

Devenir des propriétés immunomodulatrices des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton au cours de la différenciation chondrocytaire

Léonore Avercenc-Léger

► To cite this version:

Léonore Avercenc-Léger. Devenir des propriétés immunomodulatrices des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton au cours de la différenciation chondrocytaire. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT: 2017LORR0210. tel-01816024

HAL Id: tel-01816024 https://theses.hal.science/tel-01816024

Submitted on 14 Jun 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 <u>http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php</u> <u>http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm</u>



Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

<u>Thèse</u>

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

Léonore AVERCENC-LEGER

Devenir des propriétés immunomodulatrices des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton au cours de la différenciation chondrocytaire

Soutenue le 27 novembre 2017

Membres du jury :

Rapporteurs :M. Yves HENROTINPU, Université de Liège, BelgiqueM. Georges UZANDR Inserm, UMR 1197 Inserm, VillejuifExaminateurs :Mme Danièle BENSOUSSANPU-PH, UMR 7365 CNRS-UL, directrice de thèseMme Céline HUSELSTEINPU, UMR 7365 CNRS-UL, co-directrice de thèse

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

À Alice et Jeannine Delahaigue,

À mes parents,

À mon époux,

 \dot{A} mes enfants.

Remerciements

Je tiens ici à remercier Madame le Professeur **Danièle Bensoussan**, ma directrice de thèse, pour avoir cru en moi dès le début et m'avoir accompagnée sans faille jusqu'ici. Vos encouragements constants et votre perpétuelle bienveillance m'ont permis d'arriver au bout malgré les difficultés, de murir et de réfléchir autrement, y compris concernant mon avenir professionnel. Soyez assurée de mon admiration et de ma profonde reconnaissance.

Je remercie également Madame le Professeur Céline Huselstein, ma co-directrice de thèse, pour m'avoir accompagnée durant toutes ces années avec bonne humeur. Votre soutien et votre compréhension dans des périodes difficiles m'ont été précieux. Soyez assurée de mon admiration et de ma profonde reconnaissance.

Je remercie les Professeurs **Georges Uzan** et **Yves Henrotin** pour l'honneur qu'ils me témoignent en acceptant d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je les remercie du temps consacré à évaluer mes travaux et je leur en suis reconnaissante.

Je tiens également à remercier les Docteurs **Nathalie Rouas-Freiss** et **Sébastien Gibot** pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse. Vos conseils m'ont guidée tout au long de ce travail.

Je souhaite exprimer ma très grande reconnaissance à Monsieur le Professeur Jean-Yves Jouzeau pour avoir accepté de m'accueillir dans le laboratoire IMoPA. Nos discussions et nos réunions au Conseil Scientifique de l'Université m'ont permis de connaitre votre grand dévouement à vos postes et au soutien des étudiants.

Je remercie Monsieur le Professeur **Patrick Menu** et Madame **Hélène Primerano** pour leur disponibilité et leur dévouement à la réussite des doctorants.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur le Professeur **Jacques Magdalou**, pour sa constante bienveillance et son aide précieuse notamment en langue anglaise.

Je remercie le Conseil Scientifique de la Faculté de Médecine de Nancy pour m'avoir soutenue en m'attribuant le prix Wittner 2017, et tout particulièrement les Docteurs Astrid Pinzano et Christelle Henrionnet

Un grand merci à Madame le Docteur **Natalia De Isla** pour son accompagnement dans les enseignements, nos discussions, et sa présence toujours réconfortante.

Ma profonde reconnaissance également à toutes ces personnes qui ont fait du laboratoire un lieu d'échanges, d'écoute, de partage, de soutien aussi : Brigitte Guerber, Monique Gentils, Ghislaine Cauchois, Nasser Charif, Marie-Hélène Piet, Nadia Bezai et last but not least, ma très chère Valérie Gobert.

Mille merci à mes copines et copains de thèse pour les soutiens indéfectibles, gardes de Margot, rires, émotions, aides précieuses, échanges de matériels, réactifs et techniques, coups à boire, repas au RU ... J'espère que les années à venir feront perdurer certaines de ces pratiques avec Reine El-Omar, Mathilde Guibert, Julie Hablot, Caroline Laroye, Paul Neybecker, Mathieu Riffault, Laurie Targa, Mélissa Yéléhé-Oukouma. Un grand merci à A-Team of BioSE et tous ceux qui m'ont accompagnée avant et pendant ce mandat : Antoine Bersweiler, Benoît Bragantini, Guillaume Clerget, Mathilde Guibert, Cécile Huppert, Jean-Christophe Lec, Amel Mohamadi, Arnaud Paul.

Merci à tous les copains, ceux du M1, de l'UHP et affiliés, les sages-femmes, les médecins, les mineurs, et ceux de l'enfance. En vrac : Aline Albert, Steven Baillet, Rémi Béranger, Etienne Bissonnet, Diane Butscha, Linda Caléro, Alison Calvaruso, Charlotte Casamitjana, Alice Castagnola, Adèle Cortet, Thomas Deharbe, Ombeline Fallot, Mars Goumont, Julie Hoff, Barbara de Maestri, Sandra Marchionni ♥, David Moulin, Gergana Pehlivanska, Romain Pierronnet, Cécile Pochon, Léa Rey, Camille Santos, Charlotte Spolidoro, Cécile Tortiget, Charlotte Trebel, et Zotero.

Merci au cinéma, à la littérature, à la musique, au monde, à la voile et au ski d'exister, et d'avoir rendu ce travail de thèse parfois très difficile, parfois un peu plus supportable.

Merci à ma belle-famille pour son soutien, Marion, Corinne, Frédéric et Anthony.

Merci à Lulu.

Merci à ma grand-mère bien-aimée pour son accompagnement et sa fierté éternels.

Merci également à mes frère et sœur, Adrien et Marianne.

Merci à mes parents, **Martine** et **Sylvain**, pour m'avoir donné l'opportunité de connaitre le monde. Ce cadeau m'est inestimable.

Merci à Pierre, Margot et les suivants, de me supporter et donner un sens à ma vie.

Table des matières

Table des matières

Liste de	s publications et communications	
Liste de	es abréviations	13
Figures		
Tableau	IX	21
Etat de	l'art	
I. I	es cellules souches humaines	
A.	Généralités	23
B.	Cellules souches totipotentes et pluripotentes	23
C.	Cellules souches multipotentes	27
D.	Cellules souches unipotentes	
II.	Les cellules souches mésenchymateuses	
A.	Caractérisation	
B.	Sources	
C.	Propriétés	
III.	Alloréactivité et rôle des CSM	
A.	Mécanismes impliqués dans l'alloréactivité	
B.	Mécanismes inhibiteurs des CSM	
C.	Recherches sur les CSM	44
IV.	L'ingénierie tissulaire du cartilage	47
A.	Le cartilage sain	47
B.	Lésions du cartilage et traitements	
C.	Ingénierie du cartilage	55
Objecti	fs de thèse	61
Matérie	ls et méthodes	

I. Recueil de données et facteurs obstétricaux		
II. Culture cellulaire	67	
Isolement et culture en monocouche des CSM-GW		
Passage et conservation des cellules		
Décongélation et mise en culture en monocouche des cellules	69	
Amplification cellulaire	69	
Evaluation de la prolifération cellulaire : temps de doublement6		
Différenciation chondrogénique en pellets	70	
Différenciation chondrogénique en biomatériaux	71	
Dissolution des billes d'Alginate/HA	71	
Stimulation des CSM-GW à l'IFN- γ et TNF- α		
III. Méthodes analytiques		
A. Cytométrie en flux		
Viabilité cellulaire, apoptose, nécrose	76	
Immunophénotypage77		
B. Histologie	77	
Analyse quantitative de la synthèse matricielle		
C. Biologie Moléculaire		
D. ELISA		
E. Cultures mixtes lymphocytaires (MLR)		
IV. Analyses statistiques		
A. Tests de corrélation	92	
B. Régressions linéaires		
C. Analyses de variance		
Résultats et discussion		
I. Influence des facteurs obstétricaux sur le comportement cellula	ire95	

A.	Caractéristiques des échantillons) 7
B.	Caractérisation des CSM-GW) 9
C. cho	Influence des paramètres avant décongélation sur la prolifération et la différenciation ondrocytaire	on 00
D.	Prolifération)1
E.	Différenciation chondrocytaire10)5
F.	Discussion)8
II.	Détermination des conditions optimales mimant un contexte inflammatoire in vitro 12	28
A.	Différenciation chondrocytaire	29
B.	Viabilité	35
C.	Sécrétion de facteurs solubles	36
D.	Discussion14	40
III. chond	Evaluation des propriétés immunomodulatrices des CSM-GW au cours de la différenciation lrocytaire	on 45
A. pro	Caractérisation des CSM-GW pendant la différenciation chondrocytaire : phénotype fil sécrétoire	et 45
B. de l	Caractérisation des propriétés immunogènes et immunomodulatrices des CSM-GW lo la différenciation chondrocytaire en situation allogénique1	rs 51
C.	Discussion15	54
Conclus	sions et perspectives	53
Référen	ces bibliographiques	57
Résumé		32
Abstrac	t18	32

Liste des publications et communications Publications dans des journaux à comité de lecture :

- Avercenc-Léger L, Guerci P, Virion JM, Cauchois G, Hupont S, Rahouadj R, Magdalou J, Stoltz JF, Bensoussan D, Huselstein C, Reppel L. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells: predictive obstetric factors for cell proliferation and chondrogenic differentiation. Stem Cell Res Ther. 2017;8(1):161.
- Yang X, Qi Y, Avercenc-Léger L, Vincourt JB, Hupont S, Huselstein C, Wang H, Chen L, Magdalou J. Effect of nicotine on the proliferation and chondrogenic differentiation of the human Wharton's jelly mesenchymal stem cells. Biomed Mater Eng. 2017;28(s1):S217-S228.
- Du W, Reppel L, Léger L, Schenowitz C, Huselstein C, Bensoussan D, Carosella E, Han ZC, Rouas-Freiss N. Mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and adipose tissue maintain their immunosuppressive properties after chondrogenic differentiation: role of HLA-G. Stem Cells Dev. 2016;25(19):1454-69.
- Reppel L, Schiavi J, Charif N, Léger L, Yu H, Pinzano A, Henrionnet C, Stoltz JF, Bensoussan D, Huselstein C. Chondrogenic induction of mesenchymal stromal/stem cells from Wharton's jelly embedded in alginate hydrogel and without added growth factor: an alternative stem cell source for cartilage tissue engineering. Stem Cell Res Ther. 2015;6(1):260.
- 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. Curr Stem Cell Res Ther. 2014;9(4):306–18.

Brevet d'invention :

Cellules souches mésenchymateuses, leur méthode de préparation et leurs utilisations.
Bensoussan D, Gibot S, Reppel L, Laroye C, Boufenzer A, Avercenc L, Huselstein C.
Numéro de soumission : 1000392684 le 28 février 2017.

Communications orales avec publication d'acte :

 Léger L, Reppel L, Huselstein C, Bensoussan D. (2015) Evolution of HLA-G expression by Wharton's jelly's mesenchymal stromal cells during chondrogenic differentiation in two different culture methods. Tissue Antigens. 86(2):93-93.

Communications affichées avec publication d'acte :

Léger L, Reppel L, Guerci P, Virion JM, Hupont S, Rahouadj R, Magdalou J, Stoltz JF, Huselstein C, Bensoussan D (2013) Is there an influence of obstetric factors on proliferation and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly? Wound Rep Reg. 21(6):A73-A73.

Communications affichées sans publication d'acte :

- Léger L, Louis H, Chayem A, Cauchois G, Bensoussan D, Huselstein C (2016) Evolution of immunomodulatory effects of Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells during chondrogenic differentiation: effect of IFN-γ/TNF-α stimulation. – First meeting of the CNRS GDRI France-China "Mesenchymal Stem Cells and Regenerative Medicine" 11-13 juillet 2016, Vandœuvre-lès-Nancy.
- Yang X, Léger L, Vincourt JB, Chen LB, Wang H., Magdalou J (2016) Effect of nicotine on human chondrocyte and on the proliferation and differentiation of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. – First meeting of the CNRS GDRI France-China "Mesenchymal Stem Cells and Regenerative Medicine" 11-13 juillet 2016, Vandœuvre-lès-Nancy.

Liste des abréviations

Α

ADAMTS4 ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 4 ADAMTS5 ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 5 ADN acide désoxyribonucléique ADNc Acide désoxyribonucléique complémentaire AF488 AlexaFluor[®] 488 Alg/HA Alginate/Acide hyaluronique AMM Autorisation de mise sur le marché APC Allophycocyanine ARN Acide ribonucléique

В

BDNF Brain-derived neurotrophic factor BMP-2 bone morphogenetic protein 2 BrdU 5-Bromo-2'-deoxyuridine BSA Albumine de sérum bovin

С

CaCl₂ chlorure de calcium CD Cluster de Différenciation CFU-F colony-forming-unit fibroblasts CHRU Centre Hospitalier Régional Universitaire CHU centre hospitalo-universitaire CMF cytométrie en flux CMH complexe majeur d'histocompatibilité COMP Cartilage oligomeric matrix protein СРА cellules présentatrices d'antigènes CSE cellules souches embryonnaires CSH cellules souches hématopoïétiques CSM cellules souches mésenchymateuses

CSM-GW cellules souches mésenchymateuses de gelée de Wharton CSM-MO cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse CSM-TA cellules souches mésenchymateuses de tissu adipeux CTLA cytotoxic T-lymphocyte-associated protein

D

DMEM Dubelcco's Modified Eagle Medium DMSO diméthylsulfoxyde DNMT 3B DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta

Ε

EDTA Éthylène Diamine Tétra-Acétique ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay EPO érythropoïétine

F

FGF Fibroblast growth factor FITC Fluorescéine IsoThiocyanate

G

GABRB3 Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-3 GAG glycosaminoglycanes G-CSF Granulocyte-colony stimulating factor GDF3 Growth differentiation factor-3 GDF5 growth differentiation factor 5 GDNF Glial cell-derived neurotrophic factor GM-CSF Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor GvHD graft versus host disease GvL greffon versus leucémie GW Gelée de Wharton

Η

НΑ

Acide hyaluronique

HBSS Hank's Balanced Salt Solution HES hématoxyline-éosine-safran HGF hepatocyte growth factor HLA Human Leukocyte Antigen HRP peroxydase de raifort HSP Heat shock protein

I

IBMP Institut de Biologie Moléculaire des Plantes ICAM IntraCellular Adhesion Molecule IDO Indoleamine 2,3-dioxygénase IFN interféron IMF intensité moyenne de fluorescence iPSC cellules pluripotentes induites ISCT International Stem Cell Banking Initiative ITS Insuline, Transferrine, acide Sélénieux

Κ

KLF4 Kruppel-like factor 4

М

MEC matrice extracellulaire MLR Mixed lymphocyte reaction MMP1 Matrix metalloproteinase-1 MMP3 Matrix metalloproteinase-1 MO moelle osseuse

Ν

NaCl chlorure de sodium NCAM Neural cell adhesion molecule NO oxyde nitrique

0

Oct

Octamer-binding transcription factor

Ρ

Ρ Passage PAF Paraformaldéhyde PBMC Peripheral blood mononuclear cell PBS Phosphate Buffer Salin PCR polymerase chain reaction PD1 Programmed cell death protein 1 PDGF Platelet-derived growth factor PD-L1 Programmed death-ligand 1 PD-L2 Programmed death-ligand 2 ΡE Phycoérythrine PGE-2 Prostaglandine E2 PMT Photomultiplicateurs PTIBC Plate Forme d'Imagerie et de Biophysique Cellulaire

Q

qPCR quantitative polymerase chain reaction

R

RP29 ribosomal protein 29 RT-PCR Reverse transcription polymerase chain reaction Runx2 Runt-related transcription factor 2

S

SCID Severe Combined ImmunoDeficiency SDF-1 stromal cell-derived factor 1 Sox SRY box SSEA Stage-Specific Embryonic Antigens SVF Sérum de Veau Fœtal

Τ

TA Tissu adipeux

TGF

Transforming growth factor

TNF tumor necrosis factor

тро

thrombopoïétine

V

VCAM Vascular Cell Adhesion Molecule VEGF

Vascular endothelial growth factor

Tables des illustrations

Figures

Figure 1 : Structure du cordon ombilical	32
Figure 2 : Locus HLA	35
Figure 3 : Récepteurs et ligands impliqués dans l'activation des lymphocytes T	39
Figure 4 : Processus d'interaction des CSM avec les lymphocytes T et les cellules dendritiques	43
Figure 5 : Formation des articulations	48
Figure 6 : Différents stades de la chondrogenèse	49
Figure 7 : Structure du cartilage articulaire	50
Figure 8 : Composition de la MEC du cartilage hyalin	51
Figure 9 : Principe de l'ingénierie du cartilage	55
Figure 10 : Structure des chaines d'alginate et modèle de liaison « boite à œufs »	59
Figure 11 : Processus d'étude de l'influence des facteurs obstétricaux sur la prolifération et la différenciation GW	des CSM- 61
Figure 12 : Processus d'étude de l'influence de la stimulation IFN/TNF sur les propriétés des CSM-GW	62
Figure 13 : Processus d'évaluation des propriétés immunologiques des CSM-GW au cours de la diffé chondrocytaire	renciation 63
Figure 14 : Méthode de mesure des pellets	71
Figure 15 : Fonctionnement schématique d'un cytomètre en flux	73
Figure 16 : Techniques d'immunomarquages direct et indirect	75
Figure 17 : Marquage des cellules apoptotiques et nécrotiques	76
Figure 18 : Méthode d'isolement des colorations par le logiciel ImageJ	81
Figure 19 : Représentation schématique d'un ELISA en sandwich	84
Figure 20 : Représentation schématique d'un ELISA par compétition	85
Figure 21 : Schématisation des tests de cultures mixtes lymphocytaires réalisés	88
Figure 22 : Caractérisation des CSM-GW	99
Figure 23 : Temps de doublement. Distribution des échantillons aux passages 1 et 2	101
Figure 24 : Facteurs obstétricaux influençant le temps de doublement en P1	102

