonstrated that mesenchymal markers (CD73, CD90 and CD105) were down-regulated in hypoxic cultures [55]. Similar results to ours have been reported with MSC from adipose tissue [56].

A key property of MSC is their immunomodulatory capacity which involves cell-to-cell contacts and different molecules and paracrine factors, including HLA-G. HLA-G contributes to the suppression of natural killer (NK) cytotoxicity activity [57] and the inhibition of T-cell alloproliferation [58]. Although HLA-G has been detected previously in WJ-MSC [21, 59], we found the protein weakly expressed when compared to choriocarcinoma cells, and mRNA quantification confirmed those results. Recently, Deschaseaux *et al.* have also shown a low protein expression of soluble isoform HLA-G5 in BM-MSC, with a ratio of mean fluorescence intensity equal to 1 [60]. According to a study, soluble HLA-G5 would be the main isoform expressed by MSC [58]. Nevertheless, in some WJ-MSC strains, hypoxia seemed to increase HLA-G transcript expression. It was previously reported that HLA-G transcriptional activity was inducible in melanoma cells exposed to the hypoxia-mimicking desferrioxamine (DFX) [61], and in cultures of extravillous cytotrophoblasts exposed to low oxygen concentrations [62]. However, we were not able to confirm these results by immunofluorescence staining. A further study focusing on soluble HLA-G isoforms (especially HLA-G5, previously reported as the main isoform expressed by adult MSC [58]) could be performed. Moreover, it has been shown that cytokines (IL-10 for example) can up-regulate adult-MSC HLA-G expression [58]. Thus, it would be interesting to see whether these cytokines enhance HLA-G expression in WJ-MSC and whether this expression has a functional implication by increasing their immunomodulatory effect.

We observed that hypoxia worsened the adipogenic differentiation potential of WJ-MSC during expansion, unlike Valorani *et al.* who reported that MSC from adipose tissue increased differentiation into adipocytes under hypoxia [63]. Moreover, our study reported for the first time an increase in chondrogenic differentiation when WJ-MSC were expanded under hypoxia (significant at P1 and P5). Recent similar results were obtained from BM-MSC [64].

Finally, our study reported a wide and systematic characterization of WJ-MSC during passages. Our data showed a higher proliferation at P3 and P5 compared to P1. Similarly, TA was increased at P3 and P5 compared to P1 and therefore, confirmed that TA was related to the proliferative potential of cells. Our results also showed multilineage differentiation potential of WJ-MSC, particularly for osteogenesis and chondrogenesis. Although such results have been reported previously [13, 46] this is the first study to show a sustained chondrogenic differentiation potential of WJ-MSC during expansion (until passage 7) irrespective of oxygen exposure. We did not observe the same stability for osteogenic potential. Gene expression involved in chondrogenesis (Sox9, cartilage oligo matrix protein (COMP) and type IIa collagen (Col2A)) was also expressed during passages. However, as the control groups were also positive for chondrogenic markers, especially Sox9, probably due to 3D chondrogenic induction, we were not able to draw any conclusions (data not shown). Chondrogenic characteristics found in the control pellets, only at transcript level, corresponded with those of previous reports [17]. Due to their chondrogenic differentiation potential, WJ-MSC promise to be a source of MSC for cell therapy and tissue engineering for cartilage repair and/or regeneration.

CONCLUSIONS

In conclusion, our work demonstrates that WJ-MSC could be a promising alternative source of MSC, with a higher proliferation potential than BM-MSC, due to their self-renewal and increased TA, and a preserved capacity to differentiate into osteogenic and chondrogenic lineages. Despite the presence of TA, it remains very low, which argues for the safety of WJ-MSC in a therapeutic context. In an allogeneic clinical use prospect, MSC production in clinical batches requires the generation of high numbers of cells. Considering our results, hypoxia during cell expansion will be an important parameter to take into account regarding proliferation potential but also chondrogenic differentiation potential. However, before any therapeutic use of these cells, it is necessary to consider a thorough study of immunomodulatory properties and evaluate their genetic stability.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the PIR-CNRS "vieillissement-longévité" and the "Conseil Regional de Lorraine". L.Y was supported by IRTELIS fellowship from CEA and Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer. The authors would like to thank M. Wattenhofer-Donze and H. Puccio (IGBMC, Illkirch, France) for their contribution to the study of pluripotency factors expression. Confocal microscopy images were obtained thanks to the "PlaTeforme d'Imagerie et de Biophysique Cellulaire et Tissulaire IBISA" (FR3209 CNRS - PTIBC IBISA Nancy, France) (D. Dumas, S. Hupont). Finally, the authors would like to thank the team of Professor Pourquié (IGBMC, Illkirch, France) for providing the RNA from human embryonic stem cells line H1.

ABBREVIATIONS

BM-MSC	=	Bone marrow-Mesenchymal stromal/stem cells
CFU-F	=	Colony forming units-fibroblast
Col2A	=	Type IIa collagen
COMP	=	Cartilage oligo matrix protein
HBSS	=	Hanks' balanced salt solution
LPL	=	Lipoprotein lipase
MFI	=	Mean fluorescence intensity
MSC	=	Mesenchymal stromal/stem cells
NK	=	Natural killer
OTC	=	Osteocalcin
P	=	Passage
PBS	=	Phosphate-buffered saline
PCR	=	Polymerase chain reaction
PD	=	Population doubling
PPARγ	=	Peroxysome proliferator-activated receptor γ
RT	=	Reverse transcriptase

TA = Telomerase activity

WJ-MSC = Wharton's jelly-Mesenchymal stromal/stem cells

REFERENCES

[1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284(5411): 143-7.

[2] Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, *et al.* Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. Blood 2006; 107(1): 367-72.

[3] Menard C, Tarte K. [Immunosuppression and mesenchymal stem cells: back to the future]. Med Sci (Paris) 2011; 27(3): 269-74.

[4] Baglio SR, Pegtel DM, Baldini N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. Front Physiol 2012; 3: 359.

[5] Roche S, D'Ippolito G, Gomez LA, *et al.* Comparative analysis of protein expression of three stem cell populations: models of cytokine delivery system *in vivo*. Int J Pharm 2012; 440(1): 72-82.

[6] Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. Circ Res 2008; 103(11): 1204-19.

[7] Yoon JH, Roh EY, Shin S, *et al.* Comparison of Explant-Derived and Enzymatic Digestion-Derived MSCs and the Growth Factors from Wharton's Jelly. Biomed Res Int 2013; 2013: 428726.

[8] Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. J Cell Biochem 1994; 56(3): 283-94.

[9] Prockop DJ. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. Mol Ther 2009; 17(6): 939-46.

[10] Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. Cell Stem Cell 2009; 4(3): 206-16.

[11] Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J Cell Biochem 2006; 98(5): 1076-84.

[12] Wu L, Prins HJ, Helder MN, van Blitterswijk CA, Karperien M. Trophic effects of mesenchymal stem cells in chondrocyte co-cultures are independent of culture conditions and cell sources. Tissue Eng Part A 2012; 18(15-16): 1542-51.

[13] Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. Stem Cells 2007; 25(6): 1384-92.

[14] Zaim M, Karaman S, Cetin G, Isik S. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. Ann Hematol 2012; 91(8): 1175-86.

[15] Fossett E, Khan WS, Pastides P, Adesida AB. The effects of ageing on proliferation potential, differentiation potential and cell surface characterisation of human mesenchymal stem cells. Curr Stem Cell Res Ther 2012; 7(4): 282-6.

[16] McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT, McLean WH. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. Biochem Soc Trans 1991; 19(1): 29S.

[17] Wang HS, Hung SC, Peng ST, *et al.* Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cells 2004; 22(7): 1330-7.

[18] Kim DW, Staples M, Shinozuka K, Pantcheva P, Kang SD, Borlongan CV. Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications. Int J Mol Sci 2013; 14(6): 11692-712.

[19] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006; 8(4): 315-7.

[20] Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. Stem Cells 2008; 26(3): 591-9.

[21] La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, *et al.* 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 2009; 131(2): 267-82.

[22] Fong CY, Richards M, Manasi N, Biswas A, Bongso A. Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. Reprod Biomed Online 2007; 15(6): 708-18.

[23] Chen X, Zhang F, He X, *et al.* Chondrogenic differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in type I collagen-hydrogel for cartilage engineering. Injury 2013; 44(4): 540-9.

[24] Ma T, Grayson WL, Frohlich M, Vunjak-Novakovic G. Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues. Biotechnol Prog 2009; 25(1): 32-42.

[25] Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. Cell Stem Cell 2010; 7(2): 150-61.

[26] Nekanti U, Mohanty L, Venugopal P, Balasubramanian S, Totey S, Ta M. Optimization and scale-up of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications. Stem Cell Res 2010; 5(3): 244-54.

[27] Cattan V, Mercier N, Gardner JP, *et al.* Chronic oxidative stress induces a tissue-specific reduction in telomere length in CAST/Ei mice. Free Radic Biol Med 2008; 44(8): 1592-8.

[28] Margossian T, Reppel L, Makdissy N, Stoltz JF, Bensoussan D, Huselstein C. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly: comparative phenotype analysis between tissue and *in vitro* expansion. Biomed Mater Eng 2012; 22(4): 243-54.

[29] Moreau P, Mouillot G, Rousseau P, Marcou C, Dausset J, Carosella ED. HLA-G gene repression is reversed by demethylation. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100(3): 1191-6.

[30] Tsai CC, Su PF, Huang YF, Yew TL, Hung SC. Oct4 and Nanog directly regulate Dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells. Mol Cell 2012; 47(2): 169-82.

[31] Blagoev KB. Cell proliferation in the presence of telomerase. PLoS One 2009; 4(2): e4622.

[32] Zhang HT, Chen H, Zhao H, Dai YW, Xu RX. Neural stem cells differentiation ability of human umbilical cord mesenchymal stromal cells is not altered by cryopreservation. Neurosci Lett 2011; 487(1): 118-22.

[33] Tong CK, Vellasamy S, Tan BC, *et al.* Generation of mesenchymal stem cell from human umbilical cord tissue using a combination enzymatic and mechanical disassociation method. Cell Biol Int 2010; 35(3): 221-6.

[34] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282(5391): 1145-7.

[35] Chiu CP, Dragowska W, Kim NW, *et al.* Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. Stem Cells 1996; 14(2): 239-48.

[36] Zimmermann S, Voss M, Kaiser S, Kapp U, Waller CF, Martens UM. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. Leukemia 2003; 17(6): 1146-9.

[37] Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, *et al.* Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. Nat Biotechnol 2002; 20(6): 592-6.

[38] Tsai CC, Chen YJ, Yew TL, *et al.* Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. Blood 2011; 117(2): 459-69.

[39] Gladych M, Wojtyla A, Rubis B. Human telomerase expression regulation. Biochem Cell Biol 2011; 89(4): 359-76.

[40] Liu JP. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. FASEB J 1999; 13(15): 2091-104.

[41] Misiti S, Nanni S, Fontemaggi G, *et al.* Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. Mol Cell Biol 2000; 20(11): 3764-71.

[42] Cha Y, Kwon SJ, Seol W, Park KS. Estrogen receptor-alpha mediates the effects of estradiol on telomerase activity in human mesenchymal stem cells. Mol Cells 2008; 26(5): 454-8.

[43] Plotka ED, Seal US, Verme LJ, Ozoga JJ. Reproductive steroids in the white-tailed deer (Odocoileus virginianus borealis). II. Progesterone and estrogen levels in peripheral plasma during pregnancy. Biol Reprod 1977; 17(1): 78-83.

[44] Tekkatte C, Vidyasekar P, Kapadia NK, Verma RS. Enhancement of adipogenic and osteogenic differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by supplementation with umbilical cord blood serum. Cell Tissue Res 2012; 347(2): 383-95.

[45] Hong L, Zhang G, Sultana H, Yu Y, Wei Z. The effects of 17-beta estradiol on enhancing proliferation of human bone marrow mesenchymal stromal cells *in vitro*. Stem Cells Dev 2011; 20(5): 925-31.

[46] De Bruyn C, Najar M, Raicevic G, *et al.* A rapid, simple, and reproducible method for the isolation of mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly without enzymatic treatment. Stem Cells Dev 2011; 20(3): 547-57.

[47] Ragni E, Vigano M, Parazzi V, *et al.* Adipogenic potential in human mesenchymal stem cells strictly depends on adult or foetal tissue harvest. Int J Biochem Cell Biol 2013; 45(11): 2456-66.

[48] Jeong S, Yoon M. 17beta-Estradiol inhibition of PPARgamma-induced adipogenesis and adipocyte-specific gene expression. Acta Pharmacol Sin 2011; 32(2): 230-8.

[49] Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. Annu Rev Biochem 2012; 81: 715-36.

[50] Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun 2007; 358(3): 948-53.

[51] Nekanti U, Dastidar S, Venugopal P, Totey S, Ta M. Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia. Int J Biol Sci 2010; 6(5): 499-512.

[52] Lopez Y, Seshareddy K, Trevino E, Cox J, Weiss M. Evaluating the impact of Oxygen Concentration and Plating Density on Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stromal Cells. Open Tissue Eng Regen Med J 2011; 4: 82-94.

[53] Sun LY, Pang CY, Li DK, *et al.* Antioxidants cause rapid expansion of human adipose-derived mesenchymal stem cells via CDK and CDK inhibitor regulation. J Biomed Sci 2013; 20(1): 53.

[54] Palumbo S, Tsai TL, Li WJ. Macrophage Migration Inhibitory Factor Regulates AKT Signaling in Hypoxic Culture to Modulate Senescence of Human Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells Dev 2014; 23(8): 852-65.

[55] Majumdar D, Bhonde R, Datta I. Influence of ischemic microenvironment on human Wharton's Jelly mesenchymal stromal cells. Placenta 2013; 34(8): 642-9.

[56] Roemeling-van Rhijn M, Mensah FK, Korevaar SS, *et al.* Effects of Hypoxia on the Immunomodulatory Properties of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem cells. Front Immunol 2013; 4: 203.

[57] Moffett A, Loke YW. The immunological paradox of pregnancy: a reappraisal. Placenta 2004; 25(1): 1-8.

[58] Selmani Z, Naji A, Gaiffe E, *et al.* HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells. Transplantation 2009; 87(9 Suppl): S62-6.

[59] Liu S, Yuan M, Hou K, *et al.* Immune characterization of mesenchymal stem cells in human umbilical cord Wharton's jelly and derived cartilage cells. Cell Immunol 2012; 278(1-2): 35-44.

[60] Deschaseaux F, Gaillard J, Langonne A, *et al.* Regulation and function of immunosuppressive molecule human leukocyte antigen G5 in human bone tissue. FASEB J 2013; 27(8): 2977-87.

[61] Mouillot G, Marcou C, Zidi I, *et al.* Hypoxia modulates HLA-G gene expression in tumor cells. Hum Immunol 2007; 68(4): 277-85.

[62] Nagamatsu T, Fujii T, Yamashita T, *et al*. Hypoxia does not reduce HLA-G expression on extravillous cytotrophoblasts. J Reprod Immunol 2004; 63(2): 85-95.

[63] Valorani MG, Montelatici E, Germani A, *et al*. Pre-culturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials. Cell Prolif 2012; 45(3): 225-38.

[64] Adesida AB, Mulet-Sierra A, Jomha NM. Hypoxia mediated isolation and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells. Stem Cell Res Ther 2012; 3(2): 9.

Received: October 22, 2013 **Revised: February 01, 2014** **Accepted: February 13, 2014**

RECHERCHE D'UNE INFLUENCE DES FACTEURS OBSTETRICAUX SUR LA PROLIFERATION ET LA DIFFERENCIATION CHONDROCYTAIRE DES CELLULES STROMALES/SOUCHES MESENCHYMATEUSES ISSUES DE LA GELEE DE WHARTON.

Ce projet a été initié en 2011 et réalisé en parallèle des autres études menées au cours de ma thèse. En 2013, ce projet a fait l'objet du travail de Master 2 de Léonore Léger qui nous a permis d'obtenir des résultats préliminaires.

Pour cette étude, nous avons soulevé l'hypothèse que des facteurs obstétricaux peuvent avoir un impact sur l'expansion des CSM-GW et leur potentiel de différenciation chondrocytaire et nous avons souhaité identifier ces paramètres. L'objectif secondaire qui en découle consiste à déterminer s'il est possible de privilégier l'utilisation de certains cordons pour une médecine régénératrice du cartilage.

Ce projet a été réalisé, tout d'abord, avec la collaboration du Docteur Philippe Guerci, à l'époque interne d'anesthésie et de réanimation à la Maternité Régionale Universitaire de Nancy. Ensemble, nous avons recueilli 58 cordons ombilicaux associés à différents paramètres obstétricaux relatifs à la mère, au nouveau-né, au travail et à la délivrance. Le recueil de ces paramètres a permis la création d'une base de données importante. Par la suite, l'évaluation de la différenciation chondrocytaire, *via* le calcul des volumes des micromasses et la quantification des images histologiques, a été réalisée, respectivement, grâce aux collaborations du Professeur Rachid Raouadj (LEMTA, Nancy) et Sébastien Hupont de la « PlaTeforme d'Imagerie et de Biophysique Cellulaire et Tissulaire IBISA » (FR3209 CNRS – PTIBC IBISA Nancy, France). Une macro a été créée sous le logiciel ImageJ (logiciel open source multiplateformes) par les responsables de la plateforme PTIBC en collaboration avec l'IBMP de Strasbourg et l'Institut Curie de Paris. Les analyses statistiques ont été réalisées par Jean-Marc Virion du service d'Epidémiologie et Evaluation Clinique du CHU de Nancy sur le logiciel SAS.

METHODOLOGIE :

Dans un premier temps, nous avons sélectionné les facteurs obstétricaux pour l'étude puis avons cultivé les CSM-GW issues de chaque patiente afin de mesurer leurs potentiels de

prolifération et de différenciation chondrocytaire. Enfin, une analyse statistique multivariée nous a permis d'identifier les facteurs obstétricaux affectant les propriétés des CSM-GW.

Recueil des échantillons et des données obstétricales associées :

Les prélèvements des cordons ombilicaux ont été effectués de manière aléatoire et après accord des familles du 16 février au 27 avril 2011 par le personnel de la maternité. Par la suite, j'ai réalisé l'isolement des CSM-GW issues de ces cordons ombilicaux par la méthode dite « des explants » dans des conditions d'hypoxie (5% d'O_2, 5% de CO_2 et 95% de N_2). Les cellules ont ensuite été remises en suspension dans une solution cryoconservatrice (SVF + 10% DMSO) puis congelées en vapeur d'azote (-150°C) à P0 pendant deux ans. Pour cette étude préliminaire, 32 cordons ombilicaux ont pu être utilisés.

En parallèle, de nombreuses données relatives à la mère, à l'accouchement et au nouveau-né ont été recueillies par le Docteur Philippe Guerci. Une étude de la bibliographie et une analyse des facteurs permettant de créer des groupes de puissance suffisante pour une analyse statistique ont permis de dégager les facteurs qui sont utilisés dans ce travail.

Amplification et différenciation chondrocytaire des CSM-GW :

En janvier 2013, les cellules sont décongelées et amplifiées en culture *in vitro* dans des conditions d'hypoxie jusqu'au deuxième passage. Une fois amplifiées, les cellules sont centrifugées afin de former des micromasses qui sont incubées dans un milieu de différenciation chondrocytaire pendant 28 jours, toujours dans des conditions d'hypoxie. En effet, d'après la littérature, la différenciation chondrocytaire des CSM est améliorée en hypoxie.

Méthodes analytiques :

Certains paramètres ont été évalués en rapport avec l'amplification et d'autres en lien avec la différenciation chondrocytaire. Les analyses statistiques réalisées sont également décrites.

<u>Paramètres liés à l'amplification :</u>

Après décongélation des cellules, un test de viabilité, apoptose et nécrose est réalisé par cytométrie en flux afin de s'assurer de l'intégrité cellulaire. Au terme du deuxième passage, une analyse phénotypique permettant de caractériser ces CSM-GW est effectuée

également par cytométrie en flux. Les capacités d'expansion cellulaire spécifiques à chacune des « sources cellulaires » décongelées ont été évaluées par calcul du temps de doublement en P1 et en P2 selon la formule suivante :

$$Temps\ de\ doublement\ (h) = T \times \frac{\mathbf{log}\,2}{\mathbf{log}\,C_r - \mathbf{log}\,C_e}$$

T : temps du passage en heures
C_r : nombre de cellules récoltées en fin de passage
C_e : nombre de cellules ensemencées

Paramètres liés à la différenciation chondrocytaire :

Afin de calculer le volume des micromasses, ces dernières sont mesurées par méthode photographique normalisée avec un Canon Powershot SX220, 12,1 millions de pixels, zoom 28mm 14x full HD en mode macro sans agrandissement, objectif à 4 cm de l'objet. Un trocart de dimension connue sert d'échelle sur chaque image, et chaque micromasse est photographiée de face puis à 90° afin d'obtenir 3 mesures : hauteur (a), largeur (b), profondeur (c). Le calcul des volumes est ensuite réalisé selon la formule utilisée pour les formes ellipsoïdes : $vol\ (mm^3) = \frac{4}{3}\pi abc$ (**Figure 23**).

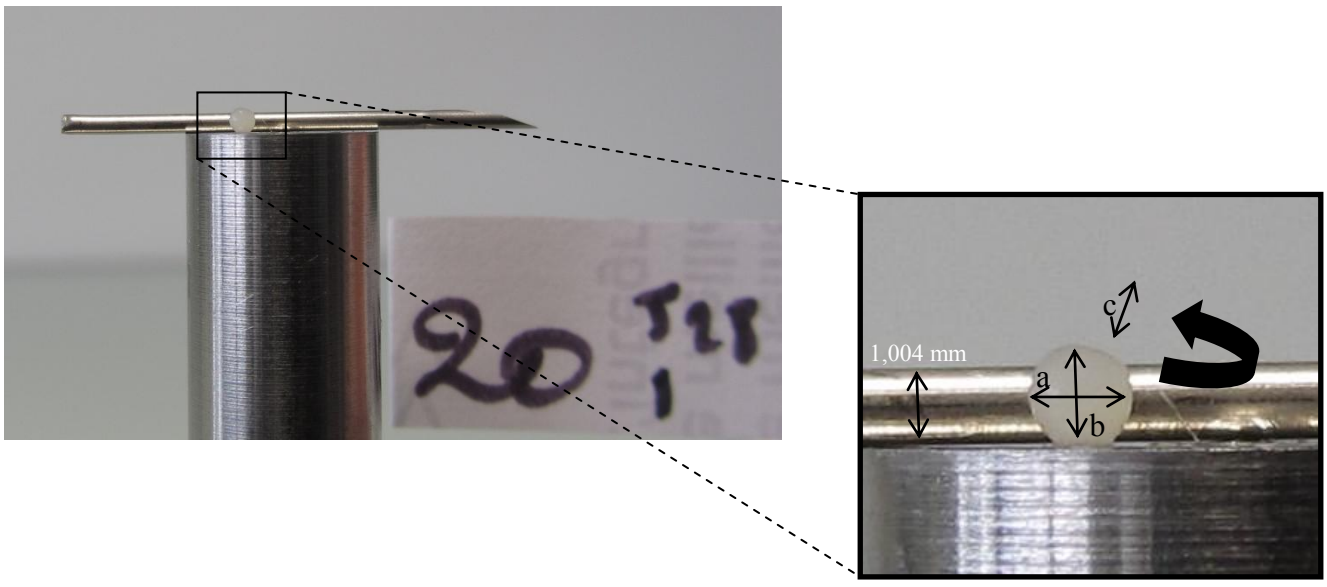


Figure 23: Méthode de mesure des micromasses
Les valeurs mesurées sont la hauteur, la largeur et la profondeur de chaque micromasse. La profondeur est mesurée en faisant pivoter le support de 90° ; cela permet de ne pas bouger la micromasse et d'être certain que la valeur mesurée est bien celle recherchée. Le calcul du volume est donné par la formule suivante : $\boldsymbol{vol\ (mm^3) = \frac{4}{3}\pi abc}$

Deux colorations sont utilisées pour visualiser mais aussi quantifier la synthèse matricielle dans les micromasses : le Bleu Alcian pour les protéoglycanes et le Rouge Sirius pour les collagènes totaux. Les modalités de coloration sont décrites dans l'article 2.

La quantification de la synthèse matricielle repose sur une analyse d'image. Pour cela, les micromasses ont été observées avec le Macrofluo Leica de type Z16APOA (objectif x5 NA05) et de la caméra couleur DFC310FX munie d'un filtre Bayer et refroidie par effet Peltier à -10°C (3,5 millions de pixels, 1 pixel = 6,45x6,45 µm², 1,4 megapixel ccd). L'acquisition est effectuée en fullframe HQ 2048x1483. Le travail est fait à grandissement constant équivalent à une magnificence totale de 45, avec un éclairage constant, avec une puissance en lumière transmise fixe et un seuil de sensibilité de lumière de 61% pour le bleu Alcian et 65% pour le rouge Sirius. Ceci justifie la bonne répétabilité et reproductibilité des acquisitions. La détermination de contour a été faite par une méthode de filtrage. La séparation des différents colorants a été effectuée par une méthode de seuillage successifs et itératifs utilisant les propriétés spectrales de brillance et de saturation de l'image (**Figure 24**).

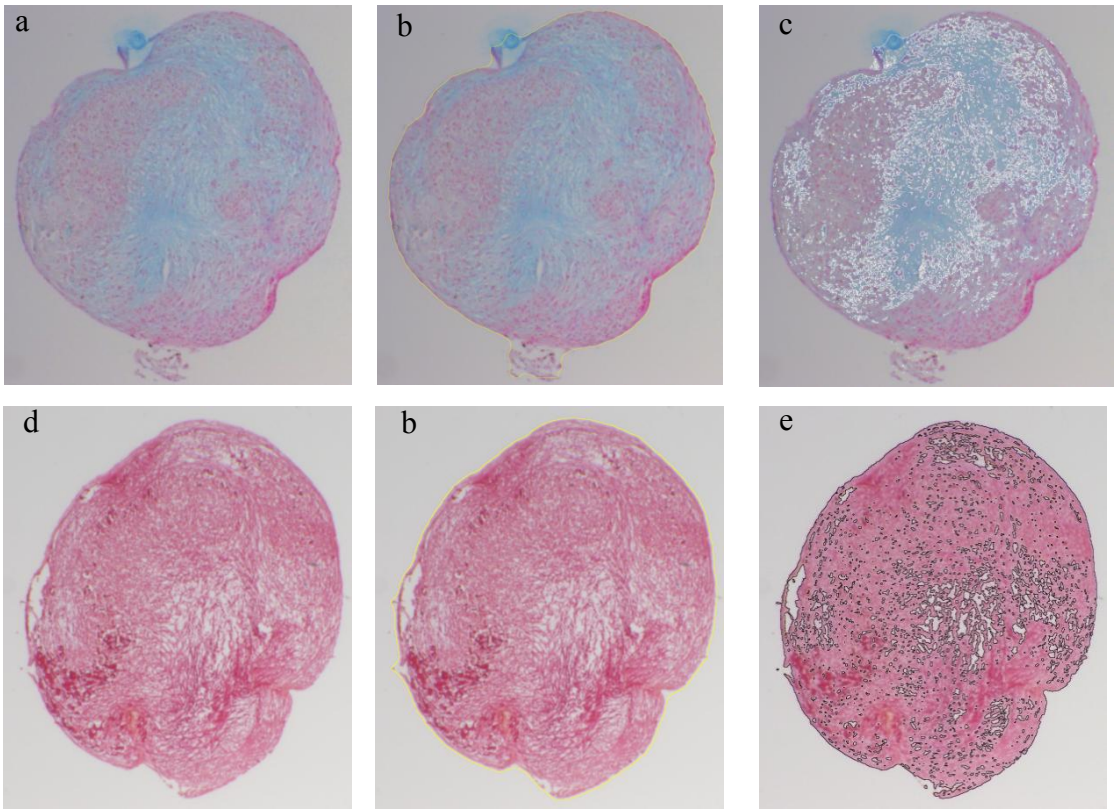


Figure 24: Méthode d'isolement des colorations par le logiciel ImageJ
a : Image d'une micromasse colorée au bleu alcian. b : détermination de l'aire totale de la micromasse (en jaune). c : détermination de l'aire bleue (en blanc). d : Image d'une micromasse colorée au rouge sirius. e : détermination de l'aire rouge (en noir).

L'expression des gènes est étudiée par reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) en temps réel. Les gènes étudiés codent pour différentes protéines : RP29, Sox9 et COMP. La protéine RP29 est ubiquitaire et son expression est la même dans toutes les cellules indépendamment des méthodes de culture utilisées dans cette étude. Elle sert de référence. Sox9 est un gène codant pour le facteur de transcription principal de la chondrogenèse, et la COMP est une protéine matricielle. Les séquences des amorces utilisées pour chaque gène sont listées dans le **tableau 11**.

Tableau 11 : Liste des amorces utilisées en PCR.
Pour chaque gène, une amorce sens et anti-sens sont utilisées afin de permettre la synthèse d'un double brin d'ADNc. Chaque réaction de PCR s'effectue à une température de fusion spécifique au gène recherché.

Amorce		Séquence (5'-3')	Température d'hybridation
RP29	Anti-sens	AGACGCGGCAAGAGCGAGAA	60°C
	Sens	AAGATGGGTCACCAGCAGCTCTACTG	
COMP	Anti-sens	TCTGCATCAAAGTCGTCCTG	60°C
	Sens	ACAATGACGGAGTCCCTGAC	
SOX 9	Anti-sens	CCTGGGATTGCCCCGA	55°C
	Sens	GAGCAGACGCACATCTC	

Les micromasses sont broyées à l'aide d'un pilon en teflon et 100µL de chloroforme sont ajoutés dans les tubes Eppendorf® qui sont ensuite agités vigoureusement pendant 15 secondes. Les tubes sont ensuite centrifugés (12 000g, 15 min, 4°C) ; la phase aqueuse formée est transférée dans une colonne d'extraction. La suite de l'extraction d'ARN s'effectue selon le protocole fourni avec le kit RNeasy Plus Micro. Le dosage des ARN extrait est réalisé par spectrophotométrie. La rétro-transcription des ARN en ADNc est exécutée selon le protocole fourni dans le kit iScript cDNA Synthesis en présence de 300ng d'ARN pour chaque « source cellulaire ». La réaction de PCR en temps réel s'effectue en capillaires : 2µL d'échantillon sont dilués dans le Mix de PCR correspondant au gène recherché, ainsi qu'une gamme étalon. L'automate effectue plusieurs cycles de température spécifique au gène étudié et mesure la fluorescence à chaque cycle.

Analyses statistiques :

Avec un échantillon de 32 « sources cellulaires », nous avons recherché les corrélations entre 27 paramètres obstétricaux et 7 indicateurs biologiques de prolifération cellulaire et de différenciation chondrocytaire. Pour les moyennes qualitatives, on a considéré les moyennes

par modalité ainsi qu'un test de Kruskal-Wallis. Pour les variables quantitatives, on a effectué un test de corrélation et calculé les coefficients. Chaque variable a fait l'objet d'une analyse de régression linéaire bivariée (RLB). Seuls les facteurs présentant une association significative au seuil 0,2 en RLB ont été candidats à une analyse de régression linéaire multivariée (RLM). La méthode de sélection des variables Stepwise a été utilisée avec un seuil d'entrée dans le modèle à 0,1 et un seuil de sortie du modèle à 0,05.