Figure 25 : Facteurs quantitatifs ayant une influence sur le temps de doublement en P_2	104
Figure 26 : Facteurs qualitatifs ayant une influence sur le temps de doublement en P $_2$	104
Figure 27 : Impact des facteurs obstétricaux impliqués dans la prolifération cellulaire sur la différenciation chondrocyte	aire 105
Figure 28 : Mise en évidence de la différenciation chondrocytaire des CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA	130
Figure 29 : Mise en évidence de la différenciation chondrocytaire en histologie	131
Figure 30 : Expression des collagènes de type I et II par les CSM-GW à J₂ et J₃₀ de la différenciation chondrocytaire	132
Figure 31 : Comparaison histologique de l'impact des stimulations sur la différenciation chondrocytaire – coloratic l'HES	on à 133
Figure 32 : Comparaison histologique de l'impact des stimulations sur la différenciation chondrocytaire - coloratior bleu Alcian	า au _133
Figure 33 : Comparaison histologique de l'impact des stimulations sur la différenciation chondrocytaire - coloratior rouge Sirius	า au 134
Figure 34 : Viabilité cellulaire en fonction du temps et de la stimulation	135
Figure 35 : Influence des différentes stimulations sur la sécrétion d'IL-6 par les CSM-GW en cours de différenciation _	136
Figure 36 : Influence des différentes stimulations sur la sécrétion de TGF-8 par les CSM-GW en cours de différencia	tion 137
Figure 37 : Influence des différentes stimulations sur la sécrétion de PGE-2 par les CSM-GW en cours de différencia	tion 138
Figure 38 : Influence des différentes stimulations sur la sécrétion de VEGF par les CSM-GW en cours de différenciat	tion 139
Figure 39 : Expression d'HLA-DR, CD40 et des molécules de costimulation en fonction du temps et de la stimulation _	146
Figure 40 : Expression d'IDO et d'HLA-G en fonction du temps et de la stimulation	148
Figure 41 : Sécrétion d'IL-6, TGF-6, PGE-2 et VEGF en fonction du temps et de la stimulation	150
Figure 42 : Immunogénicité des CSM-GW en situation allogénique	151
Figure 43 : Immunomodulation des CSM-GW en situation allogénique	152
Figure 44 : Vérification du rôle du biomatériau dans les MLR – N=2	153
Figure 45 : Sécrétion d'IL-10 en fonction du temps et de la stimulation	157

Tableaux

Tableau 1 : Types de législations encadrant la recherche sur les cellules souches embryonnaires et pays dans les elles sont en vigueur	quels 26
Tableau 2 : Caractéristiques des différentes sous-populations de lymphocytes T	37
Tableau 3 : Biomatériaux utilisés en ingénierie du cartilage	57
Tableau 4 : Liste des paramètres obstétricaux retenus pour l'étude	66
Tableau 5 : Composition des différents milieux de culture cellulaire	67
Tableau 6 : Anticorps directs utilisés pour la CMF	74
Tableau 7 : Anticorps indirects utilisés pour la CMF	75
Tableau 8 : Protocoles de coloration de l'appareil Tissue-Tek TEC	80
Tableau 9 : Amorces utilisées en PCR en temps réel	82
Tableau 10 : Facteurs de dilution des anticorps ELISA DuoSet	86
Tableau 11 : Facteur de dilutions des surnageants utilisés pour les tests ELISA et gammes de détection	87
Tableau 12 : Influence des facteurs obstétricaux sur les propriétés des CSM-GW	96
Tableau 13: Descriptif des facteurs obstétricaux relatifs à la mère	97
Tableau 14: Descriptif des facteurs obstétricaux relatifs aux nouveau-nés	98
Tableau 15: Descriptif des facteurs obstétricaux relatifs au travail et à l'accouchement	98
Tableau 16 : Corrélation entre les propriétés des CSM-GW en P ₀ et après décongélation	_ 100
Tableau 17 : Corrélation entre le temps passé en congélation et les propriétés des CSM-GW après décongélation	_ 101
Tableau 18 : Différences entre les CSM-GW des groupes Temps de doublement P1 inférieur et supérieur à 100h	_ 103
Tableau 19 : Récapitulatif des facteurs influençant les capacités des CSM-GW	_ 107
Tableau 20 : Ratio d'intensités moyennes de fluorescence d'HLA-DR et des marqueurs de costimulation par rappo contrôle en fonction du temps et de la stimulation	ort au 146
Tableau 21 : Ratio d'intensités moyennes de fluorescence d'IDO et HLA- G par rapport au contrôle en fonction du t et de la stimulation	emps 148

Première partie : Etat de l'art

I. Les cellules souches humaines

A. Généralités

Les cellules souches sont des cellules non spécialisées qui, sous l'effet d'un signal provenant de leur environnement, peuvent se différencier afin de devenir des cellules spécialisées. Elles constituent un réservoir cellulaire, notamment pour l'individu en devenir (embryon, fœtus) mais également chez l'individu adulte. Elles sont dotées de deux potentialités principales : leurs capacités d'auto-renouvellement et de différenciation.

L'auto-renouvellement se définit comme la capacité d'une cellule à se diviser pour donner deux individus identiques. Cette division peut être réalisée de manière symétrique, c'est-à-dire qu'une cellule mère va donner deux cellules filles souches, ou bien de manière asymétrique, pour donner une cellule souche et une cellule différenciée. De cette manière, le pool originel de cellules souches est conservé. Une autre méthode de division consiste à donner deux cellules filles différenciées, dans ce cas, la cellule souche originelle disparait et le pool de cellules souches diminue. Ces divisions ont lieu dans la niche des cellules pour les divisions asymétriques et en dehors de la niche pour les divisions symétriques.

La capacité de différenciation, quant à elle, résulte dans le fait de donner différents types cellulaires fonctionnels adaptés à la situation topographique ou au tissu environnant. La cellule obtenue perd son caractère souche. De manière générale, plus les cellules se différencient, plus elles sont spécialisées, moins elles prolifèrent. Cette capacité est dépendante du type de cellule souche. En effet, il existe 4 types de cellules souches. Chaque nouveau type implique une perte de capacité de différenciation.

B. Cellules souches totipotentes et pluripotentes *a. Caractéristiques*

Les cellules souches totipotentes sont les premières cellules dans le développement de l'organisme. Elles sont capables de produire l'intégralité des cellules constituant l'individu, ainsi que son environnement *in utero* (trophoblaste puis placenta, cordon ombilical et membranes). Elles constituent les stades du zygote jusqu'à la morula (de 2 à 16 cellules).

Les cellules souches pluripotentes sont responsables de la production des trois feuillets embryonnaires qui vont constituer l'intégralité du corps de l'individu : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. D'après les recommandations de l'International Stem Cell Banking Initiative (ISCT), elles sont caractérisées par la présence des marqueurs de surface SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 et l'absence de SSEA-1, ainsi que par l'expression des gènes Nanog, Oct-4, DNMT 3B, TDGF, GABRB3 et GDF3. Elles doivent également produire un tératocarcinome lorsqu'elles sont implantées chez la souris SCID (1).

En 2006, Shinya Yamanaka publie une découverte majeure : la production d'un nouveau type de cellules souches, les cellules pluripotentes induites (iPSC), qui sont des cellules différenciées reprogrammées. A l'aide de rétrovirus, 24 gènes sont testés afin d'isoler la combinaison permettant de transformer les cellules différenciées en cellules pluripotentes. Quatre gènes sont identifiés comme permettant la reprogrammation des cellules au stade de la pluripotence : Oct3/4, Sox2, KLF4 et c-Myc (2). En 2007, une autre équipe publie une nouvelle association de gènes n'incluant pas le proto-oncogène c-Myc : Oct4, Sox2, NANOG et LIN28 (3).

b. Cadre législatif

L'usage des cellules souches pluripotentes, c'est-à-dire des cellules souches embryonnaires, en recherche ou en application clinique nécessite la destruction d'un embryon. L'obtention d'une telle lignée cellulaire est alors subordonnée à plusieurs points. Tout d'abord d'un point de vue éthique, le présupposé est que l'embryon n'a pas de statut moral ou alors que les bénéfices potentiels de la recherche ou de la thérapie sont importants (4). En France, depuis la loi du 06 aout 2013 modifiant la loi n°2011-814 du 07 juillet 2011, la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires est passée d'un régime d'interdiction avec dérogations à un régime d'autorisation encadrée. D'un point de vue légal (Source : Articles L2151-5 et L1241-5 du code de la Santé Publique, République Française) :

- la pertinence scientifique de la recherche doit être établie
- l'usage des CSE doit avoir une finalité médicale
- le recours à l'embryon est nécessaire, c'est-à-dire qu'on ne peut plus substituer des cellules d'un autre organisme

- les principes éthiques doivent être respectés
- l'embryon ne doit plus faire l'objet d'un projet parental et le couple doit avoir donné son autorisation avec un délai de 3 mois avant l'usage des cellules
- une autorisation doit être délivrée par l'agence de la Biomédecine qui juge de la pertinence scientifique du projet, de la finalité médicale et du fait qu'elle ne peut être menée sans recourir à des embryons ou cellules souches embryonnaires
- un embryon ayant servi à la recherche ne peut plus être implanté à des fins de gestation
- un embryon résultant d'une interruption volontaire de grossesse peut être utilisé à des fins de recherche si la femme la subissant a donné son consentement et que le protocole de recherche est validé par l'Agence de la biomédecine.

Ces dispositions sont très variables d'un pays à un autre, et l'on peut définir 4 catégories de législation encadrant la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires : législation permissive, permissive avec restriction, restrictive et enfin législation d'interdiction (Source : Agence de la Biomédecine – <u>Encadrement international de la bioéthique – Actualisation 2014</u>). Ces 4 catégories regroupent des caractères principaux communs, mais de petites variations existent entre chaque pays d'une même catégorie.

La législation permissive, en vigueur notamment au Royaume-Uni (**Tableau 1**), autorise les recherches sur l'embryon et les CSE humains, la dérivation de nouvelles lignées de CSE humaines, la création d'embryons pour la recherche et le transfert nucléaire ; la majorité des techniques sont autorisées à l'exception du clonage reproductif.

La législation permissive avec restrictions, en vigueur en France et dans la majorité des pays européens (**Tableau 1**), autorise – ou n'interdit pas – les recherches sur l'embryon et les CSE humains et la dérivation de lignées à partir d'embryons ne faisant plus l'objet d'un projet parental. La destruction d'embryon est donc autorisée. En revanche, le transfert nucléaire est interdit tout comme la création d'embryon pour la recherche. Ce dernier point est d'ailleurs ratifié par la Convention internationale d'Oviedo sur les Droits de l'Homme et la Biomédecine du 4 avril 1997 et tous les pays signataires s'y soumettent. A ce jour, 29 pays du continent européen l'ont ratifiée (Source : Conseil de l'Europe – <u>Etat des signatures</u>

<u>et ratifications du traite 164</u>). Dès lors, les financements européens pour la recherche sur l'embryon y sont également soumis.

La législation restrictive, en vigueur entre autres en Allemagne (**Tableau 1**), interdit les recherches sur l'embryon à l'exception de lignées importées. Aucune destruction d'embryon n'est tolérée dans le cadre de la recherche.

La législation d'interdiction interdit l'ensemble des recherches sur embryon, mêmes les lignées importées.

Tableau 1 : Types de législations encadrant la recherche sur les cellules souches embryonnaires et pays dans lesquels elles sont en vigueur

Type de législation	Pays concernés
Permissive	Belgique, Chine, Corée du Sud, Egypte, Etats-Unis (sur fonds non fédéraux), Israël, Japon, Royaume-Uni, Russie, Singapour, Suède, Taiwan, Ukraine
Permissive avec restrictions	Australie, Brésil, Bulgarie, Canada, Chypre, Croatie, Danemark, Espagne, Estonie, Finlande, France, Grèce, Hongrie, Inde, Islande, Norvège, Nouvelle-Zélande, Pays-Bas, Portugal, République Tchèque, Slovénie, Suisse
Restrictive	Allemagne, Etats-Unis (sur fonds fédéraux), Hongrie, Italie
D'interdiction	Autriche, Chili, Colombie, Costa Rica, Equateur, Irlande, Jordanie, Lituanie, Malaisie, Maroc, Pérou, Philippines, Pologne, Slovaquie, Tunisie, Uruguay, Venezuela, Vietnam.

c. Utilisation dans le cadre d'essais cliniques

A ce jour, les CSE sont ou ont été utilisées dans le cadre de peu d'essais cliniques – 22 répertoriés sur le site clinicaltrials.gov au 20 octobre 2017. Ceux-ci concernent majoritairement des traitements de maladies de la rétine et 3 concernent l'insuffisance cardiaque, la maladie de Parkinson et un protocole d'amélioration de fécondation *in vitro*. Si l'avenir de la thérapie par les cellules souches pluripotentes semble dépendant de l'utilisation des iPSC (5), il faut noter que les iPSC sont issues d'un tissu adulte. Par conséquent, leur patrimoine génétique est altéré au niveau des télomères, mais également

des suites des modifications épigénétiques subies lors de la vie du patient. De plus, les gènes réactivés lors de la production des iPSC sont des gènes tumoraux. Par exemple, NANOG et Sox2 ont déjà été détectés dans différents cancers – glioblastome, tumeurs primitives du cerveau, cancers du sein, de l'œsophage, du colon, de l'ovaire et de la prostate (6). Leur utilisation est donc subordonnée à la preuve de leur non tumorogénicité après implantation.

C. Cellules souches multipotentes *a. Caractéristiques*

Les cellules souches multipotentes appartiennent à l'un des trois feuillets embryonnaires et ne peuvent pas se différencier en un type cellulaire d'un autre feuillet. Elles sont déjà engagées, c'est-à-dire qu'elles peuvent donner un nombre limité de types cellulaires spécialisés ; ce sont par exemple les cellules souches hématopoïétiques, mésenchymateuses ou les cellules de la crête neurale. Elles sont caractérisées différemment selon leur type cellulaire. Elles peuvent provenir de différentes sources, adultes – sang périphérique, moelle osseuse, tissu adipeux, liquide synovial, etc... – mais également de sources fœtales – placenta, liquide amniotique, membranes, sang placentaire et gelée de Wharton.

b. Cadre législatif

La législation française impose le recueil du consentement libre et éclairé du donneur, ou de sa mère lorsqu'il s'agit d'un fœtus. De plus, le don doit être bénévole et anonyme – sauf dans le cas d'un don entre frère et sœur – et ne concerne que les personnes majeures, sauf cas exceptionnel. Auparavant, les cellules provenant des annexes fœtales étaient considérées comme des déchets opératoires. Depuis la loi relative à la Bioéthique du 7 juillet 2011, le sang de cordon, le sang placentaire, les cellules du cordon et du placenta sont considérés comme des sources de cellules souches et leur prélèvement est soumis aux mêmes règles que les cellules souches d'origine adulte (Source : Articles L1211-1 à L1211-9, L1221-1 à L1221-8-1 et L1241-1 à L1241-4 du code de la Santé Publique, République Française).

c. Utilisation en clinique et essais cliniques

Actuellement, les cellules souches multipotentes sont utilisées en thérapie cellulaire pour une seule indication dans le monde, les pathologies touchant le système hématopoïétique. Depuis les années 1970, les cellules souches hématopoïétiques sont utilisées pour traiter les hémopathies malignes réfractaires. Le patient est traité pour induire une aplasie médullaire, qui a le double effet de détruire les cellules cancéreuses et de provoquer une vacuité médullaire. Les CSH d'un donneur sain et HLA (Human Leukocyte Antigen) compatible sont ensuite transfusées au patient afin de reconstituer une hématopoïèse normale et produire des lignées sanguines saines. La réponse allogénique des lymphocytes du greffon va pouvoir détruire les éventuelles cellules cancéreuses résiduelles, c'est ce qu'on appelle l'effet du greffon versus leucémie (GvL). Dans ce genre de traitement, l'une des principales complications est la réaction du greffon contre l'hôte, appelée GvHD - graft versus host disease. Lors d'une GvHD, les lymphocytes du greffon réagissent contre les tissus et organes du receveur. La prophylaxie de la GvHD consiste en l'administration d'immunosuppresseurs tels que la ciclosporine seule ou associée à d'autres molécules comme le méthotrexate par exemple. Le traitement curatif de la GvHD repose sur l'administration en première ligne de corticoïdes et en seconde ligne d'autres immunosuppresseurs. De nombreux traitements émergent actuellement dont le but est également de préserver l'effet GvL. Les CSM notamment, sont utilisées en essais cliniques en adjonction à la greffe ou après la greffe de CSH pour améliorer la prise du greffon rôle stromal - et réguler la GvHD - rôle immunomodulateur. Ces différentes propriétés seront détaillées dans la suite de ce travail.

De nombreux essais cliniques en cours utilisent des cellules souches multipotentes dans le but de traiter des pathologies ou régénérer un tissu lésé. Leurs capacités de différenciation sont telles que ces essais concernent la plupart des tissus ou organes du corps humain : système vasculaire, nerveux, respiratoire, digestif, musculo-squelettique, rétine...

D. Cellules souches unipotentes *a. Caractéristiques*

Les cellules unipotentes ne peuvent produire qu'un seul type cellulaire propre à un organe ou tissu, comme les cellules intestinales ou les cellules de la peau. Leurs capacités

de différenciation sont donc limitées. Elles permettent de réparer le tissu en cas de lésion, ou simplement de renouveler les cellules. Elles sont présentes dans la plupart des tissus et organes du corps. Leur caractérisation est spécifique du type cellulaire.

b. Cadre législatif

Tout comme les cellules souches mésenchymateuses, le recueil des cellules souches unipotentes est soumis, dans la législation française, au recueil du consentement libre et éclairé du donneur (Source : Articles L1211-1 à L1211-9, L1221-1 à L1221-8-1 et L1241-<u>1 à L1241-4</u> du code de la Santé Publique, République Française). Dans le cadre de la thérapie cellulaire et tissulaire à partir de cellules souches unipotentes, il est en revanche très fréquent d'avoir recours à un prélèvement autologue. En l'occurrence, il existe deux possibilités : (1) le prélèvement et l'administration des cellules se fait lors d'une seule et même intervention médicale, l'action est donc soumise aux obligations légales en lien avec le traitement du patient, (2) les cellules prélevées nécessitent une préparation particulière qui ne peut s'effectuer que par des établissements ou organismes autorisés par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (Source : Article L1243-2 du code de la Santé Publique Française).

c. Utilisation en clinique et en recherche

Les cellules souches unipotentes sont utilisées en clinique, notamment les cellules souches limbiques de la cornée dans les lésions de celle-ci (7) ou encore les cellules souches de la peau en cas de brûlures (8). Des études récentes montrent l'émergence de thérapies associant des cellules unipotentes avec des cellules souches mésenchymateuses, particulièrement dans les traitements de greffes cutanées (8,9).

II. Les cellules souches mésenchymateuses

A. Caractérisation

Les CSM sont définies par l'ISCT comme adhérentes au plastique en conditions standards, positives pour les marqueurs de surface CD73, CD90, CD105 et négatives pour CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 et le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II HLA-DR. Elles doivent également être capables de se différencier en ostéoblastes, chondroblastes et adipocytes (10). Leurs propriétés immunomodulatrices peuvent également être caractérisées, particulièrement pour les essais cliniques, selon deux articles récents de l'ISCT (11,12). Selon leurs auteurs, 7 caractérisations doivent être menées : un test standard par « priming » des cellules à l'IFN- $\gamma/TNF-\alpha$, une analyse fonctionnelle, l'utilisation de cellules répondantes purifiées, l'analyse de la sécrétion d'IDO in vitro, la xénogreffe chez l'animal, l'analyse prospective de la réponse lymphocytaire des patients, et le suivi des CSM injectées pour vérifier si elles sont la cible d'une réponse immunitaire. Le terme de cellules souches mésenchymateuses apparait pour la première fois en 1975 dans une publication de Collet et Des Biens, qui retrouvent des cellules souches dans le mésenchyme pulmonaire de fœtus de rats (13). Une définition plus fidèle est réalisée par Sager en 1982, qui décrit des cellules fibroblastiques capables de se différencier en adipocytes, myoblastes et chondrocytes chez le hamster (14). Il faut attendre 1991 pour que Caplan décrive des cellules adhérentes au plastique « non limitées en termes de prolifération », capables de se différencier selon des signaux de l'environnement, voire de se déplacer pour atteindre un tissu lésé. La possibilité d'une utilisation de ces cellules en thérapie tissulaire y est déjà testée chez l'animal et discutée chez l'Homme, mais uniquement dans le cadre d'un usage autologue (15). Aujourd'hui, les CSM sont caractérisées par leur forme, l'expression de certains marqueurs de surface et leurs capacités de différenciation - ostéocytes, adipocytes et chondrocytes, et, sous certaines conditions de culture, en cellules d'origine extra-mésodermale (10,16–18). Deux appellations coexistent : cellules souches mésenchymateuses et cellules stromales mésenchymateuses multipotentes. Il convient d'utiliser le terme « souche » uniquement lorsque les critères reconnus du caractère souche sont vérifiés (19). Le terme « stromal » fait référence à la capacité des CSM de former un support nourricier favorisant la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques. Par action paracrine, elles agissent

particulièrement au sein de la moelle osseuse mais également *ex vivo* pour favoriser l'expansion de cellules souches hématopoïétiques en préparation d'une greffe (20).

B. Sources

Les CSM sont présentes dans plusieurs tissus adultes et fœtaux. Chez l'adulte, elles se situent majoritairement dans le tissu adipeux et la moelle osseuse, mais également dans le liquide synovial (21), le sang périphérique (22,23), le derme (24), la muqueuse gingivale (25) et la pulpe dentaire (26), les amydgales (27), l'endomètre et le sang menstruel (28). Chez le fœtus, on en retrouve dans le liquide et les membranes amniotiques (29), le placenta (30) et la gelée de Wharton (31). Ces différentes sources présentent des avantages et des inconvénients. Par exemple, les CSM-MO sont collectées *via* un geste invasif, douloureux, nécessitant une prise en charge médicale adaptée. Plusieurs études ont montré que l'âge du donneur influence les capacités prolifératives, de différenciation, la sénescence et les capacités immunomodulatrices de ces cellules (32,33). Cet effet est également retrouvé sur les CSM de tissus adipeux (32,34). Les sources fœtales sont aussi dépendantes de leur environnement ; en effet, les CSM-GW sont influencées par des facteurs obstétricaux tels que l'âge maternel, le terme à la naissance ou encore le diabète gestationnel (35–37). Ce sujet sera détaillé plus loin.

Plusieurs critères poussent à privilégier les CSM issues de sources fœtales, et particulièrement les CSM issues de la gelée de Wharton. En effet, la faible iatrogénie du prélèvement, la plus grande quantité de cellules disponibles ainsi que leur caractère plus primitif incluant une meilleure prolifération, une senescence plus tardive et des propriétés immunomodulatrices plus robustes (31,38–41) en font de bonnes candidates en thérapie allogénique. La gelée de Wharton est un tissu conjonctif dérivé du mésoblaste extraembryonnaire. C'est une structure avasculaire très hydratée qui permet de protéger les vaisseaux du cordon ombilical de la compression tout en maintenant une importante mobilité dans le liquide amniotique (**Figure 1**). Elle contient de nombreux polysaccharides notamment des glycosaminoglycanes et principalement de l'acide hyaluronique (38), des fibres de collagène ainsi que de nombreuses CSM (38,42).



Figure 1 : Structure du cordon ombilical

A gauche : coupe histologique transversale d'un cordon ombilical au macroscope 1x, coloration HES. A droite : coupe histologique transversale d'un cordon ombilical au macroscope 10x, coloration HES. Le cordon ombilical est composé de 2 artères et d'une veine, protégés par la gelée de Wharton. Le tout est entouré d'une membrane appelée l'amnion. La gelée de Wharton est un tissu conjonctif très hydraté et composé de nombreuses CSM avec une concentration cellulaire accrue à proximité des vaisseaux sanguins. A = artère ; v = veine ; GW = gelée de Wharton ; a = membrane amniotique ; e = endothélium ; zp = zone périvasculaire.

Plusieurs études ont montré que la quantité de gelée de Wharton ou la qualité des cellules du cordon ombilical varient en fonction de l'âge gestationnel (43), mais également en cas d'hypertension maternelle ou d'anomalie de quantité du liquide amniotique (44). En particulier, plusieurs facteurs obstétricaux tels que le mode d'accouchement, l'âge maternel, le poids du nouveau-né, la parité (c'est-à-dire le nombre d'enfants dont la mère a déjà accouché), l'existence d'une hypertension maternelle ou d'une prééclampsie ont été étudiés.

C. Propriétés

Les CSM ont différentes fonctions dans l'organisme, selon leur situation et leurs potentialités. Au sein des tissus, elles constituent un réservoir cellulaire pour le renouvellement tissulaire grâce à la variété de leur potentiel de différenciation. Au sein de la moelle osseuse, elles représentent 0,001 à 0,01% des cellules nucléées avec des variations en fonction de l'âge. Elles y ont un rôle stromal pour les CSH : elles maintiennent une structure en 3 dimensions par la sécrétion de composants de la matrice extracellulaire (collagènes, acide hyaluronique), sécrètent des facteurs de l'angiogenèse (FGF, VEGF, ANGs, IL-6) et stimulent les cellules souches hématopoïétiques en sécrétant des facteurs de croissance (EPO, TPO, GM-CSF, G-CSF...) (45). De fait, un dérèglement

de la population de CSM dans la MO constitue un facteur de développement cancéreux (46). Elles ont également une action paracrine qui se décline en plusieurs rôles : trophique, immunomodulateur, « homing » et anti-tumoral. Le rôle trophique est d'une part réparateur et régénérateur, médié par la production de facteurs de croissance très variés (SDF-1, FGF, VEGF, PDGF, EPO, TPO, HGF, GDNF, BDNF ...) (45), mais également anti-apoptotique et pro-angiogénique. L'immunomodulation des CSM est médiée par la sécrétion de molécules qui agissent sur les cellules immunitaires. Une revue de Bernardo et Fibbe fait état d'une potentialité différente des CSM en fonction de l'environnement (47). Elles seraient donc capables d'avoir un comportement anti-inflammatoire mais également pro-inflammatoire pour recruter des cellules de l'immunité sur un site le nécessitant. Les CSM peuvent également quitter la niche médullaire et, en cas de lésions, migrer vers le site lésé par chémo-attraction. Cette dernière propriété est d'un intérêt particulier dans le développement d'applications cliniques basées sur l'apport de CSM de manière peu invasive – injection intra-veineuse par exemple – afin de traiter des sites difficile d'accès (48).
III. Alloréactivité et rôle des CSM

L'alloréactivité est définie comme une réponse primaire forte des lymphocytes T contre une variation allélique des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (49). Si le mécanisme de l'alloréactivité n'est pas encore totalement élucidé, il est admis que le lymphocyte T tient le rôle majeur de sa mise en œuvre. La réaction immunitaire qui en découle est la plus vigoureuse du système immunitaire et provoque une destruction du « non soi ». Elle provient de la présentation du non soi aux lymphocytes T par des cellules spécialisées, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les CSM-GW, du fait de leur origine, ne peuvent être utilisées que dans un contexte allogénique. Elles peuvent se comporter comme des CPA, ou bien avoir un effet modulateur de la réaction immunitaire. Ces différentes notions seront développées dans ce chapitre.

- A. Mécanismes impliqués dans l'alloréactivité
 - a. L'identité
 - i. Généralités

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) appelé HLA chez l'homme pour *human leukocyte antigen*, constitue un panel de protéines membranaires du soi spécifique à chaque individu, déclinées en classe I ou II. Leur rôle est de présenter un antigène peptidique résultant de la digestion de protéines cellulaires, virales, bactériennes ou parasitaires aux lymphocytes T. Elles constituent le déterminant principal du rejet ou de la prise de greffe.

Les protéines HLA de classe I sont exprimées par toutes les cellules nucléées et présentent des antigènes cytosoliques – peptides dits intrinsèques – aux lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. Les protéines HLA de classe II, quant à elles, sont exprimées par les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B pour présenter des peptides extrinsèques aux lymphocytes T CD4⁺.

Les gènes codants pour ces protéines se situent sur le bras court du chromosome 6. Une troisième classe existe, codant pour des produits participant à la réaction immunitaire – le système du complément et les cytokines TNF – ainsi que pour les protéines chaperonnes HSP (**Figure 2**).



Figure 2 : Locus HLA (adapté de plusieurs sources)

Les molécules HLA se divisent en 3 classes, toutes codées par le bras cours du chromosome 6. La structure des molécules HLA de classe I et II dont le rôle est de présenter des peptides d'antigènes diffère entre les deux classes. De nombreux allèles existent pour chacune de ces molécules, sauf pour les molécules HLA-E, HLA-F et HLA-G.

Ce sont les gènes les plus polymorphes du génome des mammifères ; ils sont hérités des deux parents avec une expression codominante : un individu possède donc une signature HLA unique et, dans une même fratrie, il existe une chance sur quatre que deux individus soient compatibles.

Les molécules HLA classiques permettent la présentation de peptides dérivés des antigènes aux lymphocytes T. Elles ont une large spécificité, c'est-à-dire que de nombreux peptides différents pourront être présentés par une même molécule HLA. Elles lient les peptides de manière spécifique et ne peuvent donc pas lier d'autres produits – lipides, glucides... Une molécule HLA ne présente qu'un peptide à la fois et ce avec un temps de dissociation très long, afin qu'un lymphocyte T ait le temps de repérer ce peptide. Les molécules HLA possèdent un sillon de liaison aux peptides qui va permettre de présenter le peptide sur la surface membranaire de la cellule présentatrice d'antigène. L'expression par une cellule d'une molécule HLA de classe I ou de classe II dépend du peptide présenté et de sa voie de préparation à l'intérieur de la cellule : un peptide apprêté dans le cytosol et chargé sur la molécule HLA dans le réticulum endoplasmique sera dit « cytosolique » ou

« intrinsèque » et présenté par une molécule HLA de classe I, tandis qu'un peptide apprêté dans l'endosome sera présenté par une molécule HLA de classe II.

Les CSM-GW expriment peu les molécules HLA de classe I et n'expriment pas de molécules HLA de classe II à leur surface. Parmi les molécules HLA de classe I, elles peuvent exprimer une forte proportion de molécules HLA-G.

ii. HLA-G

HLA-G est une molécule HLA de classe I dite non classique exprimée sous 7 isoformes – 4 membranaires et 3 solubles – dont le polymorphisme est limité comparé aux molécules HLA classiques (Figure 2). HLA-G est normalement exprimée par des tissus fœtaux - l'ovocyte fécondé, le trophoblaste, l'amnion, les cellules endothéliales des vaisseaux du chorion et les érythroblastes fœtaux - et adultes - thymus, cornée et érythroblastes. C'est une molécule inductible sous certaines conditions (présence d'hormones, TNF-a, IFN, IL-10, stress, hypoxie...). Les CSM issues de tissus adultes et fœtaux expriment HLA-G (50,51), principalement sous ses formes membranaires HLA-G₁ et soluble HLA-G₅ (52). Cette molécule possède un rôle crucial dans la tolérance fœtomaternelle et le maintien de la grossesse. Il a été montré que son absence conduit à des avortements spontanés (53,54), probablement en raison d'une mauvaise acceptation immunitaire de la grossesse que l'on peut considérer comme une semi-allogreffe. En situation allogénique, HLA-G est capable d'inhiber directement la fonction des cellules immunitaires effectrices par interaction avec les récepteurs inhibiteurs ILT2 (immunoglobulin-like transcript 2) et ILT4 des lymphocytes T, B, des cellules NK et des cellules présentatrices d'antigènes (52,55-60). Sa sécrétion permet d'inhiber la cytotoxicité, la sécrétion d'IFN-y, le chimiotactisme et la maturation des cellules dendritiques, tout en induisant des cellules dendritiques tolérogènes. Certaines cellules cancéreuses sont capables d'exprimer HLA-G, échappant ainsi au système immunitaire, avec des risques accrus de métastases et une large diminution de la survie globale des patients (61); cependant sa présence pourrait servir de facteur pronostique et de cible thérapeutique (62).

b. Activation et mécanismes d'action des lymphocytes T i. Lymphocytes T naïfs

Les lymphocytes T sont les acteurs centraux de l'immunité cellulaire adaptative. Ces cellules issues de la lignée hématopoïétique lymphoïde maturent dans le thymus puis migrent vers les organes lymphoïdes secondaires ou les tissus périphériques. Elles sont impliquées dans la reconnaissance du soi, l'activation d'autres cellules immunitaires, la lyse de cellules infectées et la constitution d'une mémoire immunitaire. Ces lymphocytes sont dits naïfs lorsqu'ils sont spécifiques d'un antigène qu'ils n'ont pas encore rencontré, présenté par une cellule présentatrice d'antigène porteuse d'une molécule HLA du soi. Il existe plusieurs sous populations de lymphocytes T. Les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissent les peptides intrinsèques liés aux molécules HLA de classe I et se différencient en lymphocytes T CD4⁺ reconnaissent les peptides extrinsèques et les molécules HLA de classe II. Ils se différencient en plusieurs sous-populations de lymphocytes T caractérisées selon leur profil de sécrétion cytokinique détaillé dans le tableau 2 : TH1, TH2, TH17 ou encore Treg ; d'autres populations commencent également à être décrites mais ne seront pas développées ici.

Sous- population	Cytokines sécrétées	Rôle
Th1	IL-2, IFN-γ, TNF-α	Mobilisation des CD8 ⁺ , NK, macrophages
Th2	IL-4, IL-5, IL-13	Activation de la voie humorale ; Allergie ; Régulations de la réaction immunitaire
Th17	IL-17, IL-22	Réaction antibactérienne, antifongique
Treg	IL-10, TGF-β	Contrôle de la réponse immunitaire

Tableau 2 : Caractéristiques des différentes sous-populations de lymphocytes T

ii. Activation des lymphocytes T

Les lymphocytes T naïfs sont activés par les cellules dendritiques. Le premier signal d'activation d'un lymphocyte T naïf est la liaison du complexe HLA-peptide au récepteur de cellule T (TCR) situé à la surface membranaire des lymphocytes T.

S'ensuivent plusieurs renforcements de cette liaison (Figure 3) :

- Selon le type de lymphocyte T, les corécepteurs CD4 ou CD8 viennent confirmer la classe de la molécule HLA et assurer l'adéquation peptide/lymphocyte.
- Ensuite, les molécules de costimulation (CD40, CD80, CD86) présentées à la surface membranaire de la cellule présentatrice d'antigène se lient à leur récepteur (CD40 ligand ou CD28) présent sur la surface du lymphocyte T et renforcent le signal activateur. C'est un second signal qui est indispensable à l'action du lymphocyte. En cas d'absence des molécules de costimulation, le lymphocyte entre en anergie. Ce signal de costimulation provoque une augmentation de l'expression de la molécule CD40 ligand (CD40L) à la surface des lymphocytes T, ce qui va induire un renforcement et un maintien de la costimulation du lymphocyte T par la CPA.



Figure 3 : Récepteurs et ligands impliqués dans l'activation des lymphocytes T Source : Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique, Abbas et al. Elsevier 2016 Principales molécules de surface des lymphocytes T CD4⁺ participant à l'activation de ces cellules et leurs ligands correspondants sur les cellules présentatrices d'antigènes. Les lymphocytes T CD8⁺ utilisent la plupart de ces molécules mais reconnaissent les antigènes présentés par les molécules du CMH de classe I. Les propriétés importantes des principales molécules à la surface des lymphocytes sont également décrites.

Lorsque le signal est activateur, le lymphocyte T se différencie selon l'environnement et prolifère. Les différentes populations engendrées auront des rôles différents, effecteurs et mémoires ; les lymphocytes effecteurs migrent vers les agents pathogènes ou étrangers pour agir, tandis que les lymphocytes mémoires resteront en attente d'un nouveau contact avec le même agent étranger. Ces derniers pourront être activés par toute cellule présentatrice d'antigène – monocyte, macrophage, cellule dendritique, lymphocytes B...

Le second signal peut être inhibiteur, ce qui constitue un mécanisme de tolérance du système immunitaire dont le rôle principal est d'empêcher les lymphocytes de réagir au soi. Lors de la présentation d'un peptide issu d'un antigène du soi, 3 voies sont possibles.