RESULTATS ET CONCLUSIONS :

Facteurs obstétricaux étudiés :

Les différents facteurs obstétricaux retenus dans cette étude sont détaillés dans le **tableau 12**. Ainsi, des 115 paramètres relevés, 27 ont été sélectionnés se répartissant en 11 facteurs maternels, 8 facteurs liés au travail et à la délivrance et 8 facteurs liés au nouveau-né. Les résultats sont présentés en pourcentage ou en moyenne avec écart-types et une description de la répartition des échantillons si les variables sont quantitatives.

Les facteurs relatifs à la mère sont d'ordre général (âge, Indice de Masse Corporelle : IMC, type de grossesse), liés à d'éventuels toxiques (tabac) ou encore pathologies préexistantes ou correspondantes à la grossesse (asthme, hypertension artérielle, dysthyroïdie, maladies inflammatoires, prééclampsie, diabète gestationnel).

Les facteurs relatifs au travail et à la délivrance sont la voie d'accouchement, la nécessité ou non d'un déclenchement du travail, la direction éventuelle du travail en cas de mauvaise dynamique obstétricale, l'administration de SYNTOCINON® pendant le travail (oxytocine, utilisée pour augmenter la fréquence et l'intensité des contractions utérines), la durée du travail et si celui-ci est considéré comme long et le poids du placenta.

En ce qui concerne le nouveau-né ont été pris en compte l'âge gestationnel au moment de la naissance, le terme de la grossesse le sexe et le poids de l'enfant, le pH artériel et une éventuelle souffrance fœtale à la naissance (définie comme un indice d'APGAR <8 à 5 min de vie associé ou non à un pH pathologique <7,20).

Les sous-groupes formés grâce à ces facteurs obstétricaux rassemblent de 4 à 15 échantillons.

Tableau 12: Tableaux descriptifs des populations en fonction des critères obstétricaux retenus.
*Les facteurs obstétricaux retenus permettent de créer des groupes de puissance suffisante pour une analyse statistique. Lorsque les variables sont quantitatives, les moyennes sont données avec leurs écart-types et une description de la répartition des échantillons. * : écart-types. IMC : Indice de Masse Corporelle.*

Parturientes	N	%/moy	ET*	médiane	Q1	Q3	min	max
Age	32	29,9	4,7	30	27	32,5	20	42
IMC (kg/m²)	32	26,1	7,5	24	20,8	30,6	17,2	45,9
Tabagisme								
Non	23	71,9						
Oui	9	28,1						
Asthme								
Non	28	87,5						
Oui	4	12,5						
Grossesse Singleton / Gémellaire								
Non	25	78,1						
Oui	7	21,9						
Grossesse normale (critères maternels)								
Non	21	65,6						
Oui	11	34,4						
Hyper-tension artérielle								
Non	28	87,5						
Oui	4	12,6						
Pré éclampsie								
Non	28	87,5						
Oui	4	12,6						
Diabète gestationnel								
Non	27	84,4						
Oui	5	15,6						
Dysthyroïdie								
Non	27	84,4						
Oui	5	15,6						
Maladie inflammatoire								
Non	28	87,5						
Oui	4	12,5						

Accouchement	N	%/moy	ET*	médiane	Q1	Q3	min	max
Accouchement voie basse								
Non	12	37,5	37,5					
Oui	20	62,5	62,5					
Grossesse normale (critères travail et délivrance)								
Non	7	21,9						
Oui	25	78,1						
Déclenchement								
Non	18	56,3	56,3					
Oui	14	43,8	43,8					
Travail dirigé								
Non	25	78,1	78,1					
Oui	7	21,9	21,9					
Syntocinon pendant le travail								
Non	15	46,9	46,9					
Oui	17	53,1	53,1					
Durée du travail (h)	27	6,5	3,3	5,5	4	8	2	14
Travail long								
Manquant	5							
Non	21	77,8	77,8					
Oui	6	22,2	22,2					
Poids du placenta (g)	32	515,9	108	486,5	450	600	243	721

Nouveaux-nés	N	%/moy	ET*	médiane	Q1	Q3	min	max
Semaines d'aménorrhées	32	39	3	39,6	38,3	40,9	28,3	41,7
Terme	26	81,3						
Prématurés	6	18,8						
Sexe								
M	14	43,8						
F	18	56,3						
Poids Naissance (g)	32	3.067,8	744,9	3.160,0	2.790,0	3.480,0	760	4.310,0
Catégorie Poids								
Normal	21	65,6						
Retard de croissance intra-utérin	8	25						
pH	31	7,2	0,1	7,3	7,2	7,3	7,1	7,3
Souffrance fœtale objectivée à la naissance								
Non	23	71,9						
Oui	9	28,1						
Grossesse normale (critères néonataux)								
Non	19	59,4						
Oui	13	40,6						

Impact des facteurs obstétricaux sur la prolifération et la différenciation chondrocytaire des CSM-GW :

Analyse globale des CSM-GW après expansion:

Les résultats de cytométrie en flux sont présentés en pourcentage de cellules positives avec un seuil de positivité à 5% de cellules totales **(Figure 25**). Le test de viabilité, apoptose, nécrose réalisé en P_1 montre que plus de 92% des cellules sont viables à la décongélation, et plus de 6% sont en apoptose. Le pourcentage de cellules nécrotiques est très faible (< 1%). En ce qui concerne le phénotype, les cellules utilisées pour cette étude sont négatives pour les marqueurs hématopoïétiques (CD45, CD34) et positives pour les marqueurs mésenchymateux (CD90, CD73, CD105, CD166).

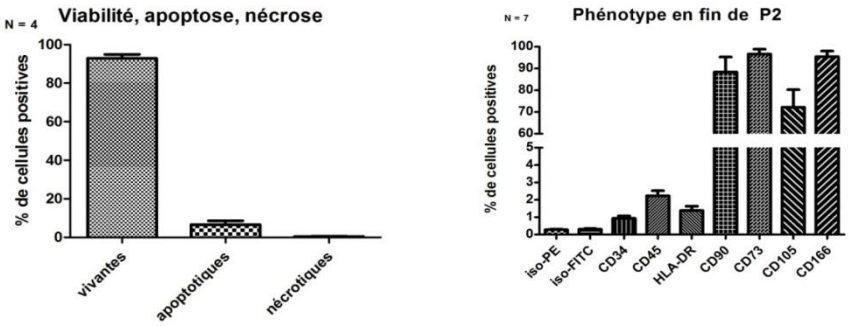


Figure 25: Viabilité et phénotype des CSM avant différenciation cellulaire.
Les résultats sont exprimés en moyenne de pourcentage de cellules positives ± SEM. Le test de viabilité apoptose nécrose (N=4) a été réalisé après décongélation en P_1 et le phénotypage (N=7) a été effectué en fin de P_2.

Le temps de doublement moyen diminue de P_1 à P_2 de manière non significative (p=0,1776). En effet, si certaines « sources cellulaires » ont présenté une meilleure prolifération en P_2, d'autres au contraire proliféraient moins bien. On observe néanmoins une réduction de l'amplitude des valeurs en P_2 (**Figure 26**). En pratique, certaines « sources cellulaires » ont manifesté une période de latence variable entre l'ensemencement en P_1 et une reprise de prolifération effective.

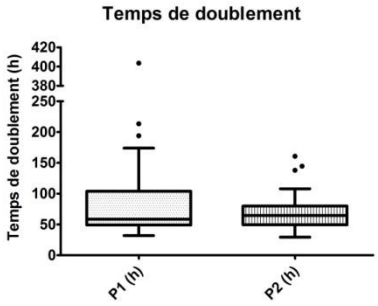


Figure 26 : Répartition des temps de doublement des échantillons en P_1 et en P_2.
On observe une plus grande homogénéité de la prolifération cellulaire en P_2.

Paramètres liés à l'expansion des CSM-GW:

En analyse bivariée, seule l'administration à la mère de SYNTOCINON® pendant le travail diminue le temps de doublement en P_1 (**Figure 27** ; *p*=0,0159). En P_2, l'asthme, paramètre lié à la mère, augmente le temps de doublement (**Figure 28** ; *p*=0,0401). En revanche, parmi les paramètres liés à la grossesse et l'accouchement, le nombre de semaines d'aménorrhée et le poids du placenta diminuent significativement le temps de doublement (**Figure 29** ; respectivement *p*=0,0303 et *p*=0,0373). De même, parmi les paramètres liés à l'enfant, seul le poids de naissance**,** diminue le temps de doublement (**Figure 29** ; *p*=0,0393).

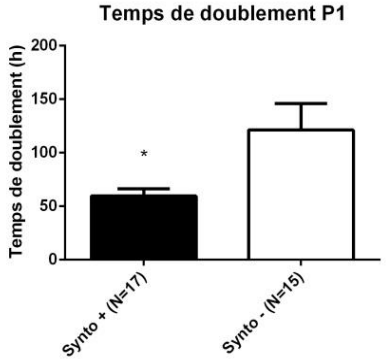


Figure 27: Temps de doublement en P_1 en fonction de l'administration de SYNTOCINON®
Le temps de doublement en P_1 est diminué lorsque la mère a reçu du SYNTOCINON® pendant le travail (p=0,0159).

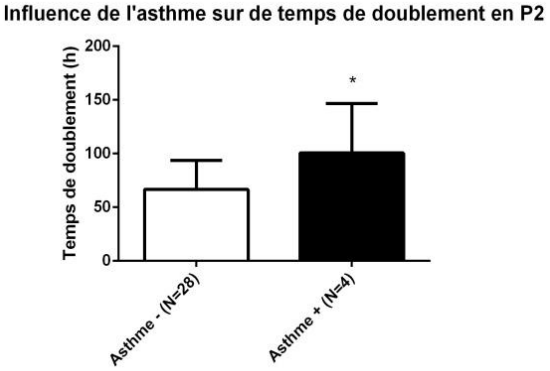


Figure 28: Temps de doublement en P_2 en fonction de l'asthme
Le temps de doublement en P_2 est augmenté lorsque la mère est asthmatique (p=0,0401)

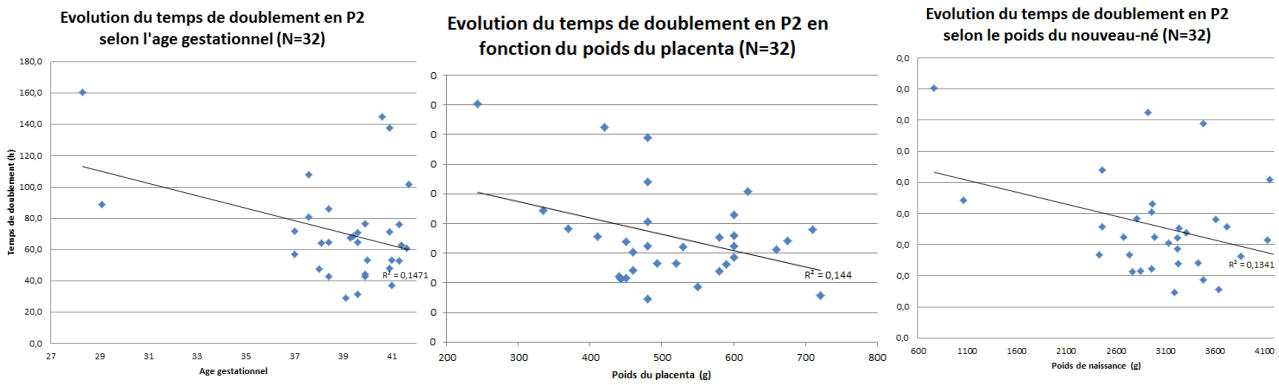


Figure 29 : Evolution du temps de doublement en fonction de l'âge gestationnel, du poids placentaire et du poids de naissance.
Plus on approche du terme, plus le temps de doublement des CSM-GW isolées diminue. Age gestationnel : p=0,0303. Poids du placenta : p=0,0373. Poids de naissance : p=0,0393.

En analyse multivariée, ces 3 derniers paramètres présentent un lien intrinsèque et influencent significativement le temps de doublement en P_2 (β = - 4,3, *p*=0,0139). De plus, le temps de doublement est diminué chez les patientes présentant un diabète gestationnel (**Figure 30** ; β = - 28,6, *p*=0,0443).

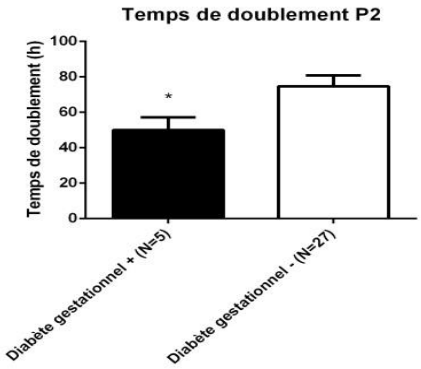


Figure 30 : Temps de doublement en P_2 en fonction du diabète gestationnel
Le temps de doublement en P_2 diminue lorsque la mère présente un diabète gestationnel (p=0,0443).

Paramètres liés à la différenciation chondrocytaire :

Le volume des micromasses est très variable (de 0,089 à 1,576 mm^3) avec une majorité des échantillons entre 0,725 et 1,029 mm^3 (N=16). Quel que soit le type d'analyse statistique, seuls les paramètres liés à la grossesse sont corrélés avec le volume de la micromasse. En analyse bivariée, la durée du travail influence le volume de la micromasse : un travail long en diminue le volume (**Figure 31**; *p*=0,0287). En analyse multivariée, un accouchement compliqué (nécessitant des thérapeutiques ou des gestes) diminue le volume de

la micromasse (**Figure 32**; β = - 0,3, *p*=0,0197). On peut noter que ces deux facteurs sont liés puisqu'un travail long détermine un accouchement compliqué.

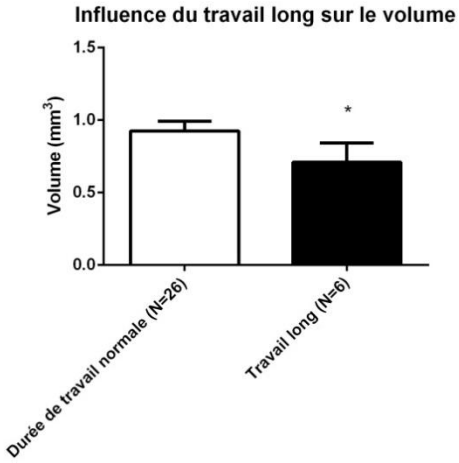


Figure 31: Influence d'un travail long sur le volume des micromasses
Le volume des micromasses diminue lorsque le travail est long (p=0,0287).

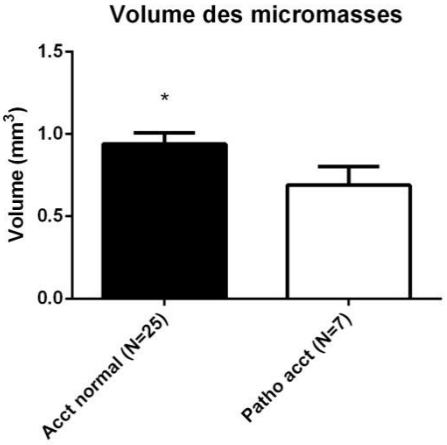


Figure 32 : Influence d'un accouchement pathologique sur le volume des micromasses
Le volume des micromasses diminue lorsque le travail est pathologique (p=0,0197).

Une analyse quantitative de la synthèse matricielle est réalisée à partir des coupes histologiques permettant une observation des collagènes et des PGs totaux. La proportion de PGs représente 0 à 69% de l'aire totale des micromasses mais reste en moyenne assez faible sauf pour quelques « sources cellulaires » où la valeur dépasse 50%.

La proportion de collagènes représente 51 à 95% de l'aire totale, dont 28 souches avec une proportion de collagène élevée comprise entre 79 et 95%.

Si en analyse bivariée, le déclenchement et la durée du travail semblent avoir une incidence sur la synthèse de PGs, l'analyse multivariée permet de confirmer que ces deux paramètres diminuent leur synthèse (**Figure 33** ; respectivement β= - 20,1, *p*=0,006 et β= - 16,6, *p*=0,0491).

En ce qui concerne la synthèse des collagènes, seul l'âge maternel a un impact, que ce soit en analyse bivariée ou multivariée : les cellules issues de cordons ombilicaux de mères plus âgées présentent une synthèse de collagènes moins importante.

Impact du déclenchement sur la synthèse des PGs

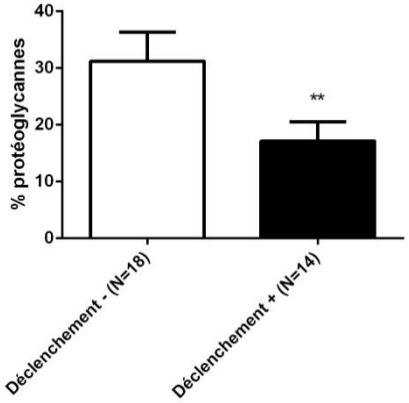


Figure 33: Influence du déclenchement sur la synthèse de protéoglycanes
Le déclenchement a un impact négatif sur la synthèse de protéoglycanes (p=0,006)

Les concentrations des gènes recherchés sont rapportées, pour chaque « source cellulaire », à la concentration retrouvée pour le gène RP29. On observe de grandes variations d'expression des gènes COMP et Sox9 entre les « sources cellulaires ».

Concernant les deux gènes d'intérêt étudiés (Sox 9 et COMP), seuls des paramètres liés à la grossesse ont un impact sur leur expression. En analyse bivariée, le terme semble avoir une incidence favorable sur l'expression du gène de la COMP (*p*=0,053). En revanche, une durée de travail accrue augmente significativement l'expression du gène du facteur de transcription Sox9 (*p*=0,0464). L'analyse multivariée confirme ce dernier résultat en montrant qu'un travail long (>8h chez une primipare, >6h chez une multipare) augmente l'expression de ce gène (β= 2,1, *p*=0,0301).

Tableau 13: Résultats de l'analyse de régression linéaire bivariée

** Moyenne par modalité pour variables qualitatives, coefficient de corrélation pour variables quantitatives.*

*** Test d'analyse de variance à un facteur si égalité des variances, test de Kruskal-Wallis sinon pour variables qualitatives, test de corrélation pour variables quantitatives.*

Tps dblmt : Temps de doublement. p : probabilité que la différence observée soit significative. PGs : protéoglycanes.

	Tps dblmt P1		Tps dblmt P2		Volume		COMP		SOX9		PGs		Collagènes	
	Moy/r*	p**	Moy/r*	p**	Moy/r*	p**	Moy/r*	p**	Moy/r*	p**	Moy/r*	p**	Moy/r*	p**
Poids Naissance (g)			-0,37	**0,0393**										
Age maternel							-0,32	**0,0736**					-0,50	**0,0034**
Semaines d'aménorrhées			-0,38	**0,0303**										
Né à terme				**0,0373**										
Non			94,5											
Oui			65,4											
Asthme				**0,0401**										
Non			66,6											
Oui			100,5											
Diabète gestationnel				**0,1055**										
Non			74,7											
Oui			50,1											
Accouchement normal						**0,0884**								
Non					0,7									
Oui					0,9									
Déclenchement												**0,0575**		
Non											33,3			
Oui											17,2			
Travail dirigé														
Non	100,9	**0,0680**												
Oui	43,3													
SYNTOCINON® pendant le travail		**0,0159**												
Non	121,1													
Oui	59,4													
Durée du travail (h)					-0,42	**0,0287**			0,39	**0,0464**				
Travail long												**0,0924**		
Non											30,3			
Oui											14,2			
Poids du placenta			-0,38	**0,0322**										

Tableau 14 : Résultats de l'analyse de régression linéaire multivariée

Seuls les facteurs présentant une association significative au seuil 0,2 en régression bivariée ont été candidates. La méthode de sélection des variables Stepwise a été utilisée avec un seuil d'entrée dans le modèle à 0,1 et un seuil de sortie du modèle à 0,05.

Tps dblmt : Temps de doublement. β *: coefficient de corrélation dans la variation multiple. p : probabilité que la différence observée soit significative. PGs : protéoglycanes.*

	Tps dblmt P1		**Tps dblmt P2**		**Volume**		**SOX9**		**PGs**		**Collagènes**	
	N=32. R^2=0,18		N=32. R^2=0,26		N=27. R^2=0,2		N=27. R^2=0,17		N=27. R^2=0,35		N=27. R^2=0,31	
	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p
Age maternel											-1,1	**0,0024**
Semaines d'aménorrhées			-4,3	**0,0139**								
Diabète gestationnel				**0,0443**								
Non			28,6	0,0443								
Oui			0,0									
Accouchement normal						**0,0197**						
Non					-0,3							
Oui					0,0							
Déclenchement										**0,0060**		
Non									20,1			
Oui									0,0			
SYNTOCINON® pendant le travail		**0,0159**										
Non	61,7											
Oui	0,0											
Travail long								**0,0301**	16,6	**0,0491**		
Non							-2,1					
Oui							0,0		0,0			

Discussion :

Il a été possible lors de ce travail de dégager 12 facteurs obstétricaux qui sembleraient avoir une influence sur d'une part la prolifération des CSM-GW, d'autre part leur différenciation chondrocytaire.

La prolifération des CSM-GW :

Le temps de doublement en P_1, est fortement influencé par l'administration de SYNTOCINON® pendant le travail. Certains auteurs retrouvent cet effet pro-prolifératif de l'oxytocine (Bakos *et al.*, 2012; Leuner *et al.*, 2012), tandis qu'une étude récente montre qu'il est dépendant du type cellulaire et que le rôle de l'oxytocine est aussi de protéger la cellule d'un stress oxydatif (Deing *et al.*, 2013). Cet effet n'est pas retrouvé en P_2 alors même que 6 facteurs obstétricaux ont une influence. Une hypothèse de réflexion serait que l'impact de l'oxytocine en P_1 serait si important sur le comportement des cellules qu'il masquerait l'effet des autres paramètres. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser une analyse statistique en écartant les souches ayant été exposées à l'oxytocine. On constate toutefois que l'oxytocine n'a pas d'impact en P_2.

Les 6 facteurs obstétricaux dont l'influence serait significative en P_2 peuvent être réduits à 3 facteurs. En effet, le poids de naissance du nouveau-né ainsi que le poids du placenta sont intrinsèquement liés au nombre de semaines d'aménorrhées et à la notion de terme. L'inter-dépendance de ces 4 facteurs explique que seul le nombre de semaines d'aménorrhées influence significativement en analyse multivariée le temps de doublement en P_2. En effet, plus l'accouchement survient proche du terme, plus les capacités prolifératives des CSM sont augmentées.

Concernant les pathologies maternelles retrouvées (asthme et diabète gestationnel), si en P2 l'asthme augmente le temps de doublement, c'est le contraire pour le diabète gestationnel. L'effet délétère de l'asthme peut être intrinsèque à la pathologie ou lié au traitement administré à la mère. Pour le diabète gestationnel, les résultats obtenus sont en accord avec ceux de Pierdomenico *et al.*, qui décrivent que les CSM-GW issues de mères diabétiques ont une capacité proliférative légèrement plus importante que les CSM-GW de mère en bonne santé (Pierdomenico *et al.*, 2011). Comme pour l'asthme, il est impossible de conclure que l'effet bénéfique du diabète gestationnel sur la prolifération est intrinsèque à la pathologie ou lié au traitement, notamment à l'insuline.

La différenciation chondrocytaire :

Les résultats de ce travail montrent que l'*âge maternel* a un impact négatif sur la synthèse des collagènes totaux lors de la chondrogenèse. Il est également intéressant de noter que l'âge de la mère aurait le même impact négatif, bien que non significatif, sur l'expression génique de la COMP (p=0,0736). On peut en conclure que plus l'âge maternel est avancé, moins bonne est la différenciation chondrocytaire et plus particulièrement la synthèse matricielle. Selon Penolazzi *et al.*, lorsque l'âge de la mère dépasse 32 ans, les CSM-GW semblent avoir des difficultés à s'engager vers une différenciation ostéogénique (Penolazzi *et al.*, 2009). Dans notre travail, aucun seuil n'a été défini.

La *durée du travail* présente une corrélation significative en analyse multivariée avec 2 variables biologiques : l'expression génique de Sox9 et la synthèse des PGs. Plus le travail est long, plus l'expression génique de Sox9 est augmentée et moins la synthèse de PGs est importante. Les travaux effectués au laboratoire ont montré que dans les mêmes conditions de culture, une expression maximale de Sox9 est obtenue à J_{14} de la différenciation chondrocytaire. L'expression génique élevée à J_{28} de la différenciation chondrocytaire obtenue lors d'un travail long témoignerait d'un retard dans la différenciation, conduisant à une diminution de la synthèse de PGs. Les cellules se trouveraient alors à un stade plus précoce de la différenciation chondrocytaire. Cette hypothèse est confortée par le volume des micromasses qui est significativement diminué en analyse bivariée lors d'un travail long. En effet, le volume des micromasses et la synthèse des PGs sont directement liés puisqu'une synthèse matricielle importante devrait permettre une augmentation de la taille des micromasses.

Le *déclenchement du travail* a un impact significatif en analyse multivariée sur la synthèse des PGs qui est diminuée. Or, le déclenchement est effectué pour un accouchement dès lors déterminé comme compliqué. Il est intéressant de noter que ce dernier paramètre est un facteur qui influence significativement mais de manière négative le volume des micromasses en analyse multivariée. Le volume des micromasses étant en lien avec la synthèse matricielle à laquelle participent les PGs, il serait donc possible que le déroulement de l'accouchement ait un impact sur la différenciation chondrogénique : un accouchement spontané sans thérapeutique ni complication serait à l'origine d'une différenciation chondrogénique plus importante.

Nous avons montré que le SYNTOCINON® influençait favorablement la prolifération des CSM-GW lors des premiers passages. Or, les différents procédés de déclenchement d'un accouchement font intervenir systématiquement ce médicament. Il est intéressant de noter que si les cellules sont amenées à proliférer, elles ne peuvent pas s'engager vers une différenciation. Toutefois, l'impact du SYNTOCINON® sur la prolifération n'a pas été montré dans notre étude au-delà de P_1.

Conclusions et Perspectives :

Ce travail fait ressortir pour la première fois que des facteurs obstétricaux liés à la mère, à la grossesse et à l'enfant ont un impact sur l'expansion des CSM-GW et également sur leur potentiel de différenciation chondrocytaire.

Les facteurs ayant un impact positif sur la prolifération des CSM-GW en analyse multivariée sont l'administration d'oxytocine, le terme et le diabète gestationnel.

Les différents facteurs favorisant la différenciation chondrocytaire en analyse multivariée sont la durée du travail et un accouchement sans complication. En revanche, un travail long, un déclenchement de l'accouchement et l'âge de la mère ont un impact négatif sur la différenciation chondrocytaire.

Ce travail permet de dégager certains critères de sélection des cordons ombilicaux qui renfermeraient des CSM-GW avec un potentiel chondrogénique accru pour l'ingénierie du cartilage : des cordons issus de mères jeunes, avec un accouchement normal et un travail court.

D'autres facteurs tels que le terme influencent favorablement mais à la limite de la significativité l'expression génique de la COMP. Il est probable que cette étude préliminaire manque de puissance statistique et qu'il soit nécessaire de poursuivre le travail sur un plus grand nombre de cordons, actuellement cryoconservés au laboratoire. De plus, il serait intéressant de préciser certaines données manquantes concernant les pathologies et leur traitement qui influencent la prolifération des CSM-GW. Le rôle de l'oxytocine mérite d'être approfondi par une étude simplifiée sur deux populations de cordons plus importantes, l'une exposée et l'autre non, puis une étude dose/effet.

Enfin, du matériel biologique a été conservé pour chacune des « sources cellulaires » étudiées afin d'affiner l'étude de la synthèse matricielle (expression de collagène de type II).

De plus, le travail est actuellement poursuivi sur l'ensemble des cellules collectées (n=58) et fera l'objet d'une publication.

II- POTENTIALITES DES CSM-GW EN INGENIERIE TISSULAIRE DU CARTILAGE

ARTICLE 3 :

Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Wharton's jelly embedded in Alginate hydrogel: a new stem cell source for Cartilage Tissue Engineering compared to Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Bone marrow.

Loïc Reppel, Jessica Schiavi, Naceur Charif, Léonore Léger, Hao Yu, Jean-François Stoltz, Danièle Bensoussan, Céline Huselstein.

Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2014, **soumis**.

Ce travail s'inscrit dans la deuxième grande partie de mon projet de thèse, qui s'intéresse au potentiel des CSM-GW en ingénierie tissulaire du cartilage. Cette étude a été réalisée en parallèle des autres études menées au cours de ma thèse et c'est la raison pour laquelle, certains paramètres de culture, et notamment pour la différenciation chondrogénique, ne sont pas parfaitement identiques à ceux décrits dans mes travaux précédents.

Dans cette étude, nous avons proposé, pour la première fois, d'évaluer le potentiel chondrogénique des CSM-GW ensemencées dans un hydrogel d'alginate enrichi en acide hyaluronique (Alg/HA). L'hydrogel est construit par une méthode de pulvérisation validée par des travaux émanant de notre équipe. Ainsi, le principal objectif est d'évaluer la différenciation des CSM-GW cultivées dans un environnement tridimensionnel et sans l'apport de facteurs de croissance. Cette efficacité de différenciation est évaluée aussi bien au niveau transcriptionnel que protéique. Les résultats obtenus avec les CSM-GW sont comparés avec ceux des CSM-MO afin de savoir si les CSM-GW peuvent représenter une réelle source alternative de cellules souches pour l'ingénierie du cartilage.

Ce travail s'intègre dans le projet international de recherche Hubert Curien (Cai Yuanpei) avec la Chine. Ce dernier s'intéresse aux potentialités des CSM-GW ensemencées dans des matrices tridimensionnelles pour l'ingénierie tissulaire du cartilage.

METHODOLOGIE :

Les CSM-GW ont été isolées comme décrit précédemment et amplifiées en culture *in vitro*, en normoxie et jusqu'au troisième passage. Après amplification, les cellules sont ensemencées dans un hydrogel Alg/HA à une concentration de 3.10^6 cellules/mL. L'hydrogel est ensuite pulvérisé sur une lame de verre puis polymérisé dans une solution de chlorure de calcium. Des cylindres de 5 mm de diamètre sont ensuite découpés et mis en culture dans un milieu chondrogénique (sans facteur de croissance) durant 28 jours.

Au cours de la différenciation, après 3, 14 et 28 jours, les cellules sont extraites de l'hydrogel et différents paramètres tels que la viabilité, le phénotype ou encore l'expression de gènes d'intérêt (Sox9, agrécane, COMP, collagène de type 2) sont analysés. La synthèse matricielle, et notamment la production des collagènes totaux et des protéoglycanes, est quant à elle évaluée après 28 jours d'induction chondrogénique par histologie. Enfin, l'expression des collagènes de type 1, 2 et 10 est observée par microscopie de fluorescence après marquages immuno-fluorescents. Les CSM-MO sont utilisées en parallèle comme contrôle.