La première est immunogène, le lymphocyte T naïf s'active, prolifère et la population engendrée se différencie en lymphocytes T effecteurs ou mémoires. Ceci provoque une auto-immunité et les maladies qui en découlent – polyarthrite rhumatoïde, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, lupus... La plupart de ces lymphocytes auto-réactifs sont détruits lors de la sélection négative centrale afin de protéger l'individu de réactions auto-immunes. Cette tolérance centrale n'étant pas absolue, elle est complétée par une tolérance périphérique qui peut prendre différentes formes : celle de l'ignorance immunologique, le lymphocyte ne reconnait pas l'antigène du soi, ou celle de la tolérance, le lymphocyte T reconnait l'antigène et entre soit en apoptose, soit en anergie.

Le processus tolérogène est déclenché soit par l'expression du récepteur CTLA-4, un analogue de CD28 à la surface du lymphocyte T, soit par la présence à la surface membranaire de la cellule présentatrice d'antigène des ligands PD-L1 ou PD-L2 qui se lient à PD1. Ces récepteurs membranaires sont exprimés de manière transitoire par les lymphocytes T pour mettre fin à leur activation et servent de point de contrôle de la réaction immunitaire. CTLA-4-CD80/86 et PD1-PD-L1/PD-L2 agissent en bloquant et éliminant les molécules de costimulation de la surface des cellules présentatrices d'antigène, soit parce que le lymphocyte a reconnu un antigène du soi, soit parce que l'environnement est celui d'une infection chronique. Leur blocage conduit à des réactions auto-immunes, il semble donc que ces récepteurs inhibiteurs interviennent en permanence pour empêcher la réaction des lymphocytes T autoréactifs. Les lymphocytes T régulateurs expriment ces mêmes molécules, de manière constitutive.

iii. Rôle des lymphocytes T dans l'alloréactivité

En situation allogénique, l'activation et la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en Th1 ou Th17 entraine la production de cytokines inflammatoires. Ces cytokines créent un environnement local inflammatoire délétère et induisent le recrutement et l'activation des autres cellules de l'immunité innée et adaptative. Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques sont attirés par des gradients de chémokines pour induire l'apoptose des cellules cibles. Après reconnaissance des cellules cibles, ils libèrent des granules cytoplasmiques ; les perforines créent des pores dans les membranes des cellules cibles tandis que les granzymes pénètrent dans les cellules et fragmentent l'ADN. Les CD8⁺ interagissent également par la voie du Fas ligand pour provoquer la mort cellulaire (63,64). Les lymphocytes T ont donc

le double rôle de détruire directement les cellules du greffon par l'action des CD8⁺ mais également de recruter les autres effecteurs du système immunitaire *via* les sécrétions des CD4⁺.

d. Mécanismes d'action des cellules présentatrices d'antigènes

Les cellules dendritiques sont des cellules myéloïdes intervenant dans l'immunité adaptative ; ce sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Ce sont les seules à pouvoir activer – ou « primer – les lymphocytes T naïfs. Elles sont présentes dans les tissus périphériques et agissent comme des sentinelles. Lorsqu'elles sont activées par un agent pathogène ou étranger, elles présentent aux lymphocytes des peptides dérivés des antigènes rencontrés. Selon leur degré de maturation, elles peuvent activer les lymphocytes T – cellules dendritiques matures – ou bien induire une tolérance – cellules dendritiques immatures ou semi-matures (40). Ainsi, elles peuvent intervenir en situation allogénique en présentant les antigènes HLA étrangers aux lymphocytes T. Les cellules dendritiques étrangères peuvent également présenter des antigènes HLA étrangers aux lymphocytes T ; ces processus sont appelés respectivement présentation directe et indirecte.

Les macrophages sont des cellules myéloïdes phagocytaires résidant dans les tissus périphériques. Ils sont activés par l'intermédiaire du CD40L et de l'IFN-y sécrété par les lymphocytes T. Leur rôle est de phagocyter les éléments étrangers mais ils peuvent également servir de cellules présentatrices d'antigène auprès des lymphocytes T CD4⁺ mémoires. Deux phénotypes distincts existent : M1 immunogène et M2 immunosuppresseur. Le phénotype M1 dérive d'une stimulation par des produits bactériens ainsi que des cytokines pro-inflammatoires (IFN-y et TNF principalement) et produit d'autres cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , etc.) ainsi que des espèces réactives de l'oxygène dont le rôle est anti-microbien. Le phénotype M2 est induit par des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-13, TGF-β, glucocorticoïdes, etc.) et sécrète des facteurs solubles et cytokines tels que VEGF, TGF-β, IL-10... Ces macrophages de type M2 sont impliqués dans la réparation tissulaire et ont des propriétés anti-inflammatoires et pro-angiogéniques (65).

Les polynucléaires neutrophiles sont des leucocytes dont le rôle principal est la phagocytose des éléments étrangers ou pathogènes. Leur durée de vie est courte. Ils sont principalement attirés par des réactions inflammatoires comme celles résultant des lésions

d'ischémie-reperfusion des greffons lors d'une transplantation d'organe. En plus de la phagocytose de cellules étrangères, les neutrophiles sont capables d'induire la maturation des cellules dendritiques en augmentant l'expression des molécules de costimulation de ces dernières *via* la sécrétion de TNF- α (66,67). Les polynucléaires neutrophiles peuvent enfin agir comme des cellules présentatrices d'antigènes par le biais des molécules HLA de classe I et de classe II, et ainsi activer tous les lymphocytes T, qu'ils soient CD4⁺ ou CD8⁺ (68).

B. Mécanismes inhibiteurs des CSM

Les CSM possèdent des effets immunomodulateurs démontrés *in vitro* et *in vivo*. Ces effets sont aussi bien liés à des contacts cellulaires qu'à la sécrétion de facteurs solubles qui seront détaillés dans ce chapitre, qui leur permettent d'interférer avec le système immunitaire inné et adaptatif. Les CSM autologues et allogéniques semblent avoir le même potentiel immunomodulateur, ce qui indique que leurs effets sont indépendants du système HLA (69). Nous nous focaliserons ici sur les effets des CSM en situation allogénique.

a. Lymphocytes T

En situation allogénique, les principaux médiateurs de la réponse immunitaire adaptative sont les lymphocytes T. *Via* la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α , ceux-ci stimulent les CSM qui attirent les lymphocytes T par chimiotactisme pour un contact cellulaire. Les CSM sont des cellules peu immunogènes car elles n'expriment pas les molécules HLA de classe II comme HLA-DR ni les molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86 (69,70). De fait, elles échappent à la reconnaissance par les lymphocytes T CD4⁺ et les font entrer en anergie. En coculture avec des cellules nucléées sanguines, les CSM ne modifient pas leur expression – ou non expression – des marqueurs mésenchymateux et des molécules HLA de classe I et II ; cependant une augmentation des molécules ICAM et VCAM, responsables des contacts cellule-cellule directs, est décrite (71).

De plus, l'expression par les CSM de l'enzyme IDO provoque une inhibition de la prolifération des lymphocytes T par déplétion du milieu environnant en tryptophane, un acide aminé essentiel à la multiplication cellulaire (70). Ce tryptophane est transformé en un métabolite toxique, la kynurénine, ainsi que des espèces réactives de l'oxygène. En parallèle, les CSM produisent des molécules solubles et des cytokines immunosuppressives parmi lesquelles PGE-2, HLA-G, IL-6, IL-10, VEGF, HGF et TGF- β (72–74). Ces dernières inhibent la prolifération des lymphocytes T, l'activation de ceux-ci par les cellules présentatrices d'antigènes et induisent la différenciation et la survie des lymphocytes T régulateurs (**Figure 4**).



Figure 4 Processus d'interaction des CSM avec les lymphocytes T et les cellules dendritiques Larghero (d'après Ménard 2011. Selmani 2009. 2009). et al. et al. et al. En situation allogénique, les CSM interagissent avec le système immunitaire via plusieurs mécanismes qui aboutissent à une inhibition de la prolifération des lymphocytes T, provoquent leur anergie, inhibent la différenciation des cellules présentatrices d'antigènes et conduisent à l'émergence de lymphocytes T régulateurs.

b. Cellules présentatrices d'antigènes

Les CSM modulent l'action des cellules dendritiques à plusieurs niveaux. Elles en altèrent le phénotype, diminuent leur sécrétion de cytokines, empêchent leur différenciation et leur maturation et compromettent leurs capacités à présenter des antigènes (75). Ainsi, les cellules dendritiques deviennent incapables de « primer » les lymphocytes T. Les CSM semblent également capables d'induire une population de cellules dendritiques régulatrices inhibant les lymphocytes T (76,77). Leur profil semble proche de celui des CSM : faible expression des molécules de costimulation, incapacité à stimuler les lymphocytes T ou induction de l'anergie de ceux-ci, faible immunogénicité, induction de lymphocytes T régulateurs, sécrétion d'IL-10 et de TGF- β ...

Les CSM, grâce à la sécrétion de PGE-2, TGF- β , IL-6 et IL-10, bloquent la maturation des monocytes et des macrophages (76,78–80). Cet effet semble amélioré par la présence de PD-L1 et IDO (81). Les signaux de maturation des monocytes et des macrophages sont alors inhibés, de même que l'expression de leurs molécules HLA de classe II, des molécules de costimulation, leur production d'IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ et TNF- α (72,82). Les monocytes/macrophages sont donc incapables de se différencier en cellules matures et de différencier des lymphocytes T mémoires. De plus, les CSM semblent induire une différenciation des macrophages vers un phénotype M2 anti-inflammatoire (80) participant à l'environnement immunorégulateur induit par les CSM en augmentant leur sécrétion d'IL-10 (82).

Peu de données sont disponibles concernant l'action des CSM spécifiquement sur les polynucléaires neutrophiles. Il semble que la sécrétion d'IL-6 et d'IL-10 par les CSM protège les polynucléaires neutrophiles de l'apoptose, ce qui diminue leurs capacités phagocytaires (83–85) et les empêche de migrer vers les tissus (86).

C. Recherches sur les CSM *a. CSM et immunologie*

Certaines études décrivent que les CSM stimulées par des molécules inflammatoires telles que l'IFN- γ et le TNF- α augmentent leur expression des molécules HLA de classe II (70,87) et de CD40 seul (88). Si l'expression de ces deux protéines membranaires peut induire une réaction immunitaire, l'induction concomitante de PD-L1 et HLA-G semble contrebalancer leurs effets et inhiber l'activation des lymphocytes T. Plusieurs études précliniques décrivent des résultats contradictoires ; si certains montrent le caractère hypo-immunogène des CSM (70), d'autres signalent qu'elles sont immunogènes et stimulent le rejet de greffe (87).

b. CSM et ingénierie cellulaire et tissulaire

Les capacités de différenciation des CSM vont au-delà des chondrocytes, ostéocytes et adipocytes, puisqu'il a été démontré qu'elles pouvaient également se différencier en cellules productrices d'insuline (89), en cellules gliales (90), de vessie (91), de peau (92)... De fait, les CSM sont capables de participer à la reconstruction de tissus d'origine mésenchymateuse mais également de tissus d'origine ectodermique et endodermique (92,93). Ainsi, les CSM sont utilisées dans de nombreux essais cliniques - le site de recensement clinicaltrials gov en répertorie plus de 700 au 02 octobre 2017 – portant sur le traitement de pathologies aussi diverses que le diabète, l'infarctus du myocarde, les traumatismes de la moelle épinière, la GvHD... Elles sont donc aussi bien utilisées pour leurs capacités de différenciation que pour leurs propriétés immunomodulatrices du fait qu'elles présentent une faible expression de CMH de classe I et pas d'expression de CMH de classe II et molécules de costimulation CD40, 80 et 86. Ainsi, les CSM ne créent pas de réaction allogénique, ce qui les protège de la lyse par les NK. En l'occurrence, elles sont utilisées en essais cliniques pour des greffes allogéniques ou encore le traitement de différents cancers - prostate (NCT01983709), ovaires (NCT02530047), neuroblastome (NCT00790413).

Leurs propriétés immunomodulatrices sont d'une importance cruciale dans le cadre d'une greffe allogénique puisqu'elles vont permettre aux cellules d'échapper au système immunitaire et donc d'éviter le rejet, mais également de restreindre le contexte inflammatoire dans lequel elles peuvent être greffées. C'est notamment le cas dans plusieurs études ou essais cliniques en cours pour le traitement de l'arthrite inflammatoire (94,95), les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou encore la GvHD.

Les essais cliniques menés sur les CSM montrent des résultats prometteurs, ce qui induit une augmentation de la demande de processus de production en accord avec les bonnes pratiques de laboratoires pour un usage clinique. Les CSM deviennent des médicaments de thérapie innovante répondant à des critères de production en conformité avec les Bonnes Pratiques de Fabrication Pharmaceutiques, l'obtention des autorisations règlementaires afférentes et une obligation de pharmacovigilance. Ces médicaments doivent répondre à une caractérisation complète et être sécurisés – des contrôles qualités incluant le phénotype, l'absence de contamination, l'unicité cellulaire des préparations, la

stabilité cellulaire et l'absence de tumorogénicité doivent notamment être réalisés. Dans cette optique, une étude récente a présenté la qualité et la sécurité des CSM-GW pour un usage en tant que médicament de thérapie innovante (96).

IV. L'ingénierie tissulaire du cartilage

A. Le cartilage sain

Le cartilage est un tissu avasculaire, non innervé et non minéralisé, dont le rôle est d'amortir, distribuer et transférer les charges reçues par l'appareil locomoteur lors des contraintes de la vie courante. Trois structures anatomiques existent : le cartilage hyalin ou articulaire, le cartilage élastique, et le fibrocartilage. Bien que similaires, ces tissus diffèrent par leur développement, leur anatomie, leur structure, leur fonction et les cellules qui les composent. Nous ne traiterons ici que du cartilage articulaire.

Le cartilage articulaire représente 5 à 10% du cartilage total présent dans le corps humain. Il résulte de la formation des os selon le processus d'ossification endochondrale, mais également d'un phénomène de cavitation. Au stade embryonnaire, une condensation de CSM dans le feuillet mésodermique commence à former une ébauche de squelette, intégralement composé de cartilage hyalin. Cette condensation s'effectue sous l'influence de facteurs paracrines tels que le FGF, le TGF- β ou encore la BMP-4 et de molécules d'adhésion cellulaires – cadhérines, NCAM ou encore le CD44, récepteur de l'acide hyaluronique (97). La formation des articulations mobiles s'effectue ensuite par un processus de cavitation entre les épiphyses des futurs os. Cette cavitation est liée à un apport continu de GDF5 et de molécules telles que Wnt9A, Erg, Gli3, CD44 et des collagènes de type I et IIA (98–102). Une zone intermédiaire est ainsi créée et va donner naissance à l'ensemble des composants de la capsule articulaire : le cartilage, la synovie et la membrane synoviale ainsi que les éventuels ligaments internes à l'articulation (**Figure 5**). En parallèle, les épiphyses des futures structures osseuses vont former des chondrocytes, l'os sous-chondral et les ligaments externes de l'articulation.



A : Chronologie de la formation des articulations *A* : Chronologie de la formation d'une diarthrose *B* : Origine embryonnaire des différentes structures d'une diarthrose (d'après Pacifici et al. 2006 et Caldwell et al. 2015)

La chondrogenèse s'effectue à partir des CSM qui se différencient à travers plusieurs étapes. Les CSM deviennent des chondroprogéniteurs puis des chondroblastes, et enfin des chondrocytes. Ces différentes étapes sont induites par des cytokines spécifiques, et sont caractérisées par le type de MEC synthétisée par les cellules (**Figure 6**). Le facteur de transcription Sox9 tient un rôle important dans le développement de ce tissu puisqu'il stimule l'expression des collagènes de type II, IX et XI, spécifiques du cartilage hyalin. La protéine Sox9 est nécessaire mais non suffisante à l'induction et la maintenance d'un phénotype chondrocytaire. En effet, l'expression de Sox9 ne semble pas être corrélée avec l'expression du collagène de type II dans les cellules du cartilage articulaire, et semble même inhiber la transcription du collagène de type II dans les chondrocytes dédifférenciés. De plus, certaines études montrent que Sox9 agit avec Sox5 et Sox6 pour induire la transcription du collagène de type II et des agrécanes (103).



Figure 6 : Différents stades de la chondrogenèse

(D'après Kempf et al., 2007 ; Vinatier et al., 2009 ; Studer et al., 2012). La séquence d'événements conduisant à la différenciation chondrocytaire des CSM est décrite de manière schématique, présentant le type et l'organisation des cellules, les facteurs impliqués ainsi que les protéines de la matrice extra cellulaire sécrétées par chaque stade cellulaire impliqué.

Dans les premières étapes de la chondrogenèse, correspondant au stade fœtal et lors de la croissance, les chondrocytes se multiplient rapidement et synthétisent de la MEC spécifique du cartilage. Dans les zones destinées à devenir de l'os, les cellules cessent de proliférer, leur taille augmente et elles synthétisent du collagène de type X et de la fibronectine ; ce sont des chondrocytes hypertrophiques. Le facteur de transcription Runx2 initie en partie la minéralisation du tissu avec le dépôt de cristaux de calcium comme l'hydroxyapatite. En parallèle, des métalloprotéases sont sécrétées pour modifier la fraction collagénique du tissu comme MMP13 qui dégrade spécifiquement le collagène de type II. Puis, les chondrocytes hypertrophiques entrent en apoptose. Ainsi, l'espace est libre pour la formation de vaisseaux sanguins qui apportent des progéniteurs ostéoblastiques. Ces derniers vont se différencier en ostéoblastes et synthétiseront une MEC spécifique à l'os.

La nature avasculaire du cartilage articulaire résulte de sa composition biochimique qui empêche l'invasion vasculaire qui provoquerait une dégénération irréversible du cartilage (104). Ces éléments, la thrombospondin-1, la chondromoduline-I, l'endostatine/collagène XVIII, des protéines acides sécrétées riches en cystéine et le procollagène de type II ont montré des propriétés anti-angiogéniques *in vitro* et *in vivo*. La COMP semble également avoir un rôle dans la suppression de la vascularisation (105). De plus, des inhibiteurs de métalloprotéinases d'origine tissulaire du type 2 sont présents à des niveaux élevés dans le cartilage articulaire normal en tant que facteur anti-angiogénique. En raison de son caractère avasculaire et non innervé, le cartilage articulaire est dépendant de processus de diffusion à travers la matrice extracellulaire pour recevoir des nutriments et de l'oxygène à partir du liquide synovial. Enfin, l'absence d'activité mitotique des chondrocytes adultes ne permet pas la régénération des tissus lésés.

a. Chondrocytes

Les chondrocytes représentent l'unique type cellulaire du cartilage hyalin. De forme sphérique, ils mesurent entre 10 à 30 μ m de diamètre et représentent 1 à 10% du volume du cartilage. Ils sont responsables de la synthèse matricielle au sein du cartilage et réagissent, grâce à des mécanotransducteurs, aux contraintes mécaniques subies par l'articulation. Ainsi, selon les signaux reçus, ils équilibrent la balance synthèse/dégradation de la MEC. Le chondrocyte et sa matrice péricellulaire constituent un chondron, qui représente la structure principale, fonctionnelle et métabolique du cartilage articulaire. Le cartilage articulaire mature consiste en 4 couches successives : superficielle, intermédiaire, profonde et calcifiée. Les chondrocytes n'ont pas la même forme ni la même répartition selon leur situation. Ils sont aplatis et regroupés dans la couche superficielle, ronds et



Figure 7 : Structure du cartilage articulaire (source : www. conflitdehanche.blogspot.de). Le cartilage hyalin est composé de 4 couches qui diffèrent par la forme et la répartition des cellules ainsi que la composition de la matrice extra-cellulaire.

espacés dans la couche intermédiaire ou disposés en colonnes dans la couche profonde (Figure 7).

b. Matrice extracellulaire

La MEC du cartilage hyalin est principalement composée d'eau, de collagènes, de protéoglycannes et de glycoprotéines (**Figure 8**).





La haute concentration en eau du cartilage lui permet de se déformer en fonction des sollicitations mécaniques appliquées. Cette concentration varie selon la couche articulaire : elle est environ 15% plus concentrée à la surface de l'articulation par rapport à la zone profonde.

Il existe au moins 15 types de collagènes distincts dans le cartilage articulaire, mais le collagène de type II représente 90 à 95% de ces collagènes ; il participe à la résistance du cartilage à la traction (106). Bien que leur contribution soit mineure, les collagènes de type IV, V, VI, IX, X et XI aident à créer et maintenir la structure formée par les fibres de collagène de type II (104). Cette structure assure l'élasticité du tissu et sa résistance à la compression. Les collagènes de type I et III sont indétectables dans le cartilage articulaire sain, mais leur expression est augmentée lors d'une dégénérescence.

Les protéoglycannes représentent la deuxième plus grande catégorie de macromolécules de la MEC et, en interagissant avec les molécules d'eau, amortissent les tensions reçues par le cartilage. Le principal protéoglycanne, l'agrécane, et le biglycan interagissent avec le collagène de type II et régulent la formation des fibres pour modifier la structure du tissu. Les glycosaminoglycanes (chondroïtine-sulfate et kératane-sulfate) sont riches en radicaux acides très hydrophiles, responsable de la concentration en eau du tissu. Ces protéoglycannes sont associés à l'acide hyaluronique et à la COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein).

La MEC contient également des enzymes protéolytiques (métalloprotéinases matricielles et agrécanases) dont le rôle est de dégrader la matrice lors de son renouvellement, ainsi que des facteurs de croissance et des cytokines produits par les chondrocytes.

Tout comme les chondrocytes, la répartition et l'arrangement des composants matriciels du cartilage n'est pas homogène et correspondent à la fonction mécanique du cartilage articulaire. Dans la couche superficielle, de petites quantités de protéoglycannes ainsi que de grandes quantités de fibres de collagènes sont arrangées de manière parallèle à la surface articulaire. Dans la couche intermédiaire, on retrouve une grande proportion de protéoglycannes par rapport aux autres couches, et une répartition aléatoire du collagène. La zone profonde se distingue par ses fibres de collagènes accompagnées par des colonnes de chondrocytes perpendiculaires à l'os sous-jacent. La zone calcifiée est minéralisée dans une certaine mesure et sert de transition entre le cartilage et l'os sous chondral.

B. Lésions du cartilage et traitements

La dégradation du cartilage dans le corps humain est dépendante de l'âge, de maladies, de prédispositions génétiques et des dégâts continuels liés aux activités quotidiennes. Le poids des lésions du cartilage (arthrose, arthrite rhumatoïde, lésions des disques intervertébraux...) est considérable à la lumière des tensions économiques et sociales qui en résultent. De nature non vascularisé et constitué de cellules non prolifératives, le cartilage est un tissu aux capacités de réparation faibles, tout en étant fortement sollicité. Le cartilage hyalin peut être lésé par des traumatismes ou des maladies dégénératives comme l'arthrose. Cette pathologie se développe en présence de plusieurs facteurs (107) :

- cytokines et/ou chémokines : IL-1, IL-6, IL-15, oncostatine M, TNF
- médiateurs de l'inflammation : PGE-2, NO, espèces réactives de l'oxygène
- dégradation matricielle : MMP1, MMP3, MMP13, agrécannase, ADAMTS4, ADAMTS5, cathépsines
- dérivés cellulaires ou matriciels : alamines, fragments de fibronectine, d'acide hyaluronique, de collagène, de protéoglycanes.

La matrice subit des changements de structure et de composition menant à un effritement de la surface articulaire et par la suite des fissurations évoluant vers l'os souschondral. Les structures de collagène se dégradent, ce qui conduit à la détérioration des protéoglycanes. La matrice péricellulaire est déstabilisée et les fonctions chondrocytaires s'en trouvent déréglées, de même que les connexions des récepteurs de surface du chondrocyte avec sa matrice. A ce stade, les lésions sont irréversibles. A mesure que la pathologie se développe, la viabilité des chondrocytes décroit. Dans les derniers stades, les chondrocytes encore présents deviennent hypertrophiques et synthétisent des protéines et facteurs qui accélèrent la dégradation du cartilage, comme le VEGF. Les lésions superficielles ne sont pas réparées par l'organisme. En revanche, les lésions profondes, lorsqu'elles atteignent l'os sous-chondral, peuvent provoquer un saignement dans l'articulation. Cette atteinte vasculaire entraine une inflammation, puis une cicatrisation de la lésion cartilagineuse grâce aux CSM mobilisées à partir de la moelle osseuse sousjacente. Cependant, cette cicatrisation aboutit à la formation d'un fibrocartilage par un processus d'ossification endochondrale. Ce fibrocartilage est différent du cartilage hyalin, il est constitué principalement de collagène de type I et de peu de GAG et de collagène de type II (108). Il est mal intégré au tissu natif et ses propriétés mécaniques sont faibles au regard de celles du cartilage articulaire, ce qui conduit souvent à une dégénération du tissu néo-formé

Différents traitements sont utilisés actuellement, en fonction de la nature de la lésion et de son étendue. Des traitements pharmacologiques peuvent être utilisés, mais n'ont pas de vocation curative. Le plus radical d'entre eux est le remplacement total de l'articulation par une prothèse, cependant, l'acte chirurgical est lourd et une longue rééducation est nécessaire. Différentes techniques chirurgicales existent :

- La réalisation de microfractures d'environ 4 mm tous les 3 à 4 mm sur les sites des lésions permet d'atteindre l'os sous-chondral et d'initier une cicatrisation du cartilage jusqu'à la zone superficielle. Comme vu précédemment, cette cicatrisation aboutit à la formation d'un cartilage fibreux aux propriétés mécaniques inférieures au cartilage hyalin. Cette technique peut s'effectuer sous arthroscopie simple.
- La mosaïcoplastie, ou greffe ostéochondrale, consiste en plusieurs prélèvements de carottes de cartilage sain sur des zones moins sollicitées, pour combler des sites de lésions importantes. Cette technique est plus lourde et invasive que les microfractures. Elle est limitée par la disponibilité des sites donneurs et la morbidité associée au prélèvement des greffons. De plus, l'incorporation des greffons est parfois mauvaise, mais cette technique semble supérieure à la technique des microfractures (109).

L'implantation de chondrocytes autologues ou méthode de Brittberg est une technique d'ingénierie cellulaire réalisée en deux temps. Des chondrocytes sont prélevés chez le patient sur des zones non portantes, puis cultivés *in vitro* jusqu'à obtention d'un nombre suffisant de chondrocytes pour pouvoir les greffer sur les lésions. Cette technique est cependant lourde aussi bien en termes d'intervention que de coût, et présente le risque d'une dédifférenciation des chondrocytes en culture.

La plupart de ces traitements n'aboutissent pas à la reconstruction d'un tissu pleinement fonctionnel aux caractéristiques égales au cartilage hyalin natif. D'autres thérapies, basées sur l'utilisation de cellules souches, voient le jour. Par exemple, le projet ADIPOA en place en Europe et notamment dans des CHU en France est initié depuis janvier 2015. C'est un essai clinique de phase IIb reposant sur l'utilisation de CSM de tissu adipeux autologues en injection intra-articulaire pour le traitement de l'arthrose du coude. Les résultats de cette étude sont attendus pour l'année 2019. Cette méthode relève de l'ingénierie cellulaire, mais d'autres méthodes en ingénierie tissulaire sont en cours de développement, dont le but est de reproduire *in vitro* un tissu complet, composé des cellules et de leur matrice.

C. Ingénierie du cartilage

L'ingénierie tissulaire du cartilage consiste à produire un substitut fonctionnel pouvant remplacer le cartilage lésé ou combler les lésions atteignant celui-ci. Ce substitut biologiquement compatible doit permettre de reconstituer le cartilage hyalin et maintenir ou restaurer les fonctions articulaires. La production d'un tel substitut repose sur trois critères : un biomatériau adéquat, les cellules composant le tissu remplacé, et la fonctionnalisation de cet ensemble (110) – **Figure 9**.



Figure 9 : Principe de l'ingénierie du cartilage (*d'après Chung et al. 2008*).

L'ingénierie du cartilage se décompose en une triade : l'obtention de cellules en quantité suffisante, leur association avec un biomatériau ainsi que la fonctionnalisation de l'ensemble en vue d'une greffe chez le patient.

a. Sources cellulaires

Différentes sources cellulaires sont exploitables. Parmi celles-ci, les chondrocytes autologues présentent l'avantage de diminuer drastiquement le risque de rejet et ont déjà été utilisés dans de nombreuses études (111). Cependant, leur prélèvement iatrogène, son rendement faible et le risque de dédifférenciation en culture limite leur usage clinique

(112). Rapidement, les chercheurs se sont tournés vers d'autres sources cellulaires. Récemment, l'utilisation de cellules iPSC a augmenté la palette de possibilités de l'ingénierie du cartilage, avec de bons résultats in vitro (113). Cependant, les résultats in vivo ne sont pas encore satisfaisants, le processus de fabrication est long et coûteux, et leur caractère potentiellement tumorigène doit encore être étudié avant leur application en clinique. Les CSM représentent une alternative prometteuse : prélèvement plus aisé, rendement plus important, utilisation connue et documentée, capables de se différencier en chondrocytes... Aujourd'hui, plusieurs tissus permettent le prélèvement et l'isolement des CSM, le gold standard étant la moelle osseuse. Cependant, le prélèvement de CSM-MO est iatrogène, produit peu de cellules, et les qualités cellulaires varient en fonction de plusieurs facteurs, comme l'âge du donneur. Il en résulte une faible productivité, les cellules étant peu nombreuses, rapidement sénescentes en fonction de l'âge du donneur et donc moins prolifératives. Les CSM issues du cordon ombilical représentent une alternative importante aux CSM-MO. En effet, ces cellules sont plus primitives, possèdent des capacités prolifératives plus importantes, et ont des propriétés immunomodulatrices particulières (31), dues à leur environnement - la grossesse étant un cas unique de greffe semiallogénique. De plus, le prélèvement du cordon ombilical est totalement indolore, non iatrogène, et ne présente aucun danger ni pour la mère ni pour l'enfant donneur. Quelques questions subsistent néanmoins quant à leur caractérisation : possèdent-elles toutes les mêmes compétences prolifératives, immunomodulatrices et de différenciation ? L'âge du donneur impactant les qualités des CSM-MO, est-il possible de trouver des facteurs modifiant les capacités des CSM-GW ?

b. Biomatériaux

Un biomatériau doit répondre à plusieurs exigences cliniques et doit notamment être biocompatible et biodégradable. Il peut être d'origine naturelle ou synthétique, composé d'un élément ou bien de plusieurs et être capable de constituer une MEC tridimensionnelle permettant le maintien des cellules qui lui sont associées (111). Différents biomatériaux ont été utilisés dans l'ingénierie du cartilage : des éponges de collagène ou des hydrogels de composition variable... Ils diffèrent par leur composition chimique, leur structure tridimensionnelle, leurs propriétés mécaniques et leur vitesse de dégradation. Le **tableau 3** détaille ces différents biomatériaux ainsi que leurs avantages et inconvénients.

Tableau 3 : Biomatériaux utilisés en ingénierie du cartilage(d'après Puppi et al. Musumeci et al. Moreira-Texeira et al (111,114,115)

Origine		Biomatériau	Avantages	Inconvénients	Référence
Naturelle	éines	Eponge de collagène I/III	Peu immunogène, bonne adhésion cellulaire, propriétés mécaniques, biocompatibilité	Biodégradation rapide, répartition des cellules non homogène	Gomez- Leduc <i>et al.</i> (116)
	Pro	Eponge de gélatine	Biocompatible, non immunogène	Mauvaise stabilité mécanique	Ponticiello et al. (117)
		Fibrine	Rôle important dans la cicatrisation	Réparation du cartilage limitée	Almeida <i>et al.</i> (118)
		Agarose	Biocompatible, bonne dégradation	Stabilité mécanique variable, tissus non homogène, sensible à la température	Lima <i>et al.</i> (119)
	Polysaccharides	Alginate	Biodégradable, injectable, bonne intégration cellulaire, biocompatible	Stabilité mécanique variable selon les procédés de fabrication, impuretés	Park <i>et al.</i> (120) Yu <i>et</i> <i>al.</i> (121)
		Chitosan	Biocompatible, biodégradable, bonne intégration cellulaire, propriétés anti-bactériennes et antifongiques	Stérilisation difficile, stabilité mécanique variable, sensible au pH	Shamekhi <i>et</i> <i>al.</i> (122)
		Acide hyaluronique	Non immunogène, bonne interaction cellules/MEC, production à grande échelle	Résistance mécanique faible	Feng <i>et al.</i> (123)
Synthétique		Polyglycolides	Stabilité du composé, pas de risque pathogène	Produits de dégradation potentiellement inflammatoires	Cui <i>et al.</i> (124)
		Acide polylactique	Stabilité du composé, pas de risque pathogène	Produits de dégradation potentiellement inflammatoires	Dounchis <i>et al.</i> (125)
		Poly(L- lactide-co- glycolide)	Stabilité du composé, pas de risque pathogène	Produits de dégradation potentiellement inflammatoires	Kim <i>et al.</i> (126)

Le biomatériau idéal pour l'ingénierie du cartilage doit se dégrader de manière contrôlée et non toxique, promouvoir la viabilité et la différenciation cellulaire, permettre la diffusion de nutriments, d'oxygène et de métabolites, adhérer et s'intégrer au tissu natif, être élastique et correspondre à la taille des lésions et répondre correctement aux contraintes mécaniques des lésions qu'il comble. Sa constitution doit également permettre de bonnes interactions entre les cellules et leur matrice, comme c'est le cas dans le tissu natif. Les biomatériaux d'origine synthétique présentent l'avantage d'une conception spécifique aux lésions à combler et ne peuvent pas transmettre de pathogène. Leur biocompatibilité est en revanche faible et leur dégradation conduit à des réponses inflammatoires importantes. Leur usage dans le cadre du traitement de l'arthrose est en conséquence malvenu. Les biomatériaux d'origine naturelle sont, pour la plupart, dégradables par les enzymes humaines sans produits de dégradation toxiques. Ils peuvent servir de structure temporaire et permettre le relargage de facteurs favorisant la chondrogenèse ou la cicatrisation. Toutefois, ils peuvent être vecteurs de contamination et leurs propriétés sont variables selon les méthodes de production. Parmi ceux-ci, les hydrogels peuvent être formés de manière extemporanée dans les lésions, ce qui réduit les procédures invasives de thérapie du cartilage. Ils ont également l'avantage de bien s'intégrer au tissu natif. Les suspensions cellulaires sont mélangées au biomatériau avant le processus de gélification, ce qui permet une répartition homogène des cellules, ce qui est plus difficile à obtenir avec des biomatériaux de type éponge préformées. En tant que composant du cartilage natif, l'acide hyaluronique, un glycosaminoglycane linéaire, représente un biomatériau de choix pour l'ingénierie du cartilage car il permet la fixation de l'agrécanne pour former les longs protéoglycanes composant la MEC du cartilage (127). Il ne peut cependant pas être utilisé seul en raison de ses faibles propriétés mécaniques, mais peut être associé à l'alginate. L'alginate est un polysaccharide naturel extrait d'algues brunes. Deux monomères le composent, l'acide D-mannuronique et l'acide L-guluronique, qui sont reliés par des liaisons glycosiliques pour former des chaines. Ces monomères peuvent être présents dans différentes proportions, ce qui explique la variabilité des propriétés mécaniques de l'alginate. En solution aqueuse, ces chaines de monomères ne sont pas ordonnées et l'alginate se comporte comme un liquide visqueux, mais lors d'un contact avec une solution d'ions divalents comme le calcium, les ions calcium créent des liaisons covalentes avec les chaines de monomères (128). Il en résulte une structure ordonnée de type « boite à œuf » qui confère à l'alginate sa structure de gel (Figure 10).



Figure 10 : Structure des chaines d'alginate et modèle de liaison « boite à œufs » (d'après Bruchet et Melman).