RESULTATS ET CONCLUSIONS :

Une fois ensemencées dans l'hydrogel, les CSM-GW et les CSM-MO présentent un profil de différenciation chondrogénique différent, aussi bien au niveau phénotypique qu'au niveau de la synthèse matricielle. Au cours de la culture tridimensionnelle, la proportion de CSM-GW, exprimant les marqueurs mésenchymateux (tels que CD90, CD105 ou CD166), diminue de façon significative et permet de suggérer une potentielle entrée des cellules dans la voie de différenciation chondrocytaire. Après 4 semaines de culture, les CSM-GW sont capables de s'adapter à leur environnement et d'exprimer les gènes et protéines spécifiques du tissu cartilagineux et notamment le collagène de type 2, qui se retrouve davantage exprimé après différenciation à partir de CSM-GW qu'après différenciation à partir de CSM-MO. De plus, notre étude a montré que les CSM-GW n'expriment pas le collagène de type 10 (marqueur du chondrocyte hypertrophique) au cours de la différenciation contrairement aux CSM-MO. *In vitro*, l'objectif est de contrôler la chondrogénèse et d'orienter les CSM vers un phénotype de chondrocyte, qui synthétise une matrice cartilagineuse et non vers le chondrocyte hypertrophique. Aujourd'hui, cet objectif est un enjeu majeur dans l'utilisation des CSM en ingénierie tissulaire du cartilage.

Ainsi, grâce à leur potentiel de différenciation chondrogénique, leur faible immunogénicité et leur facilité d'obtention, les CSM-GW représentent, aujourd'hui, une véritable source alternative de cellules souches pour des applications en ingénierie tissulaire du cartilage.

Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Wharton's jelly embedded in Alginate Hydrogel: a new stem cell source for Cartilage Tissue Engineering compared to Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Bone Marrow

Loïc REPPEL[1,2,3,4], Jessica SCHIAVI[1,3,4], Naceur CHARIF[1,3,4], Léonore LEGER[1,3,4], Hao Yu[1,3,4], Jean-François STOLTZ[1,2,3,4], Danièle BENSOUSSAN[1,2,3,4], Céline HUSELSTEIN[1,3,4]

1. UMR 7365 CNRS – Université de Lorraine, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), Biopôle, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

2. CHU de Nancy, Unité de Thérapie Cellulaire et Tissulaire, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

3. Université de Lorraine, 54000 Nancy, France

4. Fédération de Recherche 3209, Bioingénierie Moléculaire Cellulaire et Thérapeutique, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Corresponding Author:

Loïc REPPEL

UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine

Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA)

Biopôle de l'Université de Lorraine

Campus biologie-santé, Faculté de Médecine

Avenue de la Forêt de Haye

BP 184

54505 VANDOEUVRE-LES-NANCY

Tel: 03 83 68 54 55

e-mail : loic.reppel@univ-lorraine.fr

ABSTRACT

Due to their intrinsic properties, stem cells are promising tools for new developments in tissue engineering and particularly for cartilage tissue regeneration. Although mesenchymal stromal/stem cells from bone marrow (BM-MSC) have long been the most used stem cell source in cartilage tissue engineering, they have certain limits. Thanks to their properties such as low immunogenicity and particularly chondrogenic differentiation potential, MSC from Wharton's jelly (WJ-MSC) promise to be an interesting source of MSC for cartilage tissue engineering. In this study, we propose, for the first time, to evaluate chondrogenic potential of WJ-MSC embedded in Alginate/Hyaluronic Acid (Alg/HA) hydrogel during 28 days. Hydrogels were constructed by the original spraying method. Our main objective was to evaluate chondrogenic differentiation of WJ-MSC in 3D scaffold, without adding growth factors, at transcript and protein levels. We compared the results to those obtained from standard BM-MSC. After 3 days of culture, WJ-MSC seemed to be adapted to their new 3D environment without any detectable damage. From 14 and up to 28 days, the proportion of WJ-MSC CD73+, CD90+, CD105+ and CD166+ decreased significantly compared to monolayer marker expression. Moreover, WJ-MSC and BM-MSC showed different phenotype profiles. After 28 days of scaffold culture, our results showed strong up-regulation of cartilage-specific transcript expression. WJ-MSC exhibited greater type II collagen synthesis than BM-MSC at both transcript and protein levels. Furthermore, our work highlighted a relevant result showing that WJ-MSC expressed type X collagen at lower levels than BM-MSC. In conclusion, once seeded in the Alg/HA hydrogel scaffold, WJ-MSC and BM-MSC have different profiles of chondrogenic differentiation at both phenotypic level and matrix synthesis. After 4 weeks, WJ-MSC, embedded in a 3D environment, were able to adapt to their environment and express specific cartilage-related genes and matrix proteins. Today, WJ-MSC represent a real alternative source of stem cells for cartilage tissue engineering based on their chondrogenic differentiation potential, their low immunogenicity and the fact that they are easy to obtain.

INTRODUCTION

Once damaged, cartilage tissue has limited self-repair capacity. Today, traumatic and degenerative articular cartilage damage can only be treated symptomatically (analgesics and anti-inflammatory drugs) or by surgery (mosaicoplasty, microfrature, autologous chondrocyte implantation) in order to delay joint replacement. However, these methods fail to restore native tissue integrity and lead to the formation of fibrocartilage[1] which is functionally inferior to hyaline cartilage. For these reasons, scientists and clinicians consider cartilage tissue engineering to be a potential alternative treatment for cartilage repair. Tissue engineering combines three basic elements: a suitable cell source, a biocompatible scaffold and environmental factors to produce in vitro neotissue[2]. Three-dimensional (3D) scaffolds must be able to mimic the physiological environment and ensure attachment, proliferation and differentiation of cells. Due to their intrinsic properties, stem cells are promising tools for new tissue engineering developments and particularly for cartilage tissue regeneration. Owing to ethical considerations and the random efficiency of chondrogenic differentiation[3], the use of embryonic stem cells is not the most appropriate. Thus, mesenchymal stromal/stem cells (MSC) are an attractive source of cells for cartilage tissue engineering.

MSC from bone marrow (BM-MSC) remain the most studied stem cell source used in cartilage tissue engineering[4,5]. However, bone marrow collection is a painful and invasive procedure with the possibility of donor site damage. In addition, it has been demonstrated that the number of available BM-MSC is quite low in this compartment[6], and their differentiation potential and proliferation capacity decrease with age[7,8]. Consequently, the use of autologous BM-MSC for tissue repair, which in some indications concerns elderly patients, has certain limits. Thus, identifying alternative sources of MSC would be very helpful.

Due to their properties such as low immunogenicity[9] and particularly, chondrogenic differentiation potential, MSC from Wharton's jelly (WJ-MSC) promise to be an interesting source of MSC for cartilage tissue engineering[10]. Several studies have already demonstrated WJ-MSC potential for chondrogenic differentiation in three-dimensional (3D) cultures. WJ-MSC were embedded in natural scaffolds such as type I collagen hydrogel[11] or in synthetic polymers scaffolds such as polyglycolic acid meshes[12], and polyvinyl alcohol-polycaprolactone[13]. Cells were cultivated for 3 to 4 weeks in chondrogenic medium supplemented with growth factors (such as Transforming growth factor β1, β3 respectively (TGF-β1, -β3) and bone morphogenic protein (BMP2)) used alone or in combination[13]. These works showed the successful chondrogenic induction of WJ-MSC in 3D scaffolds with expression of specific cartilage-related genes and matrix proteins (Sox9, aggrecan, type II collagen, COMP (cartilage oligomeric matrix protein)).

Alginate hydrogel is an in vitro and in vivo biocompatible scaffold[14], and a hydrophilic polymers network which creates a porous microstructure ensuring nutrient diffusion, cell to cell contact, cell proliferation and differentiation[15]. Various studies have already shown that MSC embedded in alginate hydrogel represent a relevant model for chondrogenesis of human MSC and study of the molecular mechanisms involved in chondrogenic differentiation[4,15]. Hyluronic acid (HA) is a natural component of native cartilage and HA hydrogel can support and promote the chondrogenic differentiation of MSC[16]. According to a recent in vivo study, HA is an attractive hydrogel candidate for cartilage tissue engineering[17].

In this study, we propose, for the first time, to evaluate chondrogenic potential of WJ-MSC embedded in Alginate/Hyaluronic Acid (Alg/HA) hydrogel. Hydrogels were constructed by an original spraying method which has been previously described[4,18]. Our main objective is to evaluate chondrogenic differentiation of WJ-MSC in a 3D scaffold, without adding growth

factors, at transcript and protein levels. To conclude whether WJ-MSC represent a real alternative source of stem cells for cartilage tissue engineering, we compared the results to those obtained from standard BM-MSC.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and culture of MSC

WJ-MSC and BM-MSC were isolated and cultivated as previously described[10]. BM-MSC were only used as a standard control. MSC were incubated at 37°C under a humidified atmosphere with 5% CO2 in 21% O2 and cultivated up to the third passage. After expansion, MSC were harvested with 0.25% Trypsin-EDTA (Sigma, St. Louis, MO) and seeded at 3.10^6 cells/mL of Alg/HA (Fig. 1).

Scaffold construct and chondrogenic differentiation

Scaffolds were built up with one hydrogel layer composed of 1.5% Alg/HA (ratio 4:1) and seeded with MSC. The spraying method used was previously described with rat chondrocytes[18] and human MSC[4]. After hydrogel gelation, in a CaCl2 bath at 102mM, cylinders were cut at 5 mm diameter with a biopsy punch. Only for viability analysis, WJ-MSC were also seeded in Alg/HA hydrogel beads, manufactured as previously described[19] and used as a control. Scaffolds were cultivated in a 48-well plate in chondrogenic medium containing DMEM-high glucose (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Gibco), glutamine 2 mM (Sigma), penicillin 100 U/mL (Sigma), streptomycin 100 µg/mL (Sigma), amphotericin B 2.5 µg/mL (Sigma), 100 µg/mL of sodium pyruvate (Sigma), 40 µg/mL of L-Proline (Sigma), 50 µg/mL of L-acid ascorbic (Sigma), 100nM of dexamethasone (Sigma) and 1 mM of CaCl2 (Sigma). Scaffolds were incubated at 37°C under a humidified atmosphere with 5% CO2 in 21% O2 during 28 days and chondrogenic medium was changed twice a week (Fig. 1).

During chondrogenic differentiation, after 3, 14 and 28 days of culture, cells were extracted from Alg/HA hydrogel by dissolution in 55 mM sodium citrate (Sigma) and 50 mM EDTA solution (Merck, Darmstadt, Germany). After centrifugation (320 g, 5 min), viability, phenotype and mRNA expression were analyzed.

Viability, apoptosis and necrosis analysis

Apoptosis and necrosis of cells were analyzed by flow cytometry using the Vybrant/ApoptosisTM kit based on the AnnexinV/propidium iodide (PI) staining procedure (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cells were suspended in 100 µL of 1X Annexin-liant buffer with 2.5 µL of Annexin V-Alexa 488 and 1 µL of PI (100 µg/mL), for 15 min. at room temperature. After incubation, 200 µL of 1X Annexin V buffer were added to each sample. Then, cells were analyzed by measuring fluorescence emission at 530 nm and 575 nm, respectively for Alexa 488 (apoptotic cells) and PI (necrotic cells), with a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA). Negative (unlabeled cells) and positive controls (apotosis and necrosis) were performed. Apoptosis was induced by incubating anti-Fas mouse antibody (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) with the cells during 1 h. After washing, a second anti-mouse IgG3 antibody (BD, Franklin Lakes, NJ) was incubated for 1 h with cells and finally, cells were labeled only with Annexin V-Alexa 488. Cells necrosis was induced by adding Triton X-100 solution (Sigma) during 1 min. before centrifugation (300 g, 5 min) and PI labeling. For all analyses, at least 5000 events were analyzed.

Phenotypic analysis

Briefly, to perform phenotypic analysis, MSC were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE) conjugated mouse anti-human antibodies CD34-PE, CD45-FITC, HLA-DR-FITC, CD73-PE, CD44-FITC, CD105-PE and CD166-PE (Beckman Coulter, Brea, CA) for 30 min. at room temperature. Negative and isotype (FITC and PE) controls were performed. After immunofluorescence staining, for each sample, 10000 events were counted by Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA).

Transcript analysis

MSC were rinsed with PBS three times to remove residual alginate. Total RNA was extracted by RNeasy Plus mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA yield was evaluated by spectrophotometry and RNA quality was analyzed by electrophoresis through a 1% agarose gel. Then, RNA was reverse-transcripted to cDNA using iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-rad, Hercules, CA). Quantitative PCR was performed using iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-rad) and a Light Cycler system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) during 45 cycles to quantitatively analyze gene expression. Values were normalized to expression of RP29 mRNA. Table 1 lists the specific primers used.

Matrix protein synthesis

Matrix protein synthesis was evaluated by histology and immunofluorescence staining. After 28 days of chondrogenic differentiation, Alg/HA scaffolds were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma), 100 mM sodium cacodylate (Sigma) and 10 mM CaCl2 (Sigma) solution (pH 7.4) during 4 hours and then washed overnight in 100 mM sodium cacodylate and 50 mM BaCl2 (Sigma) buffer (pH 7.4). The scaffolds were dehydrated, embedded in paraffin blocks, cut into 5 µm thick sections and mounted onto glass slides.

For histological analysis, total collagen and proteoglycans were stained by Sirius red and Alcian Blue, respectively, and observed by light microscopy (DMD 108, Leica, Wetzlar, Germany).

For immunofluorescence staining, hydrogel sections were permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma) for 20 min. and then blocked with 0.5% bovine serum albumin (BSA) (Sigma) in DMEM without phenol red (Gibco) for 15 min. at room temperature. Specimens were incubated for 45 min. with rabbit anti-human type I, II, or X collagen antibodies (1:50) (Merck, Darmstadt, Germany). After a washing step, samples were incubated for 45 min. with secondary antibody: a goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (1:50) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Negative and isotype controls were also performed. Immunofluorescence labeling was detected using fluorescence microscopy (DMI 3000B, Leica, Wetzlar, Germany).

Statistical analysis

Statistical tests and graph representations were performed using graphPad Prism 5 software (GraphPad, San Diego, CA). All the data are presented as means ± standard error of the means (SEM) of three independent experiments with cells from different donors (umbilical cord and bone marrow). Significant statistical differences were calculated using one- or two-way ANOVA (analysis of variance). A p-value less than 0.05 was considered significant for the ANOVAs. If significance existed, a post-hoc analysis was performed using the Bonferonni post-tests to evaluate significance for all experiments.

RESULTS

Viability, apoptosis and necrosis analysis

Cell viability, apoptosis and necrosis were analyzed 3, 14 and 28 days after scaffold construct and data were compared to BM-MSC in the same conditions (Fig. 2A). After 3 days of culture, WJ-MSC viability was 58 ± 4%. From 14 days, viability significantly increased ($p < 0.05$) and became greater than 80% until 28 days. Meanwhile, apoptosis and necrosis decreased from 14 up to 28 days. No significant difference was observed between WJ-MSC and BM-MSC. To understand WJ-MSC behavior in early culture, the same parameters were evaluated using two methods of scaffold construct; alginate beads and alginate cylinders obtained by spraying method, between 3 and 10 days after build-up (Fig. 2B). The results indicated clearly that at the third day of culture, the viability of sprayed cells was significantly lower than in cells embedded in alginate beads ($p < 0.001$). At the same moment, cell apoptosis was significantly higher in cylinders compared to cells seeded in beads ($p < 0.05$).

Phenotypic analysis

Flow cytometry showed that regardless of the time of culture or the cell source, MSC were negative for the hematopoietic markers (CD34, CD45) and HLA-DR (Fig. 3A). Less than 5% of cells expressed these surface markers. WJ-MSC from the monolayer to the end of 3D culture variably expressed mesenchymal markers such as CD44, CD73, CD90, CD105 and CD166 (Fig. 3B). During monolayer expansion, the proportion of CD44+, CD73+ and CD105+ cells were significantly higher in WJ-MSC compared to BM-MSC ($p <0.001$, $p <0.05$ and $p <0.01$, respectively). No difference was reported for CD90 and CD166 expression. In 3D environment and during chondrogenic differentiation, the proportions of positive WJ-MSC for mesenchymal markers (except CD44) decreased significantly from 14 and up to 28 days, in comparison with monolayer expansion. On the other hand, the proportion of CD44+ cells remained relatively constant. From 14 days, positive WJ-MSC for mesenchymal markers seemed to be less expressed than BM-MSC, especially for CD90 and CD166 which were significantly reduced ($p < 0.05$).

Transcript analysis

Relative expression of specific cartilage-related genes was evaluated by quantitative RT-PCR during chondrogenic differentiation (Fig. 4). While aggrecan and type IIa collagen expression seemed to increase during 3D culture, Sox9, COMP and total type II collagen expression by WJ-MSC were significantly higher compared to early stage of chondrogenesis ($p <0.01$). After 28 days of chondrogenic induction, type IIa and total type II collagens were significantly more expressed by WJ-MSC than by BM-MSC ($p <0.001$). Conversely, COMP expression was lower in WJ-MSC compared to standard BM-MSC ($p <0.001$). A hypertrophic cartilage marker, type X collagen, was also analyzed during chondrogenic differentiation. Our results showed that type X collagen was very weakly expressed by WJ-MSC throughout culture compared to BM-MSC ($p <0.001$, after 28 days of chondrogenic induction).

Matrix protein synthesis

To study chondrogenic differentiation, matrix protein synthesis was detected after 28 days of induction. Proteoglycans and total collagen were stained by Alcian blue (Fig. 5A) and Sirius red (Fig. 5B), respectively. According to histological labeling, matrix protein synthesis remained pericellular and total collagen synthesis seemed to be greater in WJ-MSC compared to BM-MSC. To explore the synthesis of various collagens in depth, immunofluorescence

staining was performed after 28 days of chondrogenic induction (Fig. 5C). Both cell types expressed type I collagen. In contrast, WJ-MSC seemed to synthesize more type II collagen, whereas BM-MSC seemed to produce more type X collagen. These results obtained for matrix protein synthesis analysis were consistent with those obtained for transcript analysis.

DISCUSSION

Today, thanks to their multiple properties and their ease of access, WJ-MSC seem to be an interesting source of MSC for cartilage tissue engineering. The aim of this work was to evaluate the chondrogenic potential of WJ-MSC embedded in Alg/HA hydrogel, constructed by an original spraying method, without adding growth factors and to compare results those obtained with standard BM-MSC. The culture model used in this study has already been validated in previous studies[4,18]. We showed that the spraying process contributes to form a highly functional and structured biomaterial for cartilage tissue engineering. In this present study, we investigated the potential for chondrogenic differentiation of WJ-MSC maintained in scaffolds built by spraying process. We then compared chondrogenic potential to that obtained from BM-MSC. We focused on cell viability, cell phenotype and evaluation of matrix synthesis during chondrogenic differentiation.

Alginate hydrogel is considered a natural, polysaccharide-based and biocompatible scaffold which creates a porous microstructure and is therefore a viable environment for cell culture[20]. Adult stem cells encapsulated in alginate hydrogel exhibited viability greater than 95% up to 28 days of culture[21]. Very few studies have shown the impact of seeding WJ-MSC in alginate hydrogel on cell viability[22,23]. Penolazzi et al. indicated that WJ-MSC, encapsulated in alginate microbeads, were highly viable (about 90%) after 6 days of culture[22]. In the present study, we demonstrated an increase of sprayed WJ-MSC viability (> 80%) at day 14 which was maintained until the end of the culture. Few apoptotic and necrotic cells found at day 3 seemed to be due to the spraying method, and were eliminated in the last step of necrosis. These results are consistent with those of a previous study which used BM-MSC in the same conditions[4]. It was demonstrated that spraying method effects are quite damaging to cell viability and metabolic activity during the first 7 days of culture[4]. To confirm our hypothesis and explain cell mortality at day 3, we performed two methods of scaffold construct: alginate beads and alginate cylinders (obtained by spraying method) seeded with the same WJ-MSC (Fig. 2B). The results indicated clearly that at the third day of culture, viability of sprayed cells was significantly lower than in cells embedded in alginate beads. At the same moment, cell apoptosis was significantly higher in cylinders compared to cells seeded in beads. Thus, we have shown that the spraying method can transiently alter cell viability only during the onset of culture. This could be explained by the fact that the impact of cells on the support may induce the death of some cells. After 3 days of culture, WJ-MSC seemed to be adapted to their new 3D environment without any detectable damage. Thus, these data are consistent with previous reports[4,18] and confirm that, even after spraying process, Alg/HA hydrogel remains an in vitro biocompatible environment for 3D cell culture.

Cell characterization was performed by the study of surface marker expression and analysis of Sox9 transcription factor expression which are involved in chondrogenic differentiation. During monolayer culture, WJ-MSC expressed MSC surface markers (such as CD44, CD73, CD90, CD105 and CD166) as reported in previous studies[10,24]. A very large number of WJ-MSC (almost 100%) were positive for CD73, CD90, CD105 and it was demonstrated that expression of these markers by adult MSC was clearly in favor of a chondrogenic potential[25-27]. In monolayer and in comparison with BM-MSC, the proportion of CD44+, CD73+ and

CD105+ WJ-MSC were significantly higher. Up-regulation of the HA receptor (CD44) in WJ-MSC has been previously described and probably results in the histological structure of the umbibical cord matrix[28]. Indeed, according to histochemical analysis, Wharton's jelly contains significant amounts of HA[29]. Moreover, it is well known that scaffold composed of HA may create an environment that can preserve the normal phenotype of chondrocytes and may guide cell differentiation to chondrogenesis[17]. In our study, due to the presence of HA in alginate hydrogel, regardless of the MSC source and during 3D culture, CD44 expression remained high and stable as mentioned in literature[16]. On the other hand, Lee et al. showed that in alginate hydrogel, without hyaluronic acid, a marked decrease of CD44 expression by BM-MSC was observed after two weeks of culture[30]. CD73, an ecto-5'-nucleotidase, which plays a crucial role in extracellular adenosine generation, is known to be a regulatory factor in chondrogenic differentiation[31]. CD105 (endoglin), a membrane glycoprotein which is part of the TGFβ receptor complex[32], is considered a marker of stem cell chondrogenic potential[33]. Moreover, it has been demonstrated that the expression of these two markers decreases during chondrogenesis[30]. Thus, according to this phenotype profile (particularly CD73 and CD105 expression), before seeding in a 3D scaffold, WJ-MSC should have better chondrogenic potential compared to BM-MSC. After cell embedding in Alg/HA hydrogel and throughout culture, WJ-MSC undergo significant phenotypic changes. From 14 and up to 28 days, the percentages of positive WJ-MSC for mesenchymal markers (except CD44) decreased significantly compared to monolayer marker expression. These results are consistent with those of a previous study showing similar data with BM-MSC seeded in alginate hydrogel and cultivated with or without growth factor for two weeks[30]. In 3D culture, mesenchymal marker expression levels decreased during the chondrogenic differentiation process[30]. Nagase et al. showed that CD90 was an important indicator of chondrogenic differentiation potential of synovial MSC[34]. Decreased CD90 expression was correlated with reduced chondrogenic potential[34]. According to our results, decreased expression of mesenchymal markers could reflect a loss of undifferentiated character of WJ-MSC and cell commitment to a differentiation pathway. In our study, after 14 days of 3D culture, WJ-MSC and BM-MSC showed different phenotype profiles. Positive WJ-MSC for mesenchymal markers seemed to decrease compared to BM-MSC, notably for CD90 and CD166 which were significantly reduced. To confirm cell commitment to a differentiation pathway and particularly to chondrogenesis, we analyzed the expression of the critical chondrogenic marker, Sox9 transcription factor. Chondrogenic gene Sox9 was observed during in vitro induction of chondrogenesis and promoted transcription of cartilage protein such as type II collagen and aggrecan[2,35]. Our data showed that the relative expression of Sox9 was highly increased between the 14th and 28th days of scaffold culture and demonstrated WJ-MSC commitment to chondrogenesis. A recent study using WJ-MSC seeded in type I collagen hydrogel, but with a chondrogenic induction by growth factor (TGF-β1), described an early up-regulation of Sox9 from the 7th culture day[11]. Also, it is known that TGFβ receptor, via Smad 2/3 pathway, activated Sox9 transcription factor[35].

Evaluation of matrix synthesis was evaluated at both transcript and protein levels. Cartilage matrix is composed of a network of specific molecules which give the tissue its functional properties and notably its resistance to mechanical stress[36]. After 28 days of scaffold culture, our results demonstrated a strong up-regulation of cartilage-specific transcript expression. This result is consistent with those of previous studies using WJ-MSC embedded in 3D environment and stimulated by growth factors[11,13]. Type II collagen is the main collagen found in physiological hyaline cartilage and provides its tensile strength[36]. According to our results, after 4 weeks of chondrogenic differentiation, WJ-MSC exhibited greater type II collagen synthesis than BM-MSC, at both transcript and protein levels. In a relevant study, Wang et al. demonstrated that WJ-MSC, seeded on polyglycolic acid scaffold, using growth

factor, synthesized nearly three times as much collagen production as BM-MSC. However, the differentiation profile of WJ-MSC, compared to BM-MSC, consisted of a larger amount of type I collagen and a smaller amount of type II collagen[37]. Based on our data, Alg/HA hydrogel scaffold seems to be a suitable environment promoting type II collagen synthesis by WJ-MSC. The fact that type IIa procollagen, considered a chondroprogenitor cell marker, was still present at 28 days seems to indicate incomplete or slow chondrogenesis in WJ-MSC[38]. No significant difference in proteoglycans synthesis was observed between WJ-MSC and BM-MSC. Finally, our work highlights a relevant result showing that WJ-MSC express type X collagen at lower levels than BM-MSC, at both transcript and protein levels and especially at 28 days. Type X collagen is considered a relevant hypertrophic chondrocyte marker[35] and serves as a framework for subsequent matrix calcification[39]. Hypertrophic extracellular matrix is functionally different to physiological hyaline cartilage and tends to become similar to bone matrix. Hypertrophic chondrocytes are associated with the final stage of MSC chondrogenesis[2]. A major challenge for cartilage tissue engineering is to control hypertrophic differentiation and maintain a stable chondrocyte phenotype[35]. In this context, according to our results, after 28 days of chondrogenic differentiation, WJ-MSC seem to be less committed towards hypertrophy than BM-MSC.

CONCLUSIONS

Although numerous studies showed the successful chondrogenic induction of WJ-MSC in 3D scaffolds, our work demonstrated, for the first time, chondrogenic differentiation of WJ-MSC without adding growth factors. Once seeded in Alg/HA hydrogel scaffold, WJ-MSC and BM-MSC have different profiles of chondrogenic differentiation at both transcript and protein levels. After 4 weeks, WJ-MSC, embedded in 3D environment, were able to adapt to their environment and express specific cartilage-related genes and matrix proteins. Due to their chondrogenic differentiation potential, their low immunogenicity and the fact that they are easy to obtain, today WJ-MSC represent a real alternative source of stem cells for cartilage tissue engineering. In order to improve mimicking of the physiological environment and enhance chondrogenic differentiation, it would be interesting to apply mechanical stress and turn to stratified cartilage tissue engineering. In all events, cartilage repair based on WJ-MSC embedded in Alg/HA hydrogel remains to be examined further by preclinical and clinical in vivo assays.

DISCLOSURE STATEMENT

No competing financial interests exist.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank G. Cauchois and M. Gentils (UMR 7365 CNRS, Vandœuvre-lès-Nancy, France) for their contribution to umbilical cord collection. Flow cytometry data were obtained thanks to the “Plateforme de Biologie Cellulaire” (Fédération de Recherche 3209, Vandœuvre-lès-Nancy, France) (H. Louis).

REFERENCES

1. Macmull, S., Parratt, M.T., Bentley, G., Skinner, J.A., Carrington, R.W., Morris, T., and Briggs, T.W. Autologous chondrocyte implantation in the adolescent knee. Am J Sports Med 39, 1723, 2011.

2. Vinatier, C., Mrugala, D., Jorgensen, C., Guicheux, J., and Noel, D. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. Trends Biotechnol 27, 307, 2009.

3. Toh, W.S., Lee, E.H., and Cao, T. Potential of human embryonic stem cells in cartilage tissue engineering and regenerative medicine. Stem Cell Rev 7, 544, 2011.

4. Tritz-Schiavi, J., Charif, N., Henrionnet, C., de Isla, N., Bensoussan, D., Magdalou, J., Benkirane-Jessel, N., Stoltz, J.F., and Huselstein, C. Original approach for cartilage tissue engineering with mesenchymal stem cells. Biomed Mater Eng 20, 167, 2010.

5. Georgi, N., van Blitterswijk, C., and Karperien, M. MSC or chondrocyte seeded microcarriers as building blocks for cartilage tissue engineering. Tissue Eng Part A, 2014.

6. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284, 143, 1999.

7. Zaim, M., Karaman, S., Cetin, G., and Isik, S. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. Ann Hematol 91, 1175, 2012.

8. Fossett, E., Khan, W.S., Pastides, P., and Adesida, A.B. The effects of ageing on proliferation potential, differentiation potential and cell surface characterisation of human mesenchymal stem cells. Curr Stem Cell Res Ther 7, 282, 2012.

9. Can, A., and Karahuseyinoglu, S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. Stem Cells 25, 2886, 2007.

10. Reppel, L., Margossian, T., Yaghi, L., Moreau, P., Mercier, N., Leger, L., Hupont, S., Stoltz, J.F., Bensoussan, D., and Huselstein, C. Hypoxic culture conditions for Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Wharton's jelly: a critical parameter to consider in a therapeutic context. Curr Stem Cell Res Ther 9, 306, 2014.

11. Chen, X., Zhang, F., He, X., Xu, Y., Yang, Z., Chen, L., Zhou, S., Yang, Y., Zhou, Z., Sheng, W., and Zeng, Y. Chondrogenic differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in type I collagen-hydrogel for cartilage engineering. Injury 44, 540, 2013.

12. Wang, L., Sheshareddy, K., Weiss, M.L., and Detamore, M.S. Effect of initial seeding density on human umbilical cord mesenchymal stromal cells for fibrocartilage tissue engineering. Tissue Eng Part A 15, 1009, 2009.

13. Nirmal, R.S., and Nair, P.D. Significance of soluble growth factors in the chondrogenic response of human umbilical cord matrix stem cells in a porous three dimensional scaffold. Eur Cell Mater 26, 234, 2013.

14. Luca, G., Calvitti, M., Nastruzzi, C., Bilancetti, L., Becchetti, E., Angeletti, G., Mancuso, F., and Calafiore, R. Encapsulation, in vitro characterization, and in vivo biocompatibility of Sertoli cells in alginate-based microcapsules. Tissue Eng 13, 641, 2007.

15. Ma, H.L., Hung, S.C., Lin, S.Y., Chen, Y.L., and Lo, W.H. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. J Biomed Mater Res A 64, 273, 2003.

16. Chung, C., and Burdick, J.A. Influence of three-dimensional hyaluronic acid microenvironments on mesenchymal stem cell chondrogenesis. Tissue Eng Part A 15, 243, 2009.

17. Chung, J.Y., Song, M., Ha, C.W., Kim, J.A., Lee, C.H., and Park, Y.B. Comparison of articular cartilage repair with different hydrogel-human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell composites in a rat model. Stem Cell Res Ther 5, 39, 2014.