Contrairement à l'acide hyaluronique, l'alginate n'est reconnu par aucun récepteur cellulaire et les cellules ne peuvent pas y adhérer (129). En revanche, sa microstructure poreuse assure la diffusion des nutriments, les contacts cellulaires avec la matrice, la prolifération et la différenciation chondrocytaire. Plusieurs études ont déjà montré la pertinence de son utilisation en ingénierie du cartilage et ses propriétés chondro-inductrices (130–132). L'association de Alg/HA bénéficie donc des propriétés biomécaniques et chondrogéniques de l'alginate et de la capacité de liaison cellulaire de l'HA.

c. Fonctionnalisation

Les biomatériaux peuvent être fonctionnalisés avant leur implantation, par des procédés mécaniques, biochimiques, génétiques ou environnementaux. Ces procédés permettent d'améliorer la différenciation chondrocytaire et la formation de la matrice cellulaire. Cependant, ils ne sont pas obligatoires, comme cela a été prouvé dans une étude de l'équipe (132).

L'alginate de sodium est composé d'acide guluronique (G) et d'acide mannuronique (M) en proportion variable. Cette solution visqueuse peut être polymérisée en un hydrogel grâce à l'apport d'ions bivalents comme le calcium.

Les fonctionnalisations mécaniques – compressions, déformations, agitation, nature du biomatériau – activent des voies de mécanotransduction qui induisent la chondrogenèse et améliorent la synthèse matricielle (133). Les procédés biochimiques utilisent des facteurs de croissance spécifiques du cartilage comme le TFG- β , GDF-5 ou la BMP-2 (134), mais leur utilisation dans des procédures de grade clinique est difficile. La modification de l'environnement, par exemple des conditions de culture en hypoxie qui se rapprochent des conditions du tissu natif, peuvent également améliorer le potentiel chondrogénique des CSM (135).

L'ingénierie du cartilage dispose d'un panel de techniques, cellules, biomatériaux et types de fonctionnalisation très conséquent, et il convient de sélectionner correctement les différents composants en fonction de l'usage recherché. La méthode de prélèvement, les hautes capacités prolifératives et les compétences articulaires des CSM-GW en font d'excellentes candidates dans cette optique. Le choix d'un biomatériau combiné biocompatible, alliant la structure chondro-inductrice de l'alginate aux propriétés matricielles de l'acide hyaluronique justifie largement leur usage en ingénierie du cartilage. Enfin, la fonctionnalisation par la restriction en oxygène et l'utilisation de HA permet de s'affranchir de procédés difficilement transposables en production de grade clinique, comparé à des méthodes biochimiques ou mécaniques.

Objectifs de thèse

Ce travail a pour objet de déterminer les conditions optimales de production de substituts allogéniques capables de combler les lésions cartilagineuses dans le cadre du traitement de l'arthrose. Il s'oriente particulièrement sur la composante cellulaire de ces substituts.

En premier lieu, l'usage de cellules souches mésenchymateuses issues de cordons ombilicaux implique de déterminer quels facteurs peuvent influencer la prolifération cellulaire et la différenciation chondrocytaire des CSM-GW. Ces facteurs sont liés à l'environnement direct et indirect des CSM-GW. En l'occurrence, trois types de facteurs ont été étudiés :

- Les facteurs liés à l'enfant donneur, puisque ce sont des cellules renfermant son patrimoine génétique,
- Les facteurs liés au déroulement de l'accouchement et de la délivrance, constituant le moment de rupture entre l'*in vivo* et l'*in vitro*,
- Les facteurs liés à la grossesse et à la mère, puisque c'est le contexte dans lequel les CSM-GW se sont développées.

Tous ces facteurs peuvent influencer le comportement des CSM-GW, et il convient d'infirmer ou de confirmer cet impact afin de pouvoir sélectionner les cordons idoines à la production optimale de substituts cartilagineux allogéniques. Ce processus d'étude met donc en confrontation des facteurs obstétricaux avec des paramètres biologiques de prolifération et de différenciation chondrocytaire afin d'en retirer des corrélations statistiques (**Figure 11**).



Figure 11 : Processus d'étude de l'influence des facteurs obstétricaux sur la prolifération et la différenciation des CSM-GW acct : accouchement ; NNé : Nouveau-né

Après la détermination des facteurs obstétricaux à retenir pour obtenir les CSM-GW les plus efficaces dans le cadre de l'ingénierie du cartilage, il est essentiel d'élucider leur profil d'action dans un contexte allogénique. Il a été nécessaire de mimer *in vitro* et en biomatériaux d'Alg/HA une telle situation en stimulant des CSM-GW avec de l'IFN- γ et du TNF- α . Ainsi, le deuxième temps de ce travail a consisté à trouver quel profil de stimulation était le plus performant, au regard de la viabilité des cellules et de l'évolution de la sécrétion des facteurs solubles responsables des propriétés immunomodulatrices des CSM-GW au cours du temps. Les cellules ont été stimulées par des doses croissantes d'IFN- γ et de TNF- α de manière séparée ou combinée. Une attention particulière a été portée à la viabilité cellulaire et aux effecteurs principaux de l'immunomodulation médiée par les CSM (sécrétion d'IL-6, IL-10, PGE-2, TGF- β , HLA-G et expression des molécules de costimulation et d'IDO – **Figure 12**).



Figure 12 : Processus d'étude de l'influence de la stimulation IFN/TNF sur les propriétés des CSM-GW

Enfin, les données *in vitro* issues de la stimulation à l'IFN- γ et au TNF- α sur la base des résultats de la deuxième partie sont comparées lors d'une mise en situation fonctionnelle : des cocultures avec des cellules mononucléées de sang périphérique (PBMC) de donneurs sains qui permettent d'évaluer la réponse des CSM-GW lors d'une situation allogénique. Ces mises en situations allogéniques ont été étudiées à différents temps afin d'évaluer les propriétés immunologiques des CSM-GW au cours du temps passé en biomatériaux. Les paramètres qui ont permis cette évaluation portent aussi bien sur la différenciation elle-même que sur le phénotype et le comportement des CSM-GW différenciées (Figure 13).



Figure 13 : Processus d'évaluation des propriétés immunologiques des CSM-GW au cours de la différenciation chondrocytaire

Les conclusions de ce travail permettront de (i) sélectionner les cordons idoines à l'ingénierie cellulaire et l'ingénierie du cartilage, (ii) définir les conditions permettant de mimer une situation allogénique *in vitro*, (iii) connaitre les propriétés immunomodulatrices des CSM-GW au cours de la culture en biomatériaux d'Alginate/Acide hyaluronique, y compris en situation allogénique. Tout ceci permettra de savoir à quel moment de la culture il est plus intéressant d'implanter les cellules ensemencées en biomatériaux au regard de leurs compétences immunomodulatrices et de leur capacité de remplacement du tissu lésé.

Deuxième partie : Matériels et méthodes

I. Recueil de données et facteurs obstétricaux

Les prélèvements de cordons et des facteurs obstétricaux associés ont été effectués de manière aléatoire et après consentement signé par les mères du 16 février au 27 avril 2011 par le personnel de la Maternité Régionale Universitaire de Nancy. Les cordons ont été prélevés directement après l'accouchement et conservés dans une solution d'HBSS stérile à 4°C avant transfert vers le laboratoire. En parallèle, de nombreuses données réparties en 115 items relatifs à la mère, au travail et à l'accouchement, et au nouveau-né ont été recueillies de manière anonyme à l'aide du logiciel FileMaker Pro 11 Advanced Software (FileMaker, USA). 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 ont été utilisés dans ce travail. Ainsi, des 115 paramètres relevés, 27 ont été utilisés (**Tableau 4**) – un paramètre n'apparaît pas dans ce tableau, la grossesse normale (tous paramètres), correspondant à l'absence de paramètres pathologiques relatifs à la mère, au travail et à l'accouchement, ainsi qu'au nouveau-né.

Danamètres liés à la mère	Davamètres liés au travail	Danamètuas liés	
r arametres nes a la mere	r arametres nes au travan	r arametres nes	
	et à l'accouchement	au nouveau-né	
Age : âge de la patiente au moment	Accouchement nar voie hasse	Semaines d'aménorrhée	
de l'accouchement	Accouchement par voie basse	Semanies a amenormee	
	Déclenchement : le travail a été	Prématurité : paissance avant la	
Indice de Masse Corporelle	induit par l'utilisation de	2 gème company d'aménorrhée	
	dinoprostone ou de Syntocinon [®]	38 semane d'amenormee	
	Travail dirigé : intervention		
Tabagisme	médicale durant le travail par rupture	Sexe	
	artificielle de la poche des eaux et/ou		
	administration de Syntocinon [®]		
Asthme	Syntocinon [®] pendant le	Poids à la naissance	
	travail	i vias a la maissance	
		Retard de croissance intra-	
Grossesse	Durée du travail	utérin : poids de naissance inférieur	
singleton/gémellaire	Durce uu travan	au dixième percentile selon les	
		courbes de poids régionales	
Hypertension artérielle	Travail long : défini par un travail	Souffrance fœtale objectivée	
ripper tension ar teriene.	supérieur à 8h nour une priminare et	à la naissance · score d'Apgar < 7	
tongion artárialla gunáriaura à 14/0	superieur a on pour une prinnpare et	te ite intersource : beene a ripBar	
tension artérielle supérieure à 14/9	6h pour une multipare, à compter	à une minute de vie et/ou pH artériel	
tension artérielle supérieure à 14/9 cmHg pendant la grossesse	6h pour une multipare, à compter d'une dilatation cervicale de 3 cm	à une minute de vie et/ou pH artériel au cordon < 7,2	
tension artérielle supérieure à 14/9 cmHg pendant la grossesse	6h pour une multipare, à compter d'une dilatation cervicale de 3cm	à une minute de vie et/ou pH artériel au cordon < 7,2 Naissance non compliquée :	
tension artérielle supérieure à 14/9 cmHg pendant la grossesse Prééclampsie	Superieur a sin pour une primipare et 6h pour une multipare, à compter d'une dilatation cervicale de 3cm Poids du placenta	à une minute de vie et/ou pH artériel au cordon < 7,2 Naissance non compliquée : absence des paramètres pathologiques	
tension artérielle supérieure à 14/9 cmHg pendant la grossesse Prééclampsie	6h pour une multipare, à compter d'une dilatation cervicale de 3cm Poids du placenta	à une minute de vie et/ou pH artériel au cordon < 7,2 Naissance non compliquée : absence des paramètres pathologiques précités	
tension artérielle supérieure à 14/9 cmHg pendant la grossesse Prééclampsie	Superiod a sin pour dite principale et 6h pour une multipare, à compter d'une dilatation cervicale de 3cm Poids du placenta Accouchement normal :	à une minute de vie et/ou pH artériel au cordon < 7,2 Naissance non compliquée : absence des paramètres pathologiques précités	
tension artérielle supérieure à 14/9 cmHg pendant la grossesse Prééclampsie Diabète gestationnel	Supericul a sin pour une primipare et 6h pour une multipare, à compter d'une dilatation cervicale de 3cm Poids du placenta Accouchement normal : absence des paramètres pathologiques	à une minute de vie et/ou pH artériel au cordon < 7,2 Naissance non compliquée : absence des paramètres pathologiques précités	
tension artérielle supérieure à 14/9 cmHg pendant la grossesse Prééclampsie Diabète gestationnel	Superiou a sin pour une primipare et 6h pour une multipare, à compter d'une dilatation cervicale de 3cm Poids du placenta Accouchement normal : absence des paramètres pathologiques précités	à une minute de vie et/ou pH artériel au cordon < 7,2 Naissance non compliquée : absence des paramètres pathologiques précités	
tension artérielle supérieure à 14/9 cmHg pendant la grossesse Prééclampsie Diabète gestationnel Dysthyroïdie	Supericul a sin pour une primipare et 6h pour une multipare, à compter d'une dilatation cervicale de 3cm Poids du placenta Accouchement normal : absence des paramètres pathologiques précités	à une minute de vie et/ou pH artériel au cordon < 7,2 Naissance non compliquée : absence des paramètres pathologiques précités	
tension artérielle supérieure à 14/9 cmHg pendant la grossesse Prééclampsie Diabète gestationnel Dysthyroïdie Maladie inflammatoire :	Supericul a sil pour une primpare et 6h pour une multipare, à compter d'une dilatation cervicale de 3cm Poids du placenta Accouchement normal : absence des paramètres pathologiques précités	à une minute de vie et/ou pH artériel au cordon < 7,2 Naissance non compliquée : absence des paramètres pathologiques précités	
tension artérielle supérieure à 14/9 cmHg pendant la grossessePrééclampsieDiabète gestationnelDysthyroïdieMaladie inflammatoire : présence d'une telle pathologie chez	Superiou a sin pour une primipare et 6h pour une multipare, à compter d'une dilatation cervicale de 3cm Poids du placenta Accouchement normal : absence des paramètres pathologiques précités	à une minute de vie et/ou pH artériel au cordon < 7,2 Naissance non compliquée : absence des paramètres pathologiques précités	
tension artérielle supérieure à 14/9 cmHg pendant la grossesse Prééclampsie Diabète gestationnel Dysthyroïdie Maladie inflammatoire : présence d'une telle pathologie chez la mère préexistante à la grossesse ou	Supericul a sin pour une primipare et 6h pour une multipare, à compter d'une dilatation cervicale de 3cm Poids du placenta Accouchement normal : absence des paramètres pathologiques précités	à une minute de vie et/ou pH artériel au cordon < 7,2 Naissance non compliquée : absence des paramètres pathologiques précités	
tension artérielle supérieure à 14/9 cmHg pendant la grossesse Prééclampsie Diabète gestationnel Dysthyroïdie Maladie inflammatoire : présence d'une telle pathologie chez la mère préexistante à la grossesse ou intervenant pendant celle-ci	Supericul a sin pour une primipare et 6h pour une multipare, à compter d'une dilatation cervicale de 3cm Poids du placenta Accouchement normal : absence des paramètres pathologiques précités	à une minute de vie et/ou pH artériel au cordon < 7,2 Naissance non compliquée : absence des paramètres pathologiques précités	
tension artérielle supérieure à 14/9 cmHg pendant la grossesse Prééclampsie Diabète gestationnel Dysthyroïdie Maladie inflammatoire : présence d'une telle pathologie chez la mère préexistante à la grossesse ou intervenant pendant celle-ci Grossesse normale : absence	Superiod a sin pour dite primipare et 6h pour une multipare, à compter d'une dilatation cervicale de 3cm Poids du placenta Accouchement normal : absence des paramètres pathologiques précités	à une minute de vie et/ou pH artériel au cordon < 7,2 Naissance non compliquée : absence des paramètres pathologiques précités	

Tableau 4 : Liste des paramètres obstétricaux retenus pour l'étude

II. Culture cellulaire

<u>Réactifs</u> :

- Tampon Hank's Balanced Salt Solution HBSS (Sigma, France)
- Phosphate Buffer Salin PBS (Sigma, France)
- Alcool à 70%
- Solution de Trypsine EDTA à 0,25% (v/v dans de l'HBSS, Sigma, France)
- Solution de DMSO à 10% (v/v dans du SVF, Sigma, France)
- Solution de bleu Trypan à 0,4% (Sigma, France)
- Paraformaldéhyde (PAF) à 4% (p/v dans du PBS, Sigma, France)
- QIAzol (Qiagen, USA)
- Alginate de sodium (Sigma, France)/acide hyaluronique (Acros, USA) 4:1 à 1,5% p/v dans du NaCl 0,9% (Sigma, France), poudre d'Alg/HA autoclavée à 150°C pendant 50 minutes avant utilisation
- Solution de polymérisation : Chlorure de Calcium CaCl₂ à 102 mM (Sigma, France) dissout dans de l'eau distillée, pH 7,4. Solution autoclavée à 150°C pendant 50 minutes avant utilisation
- Solution de dissolution des billes d'Alg/HA : Citrate-EDTA à 55 et 50 mM respectivement, p/v dans de l'eau distillée, pH 7,4 (Sigma, France ; Merck, France)
- IFN-γ humain grade premium (Miltenyi Biotec, France) : 100 µg/mL p/v dans de l'eau déionisée stérile
- TNF-α humain grade premium (Miltenyi Biotec, France) : 100 µg/mL p/v dans de l'eau déionisée stérile
- Milieux de culture :

Tableau 5 :	Composition	des différents	milieux d	le culture	cellulaire
-------------	-------------	----------------	-----------	------------	------------

Culture en monocouche « Culture monocouche »	Différenciation chondrogénique en pellet « Différenciation pellet »	Différenciation chondrogénique en biomatériaux « Différenciation Alg/HA »
 Milieu de culture α-MEM sans L-glutamine (Lonza, Suisse) SVF décomplémenté à 10% (v/v dans milieu de culture α-MEM, Sigma, France) L-glutamine à 2mM (Sigma, France) Pénicilline à 100U/mL – Streptomycine à 100µg/mL (Gibco, France) Amphotéricine B à 2,5µg/mL (Gibco, France) 	 DMEM high glucose (4,5g/L, sans L-glutamine) (Gibco, France) Sodium pyruvate à 10µg/mL (Gibco, France) Acide ascorbique à 5µg/mL (Sigma, France) L-proline à 4µg/mL Dexaméthasone à 10 nM (Sigma, France) L-glutamine à 2mM Pénicilline à 100µg/mL Amphotéricine B à 2,5µg/mL ITS+Premix à 1% (BD Biosciences, USA) TGF-β1 à 10ng/mL (PeproTech, 	 DMEM high glucose (4,5g/L, sans L-glutamine) SVF décomplémenté à 10% Sodium pyruvate à 10µg/mL Acide ascorbique à 5µg/mL L-proline à 4µg/mL Dexaméthasone à 10 nM L-glutamine à 2mM Pénicilline à 100µg/mL Amphotéricine B à 2,5µg/mL
	USA)	

Matériel :

- Flacons de culture cellulaire à bouchon ventilé 25, 75 et 500 cm² (Corning et Thermo Fisher, France)
- Tubes de culture cellulaire 15 et 50 mL (Corning, France)
- Tubes à hémolyse 5 mL (Sarstedt, Allemagne)
- Plaques de culture 6 et 12 puits (Corning, France)
- Tubes de cryoconservation cellulaire 2 mL (Nunc, Danemark)
- Seringues 10mL (BD, France)
- Aiguilles 18 Gauge (BD, France)
- Centrifugeuse « Labofuge 400 » (Heraeus Instruments, Allemagne)
- Congélateur en azote vapeur « Ultra low-150» (Sanyo Japon)

<u>Méthodes</u> :

Isolement et culture en monocouche des CSM-GW

Entre février et avril 2011, 52 cordons ombilicaux ont été disséqués stérilement dans une solution d'HBSS pour effectuer une extraction des CSM par méthode mécanique dite « de diffusion » ou « des explants » (38). Le cordon est sectionné en segments de 5 cm et nettoyé à l'alcool afin d'éliminer les parties souillées, contenant du sang coagulé ou du mucus. Après incision de l'épithélium amniotique, les artères et la veine ombilicales sont réséquées et la GW adhérente aux artères ainsi qu'à l'épithélium amniotique est conservée. La GW est ensuite morcelée puis ensemencée en plaques 6 puits avec 2 mL de milieu de culture « monocouche » (**Tableau 5**) : passage 0 (P₀). Les cellules vont coloniser le support de culture à partir des conditions de cultures définies par des études préalables au sein du laboratoire, en conditions d'hypoxie (5% de CO₂, <5% d'O₂) à 37°C (135). Après une semaine, la gelée est retirée, les puits sont lavés avec 2 mL d'HBSS. On ajoute ensuite 2 mL de milieu de culture monocouche. Le milieu est changé 2 fois par semaine jusqu'à l'obtention de 80% de confluence. Le nombre de jours passés en P₀ a été consigné pour chaque échantillon.

Passage et conservation des cellules

Lorsque les puits de culture sont à 80% de confluence, les cellules sont lavées avec 2 mL d'HBSS puis décollées par la trypsine (1 mL de solution de trypsine par puits). Après 3 min d'incubation à 37°C, l'action de la trypsine est inhibée avec 1 mL de milieu de culture

complet. La suspension cellulaire est alors centrifugée (300g, 5 min) et remise en suspension dans du milieu de culture puis les cellules sont comptées sur cellule de Thoma. Après une nouvelle centrifugation (300g, 5 min), le culot cellulaire est mis en suspension dans une solution de cryoconservation à 10% DMSO final et descendu en température à - 80°C pendant 24h. Les cellules sont ensuite conservées en vapeur d'azote (-144°C). Les échantillons utilisés dans cette étude ont été conservés entre 2 et 3 ans dans ces conditions.

Décongélation et mise en culture en monocouche des cellules

Les cellules sont décongelées rapidement au bain-marie à 37°C puis mises en suspension dans 10 mL de milieu de culture. Elles sont ensuite centrifugées (300g, 5 min) et le culot cellulaire est repris dans 5mL de milieu de culture « monocouche ». Une numération cellulaire au bleu Trypan sur cellule de Thoma est effectuée et les cellules sont ensemencées à 1000 cellules/cm² dans des T₂₅ avec 5 mL de milieu complet par flacon de culture, des T₇₅ avec 7 mL de milieu ou des T₅₀₀ avec 60 mL de milieu : passage 1 (P₁). Ces boites de culture sont mises en incubateur en hypoxie (5% de CO₂, <5% d'O₂) à 37°C. Le milieu est changé 2 fois par semaine.

Amplification cellulaire

Lorsque les cellules arrivent à 80 % de confluence, les tapis cellulaires sont lavés à l'HBSS puis décollés par la trypsine et centrifugés (300g, 5 min). Le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans du milieu de culture « monocouche » selon la taille du culot cellulaire. Après numération cellulaire au bleu Trypan sur cellule de Thoma, les cellules sont ensemencées à 1 000 cellules/cm² : passage 2 (P₂). Le milieu est changé 2 fois par semaine.

Evaluation de la prolifération cellulaire : temps de doublement

La prolifération cellulaire a été évaluée par calcul du temps de doublement de chacune des souches aux P₁ et P₂. La formule suivante a été utilisée :

Temps de doublement (h) = $T \times \frac{\log 2}{\log Cr - \log Ce}$

T: temps du passage (h) Cr: nombre de cellules récoltées Ce: nombre de cellules ensemencées
Différenciation chondrogénique en pellets

A 80 % de confluence en fin de P₂, les tapis cellulaires sont lavés à l'HBSS, décollés par la trypsine et centrifugés (300g, 5 min). Le surnageant est éliminé, le culot cellulaire remis en suspension dans du milieu « monocouche » et une numération cellulaire est effectuée. Les cellules sont ensuite centrifugées (150g, 5 min) et remises en suspension dans du milieu de « différenciation pellet » sans TGF- β 1. Après une seconde centrifugation (150g, 5 min) et retrait du surnageant, le culot cellulaire est mis en suspension dans 5mL de milieu de « différenciation pellet » () et réparti dans des tubes Falcon 15 à raison de 250 000 cellules/tube. Les tubes sont ensuite centrifugés une dernière fois (150g, 5 min) puis placés en condition d'hypoxie (5% de CO₂, <5% d'O₂) à 37°C. Le milieu est changé 2 fois par semaine jusqu'à J₂₈.

A J₂₈, les pellets sont rincés avec 1mL de PBS à deux reprises. Les pellets destinés à une étude histologique sont fixés avec 0,5mL de PAF 4% pendant 24h à 4°C, puis de nouveau rincées au PBS et enfin stockées à 4°C jusqu'à utilisation pour être mesurés ou utilisés en histologie. Les pellets restants sont congelés dans 0,5mL de QIAzol pour une utilisation ultérieure en biologie moléculaire.

Mesure des pellets

Les pellets ont été mesurés par méthode photographique normalisée avec un appareil photo 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 pellet est photographié de face puis à 90° afin d'obtenir 3 mesures : hauteur (a), largeur (b), profondeur (c) (**Figure 14**). Le calcul des volumes est ensuite réalisé selon la formule utilisée pour les formes ellipsoïdes :

$$vol(mm^3) = \frac{4}{3}\pi \frac{abc}{2}$$



Figure 14 : Méthode de mesure des pellets

Différenciation chondrogénique en biomatériaux

A 80 % de confluence en fin de P₃, les tapis cellulaires sont lavés à l'HBSS, décollés à la trypsine et centrifugés (300g, 5 min). Le surnageant est éliminé, le culot cellulaire remis en suspension dans du milieu de culture « monocouche » et une numération cellulaire est effectuée. Les cellules sont ensuite centrifugées (300g, 5 min) et remises en suspension dans la solution d'Alg/HA 4:1 à 1,5% à raison de 3 millions de cellules par mL d'Alg/HA. Après homogénéisation de la suspension cellulaire, des billes d'Alg/HA/CSM-GW sont formées par goutte à goutte avec une aiguille 18G dans une solution de polymérisation de CaCl₂ à 102 mM. Les billes ainsi formées sont conservées dans la solution de CaCl₂ pendant 15 minutes, puis rincées 2 fois au PBS et une fois avec du milieu de « différenciation Alg/HA ». Elles sont ensuite réparties en plaques 6 puits dans du milieu de « différenciation Alg/HA » et placées en conditions d'hypoxie (5% de CO_2 , <5% d'O₂) à 37°C. Le milieu de « différenciation Alg/HA » (**Tableau 5**) est changé 2 fois par semaine jusqu'à J₂₈.

Dissolution des billes d'Alginate/HA

Pour l'utilisation des cellules différenciées en billes d'Alg/HA en cytométrie en flux ou bien en biologie moléculaire, les billes sont rincées deux fois dans du PBS chauffé à 37° C (1 mL/bille). Les billes sont dissoutes par aspiration/refoulement dans une solution de Citrate/EDTA 55/50 mM à pH 6,8 chauffé à 37° C pendant 5 minutes (250 µL/bille). La dissolution de l'Alg/HA est arrêtée par l'ajout de PBS (1 mL/bille) et la suspension cellulaire est centrifugée (300g, 5 minutes). Le surnageant est jeté et les cellules sont de nouveau rincées au PBS, une fois pour une utilisation en CMF, cinq fois pour une utilisation en biologie moléculaire. Pour l'utilisation des cellules en biologie moléculaire, la suspension cellulaire est transférée dans un tube RNase/DNase free, les centrifugations s'effectuent à 4°C et le travail se fait sur glace. A la fin du processus, les cellules sont remises en suspension dans du PBS chauffé à 37°C pour la CMF et dans du QIazol (800 μ L/16 billes) pour la biologie moléculaire.

Stimulation des CSM-GW à l'IFN- γ et TNF- α

Les poudres d'IFN- γ et de TNF- α (100µg) sont reconstituées dans 1 mL d'eau déionisée stérile et les solutions sont conservées en alicots à -80°C jusqu'à utilisation (concentration de 100 ng/µL). Après décongélation, les alicots sont dilués 5 fois dans du milieu de culture et utilisés immédiatement (concentration de 20 ng/µL).

En monocouche, les CSM-GW sont ensemencées à 1 000 cellules/cm² pendant 24h pour permettre aux cellules d'adhérer et de commencer à proliférer. Le milieu est ensuite remplacé par du nouveau milieu de culture « monocouche », enrichi en IFN- γ et TNF- α à 20 et 30 ng/mL respectivement pendant 48h avant récolte des cellules et des surnageants pour analyse.

En billes d'Alg/HA, 3 billes sont mises en culture dans un puits de plaque 12 puits, avec 2 mL de milieu « différenciation Alg/HA ». Les différentes conditions de stimulations varient de 10 à 100 ng/mL (10, 20, 30, 50 et 100) en monostimulation et de 10 à 30 ng/mL en double stimulation.

III. Méthodes analytiques

A. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique semi-quantitative permettant de caractériser des cellules ou particules en suspension grâce à leur taille, granulosité, et à la fixation d'anticorps – couplés à un fluorochrome de manière directe ou indirecte – ou de sondes fluorescent(e)s sur leur membrane ou sur des molécules intra-cellulaires. En passant devant un laser, la cellule dévie la lumière selon sa taille et sa granulométrie. Le laser va également exciter les fluorochromes ou les sondes fluorescentes présents dans la suspension cellulaire. Ces fluorochromes ou ces sondes fluorescentes ont des spectres d'excitation et d'émission qui leur sont spécifiques ; ils doivent être excités par le laser correspondant, et vont émettre une fluorescence qui permet de les caractériser de manière spécifique. Enfin, les photomultiplicateurs (PMT) du cytomètre vont détecter la taille et la granulométrie des cellules ainsi que la présence de fluorochromes ou de sondes fluorescentes (Figure 15). Ces données sont amplifiées, numérisées et stockées sur un ordinateur, puis analysées par un logiciel de traitement de données. Cette technique a été utilisée dans cette étude pour étudier la viabilité cellulaire ainsi que l'expression de marqueurs de surface et de protéines de la matrice peri-cellulaire.



Figure 15 : Fonctionnement schématique d'un cytomètre en flux Source : Wikimedia Commons avec modifications

<u>Réactifs :</u>

_

- PBS (Sigma, France)
- Solution de blocage : BSA à 0,5% (p/v dans du PBS ; Sigma, France)
 - Kit Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, France) pour marquages intracellulaires o Solution de fixation/perméabilisation

- o Tampon de lavage 10X dilué 10 fois dans du PBS
- Kit Vybrant/Apoptosis[™] (Invitrogen, France)
 - o Tampon annexine-liant 5X dilué 5 fois dans de l'eau distillée
 - Solution d'annexine V couplée AlexaFluor[®] 488 (AF488)
 - Solution d'iodure de propidium 100µL/mL
- Kit Legendplex Human Th Cytokine Panel (BioLegend, France)
 - Lot de billes recouvertes d'anticorps anti-IL-10 13X dilué dans l'Assay Buffer
 - o Assay Buffer
 - o Wash Buffer 20X dilué dans de l'eau distillée
 - Cocktail « Human Th Cytokine Standard » lyophilisé dilué dans 250 μL d'Assay Buffer (0 – 10 000 pg/mL)
 - o Fluorochrome révélateur Streptavidine/R-Phycoérythrine conjugué
- Solution d'immunomarquage : anticorps spécifique (**Tableaux 6 et 7**) dilué dans la solution de blocage
- Solution de fixation : PAF 1% p/v dans de l'eau distillée (Sigma, France)

 Tableau 6 : Anticorps directs utilisés pour la CMF (les antigènes soulignés nécessitent une perméabilisation des cellules de même que leur isotype associé)

Antigène cible	Fluorochrome	Fournisseur
Isotype FITC	FITC	Dako
Isotype Alexa Fluor 488	Alexa Fluor 488	R&D Systems
Isotype PE	PE	Miltenyi
Isotype APC	APC	Miltenyi
CD34	PE	BD Biosciences
CD40	PE	Miltenyi
CD45	FITC	Dako
CD73	PE	BD Biosciences
CD73	APC	BD Biosciences
CD80	PE	Miltenyi
CD86	FITC	Miltenyi
CD90	FITC	BD Biosciences
CD105	PE	Beckman Coulter
HLA-DR	FITC	Beckman Coulter
HLA-G clone MEM-G/9	FITC	Exbio
HLA-G clone 2A12	FITC	Exbio
IDO	Alexa Fluor 488	R&D Systems

Tableau	7	:	Anticorps	indirects	utilisés	pour	la	CMF
---------	---	---	-----------	-----------	----------	------	----	-----

Cible	Hôte	Fournisseur					
Anticorps primaires							
Collagène I	Lapin	Merck					
Collagène II	Lapin	Sigma					
Anticorps secondaire							
Lapin	Chèvre couplé Alexa Fluor	Molecular Probes					
	488						

Deux types d'immunomarquage ont été utilisés (Figure 16). Le marquage direct consiste en l'ajout d'un anticorps directement couplé à un fluorochrome. Le marquage indirect consiste en l'utilisation d'un anticorps provenant d'une espèce, doublé d'un anticorps couplé à un fluorochrome dirigé contre l'espèce du premier anticorps.



Figure 16 : Techniques d'immunomarquages direct et indirect

Matériel :

- Tubes à hémolyse 5 mL (Sarstedt, Allemagne)
- Agitateur orbital
- Cytomètre Gallios (Beckman Coulter, France)
- Logiciel Gallios Software (Beckman Coulter, France)

<u>Méthodes :</u>

Viabilité cellulaire, apoptose, nécrose

L'apoptose et la nécrose sont les deux voies de mort possibles pour la cellule. L'apoptose consiste en la mort programmée de la cellule, qui par activation des gènes responsables va produire une fragmentation de la cellule pour former des corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques seront ensuite phagocytés par les macrophages. L'apoptose provoque un inversement des phosphatidylsérines de la face interne de la bicouche lipidique vers la face externe par un phénomène de flip-flop. L'annexine V, qui possède une très forte affinité pour ces phosphatidylsérines, va pouvoir les marquer et ainsi caractériser spécifiquement l'apoptose cellulaire. La nécrose est un processus de mort non programmé qui aboutit à la lyse de la cellule ; la membrane plasmique devient poreuse ce qui permet la pénétration de l'iodure de propidium, un intercalant de l'ADN (**Figure 17** 17).



Figure 17 : Marquage des cellules apoptotiques et nécrotiques Source : www.biomol.de

Pour ce test, les cellules sont réparties dans des tubes à hémolyse (100 000 cellules par tube) dans 1 mL de PBS puis centrifugées (300g, 5 min). Les cellules sont ensuite mises en suspension dans 100µL de tampon annexine-liant 1X et les cellules sont marquées à l'annexine V-Alexa Fluor 488 et à l'iodure de propidium. Après une incubation de 15 min à l'obscurité, la réaction est arrêtée avec 200µL de tampon annexine-liant 5X. Les cellules sont immédiatement analysées au cytomètre en flux qui mesure la fluorescence à 530 nm (spectre d'émission de l'Alexa Fluor 488) et 575 nm (spectre d'émission de l'iodure de propidium) sur un minimum de 6 000 évènements.

Immunophénotypage

Les cellules sont réparties dans des tubes à hémolyse (100 000 cellules par tube) avec 1mL de PBS puis centrifugées (300g, 5 min). Si le marquage nécessite une perméabilisation des cellules, celles-ci sont mises en suspension dans 100 μ L de solution de fixation/perméabilisation pendant 20 minutes à 4°C puis lavées avec 500 μ L de tampon de lavage 1X et centrifugées (300g, 5 minutes). Les cellules sont ensuite mises en suspension dans 500 μ L de solution de blocage pendant 5 min et centrifugées (300g, 5 min). La solution de blocage est éliminée et les culots cellulaires sont remis en suspension dans 100 μ L d'une solution d'immunomarquage (**Tableaux 6 et 7**) pendant 30 minutes à l'obscurité. La réaction est arrêtée avec 500 μ L de PBS et les tubes sont centrifugés (300g, 5 min) puis la solution est éliminée. Si le marquage nécessite un anticorps secondaire (**Tableau 6**), les cellules sont remises en suspension dans 100 μ L d'une solution d'immunomarquage pendant 30 minutes à l'obscurité. La réaction est arrêtée avec 500 μ L de PBS et les tubes sont centrifugés (300g, 5 min) puis la solution est éliminée. Si le marquage nécessite un anticorps secondaire (**Tableau 6**), les cellules sont remises en suspension dans 100 μ L d'une solution d'immunomarquage pendant 30 minutes à l'obscurité. La réaction est arrêtée avec 500 μ L de PBS et les tubes sont centrifugés (300g, 5 min) puis la solution est éliminée. Le culot cellulaire est ensuite suspendu dans 300 μ L de PBS – ou 300 μ L de PAF 1% si la lecture ne s'effectue pas dans la journée – avant d'être analysé par le cytomètre en flux.

Détection des facteurs solubles

Les surnageants de culture et la gamme étalon sont répartis dans des tubes à hémolyse ($25 \mu L/tube$). Dans chacun des tubes sont ensuite ajoutés successivement de l'Assay Buffer ($25 \mu L/tube$), le lot de billes recouvertes d'anticorps anti-IL-10 ($25 \mu L/tube$) et le fluorochrome révélateur conjugué ($25 \mu L/tube$). L'incubation dure ensuite 2h à l'obscurité, à température ambiante et sous agitation (1 000 rpm). Les surnageants sont ensuite analysés en cytométrie en flux.

B. Histologie

Deux colorations sont utilisées pour visualiser et quantifier la synthèse matricielle dans les pellets ou les billes d'Alg/HA : le Rouge Sirius pour les collagènes totaux et le Bleu Alcian pour les protéoglycannes. La coloration au Bleu Alcian est additionnée d'une coloration au Rouge Kernechtrot qui permet de visualiser les noyaux cellulaires. La coloration à l'hématoxyline-éosine-safran (HES) est utilisée pour observer le noyau cellulaire (hématoxyline, couleur bleu-violet), le cytoplasme (éosine, couleur rose) et les fibres conjonctives (safran, couleur jaune-orangé).