18. Tritz, J., Rahouadj, R., De Isla, N., Charif, N., Pinzano, A., Mainard, D., Bensoussan, D., Netter, P., Stoltz, J.F., Benkirane-Jessel, N., and Huselstein, C. Designing a three-dimensional alginate hydrogel by spraying method for cartilage tissue engineering. Soft Matter 6, 5165, 2010.

19. Wang, Y., de Isla, N., Huselstein, C., Wang, B., Netter, P., Stoltz, J.F., and Muller, S. Effect of alginate culture and mechanical stimulation on cartilaginous matrix synthesis of rat dedifferentiated chondrocytes. Biomed Mater Eng 18, S47, 2008.

20. Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A.M., and Chiellini, E. Polymeric materials for bone and carilage repair. Polymer Science 35, 403, 2010.

21. Awad, H.A., Wickham, M.Q., Leddy, H.A., Gimble, J.M., and Guilak, F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. Biomaterials 25, 3211, 2004.

22. Penolazzi, L., Tavanti, E., Vecchiatini, R., Lambertini, E., Vesce, F., Gambari, R., Mazzitelli, S., Mancuso, F., Luca, G., Nastruzzi, C., and Piva, R. Encapsulation of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in alginate microbeads. Tissue Eng Part C Methods 16, 141, 2010.

23. Liu, J., Zhou, H., Weir, M.D., Xu, H.H., Chen, Q., and Trotman, C.A. Fast-degradable microbeads encapsulating human umbilical cord stem cells in alginate for muscle tissue engineering. Tissue Eng Part A 18, 2303, 2012.

24. Troyer, D.L., and Weiss, M.L. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. Stem Cells 26, 591, 2008.

25. Arufe, M.C., De la Fuente, A., Fuentes, I., de Toro, F.J., and Blanco, F.J. Chondrogenic potential of subpopulations of cells expressing mesenchymal stem cell markers derived from human synovial membranes. J Cell Biochem 111, 834, 2010.

26. Krawetz, R.J., Wu, Y.E., Martin, L., Rattner, J.B., Matyas, J.R., and Hart, D.A. Synovial fluid progenitors expressing CD90+ from normal but not osteoarthritic joints undergo chondrogenic differentiation without micro-mass culture. PLoS One 7, e43616, 2012.

27. Chang, C.B., Han, S.A., Kim, E.M., Lee, S., Seong, S.C., and Lee, M.C. Chondrogenic potentials of human synovium-derived cells sorted by specific surface markers. Osteoarthritis Cartilage 21, 190, 2013.

28. Weiss, M.L., Medicetty, S., Bledsoe, A.R., Rachakatla, R.S., Choi, M., Merchav, S., Luo, Y., Rao, M.S., Velagaleti, G., and Troyer, D. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. Stem Cells 24, 781, 2006.

29. Liu, S., Hou, K.D., Yuan, M., Peng, J., Zhang, L., Sui, X., Zhao, B., Xu, W., Wang, A., Lu, S., and Guo, Q. Characteristics of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly of human umbilical cord and for fabrication of non-scaffold tissue-engineered cartilage. J Biosci Bioeng 117, 229, 2013.

30. Lee, H.J., Choi, B.H., Min, B.H., and Park, S.R. Changes in surface markers of human mesenchymal stem cells during the chondrogenic differentiation and dedifferentiation processes in vitro. Arthritis Rheum 60, 2325, 2009.

31. Ode, A., Schoon, J., Kurtz, A., Gaetjen, M., Ode, J.E., Geissler, S., and Duda, G.N. CD73/5'-ecto-nucleotidase acts as a regulatory factor in osteo-/chondrogenic differentiation of mechanically stimulated mesenchymal stromal cells. Eur Cell Mater 25, 37, 2013.

32. Roemeling-van Rhijn, M., Mensah, F.K., Korevaar, S.S., Leijs, M.J., van Osch, G.J., Ijzermans, J.N., Betjes, M.G., Baan, C.C., Weimar, W., and Hoogduijn, M.J. Effects of Hypoxia on the Immunomodulatory Properties of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem cells. Front Immunol 4, 203, 2013.

33. Jiang, T., Liu, W., Lv, X., Sun, H., Zhang, L., Liu, Y., Zhang, W.J., Cao, Y., and Zhou, G. Potent in vitro chondrogenesis of CD105 enriched human adipose-derived stem cells. Biomaterials 31, 3564, 2010.

34. Nagase, T., Muneta, T., Ju, Y.J., Hara, K., Morito, T., Koga, H., Nimura, A., Mochizuki, T., and Sekiya, I. Analysis of the chondrogenic potential of human synovial stem cells according to harvest site and culture parameters in knees with medial compartment osteoarthritis. Arthritis Rheum 58, 1389, 2008.

35. Studer, D., Millan, C., Ozturk, E., Maniura-Weber, K., and Zenobi-Wong, M. Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. Eur Cell Mater 24, 118, 2012.

36. Poole, A.R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M., and Laverty, S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. Clin Orthop Relat Res, S26, 2001.

37. Wang, L., Tran, I., Seshareddy, K., Weiss, M.L., and Detamore, M.S. 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, 2259, 2009.

38. Perrier, E., Ronziere, M.C., Bareille, R., Pinzano, A., Mallein-Gerin, F., and Freyria, A.M. Analysis of collagen expression during chondrogenic induction of human bone marrow mesenchymal stem cells. Biotechnol Lett 33, 2091, 2011.

39. Shen, G. The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. Orthod Craniofac Res 8, 11, 2005.

Table 1. List of PCR primers used for the present study.

Name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	TM (°)
RP29	AAGATGGGTCACCAGCAGCTCTACTG	AGACGCGGCAAGAGCGAGAA	60
Sox9	GAGCAGACGCACATCTC	CCTGGGATTGCCCCGA	55
Aggrecan	TCGAGGACAGCGAGGCC	TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA	62
COMP	ACAATGACGGAGTCCCTGAC	TCTGCATCAAAGTCGTCCTG	60
Type IIa collagen	GCAGGATGGGCAGAGGTAT	ATCTCAGGGCTGAGGCAGT	60
Total II collagen	ATGACAATCTGGCTCCCAAC	GAACCTGCTATTGCCCTCTG	55
Type X collagen	GCTAAGGGTGAAAGGGGTTC	CTCCAGGATCACCTTTTGGA	60

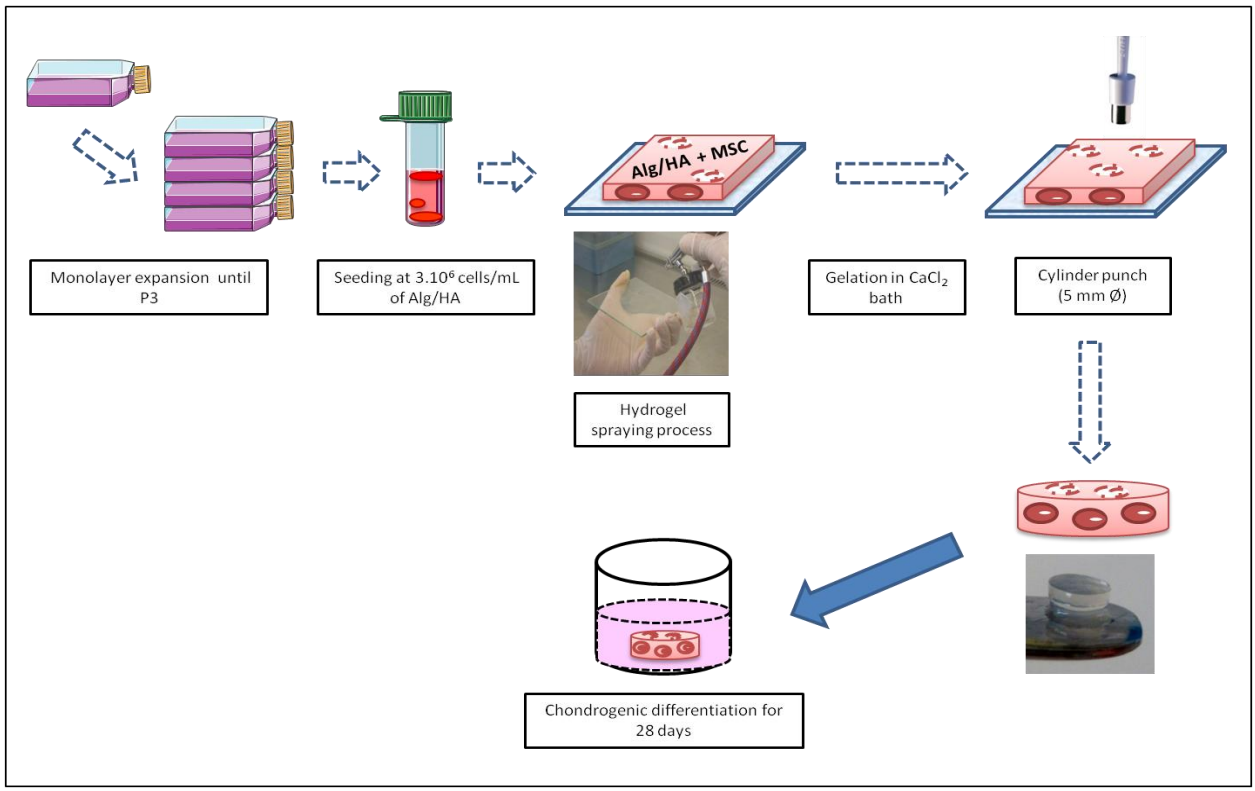


Figure 1. Illustration of protocol steps used to perform scaffold construct and chondrogenic differentiation. After monolayer expansion, MSC were seeded at 3.10^6 cells/mL of Alg/HA hydrogel. Hydrogel was sprayed, gelated and cut into 5 mm diameter cylinders; scale bar = 5 mm. Scaffolds were cultivated in a 48-well plate in chondrogenic medium during 28 days. Abbreviations: P3, passage 3; Alg/HA, Alginate/Hyaluronic Acid; MSC, mesenchymal stromal/stem cells.

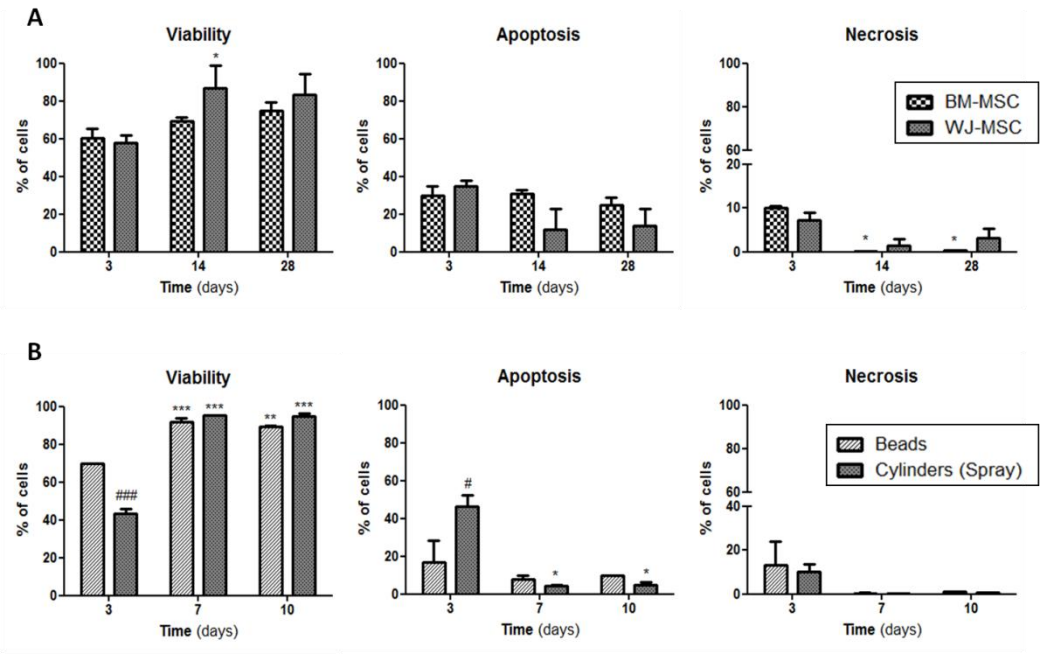


Figure 2. Changes in MSC viability during scaffold culture. Cell viability was measured by flow cytometry at 3, 14 and 28 days of culture of MSC embedded in Alg/HA hydrogel. Necrotic and apoptotic cells were labeled with propidium iodide and annexin V–Alexa 488, respectively. **(A)**: cell viability was evaluated after spraying method of scaffold construct between BM-MSC and WJ-MSC. **(B)**: WJ-MSC viability was evaluated for two methods of scaffold construct: alginate beads and alginate cylinders (obtained by spraying method). The results are expressed as mean ± SEM ($n \geq 3$). *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 (Day x *vs* Day 3 for a same cell source (A) or method of scaffold construct (B)). # p<0.05 and ### p<0.001 (Cylinders *vs* Beads for a same culture time). Abbreviations: BM-MSC, bone marrow mesenchymal stromal/stem cells; WJ-MSC, Wharton's Jelly mesenchymal stromal/stem cells.

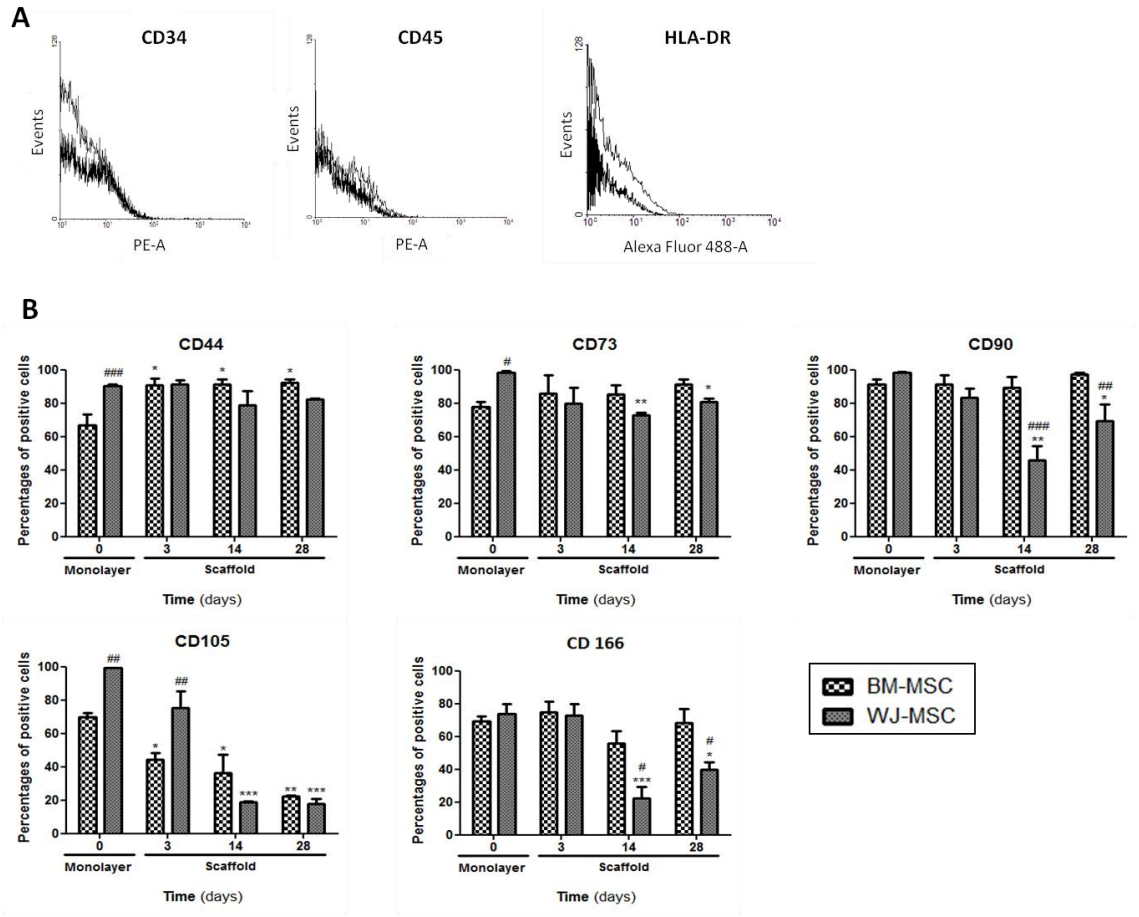


Figure 3. Immunophenotypic analysis of MSC by flow cytometry during monolayer expansion and throughout scaffold culture. **(A)**: Hematopoietic markers and Major Histocompatibility Complex class II molecule. **(B):** Mesenchymal surface markers. For mesenchymal surface markers, the results are shown as percentages of positive cells. All results are expressed as mean ± SEM. (n = 3). *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 (Day x *vs* Day 0 (monolayer) for a same cell source). # p<0.05, ## p<0.01 and ### p<0.001 (WJ-MSC *vs* BM-MSC for a same culture time). Abbreviations: BM-MSC, bone marrow mesenchymal stromal/stem cells; WJ-MSC, Wharton's Jelly mesenchymal stromal/stem cells.

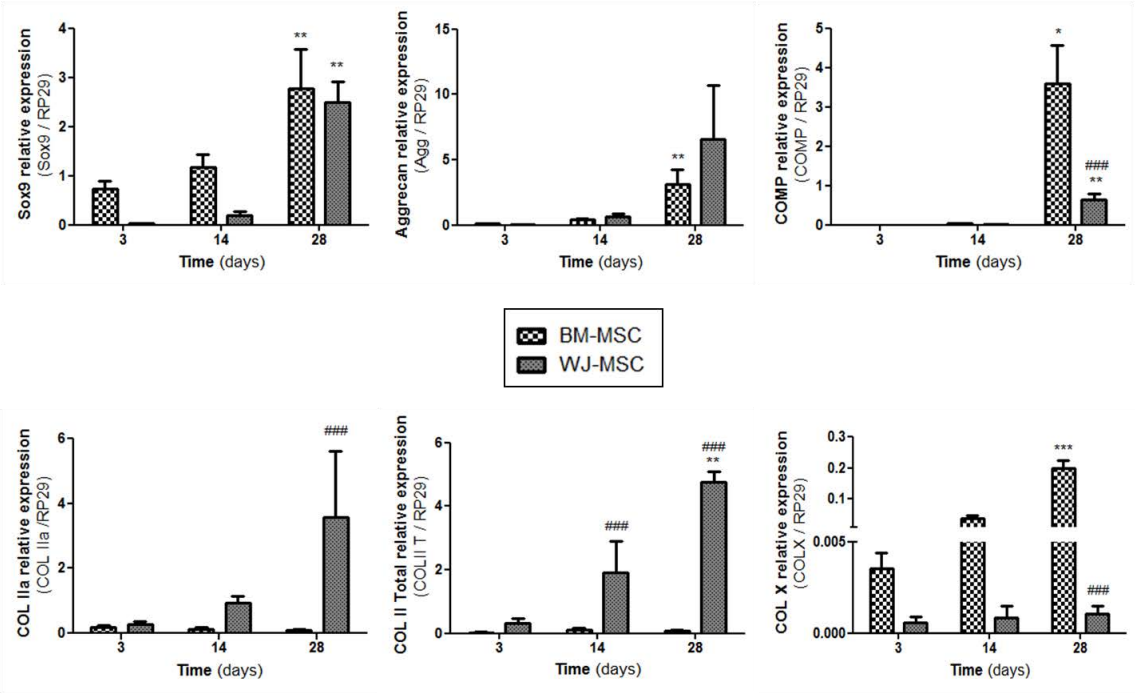


Figure 4. Relative expression of specific cartilage-related genes evaluated by quantitative RT-PCR during 28 days of chondrogenic induction. All results are expressed as mean ± SEM. (n = 3). *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 (Day x *vs* Day 3 for a same cell source). ### p<0.001 (WJ-MSC *vs* BM-MSC for a same culture time). Abbreviations: BM-MSC, bone marrow mesenchymal stromal/stem cells; COMP, cartilage oligomeric matrix protein; COL, collagen; WJ-MSC, Wharton's Jelly mesenchymal stromal/stem cells.

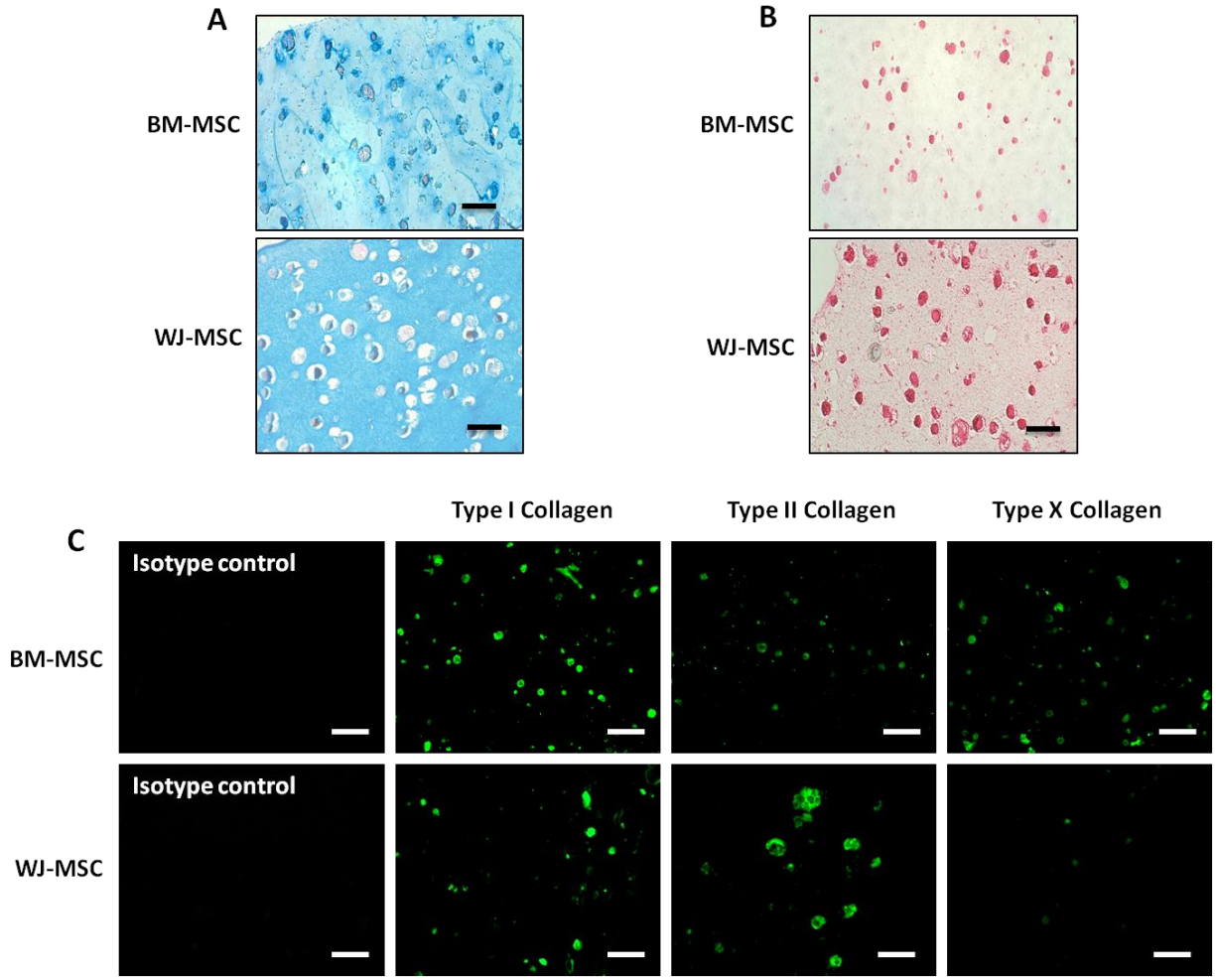


Figure 5. Matrix protein synthesis detected after 28 days of chondrogenic induction. Proteoglycans and total collagen were stained by Alcian blue (**A**) and Sirius red (**B**), respectively; scale bar = 200 µm. To explore the synthesis of various collagens in depth, immunofluorescence staining was performed and detected using fluorescence microscopy (**C**); scale bar = 100 µm. Abbreviations: BM-MSC, bone marrow mesenchymal stromal/stem cells; WJ-MSC, Wharton's Jelly mesenchymal stromal/stem cells.

III- CADRE REGLEMENTAIRE DE L'UTILISATION DES CSM-GW

ARTICLE 4:

Cellules souches et nouvelle loi de bioéthique française.

Loïc Reppel, Olivia Caunday, Stéphanie Bultel, Jean-François Stoltz, Céline Huselstein, Danièle Bensoussan.

Hématologie, 2012, 18 (3) : 175-81

Ce travail bibliographique a été réalisé pendant ma thèse d'Université au cours de laquelle je me suis également intéressé au cadre réglementaire de l'utilisation des cellules souches humaines en France. En juillet 2011, la loi de bioéthique française a fait l'objet d'une révision apportant, dans le domaine des cellules souches, quelques évolutions par rapport à la loi précédente. L'avancée majeure de cette loi repose, à présent, sur un encadrement spécifique des cellules souches hématopoïétiques du sang placentaire en vue d'une utilisation thérapeutique ou scientifique. Ce dernier n'est plus considéré comme un déchet opératoire mais bien comme une source à part entière de cellules souches hématopoïétiques au même titre que la moelle osseuse et le sang périphérique.

Après la parution de cette nouvelle loi de bioéthique, cette revue nous a permis de faire un état des lieux des aspects réglementaires encadrant l'utilisation des cellules souches à des fins thérapeutiques et scientifiques et plus particulièrement l'utilisation des cellules souches du cordon ombilical.

RESULTATS:

Avant la décision du 16 mai 2012 (n° 2012-249) résultant de la loi de bioéthique de 2011 (loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la Bioéthique), le cordon ombilical et par extension la gelée de Wharton étaient considérés comme des déchets opératoires, dont le don était encadré par un régime de « non-opposition ». À présent, la gelée de Wharton est considérée comme une source à part entière de CSM et de ce fait, le prélèvement de cellules du cordon (ou du placenta) ne peut avoir lieu qu'à des fins thérapeutiques ou scientifiques, en vue d'un don anonyme et gratuit, et à la condition que la femme, durant sa grossesse, ait

donné son consentement par écrit au prélèvement et à l'utilisation de ces cellules (Art. L. 1241-1). Des informations sur les finalités de ce don lui sont données de façon précise. Ce consentement est révocable sans forme et à tout moment tant que le prélèvement n'est pas intervenu.

Depuis la parution de cette revue et notamment concernant l'utilisation des CSE à des fins de recherche, quelques modifications non négligeables sont apparues dans la loi. En France, suite à la loi de bioéthique de 2011, l'interdiction de la recherche sur les CSE humaines était assortie de dérogations pérennes dans des conditions très strictes. En août 2013, une nouvelle loi est promulguée (Loi n° 2013-715 du 6 août 2013), tendant à modifier cette dernière loi de bioéthique en autorisant sous certaines conditions la recherche sur l'embryon et les CSE. Ainsi, ce nouveau texte permet de passer d'un régime "d'interdiction assortie de dérogations" à un régime "d'autorisation encadrée" de la recherche sur les CSE renforçant la légitimité de cette dernière. Très récemment, la décision du 3 mars 2014, publiée au Journal officiel, fait état d'une liste des autorisations accordées aux différentes équipes de recherche, par l'Agence de la Biomédecine.

Aujourd'hui, suite à la directive européenne 1394/2007, l'utilisation thérapeutique des CSM répond à la définition du Médicament de Thérapie Innovante (MTI) et impose, par conséquent, certaines exigences réglementaires. Les CSM correspondent à des médicaments de thérapie cellulaire somatique qui, au cours de leur production, ont fait l'objet de modifications substantielles (la culture *in vitro*, notamment). La notion de modification substantielle doit se comprendre sur les conséquences de la modification, qui est substantielle si elle entraîne une modification des propriétés biologiques ou fonction initiale. De plus, les CSM ne sont pas destinées à être utilisées pour la (les) même(s) fonctions(s) essentielle(s) chez le receveur et chez le donneur. Ainsi, si un produit répond à l'une ou l'autre de ces deux conditions, il est considéré comme un MTI. Le statut de MTI attribué aux CSM exige que ces dernières soient produites dans des établissements pharmaceutiques et selon les Bonnes Pratiques de Fabrication du médicament. L'autorisation de commercialisation d'un MTI se fait dans le cadre d'une procédure centralisée. Cette autorisation est délivrée par la commission européenne après évaluation de l'Agence Européenne du Médicament.

Hématologie

Revue

Hématologie 2012 ; 18 (3) : 175-81

Cellules souches et nouvelle loi de bioéthique française

Stem cells and new french bioethics law

Loïc Reppel[1,3]
Olivia Caunday[1,2,3]
Stéphanie Bultel[2]
Jean-François Stoltz[1,2,3]
Céline Huselstein[1,3]
Danièle Bensoussan[1,2,3]

[1] CNRS,
UMR 7561,
Biopôle,
Campus Santé,
54505, Vandœuvre-lès-Nancy,
France
[2] CHU de Nancy,
unité de thérapie cellulaire et tissus,
54511 Vandœuvre-lès-Nancy,
France
[3] Université de Lorraine,
54000 Nancy,
France
<loic.reppel@univ-lorraine.fr>

Résumé. En juillet 2011, la loi de bioéthique française a fait l'objet d'une révision apportant, dans le domaine des cellules souches, quelques évolutions par rapport à la loi précédente. Concernant les cellules souches embryonnaires (CSE), la nouvelle loi de bioéthique confirme la possibilité d'effectuer des recherches sur l'embryon et sur les CSE uniquement sur dérogations strictement encadrées et délivrées par l'Agence de la biomédecine. En revanche, l'avancée majeure de cette loi repose, à présent, sur un encadrement spécifique des cellules souches hématopoïétiques du sang placentaire en vue d'une utilisation thérapeutique ou scientifique. Ce dernier n'est plus considéré comme un déchet opératoire mais bien comme une source à part entière de cellules souches hématopoïétiques au même titre que la moelle osseuse et le sang périphérique.

Mots clés : loi de bioéthique, cellules souches embryonnaires, cellules souches hématopoïétiques, sang placentaire

Abstract. In July 2011, the French bioethics law was the subject of a revision bringing few remarkable changes compared to the previous law, especially in the field of stem cells. Regarding Embryonic stem cells (ESC), the new law confirms the possibility to carry out research on the embryo and ESC exclusively after obtention of a derogation strictly regulated and delivered by the French Biomedicine Agency. On the other hand, the main advance of this law concerns a specific regulating of cord blood hematopoietic stem cells for therapeutic or scientific uses. This collection site is no longer considered as a medical waste but as a source of hematopoietic stem cells as well as bone marrow and peripheral blood.

Key words: *Bioethics law, embryonic stem cells, hematopoietic stem cells, cord blood*

L'utilisation des cellules souches humaines, pour des applications cliniques ou à visée scientifique, est encadrée par un ensemble de textes législatifs et réglementaires mentionnés dans le Code de la santé publique. À l'exception des cellules souches hématopoïétiques, les cellules souches sont principalement utilisées dans des protocoles de recherche biomédicale. Ces recherches sont régies par l'ensemble des dispositions couvrant l'utilisation des éléments et produits du corps humain à des fins médicales ou scientifiques, mentionnées dans la **loi n° 2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique** [1]. Très récemment, cette loi a fait l'objet d'une révision de la part des parlementaires aboutissant à la promulgation de la **loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique** [2]. Deux types de cellules souches humaines sont spécifiquement traités dans cette loi de bioéthique : les cellules souches embryonnaires (CSE), pour lesquelles

Tirés à part :
L. Reppel

doi:10.1684/hma.2012.0703

Pour citer cet article : Reppel L, Caunday O, Stoltz JF, Huselstein C, Bensoussan D. Cellules souches et nouvelle loi de bioéthique française. *Hématologie* 2012 ; 18 (3) : 175-81 doi:10.1684/hma.2012.0703

© John Libbey Eurotext, 2012

Tirés à part auteur

les activités de recherche sont strictement réglementées, et les cellules souches hématopoïétiques (CSH), dont les sources faisant l'objet d'une utilisation thérapeutique sont clairement spécifiées (cas des CSH du sang placentaire). Cette loi de bioéthique constitue de ce fait un élément majeur du cadre juridique des cellules souches, en ceci qu'elle traite du don, de la conservation et de l'utilisation des éléments et produits du corps humain. La dernière révision de cette loi n'apporte aucun changement fondamental concernant le statut réglementaire des CSE. En revanche, elle apporte quelques modifications sur les modalités de prélèvement des CSH et encadre, à présent, de façon spécifique, les CSH du sang placentaire. Ainsi, le sang placentaire passe du statut de déchet opératoire à celui de source à part entière de CSH, nécessitant le consentement libre et éclairé des mères donneuses. Cette revue a pour objectif de relater les dispositions réglementaires récentes apportées par la nouvelle loi de bioéthique dans le domaine des cellules souches et dans le contexte actuel.

La recherche sur les CSE humaines

La production d'une lignée de CSE humaine nécessite obligatoirement la destruction d'un embryon humain. Cet acte est suffisamment significatif pour que toute action en découlant soit réglementée avec précision.

Les grands principes de la loi

D'après la loi de bioéthique de 2011, la conception *in vitro* d'embryon ou la constitution par clonage d'un embryon humain à des fins de recherche reste interdite (*Art. L. 2151-2*). En droit français, l'interdiction de la recherche sur l'embryon humain et sur les CSE a été assortie de dérogations pérennes dans des conditions très strictes (*Art. L. 2151-5*). Cet assouplissement de la loi résulte d'un compromis trouvé entre les parlementaires défavorables à la recherche sur l'embryon, au nom du respect de la dignité humaine, et ceux qui en étaient partisans au nom de la liberté de la recherche. Suite à la loi de bioéthique de 2011, un décret d'application est paru en avril 2012 [3], qui fixe précisément les modalités d'autorisation et de mise en œuvre des recherches menées sur les CSE. Ainsi, à titre dérogatoire, la loi prévoit la possibilité et l'autorisation pour les équipes de recherche française d'effectuer des recherches sur les CSE. Ces investigations sont autorisées sous plusieurs conditions, parmi lesquelles (*Art. L. 2151-5*) :

– les recherches sont susceptibles de permettre des progrès médicaux majeurs en matière de prévention, de diagnostic ou de soins,

– il est impossible, en l'état des connaissances, de parvenir au résultat escompté par le biais d'une recherche ne recourant pas à des embryons humains, des CSE ou des lignées de cellules souches,

– la décision d'autorisation est également prise en fonction de la pertinence scientifique du projet et de ses conditions de mise en œuvre au regard des principes éthiques relatifs à la recherche sur l'embryon et les CSE.

Ces recherches ne peuvent être menées qu'à partir d'embryons surnuméraires conçus au départ, *in vitro*, dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation (AMP) et ne faisant plus l'objet d'un projet parental. Le consentement écrit du couple est recueilli à deux reprises, à trois mois d'intervalle. Il est dûment informé des possibilités d'accueil des embryons par un autre couple ou d'arrêt de leur conservation. Leur consentement est révocable à tout moment et sans motif, tant que les recherches n'ont pas débuté.

Après autorisation, les recherches peuvent également être conduites sur des embryons porteurs d'une anomalie recherchée dans le cadre d'un diagnostic préimplantatoire.

Ainsi, les protocoles de recherche font l'objet d'une autorisation de la part de l'Agence de la biomédecine, qui s'assure que les conditions posées précédemment sont satisfaites. Cette demande d'autorisation nécessite la rédaction d'un dossier complet, décrivant de façon très précise le protocole de recherche. Dans un bilan relativement récent, l'Agence de la biomédecine indique qu'entre 2004 et 2011, 48 protocoles de recherche concernant les CSE ont été autorisés [4].

Après un débat de longue haleine, le Sénat, pourtant favorable en première lecture à une évolution de la loi vers une autorisation encadrée de la recherche sur les CSE, s'est finalement rangé début juin 2011 à l'avis du gouvernement et de la majorité des députés. Les 21 et 23 juin 2011, l'Assemblée nationale puis le Sénat ont donc adopté définitivement le projet de loi concernant la révision de la loi de bioéthique de 2004. Ainsi, elle maintient l'interdiction de mener en France des recherches sur l'embryon et les CSE, sauf dérogations spéciales et strictement encadrées. Ce *statu quo* a suscité de vives déceptions de la part des scientifiques français, qui considèrent cette décision parlementaire comme rétrograde, à contre-courant de certains de leurs partenaires européens et internationaux. Certains chercheurs français soulignent également l'ambiguïté de cette loi, qui interdit la recherche sur les CSE avec finalement, la possibilité d'obtenir, à titre dérogatoire, des autorisations.

La loi permet également, après autorisation de l'Agence de la biomédecine, d'importer ou d'exporter des CSE dans le cadre de ces recherches (*Art. L. 2151-6*). Tout organisme qui assure, à des fins de recherche, la conservation des CSE, doit être titulaire d'une autorisation délivrée par l'Agence de la biomédecine (*Art. L. 2151-7*). L'autorisation permettant de travailler sur les CSE, délivrée à titre dérogatoire, n'est donnée qu'à des fins de recherche et non à des fins de développement industriel. Un embryon humain ne peut

© John Libbey Eurotext, 2012

Tirés à part auteur

être ni conçu, ni constitué par clonage, ni utilisé à des fins commerciales ou industrielles (*Art. L. 2151-3*) [5].

Aujourd'hui, les lignées de CSE utilisées pour ces recherches peuvent avoir deux origines : elles peuvent provenir d'embryons surnuméraires cédés à la recherche, ou être importées depuis l'étranger.

Obtention de lignées de CSE en France

En premier lieu, une lignée de CSE peut être produite à partir d'embryons conçus *in vitro* dans le cadre d'une démarche d'AMP. Trois types d'embryons sont concernés :

– les embryons surnuméraires sains, congelés et ne faisant plus l'objet d'un projet parental,

– les embryons issus de fécondation *in vitro* mais dont la qualité empêche leur utilisation à des fins de procréation,

– les embryons porteurs de maladies génétiques, repérés lors d'un diagnostic préimplantatoire. Les lignées réalisées à partir de tels embryons peuvent servir de modèles précieux dans la recherche du développement de ces maladies.

Dans tous les cas, le consentement libre et éclairé du couple à l'origine de la conception des embryons utilisés doit être recueilli. Ainsi, il décide de faire don de ses embryons à la recherche.

L'obtention de lignées de CSE humaines à partir d'embryons nécessite un savoir-faire et une technicité très difficiles à acquérir. À l'heure actuelle, très peu d'équipes en France s'y sont attelées. D'après les chiffres de l'Agence de la biomédecine, qui est chargée par la loi de tenir un registre des lignées de CSE dérivées en France, 27 lignées ont été dérivées depuis 2004, dont une seule produite à partir d'un embryon sain.

Dans un second temps, et afin de faciliter l'accès aux CSE humaines pour les équipes de recherche française, la loi de bioéthique a prévu la possibilité d'importer des lignées obtenues à l'étranger. Cette importation fait également l'objet d'une autorisation délivrée par l'Agence de la biomédecine. Elle s'assure que les conditions dans lesquelles les embryons ont été donnés par les couples sont en accord avec les conditions pratiquées en France. Depuis 2004, 46 autorisations d'importation ont été délivrées [4, 6].

État des lieux des législations étrangères

Les législations concernant l'utilisation de l'embryon humain et des CSE à des fins de recherche présentent une certaine disparité à travers le monde. Les législations en vigueur peuvent être classées en quatre catégories :

– *législation permissive* : l'utilisation de la majorité des techniques est permise concernant la recherche sur l'embryon, à l'exception du clonage reproductif. C'est le cas du Royaume-Uni, de la Belgique, de l'Espagne, des États-Unis (sur fonds non fédéraux) et de Singapour.

– *législation permissive avec restriction* : les recherches sur l'embryon et les lignées de CSE humaines sont permises (ou non interdites), ainsi que la dérivation de nouvelles lignées à partir d'embryons surnuméraires. En revanche, la technique de clonage thérapeutique et la création d'embryons pour la recherche sont interdites. C'est le cas du Canada, des Pays-Bas et du Brésil.

– *législation restrictive* : les recherches sur l'embryon (donc dérivation de lignées de CSE) sont interdites, mais pas les recherches utilisant des lignées importées de l'étranger. C'est le cas de l'Allemagne et de l'Italie.

– *législation d'interdiction* : l'ensemble des recherches sont interdites – recherches sur l'embryon, dérivation de lignées de CSE, recherche sur les CSE humaines, même importées. C'est le cas de la Pologne, de l'Irlande et de la Russie.

La disparité des dispositions réglementaires concernant l'utilisation des CSE à travers le monde est telle qu'il est parfois difficile de classer certains pays dans l'une ou l'autre de ces catégories. C'est le cas par exemple de la France, dont les dispositions réglementaires se rapprochent plutôt d'une législation restrictive assouplie par des dérogations.

L'utilisation thérapeutique et scientifique des CSH

La loi de bioéthique de 2011, tout comme celle de 2004, encadre de façon précise l'utilisation thérapeutique des CSH depuis le prélèvement, jusqu'à la cession de ces cellules en passant par leur conservation. L'avancée majeure de cette loi repose, à présent, sur un encadrement spécifique des CSH du sang placentaire (ainsi que des cellules du cordon et du placenta) en vue d'une utilisation thérapeutique ou scientifique.

Conditions du don et du prélèvement des CSH issues de la moelle osseuse et du sang périphérique

En application de la loi de bioéthique de 2011, le don de CSH est libre, gratuit et, dans le cas des donneurs non apparentés, anonyme, quelle que soit l'origine des cellules (moelle osseuse, sang périphérique ou sang placentaire). Ces principes sont assez semblables partout en Europe, et sont régis par la directive européenne 2004/23/CE [7]. Dans la loi de bioéthique de 2004, le recueil du consentement au prélèvement des CSH était soumis à des réglementations différentes en fonction de l'origine des cellules. Depuis la révision de la loi, les dispositions réglementaires tendent vers une harmonisation du régime juridique des CSH.

Lors d'un prélèvement de CSH par ponction intra-osseuse (CSH de la moelle osseuse) ou par cytaphérèse (CSH du sang périphérique), le recueil du consentement est soumis aux conditions dictées par l'article *L. 1241-1* du Code de

© John Libbey Eurotext, 2012

la santé publique. Ce dernier précise en particulier que le donneur doit être préalablement informé des risques et des conséquences éventuelles du prélèvement. Il doit exprimer son consentement devant le tribunal de grande instance (TGI) ou le magistrat désigné par lui, qui s'assure au préalable que le consentement est libre et éclairé. Ce consentement est révocable sans forme et à tout moment. La nouvelle loi de bioéthique rappelle également que le prélèvement de CSH, quelle que soit son origine (moelle osseuse ou sang périphérique), peut être réalisé sur un donneur mineur au bénéfice d'un don intrafamilial et en l'absence d'autre solution thérapeutique appropriée. Ce type de prélèvement n'est autorisé que s'il ne comporte aucun risque pour le mineur compte tenu de son âge ou de son développement, et si tous les moyens ont été mis en œuvre pour trouver un donneur majeur suffisamment compatible pour le receveur (*Art. L. 1241-3*). Le donneur mineur, accompagné de ses parents ou du titulaire de l'autorité parentale, donne son consentement devant un comité d'experts et le TGI. Dernièrement, les modalités de don et de prélèvement des CSH du sang placentaire ont considérablement évolué ; elles seront détaillées ultérieurement.

Le prélèvement et la collecte des CSH, destinées à des fins thérapeutiques, sont soumis aux règles de sécurité sanitaire en vigueur (*Art. L. 1211-6*) ainsi qu'aux règles de bonnes pratiques [8, 9]. Les cellules issues de la moelle osseuse ou du sang périphérique ne peuvent être prélevées à des fins d'administration autologue ou allogénique que dans des établissements de santé autorisés à cet effet par le directeur général de l'agence régionale de santé (ARS), après avis de l'Agence de la biomédecine. Les CSH peuvent également être prélevées par l'Établissement français du sang, dans ses établissements de transfusion sanguine, s'ils ont été autorisés dans les conditions applicables aux établissements de santé (*Art. L. 1242-1*). L'autorisation est accordée pour une durée de cinq ans renouvelable.

Statut juridique des CSH du sang placentaire

Les CSH du sang placentaire constituent aujourd'hui une source cellulaire intéressante dans la constitution de greffons de CSH allogéniques. À l'heure actuelle, en France, seule l'utilisation allogénique des CSH du sang placentaire est autorisée par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM[1]) à des fins thérapeutiques. Le fait d'importer ou d'exporter des CSH du sang placentaire à visée thérapeutique est également soumis à une autorisation de l'ANSM *(Art. L. 1245-5)*. La nouvelle loi de bioéthique de 2011 a fondamentalement changé le statut réglementaire des CSH du sang placentaire. Ce dernier n'est plus considéré comme un déchet opératoire, dont le don était encadré par un régime de « non-opposition », mais bien comme une source de CSH au même titre que la moelle osseuse et le sang périphérique. L'objectif de cette nouvelle disposition réglementaire est de renforcer la protection des banques de sang placentaire allogéniques et de contrer l'implantation de banques de sang placentaire privées à visée autologue.

L'activité de conservation et d'exportation de sang placentaire à visée autologue est illégale et il n'existe à ce jour en France aucune banque autorisée à le faire. Tout prélèvement et transport de sang placentaire sur le sol français dans un but de conservation autologue sont pénalement répréhensibles *(Art. 511-8 à 511-8-2 du code pénal)*. Dans certains pays, comme les États-Unis ou encore la Suisse, se sont développées des banques privées de sang placentaire pour une utilisation autologue. Leur but est de recueillir et de conserver par congélation, lors de la naissance d'un enfant, du sang placentaire en vue du traitement de pathologies éventuelles que pourrait développer cet enfant. Cette conservation est réalisée, contre paiement, pendant plusieurs années. Cependant, aujourd'hui encore, les indications en médecine réparatrice de ce type d'utilisation à visée autologue, préconisées par ces sociétés privées, restent hypothétiques et répondent davantage à des objectifs économiques. De plus, cette démarche s'oppose aux fondements même de la greffe d'organe, de cellules, et/ou de tissus qui s'est toujours constituée, en France, en un acte non lucratif, fondé sur des principes de gratuité, de solidarité, de transparence et de règles éthiques. Dans les années à venir, il sera nécessaire de favoriser la greffe allogénique destinée à la collectivité et dont l'intérêt a été prouvé. Ceci fera l'objet d'une collection d'unités de sang placentaire, riches en CSH et représentant une large diversité d'antigènes d'histocompatibilité (HLA), conservées dans des banques publiques. La taille du fichier, recensant la totalité de ces unités de sang placentaire, devra permettre d'équilibrer les importations et les exportations.

Le Réseau français de sang placentaire

En France, il existe un réseau d'établissements publics de conservation de sang placentaire, le Réseau français de sang placentaire (RFSP). L'Agence de la biomédecine est responsable du RFSP et de sa stratégie d'extension. Ce réseau structure l'activité de conservation des unités de sang placentaire, au travers des banques autorisées, et regroupe un ensemble de maternités associées à ces banques. Les banques peuvent être implantées dans des sites de l'Établissement français du sang ou dans des établissements de santé du type centre hospitalier universitaire ou centre de lutte contre le cancer. Le RFSP s'inscrit dans une

[1] L'ANSM a été mise en place le 1er mai 2012 (suite à la publication du décret du 27 avril 2012) [10] et reprend les missions, les obligations et les compétences exercées par l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps).

© John Libbey Eurotext, 2012

démarche qualité validée et formalisée à tous les niveaux de la chaîne depuis l'information de la femme enceinte jusqu'à la conservation du sang placentaire qui permet la distribution en vue de la greffe de greffons parfaitement sécurisés et suffisamment riches en cellules. L'organisation générale du dispositif répond à des procédures communes à l'ensemble du réseau et en accord avec les normes internationales. Le programme européen d'accréditation Jacie inclut les greffes de sang de cordon, sans toutefois inclure les procédures de collection, de typage, de conservation et de cession de ces greffons – qui font l'objet d'une accréditation indépendante selon le référentiel Netcord-Fact-Jacie [11, 12]. D'après les données de l'Agence de la biomédecine, de 2008 à 2012, le nombre de banques de sang placentaire passera de trois à douze et le nombre de maternités associées de 9 à environ 70 (*figure 1*), ce qui permettra d'augmenter significativement le nombre de greffons inscrits sur le fichier France-greffe de moelle (FGM). Le RFSP recensait, au 31 décembre 2011, 16 162 unités de sang placentaire stockées sur le territoire français et dont les caractéristiques sont inscrites dans sa base de données Syrenad. L'objectif à atteindre d'ici l'année 2013 s'élève à 30 000 unités de sang placentaire.

Prélèvement et don de sang placentaire

La maternité où a lieu le prélèvement de sang placentaire doit obtenir une autorisation délivrée par l'ARS dont elle dépend. La banque où est conservé le sang placentaire, quant à elle, est soumise à une autorisation de l'ANSM, après avis de l'Agence de la biomédecine, qui ne peut être accordée que dans le cadre d'une utilisation thérapeutique. Le prélèvement et la collecte du sang placentaire à des fins thérapeutiques sont soumis aux règles de bonnes pratiques ainsi qu'aux règles de sécurité sanitaire définies par le Code de la santé publique (*Art. L. 1211-6*), concernant notamment les tests de dépistage des maladies transmissibles. Seules peuvent être préparées, conservées, distribuées ou cédées les cellules du sang placentaire prélevées dans les conditions mentionnées ci-dessous (*Art. L. 1243-2*).

À présent, le prélèvement de CSH du sang placentaire (tout comme les cellules du cordon et du placenta) ne peut avoir lieu qu'à des fins thérapeutiques ou scientifiques, en vue d'un don anonyme et gratuit, et à la condition que la femme, durant sa grossesse, ait donné son consentement par écrit au prélèvement et à l'utilisation de ces cellules (*Art. L. 1241-1*). Des informations sur les finalités de ce don lui sont données

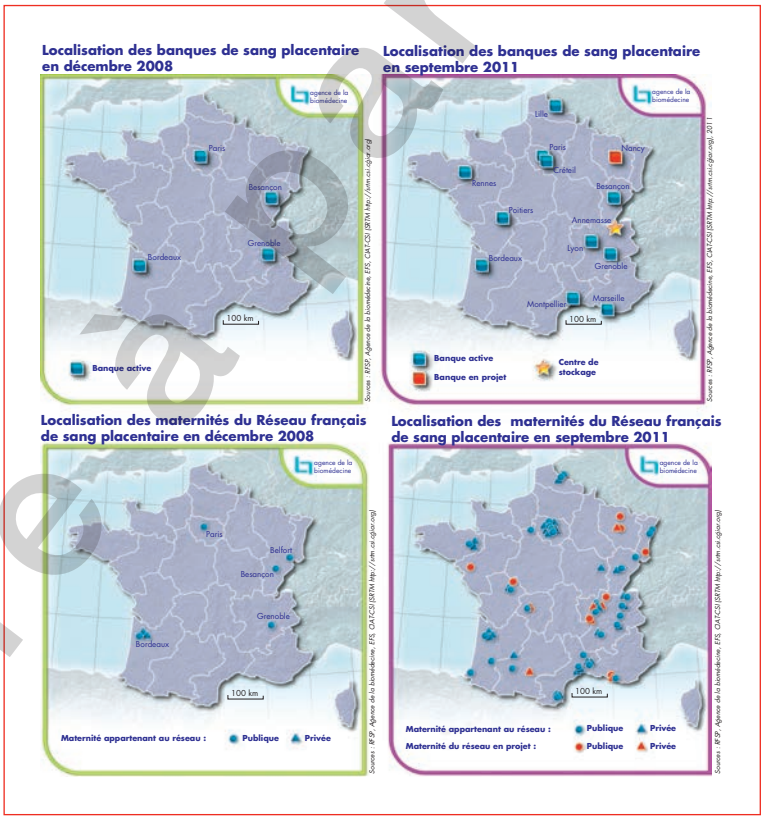


Figure 1. Évolution du Réseau français de sang placentaire entre 2008 et 2011. (Agence de la biomédecine).

© John Libbey Eurotext, 2012

Tirés à part auteur

Tableau 1
Contexte réglementaire encadrant les CSE et les CSH.

	CSE			CSH (Moelle osseuse, sang périphérique, sang placentaire)			
Activités	Recherche	Conservation	Importation Exportation	Prélèvement Collecte	Préparation Conservation Distribution	Greffe	Importation Exportation
Agences délivrant les autorisations	ABM	ABM	ABM	ARS	ANSM	ANSM	ANSM
Encadrement législatif	– Loi du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique – Décret du 11 avril 2012 relatif à la recherche sur l'embryon et les CSE			– Directive européenne du 31 mars 2004 relative à l'établissement de normes de qualité et de sécurité pour le don, l'obtention, le contrôle, la transformation, la conservation, le stockage et la distribution des tissus et cellules humains – Loi du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique – Arrêté du 16 décembre 1998 relatif au prélèvement des CSH – Décision du 27 octobre 2010 définissant les règles de bonnes pratiques relatives à la préparation, à la conservation, au transport, à la distribution et à la cession des tissus, des cellules et des préparations de thérapie cellulaire			

ABM : Agence de la biomédecine. ARS : agence régionale de santé. ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

de façon précise. Ce consentement est révocable sans forme et à tout moment tant que le prélèvement n'est pas intervenu. Le prélèvement à des fins thérapeutiques est opéré en vue d'une utilisation anonyme, dans l'intérêt de toute personne ayant besoin d'une greffe. L'anonymat est préservé entre le donneur et le receveur. Toutefois, le nom du donneur est connu de la banque afin que l'on puisse être informé de l'examen clinique du nouveau-né dans les quarante-deux jours qui suivent l'accouchement.

Dans les cas de greffes intrafamiliales, on parle de don dirigé : lorsqu'un enfant de la fratrie est atteint d'une pathologie susceptible d'être traitée par une allogreffe de CSH, le prélèvement des cellules de l'enfant à naître est conservé. La conservation des cellules faisant l'objet de dons intrafamiliaux est soumise à des conditions spécifiques. En effet, elle ne peut se faire que sur prescription du médecin spécialiste prenant en charge l'enfant malade et selon certaines modalités prévues par le groupe d'experts désigné par le RFSP. Ces recommandations portent à la fois sur les indications et les modalités de conservation et de destruction des unités de sang placentaire à visée d'utilisation allogénique familiale. Ce don intrafamilial peut être indiqué dans certaines hémoglobinopathies, maladies métaboliques, aplasies médullaires, hémopathies, tumeurs solides ou autres affections génétiques. L'existence préalable (ou concomitante) du typage HLA de l'enfant malade est indispensable à la prescription de la conservation.

Conclusion

Les textes législatifs et réglementaires français actuels, et en particulier la nouvelle loi du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique, prennent en considération spécifiquement, l'existence de deux types de cellules souches (*tableau 1*) :

– les CSE humaines, dont l'utilisation est strictement encadrée en raison de leur provenance éthiquement sensible : l'embryon. Ainsi, la loi maintient l'interdiction d'effectuer des recherches sur les CSE avec la possibilité d'obtenir des dérogations. D'après certains scientifiques, ces dispositions freineraient les avancées de la recherche française dans ce domaine et donc les potentielles applications en recherche clinique à court terme,

– les CSH, pour lesquelles le don, le prélèvement, la greffe ainsi que les activités de préparation, de contrôle, et de conservation sont très précisément encadrés, en raison du volume de plus en plus important que représente cette activité thérapeutique en France. En 2010, 1 671 allogreffes et 3 047 autogreffes de CSH ont été réalisées dans le cadre du traitement de lourdes pathologies [13]. La nouvelle loi de bioéthique tend à harmoniser le statut juridique des CSH en encadrant spécifiquement les CSH du sang placentaire.

L'utilisation spécifique de certaines populations de cellules souches, comme les cellules souches mésenchymateuses (à l'exception de celles retrouvées dans le cordon ombilical ou le placenta) ou encore les cellules souches pluripotentes induites, par exemple, ne se retrouve pas de façon précise, pour l'instant, dans les textes législatifs et réglementaires. Elle est régie par l'ensemble des dispositions couvrant l'utilisation des éléments et produits du corps humain à des fins de recherches cliniques ou scientifiques. Actuellement, ce vide juridique caractérisant ces populations cellulaires permet néanmoins de mener, assez librement, de nombreuses recherches. Les perspectives prometteuses de l'utilisation de ces cellules dans de nombreuses pathologies encore incurables aujourd'hui, ainsi que de nombreuses avancées dans

Tirés à part auteur

© John Libbey Eurotext, 2012

certains domaines (éthiques, médicaux, scientifiques, économiques et financiers, etc.) devraient faire naître, dans les années à venir, un encadrement juridique spécifique de ces populations cellulaires. ■

Remerciements. Les auteurs tiennent à remercier les docteurs Catherine Faucher et Arnaud de Guerra de l'Agence de la biomédecine pour la relecture du manuscrit et les remarques qu'ils y ont apportées. Les auteurs remercient également le docteur Federico Garnier de l'Agence de la biomédecine pour son autorisation de reproduction des cartes représentant le maillage territorial des banques de sang placentaire et des maternités en 2008 et en 2011.

RÉFÉRENCES

1. *JORF*, n° 182 du 7 août 2004, p. 14040, texte n° 1.

2. *JORF*, n° 0157 du 8 juillet 2011, p. 11826, texte n° 1.

3. *JORF*, n° 0087 du 12 avril 2012, p. 6737, texte n° 24.

4. Rapport annuel 2010 de l'Agence de la biomédecine, 2.3 La recherche sur l'embryon, Autorisations, suivi et contrôle, p. 81-82.

5. Hermange MT. Bioéthique et cellules souches. *Revue Francophone des Laboratoires* 2010 ; 427 : 61-7.

6. De Guerra A, Faucher C, Prada-Bordenave E. Cellules souches hématopoïétiques, du cordon, embryonnaires et autres: un aperçu réglementaire. *Revue Francophone des Laboratoires* 2010 ; 427 : 69-77.

7. *JO* L 102 du 7.4.2004, p. 48-58.

8. *JORF*, n° 302 du 30 décembre 1998, p. 19824.

9. *JORF*, n° 0265 du 16 novembre 2010, p. 20447, texte n° 164.

10. *JORF*, n° 0102 du 29 avril 2012, p. 7653, texte n° 12.

11. Boccaccio C, Esperou H, Rouard H, Pautas C, Robin M, Maury S, Cordonnier C. Le programme JACIE (Joint Accreditation Committee of ISCT-Europe and EBMT). Pourquoi ? Pour qui ? *Hématologie* 2008 ; 14 : 48-55.

12. NetCord-FACT International Standards for Cord Blood Collection, Processing, and Release for Administration. 4th Edition, 2010. factweb.org.

13. Rapport annuel 2010 de l'Agence de la biomédecine, prélèvement et greffe en bref, p. 189.

Tiré à part auteur

© John Libbey Eurotext, 2012

Discussion générale

Aujourd'hui, la gelée de Wharton représente une source attractive et alternative de CSM pour le développement de nouvelles approches en ingénierie cellulaire et tissulaire. *A priori* plus immatures, de par leur origine, les CSM-GW semblent apporter des avantages par rapport aux CSM adultes, permettant d'envisager leur utilisation en thérapie cellulaire à plus ou moins long terme. Contrairement à ces dernières, dont les propriétés peuvent être altérées en fonction de l'âge du donneur et au cours de l'amplification *in vitro* (perte des capacités de prolifération et de différenciation, sénescence, *etc*.), les CSM-GW présentent une relative stabilité en termes de comportement *in vitro* (Hass *et al.*, 2011). Une caractérisation étendue de ces cellules, réalisée, tout d'abord *in situ*, puis au cours de l'expansion *in vitro*, nous a permis, de mettre en évidence des différences notables entre les CSM-GW et les CSM-MO. Ces dernières représentent, encore actuellement, la source de CSM adultes de référence. Ainsi, les avantages et les inconvénients de ces cellules du cordon ombilical, en vue d'une utilisation thérapeutique, ont été identifiés et seront abordés dans le premier paragraphe de notre discussion. La production de lots cliniques de CSM nécessite de générer un grand nombre de cellules. Notre travail a montré que certains paramètres de culture ainsi que des facteurs obstétricaux, peuvent influencer positivement la prolifération cellulaire et pourront être pris en considération lors d'une éventuelle production de grade clinique des CSM-GW.

Dans un second temps, nous nous sommes focalisés sur la différenciation chondrocytaire des CSM-GW, cultivées dans un système de culture tridimensionnel, que sont les hydrogels d'alginate. Au cours de notre étude sur la caractérisation *in vitro* des CSM-GW, la différenciation chondrocytaire a été réalisée en micromasses. C'est la raison pour laquelle, nous nous proposons de discuter ensemble ces résultats de différenciation chondrocytaire obtenus dans deux systèmes de culture tridimensionnels différents. L'objectif était d'évaluer la capacité chondrogénique de ces cellules et d'apprécier les potentialités de ces dernières en ingénierie tissulaire du cartilage. Les résultats obtenus ont été comparés avec ceux obtenus avec les CSM-MO et ont permis de définir si les CSM-GW pouvaient représenter, à l'avenir, une source alternative de cellules souches pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. Notre étude a fait ressortir pour la première fois que des facteurs obstétricaux ont un impact positif sur le potentiel de différenciation chondrocytaire des CSM. Ce travail a permis de dégager certains critères de sélection des cordons ombilicaux qui renfermeraient des CSM-GW avec un potentiel chondrogénique accru pour l'ingénierie du cartilage.

I. Avantages et inconvénients des CSM-GW en vue d'une utilisation en thérapie cellulaire – comparaison avec les CSM adultes.

Contrairement à la moelle osseuse dont le prélèvement reste invasif et risqué pour le patient, la gelée de Wharton a longtemps été considérée comme un déchet opératoire, facilement accessible et proposant ainsi une source potentiellement illimitée de cellules. Depuis la nouvelle loi de bioéthique de 2011, le cordon ombilical, dans son ensemble, n'est plus considéré comme un déchet opératoire, mais bien comme une source à part entière de cellules, dont le don nécessite, à présent, le consentement libre et éclairé des mères donneuses. Cette nouvelle disposition réglementaire encadre aussi bien les CSM de la gelée de Wharton que les CSH du sang placentaire, qui sont déjà utilisées en thérapie cellulaire. La volonté du législateur d'encadrer ces cellules du cordon ombilical montre l'intérêt que suscitent ces dernières et l'espoir de pouvoir les utiliser en thérapeutique à plus ou moins long terme. Aujourd'hui, l'utilisation thérapeutique des CSM, quelle que soit la source, répond à la définition du Médicament de Thérapie Innovante (MTI) et impose, par conséquent, certaines exigences réglementaires. Le statut de MTI attribué aux CSM exige que ces dernières soient produites dans des établissements pharmaceutiques et selon les Bonnes Pratiques de Fabrication du médicament.

A l'instar des CSM-MO, le taux de réussite de l'isolement des CSM-GW est de 100%. Cependant, la densité cellulaire au sein du tissu n'est pas la même. Alors que l'on retrouve seulement entre 0,001% et 0,01% de CSM parmi les cellules mononucléées médullaires (Pittenger *et al.*, 1999), notre travail a permis, après digestion enzymatique à la collagénase, d'isoler jusqu'à 6,64 ± 0,18. 10^5 cellules stromales adhérentes par centimètre de cordon. Ainsi, sur une longueur moyenne prélevée de 25 cm de cordon ombilical, il est possible d'obtenir jusqu'à 17 millions de cellules à P0. Connaissant le doublement de population au premier passage, l'expansion *in vitro*, au terme du P1, permet de recueillir un minimum d'environ 70 millions de cellules. Actuellement, dans le cadre des essais cliniques qui utilisent des CSM-GW dans le traitement de la GVHD, la dose injectée est de 1.10^6 cellules/kg. Ainsi, avec un cordon ombilical, il serait possible de traiter au moins un patient de 70 kg à l'issue d'une expansion jusqu'à P1. Cette technique d'isolement des CSM-GW par digestion enzymatique a été utilisée, dans notre étude, uniquement afin d'estimer une densité cellulaire par centimètre de cordon. En effet, plusieurs études ont montré que l'action des enzymes sur la matrice ombilicale diminue la viabilité cellulaire et peut affecter l'expression de certains marqueurs de surface (Salehinejad *et al.*, 2012). C'est la raison pour laquelle la technique

d'isolement par la méthode non enzymatique (ou méthode dite « des explants ») a été utilisée pour la suite de nos travaux.

Nous avons isolé et amplifié *in vitro* une population relativement homogène de CSM-GW, en termes de taille, de morphologie et de phénotype (Reppel *et al.*, 2014). Dans notre article, publié en 2012, nous avions émis l'hypothèse qu'une différence phénotypique *in situ* entre la zone péri-vasculaire et inter-vasculaire de la matrice ombilicale, pouvait être prédictive du comportement des cellules en culture *in vitro* (Margossian *et al.*, 2012). Cependant, récemment, une équipe anglaise a isolé et caractérisé des CSM provenant de différentes régions de la matrice du cordon ombilical. Ces caractéristiques (immunophénotypage, prolifération et différenciation cellulaires) propres à chaque région ont été comparées avec celles de CSM prélevées sur l'ensemble d'un cordon sans distinction de zones. L'étude a montré qu'il n'y a aucune différence en termes de prolifération et de profil phénotypique entre les CSM prélevées au niveau des différentes régions. De plus, les cellules obtenues à partir de l'ensemble du cordon présentent des capacités de différenciation équivalentes voire supérieures à celles des CSM isolées à partir des différentes zones. Ainsi, les auteurs de ce travail concluent sur le fait que l'isolement des CSM, à partir de l'ensemble de la matrice du cordon ombilical, présente certains avantages (facilité technique, rapidité, quantité de matrice, rendement) et permet d'obtenir des CSM répondant aux critères minimums de caractérisation (Mennan *et al.*, 2013).

Notre travail de caractérisation des CSM-GW a mis en évidence le fait, qu'au cours de l'expansion *in vitro*, ces cellules possèdent des capacités de prolifération, expriment les marqueurs mésenchymateux et sont capables de différenciation vers les lignées ostéocytaire et chondrocytaire. Cependant, malgré un comportement en culture *in vitro* répondant aux critères minimums de définition des CSM, notre étude a permis d'identifier des différences entre les CSM-GW et les CSM-MO en termes de prolifération et de différenciation adipocytaire. En effet, les CSM-GW présentent une capacité proliférative *in vitro* plus importante que celle des CSM-MO. Cette prolifération augmentée a été démontrée par plusieurs études et se traduit notamment par un doublement de population, une capacité d'auto-renouvellement (avec l'expression du marqueur Oct-4) et une activité télomérase augmentés par rapport aux CSM-MO. Cette dernière, intimement liée à la capacité prolifératives des cellules (Blagoev, 2009), est exprimée dans la plupart des tissus tumoraux humains ainsi qu'au niveau des CSE. Elle permet, à chaque division cellulaire, d'éviter le raccourcissement des télomères et donc la sénescence des cellules. Cette activité télomérase

n'est pas retrouvée dans les cellules somatiques adultes et selon les auteurs, elle est faiblement détectée ou non au sein des cellules souches adultes (Chiu *et al.*, 1996; Zimmermann *et al.*, 2003). D'après nos résultats, malgré une faible activité télomérase détectée au sein des CSM-GW par rapport aux cellules cancéreuses HeLa, les CSM-GW présentent une télomérase plus active à P5 comparée aux CSM-MO. Différents mécanismes moléculaires, comme la phosphorylation protéique ou encore certaines hormones stéroïdes comme l'œstrogène peuvent avoir un effet sur la régulation de l'activité télomérase. En effet, une étude a montré que le 17β-œstradiol a un effet bénéfique, à la fois, sur l'activité télomérase et sur la prolifération des CSM (Cha *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2011). De plus, il a été rapporté, il y a maintenant plusieurs dizaines d'années, un pic plasmatique d'œstrogène chez la femme enceinte juste avant la délivrance. Enfin, plus récemment, une équipe a mis en évidence la présence d'œstradiol dans le sang de cordon ombilical (Tekkatte *et al.*, 2012). Nous avons, alors, émis l'hypothèse que l'œstradiol présent dans le sang de cordon ombilical pouvait diffuser, imprégnait la matrice ombilicale et donc interférait avec les propriétés des CSM-GW. Cette imprégnation hormonale pourrait alors expliquer le fait que la prolifération et l'activité télomérase des CSM-GW soient plus importantes que celles des CSM-MO. Par ailleurs, contrairement aux CSM-MO qui possèdent une bonne capacité adipogénique, notre étude a rapporté la difficulté d'induire l'adipogénèse des CSM-GW. Bien que cette constatation ait été faite par d'autres équipes (Mennan *et al.*, 2013; Ragni *et al.*, 2013), aucune d'entre elle n'a tenté d'expliquer ce phénomène. La différenciation adipogénique des CSM est induite par l'activation du facteur de transcription PPARγ (Peroxysome proliferator-activated receptor γ). Or, il a été rapporté que le 17β-œstradiol interfère avec ce facteur de transcription et inhibe l'adipogénèse (Jeong and Yoon, 2011). Ainsi, le 17β-œstradiol possède un effet positif sur la prolifération et l'activité télomérase des CSM mais diminue l'adipogénèse cellulaire à travers l'inhibition du facteur de transcription PPARγ. C'est la raison pour laquelle, nous avons cherché à explorer la présence d'une potentielle imprégnation hormonale de la gelée de Wharton et si cette dernière pouvait influencer les propriétés des CSM. Pour cela, nous avons réalisé un marquage immuno-fluorescent du 17β-œstradiol et de ses récepteurs (ERα et ERβ) au niveau de la matrice ombilicale. Des résultats préliminaires ont été obtenus et ont montré une imprégnation de 17β-œstradiol, notamment au niveau des zones péri-vasculaires de la gelée de Wharton. Nous avons également montré une expression basale de PPARγ significativement plus faible au niveau des CSM-GW par rapport aux CSM-MO, ce qui pourrait expliquer cette différence majeure entre les 2 sources de CSM concernant la différenciation adipogénique (**Figure 34**). Ces premiers résultats restent encore à confirmer.

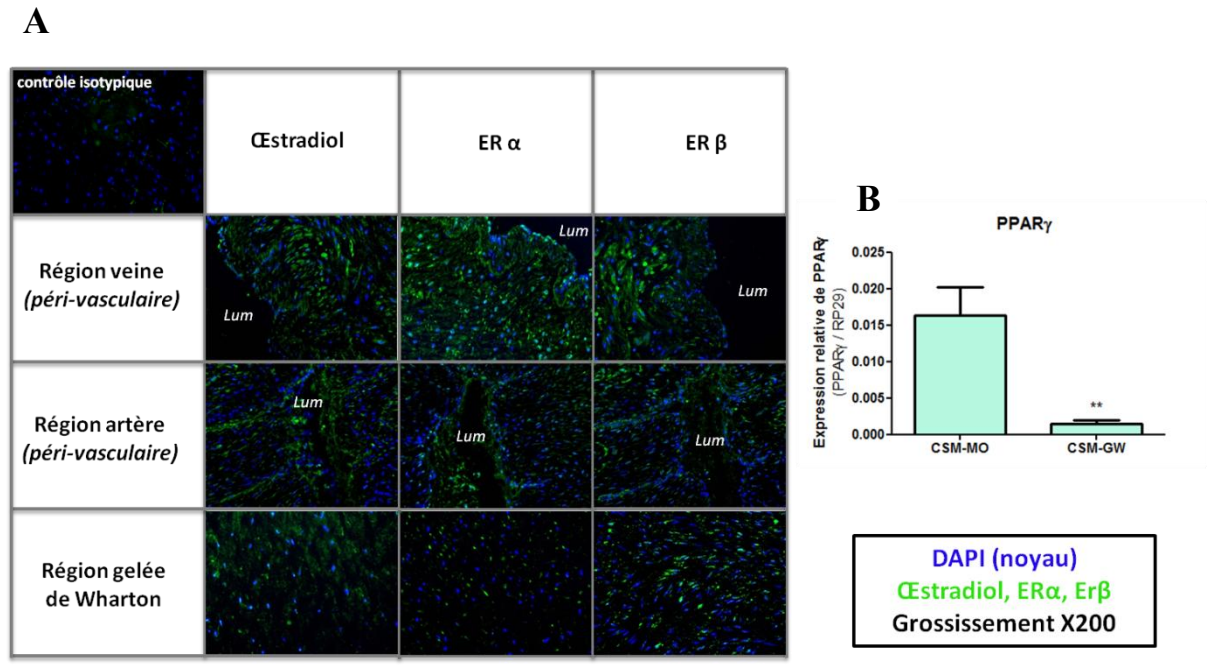


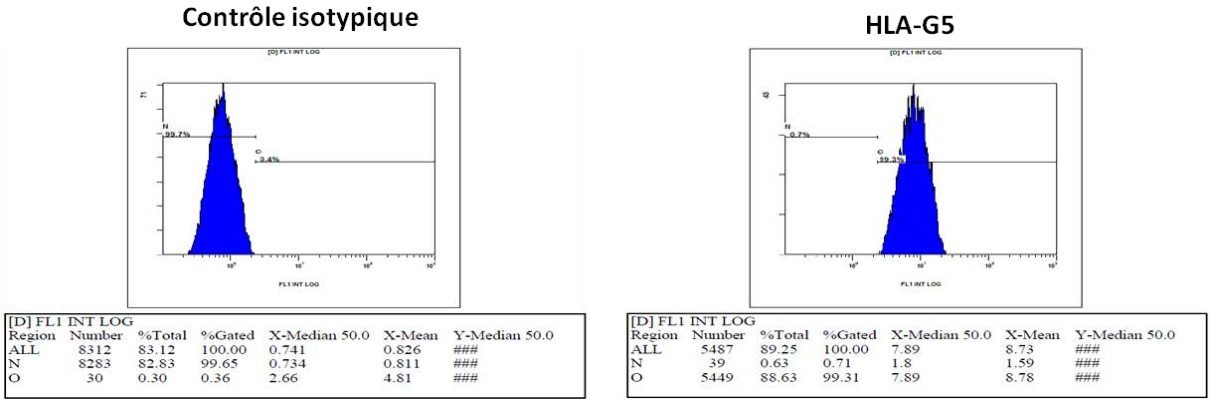
Figure 34 : Résultats préliminaires montrant l'imprégnation hormonale de la gelée de Wharton et l'expression basale de PPARγ entre les CSM-MO et les CSM-GW.
*A : Marquage immuno-fluorescent de l'œstradiol et de ses récepteurs (vert) et marquage des noyaux par le DAPI (bleu). L'émission de fluorescence a été détectée par microscopie de fluorescence (DMI 3000B, Leica ; objectif X20). B : Etude de l'expression génique de PPARγ par RT-PCR au niveau des CSM-MO et des CSM-GW (** $p < 0,01$; $n = 3$)*

Outre les différences observées entre les CSM-GW et les CSM-MO en termes de prolifération, notre travail a mis en évidence des facteurs environnementaux, comme l'hypoxie, ainsi que des facteurs obstétricaux pouvant avoir un impact positif sur la capacité proliférative des CSM-GW. En effet, il a été démontré que l'hypoxie, en stimulant l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire, par l'activation de protéines spécifiques (cyclines, protéines CDKs), favorise la multiplication et la prolifération des CSM *in vitro* (Sun *et al.*, 2013). Une étude très récente a également montré que la faible teneur en oxygène favorise la prolifération des CSM-GW en culture *in vitro* tout en maintenant leur caractère indifférencié (Drela *et al.*, 2014). Dans un contexte thérapeutique, il est nécessaire de générer *in vitro* un grand nombre de cellules afin de pouvoir constituer des lots de grade clinique. Ainsi, dans ce contexte, l'hypoxie est un paramètre important à prendre en considération. Au cours de notre étude sur l'impact des facteurs obstétricaux sur les propriétés des CSM-GW, certain d'entre eux ont montré un effet positif sur la prolifération des cellules. L'administration d'oxytocine, le diabète gestationnel ou encore la naissance à terme sont des facteurs favorisant la prolifération *in vitro* des CSM-GW. Plusieurs auteurs retrouvent cet effet pro-prolifératif de

l'oxytocine (Bakos *et al.*, 2012; Leuner *et al.*, 2012), tandis qu'une étude récente montre qu'il est dépendant du type cellulaire et que le rôle de l'oxytocine est aussi de protéger la cellule d'un stress oxydatif (Deing *et al.*, 2013). En ce qui concerne le diabète gestationnel, les résultats obtenus sont en accord avec ceux de Pierdomenico *et al.*, qui décrivent que les CSM-GW issues de mères diabétiques ont une capacité proliférative légèrement plus importante que les CSM-GW issues de mère en bonne santé (Pierdomenico *et al.*, 2011). Cependant, il est impossible de conclure que l'effet bénéfique du diabète gestationnel sur la prolifération est intrinsèque à la pathologie ou lié au traitement, notamment à l'insuline. Afin d'affiner et de confirmer potentiellement ces résultats préliminaires, il est indispensable de poursuivre ce travail sur davantage d'échantillons.

De par leur origine fœtale et les indications thérapeutiques pour lesquelles les CSM-GW pourraient apporter des bénéfices, seule une utilisation clinique en contexte allogénique de ces dernières est envisageable. De plus, la faible immunogénicité des CSM-GW ainsi que leurs propriétés d'immunomodulation sont en faveur d'une telle utilisation. La faible immunogénicité de ces cellules, liée à l'absence d'expression des antigènes HLA de classe II (comme HLA-DR par exemple) ou encore des molécules de co-stimulation (CD40, CD80 et CD86), permet d'envisager, plus favorablement, une utilisation clinique des CSM-GW en situation allogénique sans déclencher un rejet immunitaire de la part de l'organisme receveur. Les propriétés d'immunomodulation des CSM-GW sont liées à la fois aux contacts cellules-cellules ainsi qu'à la production de facteurs solubles qui inhibent l'activation des principaux effecteurs de l'immunité innée et acquise. Ces facteurs solubles sont nombreux et comprennent, notamment, le monoxyde d'azote, l'IDO, l'hème oxygénase, des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-6, TGF-β, HGF, PGE2, *etc.*), des galectines (galectine-1) et la molécule HLA-G (El Omar *et al.*, 2014; Nagamura-Inoue and He, 2014). Initialement, la molécule HLA-G est retrouvée au niveau du trophoblaste où elle joue un rôle essentiel dans la tolérance fœto-maternelle (notamment en inhibant l'activité des cellules NK maternelles) (Carosella *et al.*, 2003). Par extension et du fait de l'origine fœtale des CSM-GW, de nombreuses études ont émis l'hypothèse que ces cellules exprimaient davantage la molécule HLA-G que les CSM d'origine adulte (Weiss *et al.*, 2008; La Rocca *et al.*, 2009). C'est la raison pour laquelle notre étude s'est intéressée aux propriétés immunomodulatrices des CSM-GW à travers l'expression d'HLA-G. Cette molécule joue un rôle clé dans les capacités d'immunomodulation des CSM. Dans un contexte allogénique, elle contribue à supprimer l'activité cytotoxique des cellules NK et inhibe l'allo-prolifération des lymphocytes T

(Selmani *et al.*, 2009). Initialement, nous nous sommes focalisés sur l'expression globale d'HLA-G (isoformes membranaires et solubles). Nous avons alors montré une faible expression d'HLA-G au niveau des CSM-GW comparée à des cellules de choriocarcinomes utilisées comme contrôle positif. De plus, au niveau transcriptionnel, l'hypoxie semble augmenter l'expression d'HLA-G. Par la suite et après une revue de la littérature, il semble ressortir que l'isoforme soluble HLA-G5 est le principal isoforme d'HLA-G exprimé par les CSM (Selmani *et al.*, 2009). Dans cette étude, l'expression d'HLA-G5 a été évaluée sur des CSM-MO et quantifiée par cytométrie en flux. Le rapport des intensités moyennes de fluorescence entre les CSM-MO marquées par un anticorps anti-HLA-G5 et le contrôle isotypique est de 8,3 (Selmani *et al.*, 2009). Nous avons alors voulu réaliser, dans les mêmes conditions, le marquage d'HLA-G5 sur les CSM-GW. Nos résultats préliminaires nous ont permis d'obtenir un rapport d'intensités moyennes de fluorescence de 10,6 (**Figure 35**). Ce premier résultat est encore à confirmer mais reste très encourageant. Ainsi, à travers une expression d'HLA-G5 plus importante au niveau des CSM-GW, ces dernières pourraient présenter des propriétés d'immunomodulation supérieures à celles des CSM-MO. Les propriétés immunomodulatrices intéressantes des CSM-GW ainsi que leur faible immunogénicité, permettent d'envisager, leur transplantation en situation allogénique sans risque de déclencher un rejet immunitaire



[D] FL1 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Median 50.0	X-Mean	Y-Median 50.0
ALL	8312	83.12	100.00	0.741	0.826	###
N	8283	82.83	99.65	0.734	0.811	###
O	30	0.30	0.36	2.66	4.81	###

[D] FL1 INT LOG

Region	Number	%Total	%Gated	X-Median 50.0	X-Mean	Y-Median 50.0
ALL	5487	89.25	100.00	7.89	8.73	###
N	39	0.63	0.71	1.8	1.59	###
O	5449	88.63	99.31	7.89	8.78	###

Figure 35 : Etude de l'expression d'HLA-G5 au niveau des CSM-GW par la technique de cytométrie en flux.
Le rapport des intensités moyennes de fluorescence (IMF) est calculé par la formule suivante : IMF (HLA-G5) / IMF (contrôle isotypique) = 8,73 / 0,826 = 10,6.

II. Capacités de différenciation chondrocytaire des CSM-GW en vue d'une utilisation en ingénierie tissulaire du cartilage.

La capacité de différenciation chondrocytaire des CSM-GW, en vue de leur potentielle utilisation en ingénierie tissulaire du cartilage, a été réalisée dans deux systèmes de culture tridimensionnelle : la micromasse et l'hydrogel d'alginate enrichi en acide hyaluronique.

A l'instar des CSM-MO, notre étude a montré que les CSM-GW cultivées en micromasses, au contact d'un milieu spécifique enrichi en facteur de croissance, et notamment le TGF-β1, pendant 28 jours, sont capables de se différencier en cellules chondrocyte-like. L'expression de certains gènes d'intérêt (Sox9, agrécanes, COMP, collagène de type 2) ainsi qu'une synthèse matricielle, spécifiques du chondrocyte, a été évaluée. Notre travail de caractérisation des CSM-GW a montré que cette capacité de différenciation est maintenue au cours de l'expansion des CSM-GW. De plus, nous avons rapporté que les conditions hypoxiques, lors de l'expansion des CSM-GW, contribuent à une augmentation de la synthèse matricielle au cours de la différenciation chondrogénique. Récemment, des résultats similaires ont été obtenus avec les CSM-MO (Adesida *et al.*, 2012).

Parallèlement à la caractérisation où la différenciation chondrocytaire a été réalisée en micromasse, notre étude se situe également dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage qui associe les cellules à un biomatériau. Notre étude a évalué, pour la première fois, le potentiel chondrogénique des CSM-GW ensemencées dans un hydrogel d'alginate enrichi en acide hyaluronique (HA), sans apport de facteur de croissance, sur une cinétique de 28 jours et en comparaison avec les CSM-MO. Contrairement à la majorité des études qui utilisent des facteurs de croissance pour induire la chondrogénèse, l'induction chondrogénique, dans notre travail, a été réalisée essentiellement par l'apport d'HA au sein du biomatériau. Les hydrogels sont construits par une méthode originale de pulvérisation déjà validée antérieurement par notre équipe (Tritz *et al.*, 2010). Nous avons montré que ce procédé de fabrication permet d'obtenir un biomatériau hautement fonctionnel et structuré, apportant aux cellules un environnement biocompatible et favorisant la synthèse matricielle. Après 3 jours de culture, les CSM-GW, tout comme les CSM-MO, sont capables de s'adapter à leur environnement sans perte d'intégrité cellulaire. Au cours de l'induction chondrogénique, réalisée notamment par l'ajout d'HA au sein des hydrogels, les CSM-GW présentent des modifications phénotypiques importantes. A partir du 14ème jour de culture, le pourcentage de cellules positives pour les marqueurs mésenchymateux diminue de façon significative par rapport à

celui des cellules cultivées en monocouche. Des résultats similaires ont été obtenus avec des CSM-MO ensemencées dans des hydrogels d'alginate et cultivées en présence ou non de facteurs de croissance (Lee *et al.*, 2009). Dans cette étude, il a été démontré que le niveau d'expression des marqueurs mésenchymateux (notamment CD73 et CD105) diminue au cours de la différenciation chondrocytaire (Lee *et al.*, 2009). Ainsi, d'après nos résultats, cette diminution d'expression des marqueurs mésenchymateux pourrait refléter une perte du caractère indifférencié des CSM-GW et une entrée de ces dernières dans une voie de différenciation chondrogénique. Après 28 jours de culture, notre étude a montré que les CSM-GW sont capables d'exprimer au niveau transcriptionnel et protéique, les marqueurs spécifiques du cartilage. Le collagène de type 2 représente le principal collagène retrouvé au sein du cartilage hyalin physiologique et lui confère toutes ces propriétés biologiques et surtout mécaniques. Ces résultats confirment ceux obtenus lors de précédentes études qui ont utilisées des CSM-GW ensemencées dans des matrices tridimensionnelles (d'origine naturelle ou synthétique) et en présence de facteurs de croissance (Chen *et al.*, 2013; Nirmal and Nair, 2013).

Après 14 jours de culture tridimensionnelle et jusqu'au terme de la culture, les CSM-GW présentent un profil de différenciation chondrogénique différent de celui des CSM-MO, aussi bien au niveau phénotypique qu'au niveau de la synthèse matricielle. D'après nos résultats, après 4 semaines de différenciation chondrocytaire, les CSM-GW présentent une synthèse du collagène de type 2 plus importante que les CSM-MO, tant au niveau transcriptionnel que protéique. Dans une étude précédente, Wang *et al.* a démontré que des CSM-GW, ensemencées dans une matrice à base d'acide glycolique, en présence de facteurs de croissance, synthétisent près de trois fois plus de collagène que les CSM-MO. Cependant, ce collagène synthétisé, en comparaison avec les CSM-MO, est composé d'une plus grande quantité de collagène de type 1 et d'une quantité plus faible de collagène de type 2 (Wang, L. *et al.*, 2009). Ainsi, sur la base de nos résultats, l'hydrogel d'alginate enrichi en HA semble constituer un environnement favorisant la synthèse du collagène de type 2 des CSM-GW. En outre, aucune différence significative dans la synthèse des protéoglycanes n'a été observée entre les CSM-GW et les CSM-MO. Enfin, notre travail a mis en évidence un résultat pertinent montrant que les cellules différenciées à partir des CSM-GW expriment le collagène de type 10 à un niveau largement inférieur à celui des cellules différenciées à partir des CSM-MO, tant au niveau transcriptionnel que protéique et surtout après 28 jours de culture. Le collagène de type 10 est considéré comme l'un des principaux marqueurs du chondrocyte

hypertrophique (Studer *et al.*, 2012). Ce dernier synthétise une MEC fonctionnellement différente de celle retrouvée au niveau de cartilage hyalin physiologique. Cette matrice riche en collagène de type 10 constitue un réseau protéique favorisant la calcification et se rapprochant progressivement d'une matrice osseuse. Le chondrocyte hypertrophique est associé à la phase finale de la chondrogénèse des CSM. Or, un des défis majeurs de l'ingénierie tissulaire du cartilage est de contrôler la différenciation chondrocytaire, de façon à obtenir un phénotype chondrocytaire stable qui ne s'oriente pas vers le chondrocyte hypertrophique. Dans ce contexte, d'après nos résultats, après 28 jours de différenciation chondrocytaire, les CSM-GW semblent être moins engagées vers la voie de l'hypertrophie que les CSM-MO.

Lors de notre étude préliminaire sur l'impact des facteurs obstétricaux sur la différenciation chondrocytaire des CSM-GW, nous avons montré que les facteurs favorisant la différenciation chondrocytaire en analyse multivariée sont la durée du travail et un accouchement sans complication. En revanche, un travail long, un déclenchement de l'accouchement et l'âge de la mère ont un impact négatif sur la différenciation chondrocytaire. Ce travail a permis de dégager certains critères potentiels de sélection des cordons ombilicaux qui renfermeraient des CSM-GW avec une capacité de différenciation chondrogénique accrue pour l'ingénierie du cartilage : des cordons issus de mères jeunes, avec un accouchement normal et un travail court. Cependant, il est probable que cette étude préliminaire manque de puissance statistique et qu'il soit nécessaire de poursuivre le travail sur un plus grand nombre de cordons ombilicaux.

Conclusions et perspectives

Tout d'abord, notre travail a démontré que les CSM-GW peuvent être une source alternative de CSM, avec un potentiel de prolifération plus important que celui des CSM-MO, ainsi que des capacités de différenciation ostéogénique et chondrogénique conservées. Malgré la présence d'une télomérase active, cette dernière reste à un niveau très faible, n'altérant en rien la sécurité d'une potentielle administration de CSM-GW dans un contexte thérapeutique. Dans la perspective d'une utilisation clinique, la production de grade clinique des CSM nécessite de générer un grand nombre de cellules. Dans ce contexte et d'après nos résultats, l'hypoxie, au cours de l'expansion cellulaire, est un paramètre important à prendre en considération. Cependant, avant de pouvoir utiliser ces cellules en thérapeutique, de nombreuses études devront être menées notamment afin d'évaluer l'étendue des propriétés immunomodulatrices des CSM-GW ainsi que leur stabilité génétique. En 2014, nous avons déposé un projet, auprès de l'Agence de la Biomédecine, intitulé « Production et sécurisation de CSM-GW de grade clinique ». L'objectif principal de ce dernier est de réaliser un transfert technologique de la recherche vers la clinique. Ce transfert consiste à adapter une méthode d'isolement, de production et de conservation de CSM-GW, mise au point au sein du laboratoire de recherche, à des conditions de grade clinique à l'hôpital. L'amplification des cellules se fera jusqu'au premier passage et sera suivi d'un contrôle qualité très strict développé par le laboratoire (nombre de cellules, viabilité, auto-renouvellement et stabilité phénotypique, stabilité génétique et vieillissement cellulaire, potentiel de différenciation, capacité clonogénique, propriétés immunomodulatrices, immunogénicité et sécurité microbiologique). En tant que Médicament de Thérapie Innovante, la production de lots cliniques de CSM se fera selon les Bonnes Pratiques de Fabrication du médicament.

Dans une seconde perspective, il serait également intéressant d'évaluer leurs propriétés immunomodulatrices et le maintien de ces dernières au cours de leur différenciation. En effet, dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage, les cellules, ensemencées dans une matrice support, qui seront réinjectées en situation allogénique au niveau d'une lésion chondrale, sont des cellules différenciées issues de CSM-GW. Ainsi, il serait pertinent de savoir si ces cellules différenciées ont conservé leurs propriétés immunomodulatrices. Cette perspective fait l'objet du travail de thèse d'une doctorante du laboratoire qui s'intéresse à l'évolution de l'immunomodulation des CSM-GW lors de la différenciation chondrocytaire. L'enjeu de ce travail est de vérifier l'absence

d'immunogénicité de ces cellules au cours de la différenciation chondrocytaire au sein de biomatériaux et d'identifier les facteurs impliqués dans le maintien de l'immunomodulation. La seconde phase du projet consiste à vérifier que ces facteurs n'interfèrent pas négativement dans la différenciation chondrocytaire.

Bien que plusieurs études aient montré le potentiel chondrogénique des CSM-GW ensemencées dans une matrice tridimensionnelle, notre travail propose, pour la première fois, un modèle de culture permettant la différenciation chondrogénique des CSM-GW sans l'apport de facteur de croissance. Après 4 semaines de culture, les CSM-GW sont capables de s'adapter à leur environnement et d'exprimer les gènes et protéines matriciels spécifiques du tissu cartilagineux. Ainsi, du fait de leur potentiel de différenciation chondrogénique, leur faible immunogénicité et leur facilité d'accès, les CSM-GW représentent, aujourd'hui, une réelle source alternative de cellules souches pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. Dans la perspective de mimer davantage l'environnement physiologique du cartilage et donc d'améliorer la différenciation chondrocytaire des CSM-GW, il serait intéressant d'appliquer des stimulations mécaniques à l'ensemble cellules/matrice et de se tourner vers une ingénierie tissulaire cartilage stratifiée. Cette dernière approche fait l'objet d'un sujet de thèse d'un étudiant, au sein du laboratoire, qui tente de reconstituer, par superposition de biomatériaux de compositions différentes, l'organisation zonale du cartilage physiologique. Par la suite, il sera intéressant de réaliser des études sur des modèles animaux, présentant des lésions chondrales, afin d'évaluer la biocompatibilité *in vivo* du système cellules/matrice et de démontrer son efficacité en termes de réparation cartilagineuse. Dans une perspective d'utilisation clinique de ce système cellules/matrice, il sera nécessaire d'utiliser des biomatériaux de grade clinique (considérés comme des dispositifs médicaux) afin de répondre à la définition du Médicament de Thérapie Innovante Combiné.

A l'heure actuelle, une vingtaine d'études cliniques utilisent des CSM, hors CSM-GW, dans des applications de régénération cartilagineuse. Les cellules sont utilisées seules, par injection au niveau de la lésion, ou bien combinées à une matrice support. A notre connaissance, seulement quatre études utilisent des CSM-GW dans des pathologies articulaires qui sont la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante et l'arthrose. Cependant, dans ces études cliniques, les CSM-GW sont plutôt utilisées pour leurs propriétés anti-inflammatoires et non pour leur capacité de régénération cartilagineuse. Une autre étude utilise un facteur trophique sécrété par les CSM-GW, en injection intra-articulaire, afin de limiter la progression de gonarthrose chez les patients (http://clinicaltrials.gov) (dernière

consultation en octobre 2014). L'utilisation clinique des CSM-GW, comme source de CSM allogéniques, reste très limitée. Le fait qu'aucune étude clinique n'utilise encore des CSM-GW pour des applications en ingénierie tissulaire du cartilage, montre que leur manipulation nécessite de réaliser davantage d'études en amont et notamment des études pré-cliniques chez l'animal.

Références bibliographiques

Aasen T.,Raya A.,Barrero M. J.,Garreta E.,Consiglio A.,Gonzalez F.,Vassena R.,Bilic J.,Pekarik V.,Tiscornia G.,Edel M.,Boue S. and Izpisua Belmonte J. C. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. Nat Biotechnol, 2008, 26(11): 1276-84.

Abukawa H.,Oriel B. S.,Leaf J.,Vacanti J. P.,Kaban L. B.,Troulis M. J. and Hartnick C. J. Growth factor directed chondrogenic differentiation of porcine bone marrow-derived progenitor cells. J Craniofac Surg, 2013, 24(3): 1026-30.

Adesida A. B.,Mulet-Sierra A. and Jomha N. M. Hypoxia mediated isolation and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells. Stem Cell Res Ther, 2012, 3(2): 9.

Aggarwal S. and Pittenger M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood, 2005, 105(4): 1815-22.

Ahmed T. A. and Hincke M. T. Mesenchymal stem cell-based tissue engineering strategies for repair of articular cartilage. Histol Histopathol, 2014, 29(6): 669-89.

Al-Hajj M.,Wicha M. S.,Benito-Hernandez A.,Morrison S. J. and Clarke M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7): 3983-8.

Alberts B. Celebrating a year of Science. Science, 2008, 322(5909): 1757.

Aljitawi O. S.,Xiao Y.,Zhang D.,Stehno-Bittel L.,Garimella R.,Hopkins R. A. and Detamore M. S. Generating CK19-positive cells with hair-like structures from Wharton's jelly mesenchymal stromal cells. Stem Cells Dev, 2013, 22(1): 18-26.

Alves Da Silva M. L.,Martins A.,Costa-Pinto A. R.,Correlo V. M.,Sol P.,Bhattacharya M.,Faria S.,Reis R. L. and Neves N. M. Chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in chitosan-based scaffolds using a flow-perfusion bioreactor. J Tissue Eng Regen Med, 2011, 5(9): 722-32.

Angelucci S.,Marchisio M.,Di Giuseppe F.,Pierdomenico L.,Sulpizio M.,Eleuterio E.,Lanuti P.,Sabatino G.,Miscia S. and Di Ilio C. Proteome analysis of human Wharton's jelly cells during in vitro expansion. Proteome Sci, 2010, 8: 18.

Awe J. P.,Lee P. C.,Ramathal C.,Vega-Crespo A.,Durruthy-Durruthy J.,Cooper A.,Karumbayaram S.,Lowry W. E.,Clark A. T.,Zack J. A.,Sebastiano V.,Kohn D. B.,Pyle A. D.,Martin M. G.,Lipshutz G. S.,Phelps P. E.,Reijo Pera R. A. and Byrne J. A. Generation and characterization of transgene-free human induced pluripotent stem cells and conversion to putative clinical-grade status. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(4): 87.

Baglio S. R.,Pegtel D. M. and Baldini N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. Front Physiol, 2012, 3: 359.

Bakos J.,Strbak V.,Ratulovska N. and Bacova Z. Effect of oxytocin on neuroblastoma cell viability and growth. Cell Mol Neurobiol, 2012, 32(5): 891-6.

Baksh D.,Yao R. and Tuan R. S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. Stem Cells, 2007, 25(6): 1384-92.

Balci D. and Can A. The assessment of cryopreservation conditions for human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells towards a potential use for stem cell banking. Curr Stem Cell Res Ther, 2013, 8(1): 60-72.

Ball L. M.,Bernardo M. E.,Roelofs H.,Van Tol M. J.,Contoli B.,Zwaginga J. J.,Avanzini M. A.,Conforti A.,Bertaina A.,Giorgiani G.,Jol-Van Der Zijde C. M.,Zecca M.,Le Blanc K.,Frassoni F.,Egeler R. M.,Fibbe W. E.,Lankester A. C. and Locatelli F. Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III-IV acute graft-versus-host disease. Br J Haematol, 2013, 163(4): 501-9.

Banfi A.,Muraglia A.,Dozin B.,Mastrogiacomo M.,Cancedda R. and Quarto R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. Exp Hematol, 2000, 28(6): 707-15.

Barbosa C. M.,Leon C. M.,Nogueira-Pedro A.,Wasinsk F.,Araujo R. C.,Miranda A.,Ferreira A. T. and Paredes-Gamero E. J. Differentiation of hematopoietic stem cell and myeloid populations by ATP is modulated by cytokines. Cell Death Dis, 2011, 2: e165.

Bartholomew A.,Sturgeon C.,Siatskas M.,Ferrer K.,Mcintosh K.,Patil S.,Hardy W.,Devine S.,Ucker D.,Deans R.,Moseley A. and Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. Exp Hematol, 2002, 30(1): 42-8.

Basciano L.,Nemos C.,Foliguet B.,De Isla N.,De Carvalho M.,Tran N. and Dalloul A. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. BMC Cell Biol, 2011, 12: 12.

Bayart E. and Cohen-Haguenauer O. Technological overview of iPS induction from human adult somatic cells. Curr Gene Ther, 2013, 13(2): 73-92.

Beltrami A. P.,Barlucchi L.,Torella D.,Baker M.,Limana F.,Chimenti S.,Kasahara H.,Rota M.,Musso E.,Urbanek K.,Leri A.,Kajstura J.,Nadal-Ginard B. and Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. Cell, 2003, 114(6): 763-76.

Benvenuto F.,Ferrari S.,Gerdoni E.,Gualandi F.,Frassoni F.,Pistoia V.,Mancardi G. and Uccelli A. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. Stem Cells, 2007, 25(7): 1753-60.

Berardi A. C.,Wang A.,Levine J. D.,Lopez P. and Scadden D. T. Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. Science, 1995, 267(5194): 104-8.

Bergmann G.,Deuretzbacher G.,Heller M.,Graichen F.,Rohlmann A.,Strauss J. and Duda G. N. Hip contact forces and gait patterns from routine activities. J Biomech, 2001, 34(7): 859-71.

Bernardo M. E. and Fibbe W. E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. Cell Stem Cell, 2013, 13(4): 392-402.

Bieback K.,Kern S.,Kluter H. and Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Stem Cells, 2004, 22(4): 625-34.

Blagoev K. B. Cell proliferation in the presence of telomerase. PLoS One, 2009, 4(2): e4622.

Blanco M. V.,Vega H. R.,Giuliano R.,Grana D. R.,Azzato F.,Lerman J. and Milei J. Histomorphometry of umbilical cord blood vessels in preeclampsia. J Clin Hypertens (Greenwich), 2011, 13(1): 30-4.

Blanpain C.,Horsley V. and Fuchs E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. Cell, 2007, 128(3): 445-58.

Brittberg M.,Lindahl A.,Nilsson A.,Ohlsson C.,Isaksson O. and Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med, 1994, 331(14): 889-95.

Buzzard J. J.,Gough N. M.,Crook J. M. and Colman A. Karyotype of human ES cells during extended culture. Nat Biotechnol, 2004, 22(4): 381-2; author reply 382.

Can A. and Karahuseyinoglu S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. Stem Cells, 2007, 25(11): 2886-95.

Cao C. and Dong Y. [Study on culture and in vitro osteogenesis of blood-derived human mesenchymal stem cells]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2005, 19(8): 642-7.

Caplan A. I. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res, 1991, 9(5): 641-50.

Carlin R.,Davis D.,Weiss M.,Schultz B. and Troyer D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. Reprod Biol Endocrinol, 2006, 4: 8.

Carosella E. D.,Moreau P.,Le Maoult J.,Le Discorde M.,Dausset J. and Rouas-Freiss N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. Adv Immunol, 2003, 81: 199-252.

Cha Y.,Kwon S. J.,Seol W. and Park K. S. Estrogen receptor-alpha mediates the effects of estradiol on telomerase activity in human mesenchymal stem cells. Mol Cells, 2008, 26(5): 454-8.

Chamberlain G.,Fox J.,Ashton B. and Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Stem Cells, 2007, 25(11): 2739-49.

Chatzistamatiou T. K.,Papassavas A. C.,Michalopoulos E.,Gamaloutsos C.,Mallis P.,Gontika I.,Panagouli E.,Koussoulakos S. L. and Stavropoulos-Giokas C. Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Wharton's jelly's mesenchymal stem cell (MSC) properties: an MSC banking protocol validation for the Hellenic Cord Blood Bank. Transfusion, 2014.

Chen J. L.,Duan L.,Zhu W.,Xiong J. and Wang D. Extracellular matrix production in vitro in cartilage tissue engineering. J Transl Med, 2014, 12: 88.

Chen W. C.,Yao C. L.,Wei Y. H. and Chu I. M. Evaluating osteochondral defect repair potential of autologous rabbit bone marrow cells on type II collagen scaffold. Cytotechnology, 2011, 63(1): 13-23.

Chen X.,Zhang F.,He X.,Xu Y.,Yang Z.,Chen L.,Zhou S.,Yang Y.,Zhou Z.,Sheng W. and Zeng Y. Chondrogenic differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in type I collagen-hydrogel for cartilage engineering. Injury, 2013, 44(4): 540-9.

Chen Y.,Shao J. Z.,Xiang L. X.,Dong X. J. and Zhang G. R. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(5): 815-20.

Chiu C. P.,Dragowska W.,Kim N. W.,Vaziri H.,Yui J.,Thomas T. E.,Harley C. B. and Lansdorp P. M. Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. Stem Cells, 1996, 14(2): 239-48.

Chung C. and Burdick J. A. Engineering cartilage tissue. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(2): 243-62.

Chung C. and Burdick J. A. Influence of three-dimensional hyaluronic acid microenvironments on mesenchymal stem cell chondrogenesis. Tissue Eng Part A, 2009, 15(2): 243-54.

Chung J. Y.,Song M.,Ha C. W.,Kim J. A.,Lee C. H. and Park Y. B. Comparison of articular cartilage repair with different hydrogel-human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell composites in a rat model. Stem Cell Res Ther, 2014, 5(2): 39.

Clarke M. F.,Dick J. E.,Dirks P. B.,Eaves C. J.,Jamieson C. H.,Jones D. L.,Visvader J.,Weissman I. L. and Wahl G. M. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. Cancer Res, 2006, 66(19): 9339-44.

Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. Nat Med, 2011, 17(3): 313-9.

Colter D. C.,Sekiya I. and Prockop D. J. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(14): 7841-5.

Da-Croce L.,Gambarini-Paiva G. H.,Angelo P. C.,Bambirra E. A.,Cabral A. C. and Godard A. L. Comparison of vitrification and slow cooling for umbilical tissues. Cell Tissue Bank, 2013, 14(1): 65-76.

Dazzi F.,Ramasamy R.,Glennie S.,Jones S. P. and Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. Blood Rev, 2006, 20(3): 161-71.

De Bruyn C.,Najar M.,Raicevic G.,Meuleman N.,Pieters K.,Stamatopoulos B.,Delforge A.,Bron D. and Lagneaux L. A rapid, simple, and reproducible method for the isolation of mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly without enzymatic treatment. Stem Cells Dev, 2011, 20(3): 547-57.

Deing V.,Roggenkamp D.,Kuhnl J.,Gruschka A.,Stab F.,Wenck H.,Burkle A. and Neufang G. Oxytocin modulates proliferation and stress responses of human skin cells: implications for atopic dermatitis. Exp Dermatol, 2013, 22(6): 399-405.

Delcroix M.,Gomez C.,Marquis P. and Guibert J. Tabac, fertilité et grossesse. EMC - Obstétrique, 2007: 1-16.

Deng W.,Han Q.,Liao L.,You S.,Deng H. and Zhao R. C. Effects of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells on T and B lymphocytes from BXSB mice. DNA Cell Biol, 2005, 24(7): 458-63.

Dhollander A. A.,Verdonk P. C.,Lambrecht S.,Verdonk R.,Elewaut D.,Verbruggen G. and Almqvist K. F. Midterm results of the treatment of cartilage defects in the knee using alginate beads containing human mature allogenic chondrocytes. Am J Sports Med, 2012, 40(1): 75-82.

Diekman B. O.,Christoforou N.,Willard V. P.,Sun H.,Sanchez-Adams J.,Leong K. W. and Guilak F. Cartilage tissue engineering using differentiated and purified induced pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(47): 19172-7.

Dominici M.,Le Blanc K.,Mueller I.,Slaper-Cortenbach I.,Marini F.,Krause D.,Deans R.,Keating A.,Prockop D. and Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315-7.

Domm C.,Schunke M.,Christesen K. and Kurz B. Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension. Osteoarthritis Cartilage, 2002, 10(1): 13-22.

Drela K.,Sarnowska A.,Siedlecka P.,Szablowska-Gadomska I.,Wielgos M.,Jurga M.,Lukomska B. and Domanska-Janik K. Low oxygen atmosphere facilitates proliferation and maintains undifferentiated state of umbilical cord mesenchymal stem cells in an hypoxia inducible factor-dependent manner. Cytotherapy, 2014, 16(7): 881-92.

Duprat S.,Lemaître G. and Onteniente B. Cellules souches embryonnaires et applications thérapeutiques. Revue Francophone des Laboratoires, 2010, 427: 41-46.

Duval E.,Bauge C.,Andriamanalijaona R.,Benateau H.,Leclercq S.,Dutoit S.,Poulain L.,Galera P. and Boumediene K. Molecular mechanism of hypoxia-induced chondrogenesis and its application in in vivo cartilage tissue engineering. Biomaterials, 2012, 33(26): 6042-51.

Ebina S.,Omori A.,Tarakida A.,Ogasawara T.,Manabe M.,Katagiri S. and Kashiwakura I. Effect of the umbilical cord blood acid-base status and gas values on the yield of mononuclear cells and CD34(+) cells. J Obstet Gynaecol Res, 2012, 38(7): 997-1003.

Ebisawa K.,Hata K.,Okada K.,Kimata K.,Ueda M.,Torii S. and Watanabe H. Ultrasound enhances transforming growth factor beta-mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. Tissue Eng, 2004, 10(5-6): 921-9.

El Omar R.,Beroud J.,Stoltz J. F.,Menu P.,Velot E. and Decot V. Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: The New Gold Standard for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies? Tissue Eng Part B Rev, 2014.

Elder S. H.,Cooley A. J., Jr.,Borazjani A.,Sowell B. L.,To H. and Tran S. C. Production of hyaline-like cartilage by bone marrow mesenchymal stem cells in a self-assembly model. Tissue Eng Part A, 2009, 15(10): 3025-36.

Esposito M.,Lucariello A.,Costanzo C.,Fiumarella A.,Giannini A.,Riccardi G. and Riccio I. Differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, WJ-MSCs, into chondrogenic cells in the presence of pulsed electromagnetic fields. In Vivo, 2013, 27(4): 495-500.

Fehrer C.,Brunauer R.,Laschober G.,Unterluggauer H.,Reitinger S.,Kloss F.,Gully C.,Gassner R. and Lepperdinger G. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. Aging Cell, 2007, 6(6): 745-57.

Fong C. Y.,Richards M.,Manasi N.,Biswas A. and Bongso A. Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. Reprod Biomed Online, 2007, 15(6): 708-18.

Fong C. Y.,Subramanian A.,Biswas A.,Gauthaman K.,Srikanth P.,Hande M. P. and Bongso A. Derivation efficiency, cell proliferation, freeze-thaw survival, stem-cell properties and differentiation of human Wharton's jelly stem cells. Reprod Biomed Online, 2010, 21(3): 391-401.

Forristal C. E.,Wright K. L.,Hanley N. A.,Oreffo R. O. and Houghton F. D. Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. Reproduction, 2010, 139(1): 85-97.

Fossett E.,Khan W. S.,Pastides P. and Adesida A. B. The effects of ageing on proliferation potential, differentiation potential and cell surface characterisation of human mesenchymal stem cells. Curr Stem Cell Res Ther, 2012, 7(4): 282-6.

Fraser J. K.,Wulur I.,Alfonso Z. and Hedrick M. H. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. Trends Biotechnol, 2006, 24(4): 150-4.

Freyria A. M.,Courtes S. and Mallein-Gerin F. [Differentiation of adult human mesenchymal stem cells: chondrogenic effect of BMP-2]. Pathol Biol (Paris), 2008, 56(5): 326-33.

Friedenstein A. J.,Gorskaja J. F. and Kulagina N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol, 1976, 4(5): 267-74.

Fu Y. S.,Cheng Y. C.,Lin M. Y.,Cheng H.,Chu P. M.,Chou S. C.,Shih Y. H.,Ko M. H. and Sung M. S. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. Stem Cells, 2006, 24(1): 115-24.

Gang E. J.,Bosnakovski D.,Figueiredo C. A.,Visser J. W. and Perlingeiro R. C. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. Blood, 2007, 109(4): 1743-51.

Gatta V.,D'aurora M.,Lanuti P.,Pierdomenico L.,Sperduti S.,Palka G.,Gesi M.,Marchisio M.,Miscia S. and Stuppia L. Gene expression modifications in Wharton's Jelly mesenchymal stem cells promoted by prolonged in vitro culturing. BMC Genomics, 2013, 14: 635.

Georgi N.,Van Blitterswijk C. and Karperien M. MSC or chondrocyte seeded microcarriers as building blocks for cartilage tissue engineering. Tissue Eng Part A, 2014.

Getgood A.,Brooks R.,Fortier L. and Rushton N. Articular cartilage tissue engineering: today's research, tomorrow's practice? J Bone Joint Surg Br, 2009, 91(5): 565-76.

Gigant-Huselstein C.,Hubert P.,Dumas D.,Dellacherie E.,Netter P.,Payan E. and Stoltz J. F. Expression of adhesion molecules and collagen on rat chondrocyte seeded into alginate and hyaluronate based 3D biosystems. Influence of mechanical stresses. Biorheology, 2004, 41(3-4): 423-31.

Gigant C.,Latger-Cannard V.,Bensoussan D.,Feugier P.,Bordigoni P. and Stoltz J. F. [Quantitative expression of the adhesion receptors VLA-4, VLA-5, L-selectin, MAC-1, and ICAM-1 on the surface of CD34+ cells]. Transfus Clin Biol, 2001, 8(6): 453-9.

Gonda K.,Shigeura T.,Sato T.,Matsumoto D.,Suga H.,Inoue K.,Aoi N.,Kato H.,Sato K.,Murase S.,Koshima I. and Yoshimura K. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. Plast Reconstr Surg, 2008, 121(2): 401-10.

Grayson W. L.,Zhao F.,Bunnell B. and Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 358(3): 948-53.

Greene G. W.,Zappone B.,Soderman O.,Topgaard D.,Rata G.,Zeng H. and Israelachvili J. N. Anisotropic dynamic changes in the pore network structure, fluid diffusion and fluid flow in articular cartilage under compression. Biomaterials, 2010, 31(12): 3117-28.

Griffiths M. J.,Bonnet D. and Janes S. M. Stem cells of the alveolar epithelium. Lancet, 2005, 366(9481): 249-60.

Hangody L.,Kish G.,Karpati Z.,Udvarhelyi I.,Szigeti I. and Bely M. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. Orthopedics, 1998, 21(7): 751-6.

Hangody L.,Vasarhelyi G.,Hangody L. R.,Sukosd Z.,Tibay G.,Bartha L. and Bodo G. Autologous osteochondral grafting--technique and long-term results. Injury, 2008, 39 Suppl 1: S32-9.

Hass R.,Kasper C.,Bohm S. and Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. Cell Commun Signal, 2011, 9: 12.

Hayes A. J.,Hall A.,Brown L.,Tubo R. and Caterson B. Macromolecular organization and in vitro growth characteristics of scaffold-free neocartilage grafts. J Histochem Cytochem, 2007, 55(8): 853-66.

He H.,Mchaney M.,Hong J. and Weiss M. L. Cloning and Characterization of 3.1kb Promoter Region of the Oct4 Gene from the Fischer 344 Rat. Open Stem Cell J, 2009, 1(1): 30-39.

Hendijani F.,Sadeghi-Aliabadi H. and Haghjooy Javanmard S. Comparison of human mesenchymal stem cells isolated by explant culture method from entire umbilical cord and Wharton's jelly matrix. Cell Tissue Bank, 2014.

Hoenicka M.,Jacobs V. R.,Huber G.,Schmid F. X. and Birnbaum D. E. Advantages of human umbilical vein scaffolds derived from cesarean section vs. vaginal delivery for vascular tissue engineering. Biomaterials, 2008, 29(8): 1075-84.

Hoffman L. M. and Carpenter M. K. Characterization and culture of human embryonic stem cells. Nat Biotechnol, 2005, 23(6): 699-708.

Hong L.,Zhang G.,Sultana H.,Yu Y. and Wei Z. The effects of 17-beta estradiol on enhancing proliferation of human bone marrow mesenchymal stromal cells in vitro. Stem Cells Dev, 2011, 20(5): 925-31.

Huang A. H.,Farrell M. J.,Kim M. and Mauck R. L. Long-term dynamic loading improves the mechanical properties of chondrogenic mesenchymal stem cell-laden hydrogel. Eur Cell Mater, 2010, 19: 72-85.

Huang P.,Lin L. M.,Wu X. Y.,Tang Q. L.,Feng X. Y.,Lin G. Y.,Lin X.,Wang H. W.,Huang T. H. and Ma L. Differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells into germ-like cells in vitro. J Cell Biochem, 2010, 109(4): 747-54.

Hung S. P.,Ho J. H.,Shih Y. R.,Lo T. and Lee O. K. Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells. J Orthop Res, 2012, 30(2): 260-6.

Huselstein C.,De Isla N.,Tritz J. and Stoltz J. F. Articular Cartilage Engineering. Regenerative Medicine and Cell Therapy, 2012: 300-320.

In 'T Anker P. S.,Scherjon S. A.,Kleijburg-Van Der Keur C.,De Groot-Swings G. M.,Claas F. H.,Fibbe W. E. and Kanhai H. H. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. Stem Cells, 2004, 22(7): 1338-45.

In 'T Anker P. S.,Scherjon S. A.,Kleijburg-Van Der Keur C.,Noort W. A.,Claas F. H.,Willemze R.,Fibbe W. E. and Kanhai H. H. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. Blood, 2003, 102(4): 1548-9.

Jakobsen R. B.,Shahdadfar A.,Reinholt F. P. and Brinchmann J. E. Chondrogenesis in a hyaluronic acid scaffold: comparison between chondrocytes and MSC from bone marrow and adipose tissue. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2009.

Javed M. J.,Mead L. E.,Prater D.,Bessler W. K.,Foster D.,Case J.,Goebel W. S.,Yoder M. C.,Haneline L. S. and Ingram D. A. Endothelial colony forming cells and mesenchymal stem cells are enriched at different gestational ages in human umbilical cord blood. Pediatr Res, 2008, 64(1): 68-73.

Jeon B. G.,Kumar B. M.,Kang E. J.,Ock S. A.,Lee S. L.,Kwack D. O.,Byun J. H.,Park B. W. and Rho G. J. Characterization and comparison of telomere length, telomerase and reverse transcriptase activity and gene expression in human mesenchymal stem cells and cancer cells of various origins. Cell Tissue Res, 2011, 345(1): 149-61.

Jeong S. and Yoon M. 17beta-Estradiol inhibition of PPARgamma-induced adipogenesis and adipocyte-specific gene expression. Acta Pharmacol Sin, 2011, 32(2): 230-8.

Joerger-Messerli M.,Bruhlmann E.,Bessire A.,Wagner A.,Mueller M.,Surbek D. V. and Schoeberlein A. Preeclampsia enhances neuroglial marker expression in umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. J Matern Fetal Neonatal Med, 2014: 1-6.

Johnstone B.,Alini M.,Cucchiarini M.,Dodge G. R.,Eglin D.,Guilak F.,Madry H.,Mata A.,Mauck R. L.,Semino C. E. and Stoddart M. J. Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art. Eur Cell Mater, 2013, 25: 248-67.

Jung Y.,Kim S. H. and Kim Y. H. The effects of dynamic and three-dimensional environments on chondrogenic differentiation of bone marrow stromal cells. Biomed Mater, 2009, 4(5): 055009.

Karahuseyinoglu S.,Cinar O.,Kilic E.,Kara F.,Akay G. G.,Demiralp D. O.,Tukun A.,Uckan D. and Can A. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. Stem Cells, 2007, 25(2): 319-31.

Karp J. M. and Leng Teo G. S. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. Cell Stem Cell, 2009, 4(3): 206-16.

Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. Cell Stem Cell, 2012, 10(6): 709-16.

Kemppainen J. M. and Hollister S. J. Differential effects of designed scaffold permeability on chondrogenesis by chondrocytes and bone marrow stromal cells. Biomaterials, 2010, 31(2): 279-87.

Kerin A.,Patwari P.,Kuettner K.,Cole A. and Grodzinsky A. Molecular basis of osteoarthritis: biomechanical aspects. Cell Mol Life Sci, 2002, 59(1): 27-35.

Kim D. W.,Staples M.,Shinozuka K.,Pantcheva P.,Kang S. D. and Borlongan C. V. Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications. Int J Mol Sci, 2013, 14(6): 11692-712.

Kim J. and Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. Exp Hematol, 2009, 37(12): 1445-53.

Kim T. K.,Sharma B.,Williams C. G.,Ruffner M. A.,Malik A.,Mcfarland E. G. and Elisseeff J. H. Experimental model for cartilage tissue engineering to regenerate the zonal organization of articular cartilage. Osteoarthritis Cartilage, 2003, 11(9): 653-64.

Klein T. J.,Rizzi S. C.,Reichert J. C.,Georgi N.,Malda J.,Schuurman W.,Crawford R. W. and Hutmacher D. W. Strategies for zonal cartilage repair using hydrogels. Macromol Biosci, 2009, 9(11): 1049-58.

Kon E.,Delcogliano M.,Filardo G.,Fini M.,Giavaresi G.,Francioli S.,Martin I.,Pressato D.,Arcangeli E.,Quarto R.,Sandri M. and Marcacci M. Orderly osteochondral regeneration in a sheep model using a novel nano-composite multilayered biomaterial. J Orthop Res, 2009, 28(1): 116-24.

La Rocca G.,Anzalone R.,Corrao S.,Magno F.,Loria T.,Lo Iacono M.,Di Stefano A.,Giannuzzi P.,Marasa L.,Cappello F.,Zummo G. and Farina F. 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, 2009, 131(2): 267-82.

La Rocca G.,Lo Iacono M.,Corsello T.,Corrao S.,Farina F. and Anzalone R. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells maintain the expression of key immunomodulatory molecules when subjected to osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation in vitro: new perspectives for cellular therapy. Curr Stem Cell Res Ther, 2013, 8(1): 100-13.

Le Blanc K.,Frassoni 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. and Ringden O. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. Lancet, 2008, 371(9624): 1579-86.

Le Pen C.,Reygrobellet C. and Gerentes I. Financial cost of osteoarthritis in France. The "COART" France study. Joint Bone Spine, 2005, 72(6): 567-70.

Lee H. J.,Choi B. H.,Min B. H. and Park S. R. Changes in surface markers of human mesenchymal stem cells during the chondrogenic differentiation and dedifferentiation processes in vitro. Arthritis Rheum, 2009, 60(8): 2325-32.

Leuner B.,Caponiti J. M. and Gould E. Oxytocin stimulates adult neurogenesis even under conditions of stress and elevated glucocorticoids. Hippocampus, 2012, 22(4): 861-8.

Li T. X.,Yuan J.,Chen Y.,Pan L. J.,Song C.,Bi L. J. and Jiao X. H. Differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord tissue into odontoblast-like cells using the conditioned medium of tooth germ cells in vitro. Biomed Res Int, 2013, 2013: 218543.

Liang J.,Wu S.,Zhao H.,Li S. L.,Liu Z. X.,Wu J. and Zhou L. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly differentiate into cholinergic-like neurons in vitro. Neurosci Lett, 2013, 532: 59-63.

Liu M.,Yu X.,Huang F.,Cen S.,Zhong G. and Xiang Z. Tissue engineering stratified scaffolds for articular cartilage and subchondral bone defects repair. Orthopedics, 2013, 36(11): 868-73.

Liu S.,Yuan M.,Hou K.,Zhang L.,Zheng X.,Zhao B.,Sui X.,Xu W.,Lu S. and Guo Q. Immune characterization of mesenchymal stem cells in human umbilical cord Wharton's jelly and derived cartilage cells. Cell Immunol, 2012, 278(1-2): 35-44.

Loh Y. H.,Agarwal S.,Park I. H.,Urbach A.,Huo H.,Heffner G. C.,Kim K.,Miller J. D.,Ng K. and Daley G. Q. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. Blood, 2009, 113(22): 5476-9.

Lowry W. E. and Plath K. The many ways to make an iPS cell. Nat Biotechnol, 2008, 26(11): 1246-8.

Lund R. D.,Wang 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. and Mistry S. K. Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. Stem Cells, 2007, 25(3): 602-11.

Ma H. L.,Hung S. C.,Lin S. Y.,Chen Y. L. and Lo W. H. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. J Biomed Mater Res A, 2003, 64(2): 273-81.

Ma L.,Zhou Z.,Zhang D.,Yang S.,Wang J.,Xue F.,Yang Y. and Yang R. Immunosuppressive function of mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix in immune thrombocytopenia patients. Thromb Haemost, 2012, 107(5): 937-50.

Ma T.,Grayson W. L.,Frohlich M. and Vunjak-Novakovic G. Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues. Biotechnol Prog, 2009, 25(1): 32-42.

Magin A. S.,Korfer N. R.,Partenheimer H.,Lange C.,Zander A. and Noll T. Primary cells as feeder cells for coculture expansion of human hematopoietic stem cells from umbilical cord blood--a comparative study. Stem Cells Dev, 2009, 18(1): 173-86.

Maherali N. and Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell, 2008, 3(6): 595-605.

Majumdar D.,Bhonde R. and Datta I. Influence of ischemic microenvironment on human Wharton's Jelly mesenchymal stromal cells. Placenta, 2013, 34(8): 642-9.

Majumdar M. K.,Thiede M. A.,Haynesworth S. E.,Bruder S. P. and Gerson S. L. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. J Hematother Stem Cell Res, 2000, 9(6): 841-8.

Margossian T.,Reppel L.,Makdissy N.,Stoltz J. F.,Bensoussan D. and Huselstein C. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly: comparative phenotype analysis between tissue and in vitro expansion. Biomed Mater Eng, 2012, 22(4): 243-54.

Markway B. D.,Tan G. K.,Brooke G.,Hudson J. E.,Cooper-White J. J. and Doran M. R. Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. Cell Transplant, 2010, 19(1): 29-42.

Marlovits S.,Singer P.,Zeller P.,Mandl I.,Haller J. and Trattnig S. Magnetic resonance observation of cartilage repair tissue (MOCART) for the evaluation of autologous chondrocyte transplantation: determination of interobserver variability and correlation to clinical outcome after 2 years. Eur J Radiol, 2006, 57(1): 16-23.

Martinet L.,Fleury-Cappellesso S.,Gadelorge M.,Dietrich G.,Bourin P.,Fournie J. J. and Poupot R. A regulatory cross-talk between Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells. Eur J Immunol, 2009, 39(3): 752-62.

Matsumura K.,Hayashi F.,Nagashima T. and Hyon S. H. Long-term cryopreservation of human mesenchymal stem cells using carboxylated poly-l-lysine without the addition of proteins or dimethyl sulfoxide. J Biomater Sci Polym Ed, 2013, 24(12): 1484-97.

Maumus M.,Jorgensen C. and Noel D. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: role of secretome and exosomes. Biochimie, 2013, 95(12): 2229-34.

Mcelreavey K. D.,Irvine A. I.,Ennis K. T. and Mclean W. H. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. Biochem Soc Trans, 1991, 19(1): 29S.

Mcguirk J. P. and Weiss M. L. Promising cellular therapeutics for prevention or management of graft-versus-host disease (a review). Placenta, 2011, 32 Suppl 4: S304-10.

Mcmahon L. A.,Reid A. J.,Campbell V. A. and Prendergast P. J. Regulatory effects of mechanical strain on the chondrogenic differentiation of MSCs in a collagen-GAG scaffold: experimental and computational analysis. Ann Biomed Eng, 2008, 36(2): 185-94.

Menard C. and Tarte K. [Immunosuppression and mesenchymal stem cells: back to the future]. Med Sci (Paris), 2011, 27(3): 269-74.

Mennan C.,Wright K.,Bhattacharjee A.,Balain B.,Richardson J. and Roberts S. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. Biomed Res Int, 2013, 2013: 916136.

Messerli M.,Wagner A.,Sager R.,Mueller M.,Baumann M.,Surbek D. V. and Schoeberlein A. Stem Cells From Umbilical Cord Wharton's Jelly From Preterm Birth Have Neuroglial Differentiation Potential. Reprod Sci, 2013, 20(12): 1455-64.

Milazzo L.,Vulcano F.,Barca A.,Macioce G.,Paldino E.,Rossi S.,Ciccarelli C.,Hassan H. J. and Giampaolo A. Cord blood CD34+ cells expanded on Wharton's jelly multipotent mesenchymal stromal cells improve the hematopoietic engraftment in NOD/SCID mice. Eur J Haematol, 2014.

Mitchell K. E.,Weiss M. L.,Mitchell B. M.,Martin P.,Davis D.,Morales L.,Helwig B.,Beerenstrauch M.,Abou-Easa K.,Hildreth T.,Troyer D. and Medicetty S. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. Stem Cells, 2003, 21(1): 50-60.

Mohyeldin A.,Garzon-Muvdi T. and Quinones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. Cell Stem Cell, 2010, 7(2): 150-61.

Musumeci G.,Castrogiovanni P.,Leonardi R.,Trovato F. M.,Szychlinska M. A.,Di Giunta A.,Loreto C. and Castorina S. New perspectives for articular cartilage repair treatment through tissue engineering: A contemporary review. World J Orthop, 2014, 5(2): 80-88.

Nagamura-Inoue T. and He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. World J Stem Cells, 2014, 6(2): 195-202.

Nauta A. J.,Kruisselbrink A. B.,Lurvink E.,Willemze R. and Fibbe W. E. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. J Immunol, 2006, 177(4): 2080-7.

Nekanti U.,Dastidar S.,Venugopal P.,Totey S. and Ta M. Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia. Int J Biol Sci, 2010, 6(5): 499-512.

Nekanti U.,Mohanty L.,Venugopal P.,Balasubramanian S.,Totey S. and Ta M. Optimization and scale-up of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications. Stem Cell Res, 2010, 5(3): 244-54.

Nirmal R. S. and Nair P. D. Significance of soluble growth factors in the chondrogenic response of human umbilical cord matrix stem cells in a porous three dimensional scaffold. Eur Cell Mater, 2013, 26: 234-51.

Obokata H.,Wakayama T.,Sasai Y.,Kojima K.,Vacanti M. P.,Niwa H.,Yamato M. and Vacanti C. A. Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. Nature, 2014, 505(7485): 641-7.

Ode A.,Schoon J.,Kurtz A.,Gaetjen M.,Ode J. E.,Geissler S. and Duda G. N. CD73/5'-ecto-nucleotidase acts as a regulatory factor in osteo-/chondrogenic differentiation of mechanically stimulated mesenchymal stromal cells. Eur Cell Mater, 2013, 25: 37-47.

Ohyabu Y.,Adegawa T.,Yoshioka T.,Ikoma T.,Shinozaki K.,Uemura T. and Tanaka J. A collagen sponge incorporating a hydroxyapatite/chondroitinsulfate composite as a scaffold for cartilage tissue engineering. J Biomater Sci Polym Ed, 2009, 20(13): 1861-74.

Okita K.,Nakagawa M.,Hyenjong H.,Ichisaka T. and Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. Science, 2008, 322(5903): 949-53.

Omori A.,Hirai M.,Chiba T.,Takahashi K.,Yamaguchi S.,Takahashi T. A. and Kashiwakura I. Quality-assessments of characteristics of placental/umbilical cord blood associated with maternal age- and parity-related factor. Transfus Apher Sci, 2012, 46(1): 7-13.

Oshima H.,Rochat A.,Kedzia C.,Kobayashi K. and Barrandon Y. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. Cell, 2001, 104(2): 233-45.

Peled A.,Petit I.,Kollet O.,Magid M.,Ponomaryov T.,Byk T.,Nagler A.,Ben-Hur H.,Many A.,Shultz L.,Lider O.,Alon R.,Zipori D. and Lapidot T. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. Science, 1999, 283(5403): 845-8.

Pelttari K.,Wixmerten A. and Martin I. Do we really need cartilage tissue engineering? Swiss Med Wkly, 2009, 139(41-42): 602-9.

Penolazzi L.,Vecchiatini R.,Bignardi S.,Lambertini E.,Torreggiani E.,Canella A.,Franceschetti T.,Calura G.,Vesce F. and Piva R. Influence of obstetric factors on osteogenic potential of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. Reprod Biol Endocrinol, 2009, 7: 106.

Phinney D. G. and Prockop D. J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. Stem Cells, 2007, 25(11): 2896-902.

Pierdomenico L.,Lanuti L.,Lachmann R.,Grifone G.,Cianci E.,Gialo L.,Pacella S.,Romano M.,Vitacolonna E.,Miscia S. and Marchisio M. Diabetes mellitus during pregnancy interferes with the biological characteristics of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. Open Tissue Eng Regen Med J, 2011, 4: 103-111.

Pittenger M. F.,Mackay A. M.,Beck S. C.,Jaiswal R. K.,Douglas R.,Mosca J. D.,Moorman M. A.,Simonetti D. W.,Craig S. and Marshak D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 1999, 284(5411): 143-7.

Pittenger M. F. and Martin B. J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. Circ Res, 2004, 95(1): 9-20.

Planat-Benard V.,Menard C.,Andre M.,Puceat M.,Perez A.,Garcia-Verdugo J. M.,Penicaud L. and Casteilla L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. Circ Res, 2004, 94(2): 223-9.

Pontikoglou C.,Deschaseaux F.,Sensebe L. and Papadaki H. A. Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation. Stem Cell Rev, 2011, 7(3): 569-89.

Potier E.,Ferreira E.,Andriamanalijaona R.,Pujol J. P.,Oudina K.,Logeart-Avramoglou D. and Petite H. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. Bone, 2007, 40(4): 1078-87.

Prasajak P. and Leeanansaksiri W. Developing a New Two-Step Protocol to Generate Functional Hepatocytes from Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells under Hypoxic Condition. Stem Cells Int, 2013, 2013: 762196.

Puppi D.,Chiellini F.,Piras A. M. and Chiellini E. Polymeric materials for bone and carilage repair. Polymer Science, 2010, 35: 403-440.

Rafei M.,Hsieh J.,Fortier S.,Li M.,Yuan S.,Birman E.,Forner K.,Boivin M. N.,Doody K.,Tremblay M.,Annabi B. and Galipeau J. Mesenchymal stromal cell-derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction. Blood, 2008, 112(13): 4991-8.

Ragni E.,Vigano M.,Parazzi V.,Montemurro T.,Montelatici E.,Lavazza C.,Budelli S.,Vecchini A.,Rebulla P.,Giordano R. and Lazzari L. Adipogenic potential in human mesenchymal stem cells strictly depends on adult or foetal tissue harvest. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(11): 2456-66.

Rannou F.,Sellam J. and Berenbaum F. [Pathophysiology of osteoarthritis: updated concepts]. Presse Med, 2010, 39(11): 1159-63.

Rastegar F.,Shenaq D.,Huang J.,Zhang W.,Zhang B. Q.,He B. C.,Chen L.,Zuo G. W.,Luo Q.,Shi Q.,Wagner E. R.,Huang E.,Gao Y.,Gao J. L.,Kim S. H.,Zhou J. Z.,Bi Y.,Su Y.,Zhu G.,Luo J.,Luo X.,Qin J.,Reid R. R.,Luu H. H.,Haydon R. C.,Deng Z. L. and He T. C. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. World J Stem Cells, 2010, 2(4): 67-80.

Reppel L.,Caunday O.,Bultel S.,Stoltz J.-F.,Huselstein C. and Bensoussan D. Cellules souches et nouvelle loi de bioéthique française. Hématologie, 2012, 18(3): 175-81.

Reppel L.,Margossian T.,Yaghi L.,Moreau P.,Mercier N.,Leger L.,Hupont S.,Stoltz J. F.,Bensoussan D. and Huselstein C. Hypoxic culture conditions for Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Wharton's jelly: a critical parameter to consider in a therapeutic context. Curr Stem Cell Res Ther, 2014, 9(4): 306-318.

Richards M.,Tan S. P.,Tan J. H.,Chan W. K. and Bongso A. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. Stem Cells, 2004, 22(1): 51-64.

Robins J. C.,Akeno N.,Mukherjee A.,Dalal R. R.,Aronow B. J.,Koopman P. and Clemens T. L. Hypoxia induces chondrocyte-specific gene expression in mesenchymal cells in association with transcriptional activation of Sox9. Bone, 2005, 37(3): 313-22.

Rosland G. V.,Svendsen A.,Torsvik A.,Sobala E.,Mccormack E.,Immervoll H.,Mysliwietz J.,Tonn J. C.,Goldbrunner R.,Lonning P. E.,Bjerkvig R. and Schichor C. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. Cancer Res, 2009, 69(13): 5331-9.

Rosler E. S.,Fisk G. J.,Ares X.,Irving J.,Miura T.,Rao M. S. and Carpenter M. K. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. Dev Dyn, 2004, 229(2): 259-74.

Rossignoli F.,Caselli A.,Grisendi G.,Piccinno S.,Burns J. S.,Murgia A.,Veronesi E.,Loschi P.,Masini C.,Conte P.,Paolucci P.,Horwiz E. M. and Dominici M. Isolation, characterization, and transduction of endometrial decidual tissue multipotent mesenchymal stromal/stem cells from menstrual blood. Biomed Res Int, 2013, 2013: 901821.

Roux S.,Leotot J.,Chevallier N.,Bierling P. and Rouard H. [Mesenchymal stromal cells: Biological properties and clinical prospects]. Transfus Clin Biol, 2011, 18(1): 1-12.

Roy S.,Arora S.,Kumari P. and Ta M. A simple and serum-free protocol for cryopreservation of human umbilical cord as source of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. Cryobiology, 2014, 68(3): 467-72.

Ruan D.,Zhang Y.,Wang D.,Zhang C.,Wu J.,Wang C.,Shi Z.,Xin H.,Xu C.,Li H. and He Q. Differentiation of human Wharton's jelly cells toward nucleus pulposus-like cells after coculture with nucleus pulposus cells in vitro. Tissue Eng Part A, 2012, 18(1-2): 167-75.

Salehinejad P.,Alitheen N. B.,Ali A. M.,Omar A. R.,Mohit M.,Janzamin E.,Samani F. S.,Torshizi Z. and Nematollahi-Mahani S. N. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2012, 48(2): 75-83.

Sanchez-Ramos J.,Song S.,Cardozo-Pelaez F.,Hazzi C.,Stedeford T.,Willing A.,Freeman T. B.,Saporta S.,Janssen W.,Patel N.,Cooper D. R. and Sanberg P. R. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. Exp Neurol, 2000, 164(2): 247-56.

Sarugaser R.,Lickorish D.,Baksh D.,Hosseini M. M. and Davies J. E. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. Stem Cells, 2005, 23(2): 220-9.

Schatti O.,Grad S.,Goldhahn J.,Salzmann G.,Li Z.,Alini M. and Stoddart M. J. A combination of shear and dynamic compression leads to mechanically induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. Eur Cell Mater, 2011, 22: 214-25.

Schugar R. C.,Chirieleison S. M.,Wescoe K. E.,Schmidt B. T.,Askew Y.,Nance J. J.,Evron J. M.,Peault B. and Deasy B. M. High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue. J Biomed Biotechnol, 2009, 2009: 789526.

Secunda R.,Vennila R.,Mohanashankar A. M.,Rajasundari M.,Jeswanth S. and Surendran R. Isolation, expansion and characterisation of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study. Cytotechnology, 2014.

Selmani Z.,Naji A.,Gaiffe E.,Obert L.,Tiberghien P.,Rouas-Freiss N.,Carosella E. D. and Deschaseaux F. HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells. Transplantation, 2009, 87(9 Suppl): S62-6.

Sensebe L.,Tarte K.,Galipeau J.,Krampera M.,Martin I.,Phinney D. G. and Shi Y. Limited acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells. Cell Stem Cell, 2012, 10(1): 9-10; author reply 10-1.

Seshareddy K.,Troyer D. and Weiss M. L. Method to isolate mesenchymal-like cells from Wharton's Jelly of umbilical cord. Methods Cell Biol, 2008, 86: 101-19.

Shapiro F.,Koide S. and Glimcher M. J. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am, 1993, 75(4): 532-53.

Shizuru J. A.,Negrin R. S. and Weissman I. L. Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. Annu Rev Med, 2005, 56: 509-38.

Shohara R.,Yamamoto A.,Takikawa S.,Iwase A.,Hibi H.,Kikkawa F. and Ueda M. Mesenchymal stromal cells of human umbilical cord Wharton's jelly accelerate wound healing by paracrine mechanisms. Cytotherapy, 2012, 14(10): 1171-81.

Song L. and Tuan R. S. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. FASEB J, 2004, 18(9): 980-2.

Stadtfeld M. and Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. Genes Dev, 2010, 24(20): 2239-63.

Stadtfeld M.,Nagaya M.,Utikal J.,Weir G. and Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. Science, 2008, 322(5903): 945-9.

Steinmetz N. J. and Bryant S. J. The effects of intermittent dynamic loading on chondrogenic and osteogenic differentiation of human marrow stromal cells encapsulated in RGD-modified poly(ethylene glycol) hydrogels. Acta Biomater, 2011.

Studer D.,Millan C.,Ozturk E.,Maniura-Weber K. and Zenobi-Wong M. Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. Eur Cell Mater, 2012, 24: 118-35; discussion 135.

Sugihara E. and Saya H. Complexity of cancer stem cells. Int J Cancer, 2013, 132(6): 1249-59.

Sun L. Y.,Pang C. Y.,Li D. K.,Liao C. H.,Huang W. C.,Wu C. C.,Chou Y. Y.,Li W. W.,Chen S. Y.,Liu H. W.,Chang Y. J. and Cheng C. F. Antioxidants cause rapid expansion of human adipose-derived mesenchymal stem cells via CDK and CDK inhibitor regulation. J Biomed Sci, 2013, 20(1): 53.

Takahashi K.,Tanabe K.,Ohnuki M.,Narita M.,Ichisaka T.,Tomoda K. and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, 2007, 131(5): 861-72.

Takahashi K. and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, 2006, 126(4): 663-76.

Tarte K.,Gaillard J.,Lataillade J. J.,Fouillard L.,Becker M.,Mossafa H.,Tchirkov A.,Rouard H.,Henry C.,Splingard M.,Dulong J.,Monnier D.,Gourmelon P.,Gorin N. C. and Sensebe L. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. Blood, 2010, 115(8): 1549-53.

Tekkatte C.,Vidyasekar P.,Kapadia N. K. and Verma R. S. Enhancement of adipogenic and osteogenic differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by supplementation with umbilical cord blood serum. Cell Tissue Res, 2012, 347(2): 383-95.

Thomson J. A.,Itskovitz-Eldor J.,Shapiro S. S.,Waknitz M. A.,Swiergiel J. J.,Marshall V. S. and Jones J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, 1998, 282(5391): 1145-7.

Tisato V.,Naresh K.,Girdlestone J.,Navarrete C. and Dazzi F. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. Leukemia, 2007, 21(9): 1992-9.

Toh W. S.,Lee E. H. and Cao T. Potential of human embryonic stem cells in cartilage tissue engineering and regenerative medicine. Stem Cell Rev, 2011, 7(3): 544-59.

Tong C. K.,Vellasamy S.,Tan B. C.,Abdullah M.,Vidyadaran S.,Seow H. F. and Ramasamy R. Generation of mesenchymal stem cell from human umbilical cord tissue using a combination enzymatic and mechanical disassociation method. Cell Biol Int, 2010, 35(3): 221-6.

Torsvik A.,Rosland G. V.,Svendsen A.,Molven A.,Immervoll H.,Mccormack E.,Lonning P. E.,Primon M.,Sobala E.,Tonn J. C.,Goldbrunner R.,Schichor C.,Mysliwietz J.,Lah T. T.,Motaln H.,Knappskog S. and Bjerkvig R. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. Cancer Res, 2010, 70(15): 6393-6.

Tritz-Schiavi J.,Charif N.,Henrionnet C.,De Isla N.,Bensoussan D.,Magdalou J.,Benkirane-Jessel N.,Stoltz J. F. and Huselstein C. Original approach for cartilage tissue engineering with mesenchymal stem cells. Biomed Mater Eng, 2010, 20(3): 167-74.

Tritz J.,Rahouadj R.,De Isla N.,Charif N.,Pinzano A.,Mainard D.,Bensoussan D.,Netter P.,Stoltz J. F.,Benkirane-Jessel N. and Huselstein C. Designing a three-dimensional alginate hydrogel by spraying method for cartilage tissue engineering. Soft Matter, 2010.

Troyer D. L. and Weiss M. L. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. Stem Cells, 2008, 26(3): 591-9.

Tsai C. C.,Chen Y. J.,Yew T. L.,Chen L. L.,Wang J. Y.,Chiu C. H. and Hung S. C. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. Blood, 2011, 117(2): 459-69.

Uccelli A.,Moretta L. and Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol, 2008, 8(9): 726-36.

Ullah M.,Stich S.,Notter M.,Eucker J.,Sittinger M. and Ringe J. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells-derived adipogenic-differentiated cells into osteogenic- or chondrogenic-differentiated cells proceeds via dedifferentiation and have a correlation with cell cycle arresting and driving genes. Differentiation, 2013, 85(3): 78-90.

Valorani M. G.,Montelatici E.,Germani A.,Biddle A.,D'alessandro D.,Strollo R.,Patrizi M. P.,Lazzari L.,Nye E.,Otto W. R.,Pozzilli P. and Alison M. R. Pre-culturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials. Cell Prolif, 2012, 45(3): 225-38.

Vinatier C.,Mrugala D.,Jorgensen C.,Guicheux J. and Noel D. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. Trends Biotechnol, 2009, 27(5): 307-14.

Von Keudell A.,Atzwanger J.,Forstner R.,Resch H.,Hoffelner T. and Mayer M. Radiological evaluation of cartilage after microfracture treatment: A long-term follow-up study. Eur J Radiol, 2011.

Wagegg M.,Gaber T.,Lohanatha F. L.,Hahne M.,Strehl C.,Fangradt M.,Tran C. L.,Schonbeck K.,Hoff P.,Ode A.,Perka C.,Duda G. N. and Buttgereit F. Hypoxia promotes osteogenesis but suppresses adipogenesis of human mesenchymal stromal cells in a hypoxia-inducible factor-1 dependent manner. PLoS One, 2012, 7(9): e46483.

Wang H. S.,Hung S. C.,Peng S. T.,Huang C. C.,Wei H. M.,Guo Y. J.,Fu Y. S.,Lai M. C. and Chen C. C. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cells, 2004, 22(7): 1330-7.

Wang H. W.,Lin L. M.,He H. Y.,You F.,Li W. Z.,Huang T. H.,Ma G. X. and Ma L. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly differentiate into insulin-producing cells in vitro. Chin Med J (Engl), 2011, 124(10): 1534-9.

Wang L.,Seshareddy K.,Weiss M. L. and Detamore M. S. Effect of initial seeding density on human umbilical cord mesenchymal stromal cells for fibrocartilage tissue engineering. Tissue Eng Part A, 2009, 15(5): 1009-17.

Wang L.,Tran I.,Seshareddy K.,Weiss M. L. and Detamore M. S. 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, 2009, 15(8): 2259-66.

Wang L.,Zhao L. and Detamore M. S. Human umbilical cord mesenchymal stromal cells in a sandwich approach for osteochondral tissue engineering. J Tissue Eng Regen Med, 2011, 5(9): 712-21.

Wang X.,Wenk E.,Zhang X.,Meinel L.,Vunjak-Novakovic G. and Kaplan D. L. Growth factor gradients via microsphere delivery in biopolymer scaffolds for osteochondral tissue engineering. J Control Release, 2009, 134(2): 81-90.

Wang Y.,Zhang Z.,Chi Y.,Zhang Q.,Xu F.,Yang Z.,Meng L.,Yang S.,Yan S.,Mao A.,Zhang J.,Yang Y.,Wang S.,Cui J.,Liang L.,Ji Y.,Han Z. B.,Fang X. and Han Z. C. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. Cell Death Dis, 2013, 4: e950.

Warren L.,Manos P. D.,Ahfeldt T.,Loh Y. H.,Li H.,Lau F.,Ebina W.,Mandal P. K.,Smith Z. D.,Meissner A.,Daley G. Q.,Brack A. S.,Collins J. J.,Cowan C.,Schlaeger T. M. and Rossi D. J. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. Cell Stem Cell, 2010, 7(5): 618-30.

Waterman R. S.,Tomchuck S. L.,Henkle S. L. and Betancourt A. M. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. PLoS One, 2010, 5(4): e10088.

Wei X.,Peng G.,Zheng S. and Wu X. Differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells into steroidogenic cells in comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. Cell Prolif, 2012, 45(2): 101-10.

Weiss M. L.,Anderson C.,Medicetty S.,Seshareddy K. B.,Weiss R. J.,Vanderwerff I.,Troyer D. and Mcintosh K. R. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. Stem Cells, 2008, 26(11): 2865-74.

Weiss M. L.,Medicetty S.,Bledsoe A. R.,Rachakatla R. S.,Choi M.,Merchav S.,Luo Y.,Rao M. S.,Velagaleti G. and Troyer D. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. Stem Cells, 2006, 24(3): 781-92.

Weissman I. L. and Shizuru J. A. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. Blood, 2008, 112(9): 3543-53.

Wognum A. W.,Eaves A. C. and Thomas T. E. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. Arch Med Res, 2003, 34(6): 461-75.

Wolbank S.,Van Griensven M.,Grillari-Voglauer R. and Peterbauer-Scherb A. Alternative sources of adult stem cells: human amniotic membrane. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2010, 123: 1-27.

Wong M.,Siegrist M.,Wang X. and Hunziker E. Development of mechanically stable alginate/chondrocyte constructs: effects of guluronic acid content and matrix synthesis. J Orthop Res, 2001, 19(3): 493-9.

Wu A. G.,Michejda M.,Mazumder A.,Meehan K. R.,Menendez F. A.,Tchabo J. G.,Slack R.,Johnson M. P. and Bellanti J. A. Analysis and characterization of hematopoietic progenitor cells from fetal bone marrow, adult bone marrow, peripheral blood, and cord blood. Pediatr Res, 1999, 46(2): 163-9.

Xie J.,Han Z.,Kim S. H.,Kim Y. H. and Matsuda T. Mechanical loading-dependence of mRNA expressions of extracellular matrices of chondrocytes inoculated into elastomeric microporous poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold. Tissue Eng, 2007, 13(1): 29-40.

Xu Y.,Huang S.,Ma K.,Fu X.,Han W. and Sheng Z. Promising new potential for mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord Wharton's jelly: sweat gland cell-like differentiative capacity. J Tissue Eng Regen Med, 2012, 6(8): 645-54.

Yoo K. H.,Jang I. K.,Lee M. W.,Kim H. E.,Yang M. S.,Eom Y.,Lee J. E.,Kim Y. J.,Yang S. K.,Jung H. L.,Sung K. W.,Kim C. W. and Koo H. H. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. Cell Immunol, 2009, 259(2): 150-6.

Yoon J. H.,Roh E. Y.,Shin S.,Jung N. H.,Song E. Y.,Chang J. Y.,Kim B. J. and Jeon H. W. Comparison of explant-derived and enzymatic digestion-derived MSCs and the growth factors from Wharton's jelly. Biomed Res Int, 2013, 2013: 428726.

Yu B.,Zhang X. and Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. Int J Mol Sci, 2014, 15(3): 4142-57.

Yu J.,Vodyanik M. A.,Smuga-Otto K.,Antosiewicz-Bourget J.,Frane J. L.,Tian S.,Nie J.,Jonsdottir G. A.,Ruotti V.,Stewart R.,Slukvin, Ii and Thomson J. A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science, 2007, 318(5858): 1917-20.

Zaim M.,Karaman S.,Cetin G. and Isik S. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. Ann Hematol, 2012, 91(8): 1175-86.

Zeddou M.,Briquet A.,Relic B.,Josse C.,Malaise M. G.,Gothot A.,Lechanteur C. and Beguin Y. The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. Cell Biol Int, 2010, 34(7): 693-701.

Zhang H. T.,Chen H.,Zhao H.,Dai Y. W. and Xu R. X. Neural stem cells differentiation ability of human umbilical cord mesenchymal stromal cells is not altered by cryopreservation. Neurosci Lett, 2011, 487(1): 118-22.

Zhang H. T.,Fan J.,Cai Y. Q.,Zhao S. J.,Xue S.,Lin J. H.,Jiang X. D. and Xu R. X. Human Wharton's jelly cells can be induced to differentiate into growth factor-secreting oligodendrocyte progenitor-like cells. Differentiation, 2010, 79(1): 15-20.

Zhao W.,Ji X.,Zhang F.,Li L. and Ma L. Embryonic stem cell markers. Molecules, 2012, 17(6): 6196-236.

Zhou J.,Xu C.,Wu G.,Cao X.,Zhang L.,Zhai Z.,Zheng Z.,Chen X. and Wang Y. In vitro generation of osteochondral differentiation of human marrow mesenchymal stem cells in novel collagen-hydroxyapatite layered scaffolds. Acta Biomater, 2011.

Zimmermann S.,Voss M.,Kaiser S.,Kapp U.,Waller C. F. and Martens U. M. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. Leukemia, 2003, 17(6): 1146-9.

Zouboulis C. C.,Adjaye J.,Akamatsu H.,Moe-Behrens G. and Niemann C. Human skin stem cells and the ageing process. Exp Gerontol, 2008, 43(11): 986-97.

POTENTIALITE DES CELLULES STROMALES DE LA GELEE DE WHARTON EN INGENIERIE DU CARTILAGE

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton humaines (CSM-WJ) représentent une source abondante et intéressante de cellules souches pour des applications en ingénierie cellulaire et tissulaire. Leur origine fœtale leur confère des caractéristiques spécifiques par rapport aux cellules stromales/souches mésenchymateuses isolées à partir de moelle osseuse humaine (CSM-MO). Tout d'abord, le but de ce travail est d'optimiser les conditions de culture des CSM-GW pour leur utilisation clinique ultérieure. Nous nous concentrons sur l'influence de la concentration en oxygène lors de l'expansion en monocouche de P1 à P7 sur plusieurs paramètres permettant de caractériser les CSM. Les résultats obtenus sont comparés à ceux obtenus avec les CSM-MO. Notre travail a montré des différences entre les deux sources cellulaires en termes de prolifération et de différenciation adipocytaire. D'après nos résultats, l'hypoxie, au cours de l'expansion, est un paramètre important à prendre en compte en ce qui concerne la prolifération et le potentiel de différenciation chondrocytaire. L'influence des facteurs obstétricaux sur les caractéristiques des CSM-GW est également explorée. Cette étude se situant également dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage, la seconde phase du projet consiste à induire la différenciation des cellules en chondrocytes en ensemençant ces dernières dans un biomatériau à base d'alginate et d'acide hyaluronique, et sur une cinétique de 28 jours. Les résultats obtenus sont comparés à ceux obtenus avec les CSM-MO. Après 4 semaines de culture, les CSM-GW sont capables de s'adapter à leur environnement et d'exprimer des gènes et des protéines matriciels spécifiques du cartilage tels que le collagène de type 2, qui se trouve plus exprimé après différenciation à partir des CSM-GW qu'à partir de CSM-MO.

Mots clés : Cellules Stromales/Souches Mésenchymateuses, Gelée de Wharton, Hypoxie, Facteurs obstétricaux, Ingénierie Tissulaire du Cartilage.

POTENTIALITY OF STROMAL CELLS FROM WHARTON'S JELLY IN CARTILAGE ENGINEERING

Mesenchymal Stromal/Stem Cells from human Wharton's jelly (WJ-MSC) are an abundant and interesting source of stem cells for applications in cell and tissue engineering. Their fetal origin confers specific characteristics compared to Mesenchymal Stromal/Stem Cells isolated from human bone marrow (BM-MSC). First, the aim of this work is to optimize WJ-MSC culture conditions for their subsequent clinical use. We focus on the influence of oxygen concentration during monolayer expansion on several parameters to characterize MSC. The results are compared to those obtained with BM-MSC. Our work distinguishes WJ-MSC from BM-MSC in terms of proliferation and adipogenic differentiation. Considering our results, hypoxia during cell expansion is an important parameter to take into account regarding proliferation potential but also chondrogenic differentiation potential. The influence of obstetric factors on WJ-MSC characteristics is also explored. In cartilage tissue engineering context, the second phase of the project is to induce cell differentiation into chondrocytes by seeding them in Alginate/Hyaluronic Acid hydrogel scaffold, and during 28 days. The results obtained are compared to those obtained with BM-MSC. After 4 weeks of culture, WJ-MSC are able to adapt to their environment and express specific cartilage-related genes and matrix proteins such as type 2 collagen, which is found more expressed after differentiation fromWJ-MSC, than from BM-MSC.

Key words: Mesenchymal Stromal/Stem Cells, Wharton's Jelly, Hypoxia, Obstetrics factors, Cartilage Tissue Engineering.