<u> Réactifs :</u>

- Paraffine (Sakura, Japon)
- Toluène (Sigma, France)
- Coloration au Rouge Sirius : Direct Red 80 (Sigma, France) à 0,1% p/v dans une solution d'acide picrique saturée (Sigma, France)
- Chlorure d'hydrogène 0,01N (Sigma, France)
- Coloration au Bleu Alcian :
 - Bleu Alcian 8GX Gurr acide (Searle Diagnostic, France) à 0,1% p/v dans de l'eau distillée
 - Rouge Kernechtrot (Merck, France) à 0,1% p/v et sulfate d'aluminium (Sigma, France) 5% p/v dans de l'eau distillée
- Coloration HES :
 - o Hématoxyline de Harris (RAL Diagnostics, France)
 - Eosine : érythrosine (RAL Diagnostics, France) 1% p/v dans de l'eau distillée
 - Safran : pistils de Safran du Gatinais (Labonord, France) 1% p/v dans de l'éthanol absolu (Carlo Erba, Italie)
- Tissue Clear (Sakura, Japon)
- Ethanol absolu utilisé pur ou dilué à 95, ou 70% v/v dans de l'eau distillée (Carlo Erba, Italie)
- Alcool ammoniacal (Carlo Erba, Italie)
- Résine de montage Pertex (Baler, France)

Matériel :

- Cassette (Simport, Canada)
- Mousse rectangle bleu (Simport, Canada)
- Appareil de déshydratation automatisée : ASP 300S (Leica, Allemagne)
- Appareil d'inclusion en paraffine : Tissue-Tek DRS 2000E-D2 (Sakura, Japon)
- Microtome RM2135 (Leica, Allemagne)
- Lames de microtome N35 (Feather, Japon)
- Appareil de coloration automatisée : Tissue-Tek TEC (Sakura, Japon)
- Lames de verre Menzel-Gläzer Superfrost (Thermo Scientific, France)
- Lamelles de verre (Sakura, Japon)
- Macroscope motorisé Macrofluo Z16 APO A (Leica, France)
- Microscope optique DMD108 (Leica, France)

<u>Méthodes :</u>

Les pellets ou les billes d'Alg/HA recueillis pendant les cultures sont placés entre deux mousses rectangulaires dans des cassettes. Les échantillons sont traités dans un appareil de déshydratation qui permet d'évacuer l'eau présente grâce à des bains croissants d'éthanol de 70, 95 et 100%. L'éthanol est ensuite remplacé par de la paraffine liquide grâce à différents bains de toluène et les échantillons sont conservés à 58°C jusqu'à l'inclusion en paraffine. Les échantillons sont ensuite inclus en bloc de paraffine liquide qui solidifie par baisse de température. Des coupes de 5µm sont réalisées au microtome et déposées sur lames. Les échantillons sont ensuite traités pour la coloration par un appareil de coloration automatisé (**Tableau 8**) : les lames sont placées dans différents bains d'éthanol décroissants pour réhydrater les échantillons qui sont ensuite colorés puis lavés. Enfin, les échantillons sont déshydratés une dernière fois et montés sous lamelles grâce à une résine pour observation.

Rouge	Sirius	Bleu Alcian		HE	S
Réactif	Durée (min)	Réactif	Durée (min)	Réactif	Durée (min)
Tissue Clear	10	Tissue Clear	10	Tissue Clear	10
Ethanol 100%	5	Ethanol 100% 5 Ethanol 100%		5	
Ethanol 95%	5	Ethanol 95%	5	Ethanol 95%	5
Ethanol 70%	5	Ethanol 70%	5	Ethanol 70%	5
Lavage	5	Lavage	5	Lavage	5
Rouge Sirius	60	Bleu Alcian	60	Hématoxyline	5
HCl	2	Bleu Alcian	60	Lavage	3
Ethanol 95%	2	Lavage	5	Alcool ammoniacal	1
Ethanol 100%	2	Rouge Kernechtrot	5	Lavage	3
Tissue Clear	5	Lavage	5	Eau distillée	3
		Ethanol 95%	0,5	Eosine	5
		Ethanol 100%	0,5	Lavage	3
		Tissue Clear	5	Ethanol 95%	3
				Ethanol 100%	3
				Safran	5
				Ethanol 100%	5
				Tissue Clear	5

Tableau 8 : Protocoles de coloration de l'appareil Tissue-Tek TEC

Les coupes de pellets ont été observées au macroscope Macrofluo Leica Z16 APO A. Les images ont été capturées par un objectif X5 NA05, caméra couleur DFC310FX munie d'un filtre Bayer et refroidie par effet Peltier à -10°C, avec une précision de 3,5 millions de pixels, 1 pixel = 6,45 x 6,45 μ m². 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, 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 répétabilité et reproductibilité des acquisitions.

Les coupes de billes d'Alg/HA sont observées au microscope optique DMD108 aux grossissements 4, 10 et 20X.

Analyse quantitative de la synthèse matricielle

Une macro a été créée à l'aide du logiciel ImageJ par les responsables de la plateforme PTIBC en collaboration avec l'IBMP de Strasbourg et l'Institut Curie de Paris. Cette macro permet d'analyser les images et de quantifier la coloration des différentes coupes de pellets de manière automatique. La détermination de contour a été réalisée par une méthode de filtrage jouant sur la variance. 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 18**).



Figure 18 : Méthode d'isolement des colorations par le logiciel ImageJ

a : Image d'un pellet coloré au bleu alcian. b : détermination de l'aire totale du pellet (en jaune). c : détermination de l'aire bleue (en blanc). d : Image d'un pellet coloré au rouge sirius. e : détermination de l'aire rouge (en noir).

C. Biologie Moléculaire

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, RunX2, COMP, agrécanes, et les collagènes I, II total, IIa, X. La protéine RP29 est ubiquitaire et son expression est la même dans toutes les cellules indépendamment des méthodes de culture utilisées dans cette étude et sert de référence.

<u> Réactifs :</u>

- Kit d'extraction d'ARN RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, France)
- Chloroforme (Carlo Erba, Italie)
- Isopropanol (Carlo Erba, Italie)
- Kit de rétro-transcription des ARN : iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad, France)
- SYBR Green Supermix (Biorad, France)
- Amorces Forward et Reverse de chaque gène à 10μM (Eurogentech, France) : Tableau 9
- Solution mère de chaque gène à $1ng/\mu L$
- Mix de PCR : 10μL de SYBR Green + 6μL d'eau RNase/DNase free + 1μL de chaque amorce du gène recherché (**Tableau 9**)

Amorce		Séquence (5' – 3')	Température d'hybridation
RP29	Reverse	AGACGCGGCAAGAGCGAGAA	60°C
	Forward	AAGATGGGTCACCAGCAGCTCTACTG	
Sox9	Reverse	CCTGGGATTGCCCCGA	55°C
	Forward	GAGCAGACGCACATCTC	
RunX2	Reverse	CGTTACCCGCCATGACAGTA	56°C
	Forward	CCCGTGGCCTTCAAGGT	
COMP	Reverse	TCTGCATCAAAGTCGTCCTG	60°C
	Forward	ACAATGACGGAGTCCCTGAC	
AGR	Reverse	TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA	62°C
	Forward	TCGAGGACAGCGAGGCC	
Coll I	Reverse	GGACCACTTTCACCCTTGT	62°C
	Forward	AGGTGCTGATGGCTCTCCT	
Coll II total	Reverse	GAACCTGCTATTGCCCTCTG	60°C
	Forward	ATGACAATCTGGCTCCCAAC	
Coll IIa	Reverse	ATCTCAGGGCTGAGGCAGT	60°C
	Forward	GCAGGATGGGCAGAGGTAT	
Coll X	Reverse	CTCCAGGATCACCTTTTGGA	60°C
	Forward	GCTAAGGGTGAAAGGGGTTC	

Tableau 9 : Amorces utilisées en PCR en temps réel

Matériel :

- Spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (Labtech, France)
- Reverse-transcription : Thermal cycler (Biorad, France)
- Capillaires qPCR (Roche, France)
- PCR en capillaires : Thermocycler (LightCycler 1.5, Roche, USA)
- Plaques qPCR 96 puits Axygen (Fisher Scientific, France)
- PCR en plaques : Step One Plus (Applied Biosystems, France)

<u>Méthodes :</u>

Extraction des ARN à partir de cellules en culture en monocouche ou en biomatériaux Alg/HA

Les échantillons issus de culture en monocouche ou en billes d'Alg/HA sont conservés à -80°C dans du QIazol jusqu'à extraction des ARN. Les ARN sont séparés par méthode classique au chloroforme, précipités par de l'isopropanol puis lavés à l'éthanol. Les ARN sont ensuite conservés en suspension aqueuse à -20°C jusqu'à utilisation.

Extraction des ARN à partir de cellules en culture en pellets

Les pellets sont conservés après culture à -80°C dans du QIazol jusqu'à extraction des ARN. Après décongélation, les pellets sont broyés à l'aide d'un pilon en téflon et les ARN sont séparés au chloroforme ; la phase aqueuse formée est transférée dans une colonne d'exclusion d'ARN du kit RNeasy Plus Micro (QIagen). La suite de l'extraction d'ARN s'effectue selon le protocole du fournisseur.

Dosage des ARN, rétro-transcription en ADNc et RT-PCR

Le dosage des ARN extraits est réalisé par spectrophotométrie. La rétro-transcription des ARN en ADNc est exécutée selon le protocole fourni avec le kit iScript cDNA Synthesis en présence de 300ng d'ARN pour chaque échantillon. La réaction de PCR en temps réel s'effectue en capillaires pour les ADNc issus de culture en pellets ou en plaques pour les autres échantillons : 2μ L d'échantillon sont dilués dans le Mix de PCR correspondant au gène recherché, ainsi qu'une gamme étalon. L'automate – Thermocycler pour les PCR en capillaires, Step One Plus pour les PCR en plaques – effectue plusieurs cycles de température spécifique au gène étudié (**Tableau 9**) et mesure la fluorescence à chaque cycle. Les résultats sont présentés en rapport au gène de référence RP29.

D. ELISA

Les techniques de détection immuno-enzymatique ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) sont des tests permettant de détecter et/ou doser une molécule par méthode colorimétrique ou fluorimétrique. Les molécules recherchées peuvent être des antigènes, des anticorps, des facteurs solubles, présents dans du sérum, du surnageant de

culture ou même directement sur les cellules. La technique ELISA repose sur une réaction immunologique se déroulant sur un support solide et révélée par une réaction enzymatique en phase liquide. Dans ce travail, deux types d'ELISA ont été utilisés : ELISA en sandwich et ELISA par compétition.

Pour la méthode en sandwich (**Figure 19**), utilisée dans ce travail pour la détection des interleukines 6 et 10, le VEGF, l'HGF et le TGF- β , l'antigène se trouve entre 2 anticorps spécifiques. La solution contenant la molécule d'intérêt est déposée dans le puit dont le fond est recouvert d'anticorps dirigés contre la molécule d'intérêt – anticorps de capture. Au cours de la phase d'incubation, les antigènes en solution vont se fixer à l'anticorps de capture. Dans une 2^{ème} étape, l'anticorps de détection couplé à la biotine est ajouté et va prendre en sandwich l'antigène fixé sur l'anticorps de capture. Dans une dernière étape, la streptavidine qui a une très forte affinité avec la biotine est ajoutée. Elle est couplée à une enzyme – la peroxydase de Raifort ou HRP – qui permet, par l'ajout d'une solution révélatrice contenant le substrat de l'enzyme, d'obtenir un produit de réaction soluble et coloré. La quantité de signal émis est proportionnelle à la quantité d'antigène pris en sandwich.



Figure 19 : Représentation schématique d'un ELISA en sandwich

La méthode dite « de compétition » (**Figure 20**) a été adoptée pour la détection de la PGE-2. La solution contenant la molécule d'intérêt est déposée dans le puit dont le fond est recouvert d'anticorps polyclonaux dirigés contre l'anticorps de capture de PGE-2 et contre un complexe PGE-2 – HRP fourni dans le kit. Au cours de la phase d'incubation, la PGE-2 en solution va se fixer à l'anticorps de capture qui va lui-même se fixer aux

anticorps polyclonaux. Dans une 2^{eme} étape, un complexe PGE-2 – HRP est ajouté et va se fixer sur les anticorps polyclonaux non occupés par les antigènes de capture de la PGE-2. Dans une dernière étape, l'ajout d'une solution révélatrice contenant le substrat de l'enzyme HRP va permettre d'obtenir un produit de réaction soluble et coloré. C'est la présence du complexe PGE-E – HRP qui sera détectée par méthode colorimétrique, on mesure donc ici l'absence de PGE-2 dans les surnageants.



Figure 20 : Représentation schématique d'un ELISA par compétition

Réactifs :

- Kit humain IL-6, IL-10, HGF, VEGF, TGF-β1 DuoSet ELISA (Biotechne, France)
 - Anticorps de capture (voir tableau 10) v/v dans du PBS
 - o Anticorps de détection (voir tableau 10) v/v dans du Diluant pour réactif
 - o Standard IL-6, IL-10, HGF, VEGF, TGF-β1
 - o Streptavidine-HRP, 80X v/v dans du Reagent Diluent
- Prostaglandin E2 Parameter assay kit (Biotechne, France)
 - o Tampon de lavage 25X v/v dans de l'eau distillée
 - \circ Solution substrat color reagent A + color reagent B v/v
 - Standard PGE-2
 - o Diluant RD5-56
 - o Solution d'anticorps primaire
 - Solution de PGE-2 conjuguée
- Solution d'activation acide : 1N HCl v/v dans de l'eau distillée
- Solution neutralisante : 1,2N NaOH/0,5 M HEPES p/v dans de l'eau distillée
- DuoSet ELISA Ancillary reagent kit 1 et 2 (Biotechne, France)
 - o Tampon de lavage 25X v/v dans de l'eau distillée

- Diluant pour réactifs concentré 1, 70X v/v dans du PBS (ancillary reagent kit 1)
- Diluant pour réactifs concentré 2, 10X v/v dans du PBS (ancillary reagent kit 2)
- Diluant pour réactifs concentré 3, 5X v/v dans du PBS (ancillary reagent kit 1)
- $\circ \quad Solution \ substrat: color \ reagent \ A + color \ reagent \ B \ v/v$
- o Solution stop

Cytokine	Anticorps de	Facteur de dilution
II 6	Capture	180
1L-0	Détection	180
11 10	Capture	120
<i>1L-10</i>	Détection	60
HCE	Capture	120
ПОГ	Détection	60
VECE	Capture	120
VEGF	Détection	60
TCE 01	Capture	120
TGF-βI	Détection	60

Tableau 10 : Facteurs de dilution des anticorps ELISA DuoSet

Matériel :

- Plaques 96 puits à haute affinité pour les protéines
- Agitateur orbital
- Varioskan flash (Thermo Scientific, France)

<u>Méthodes :</u>

Les surnageants de culture sont prélevés après 48h de culture, centrifugés (300g, 5 minutes), puis transférés dans des tubes propres. Ils sont ensuite conservés au congélateur à -20°C jusqu'à 6 mois. Avant les tests, les surnageants sont dilués comme indiqué dans le **tableau 11**. Les kits ELISA sont utilisés conformément aux protocoles du fournisseur avec dépôt des échantillons en duplicats et utilisation d'une gamme étalon pour permettre de quantifier les échantillons.

	Facteur de dilution des surnageants issus de culture en monocouche	Facteur de dilution des surnageants issus de culture en biomatériaux	Gamme de détection (pg/mL)
PGE-2	30	3	39 – 2 500
IL-6	1000	100	9 - 600
IL-10	0	0	$31 - 2\ 000$
HGF	0	0	125 - 8 000
VEGF	3	3	$31 - 2\ 000$
TGF-β1	3	3	$31 - 2\ 000$

Tableau 11 : Facteur de dilutions des surnageants utilisés pour les tests ELISA et gammes de détection

Les kits DuoSet ELISA IL-6, IL-10, HGF, VEGF – principe d'ELISA en sandwich – nécessitent l'utilisation des réactifs fournis dans les kits DuoSet et le kit Ancillary reagent 2. Les puits des plaques sont préparés la veille de la manipulation par revêtement avec 100µL d'anticorps de capture pendant toute la nuit à température ambiante. Les puits sont ensuite lavés 3 fois avec du tampon de lavage puis vidés. Une solution de blocage est ajoutée (Diluant pour réactifs concentré 2 - 300µL/puits) et incubée à température ambiante pendant 1h. Les puits sont ensuite lavés 3 fois avec du tampon de lavage puis vidés. Les échantillons dilués ou non (Tableau 11) ainsi que la gamme sont déposés (100µL/puits) et incubés pendant 2h à température ambiante. Les puits sont ensuite lavés 3 fois avec du tampon de lavage puis vidés. L'anticorps de détection est déposé (100µL/puits) et incubé pendant 2h à température ambiante. Les puits sont ensuite lavés 3 fois avec du tampon de lavage puis vidés. La streptavidine-HRP (100 µL/puits) est déposée et incubée pendant 20 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Les puits sont ensuite lavés 3 fois avec du tampon de lavage puis vidés. La solution substrat (200 µL/puits) est déposée et incubée pendant 20 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Enfin, la solution stop (50µL/puits) permet la révélation de la réaction et la plaque peut être lue par un automate pendant 30 minutes avant altération des résultats.

La méthode utilisée pour le kit DuoSet ELISA TGF- β 1 – principe d'ELISA en sandwich – nécessite l'utilisation des réactifs fournis dans le kit DuoSet et le kit Ancillary reagent 1. Le procédé d'expérimentation est le même que pour les kits DuoSet ELISA IL-6, IL-10, HGF, VEGF à l'exception de la préparation des échantillons. Ceux-ci doivent être activés afin de permettre la détection du TGF- β 1 par une solution d'activation acide 20% pendant 10 minutes à température ambiante puis par une solution neutralisante 16,6% avant dépôt des échantillons dans les puits.

Le kit Prostaglandin E2 Parameter assay nécessite uniquement l'utilisation des réactifs fournis dans le kit. Les échantillons et la gamme étalon sont ajoutés dans les puits (150 μ L/puits) et immédiatement après, la solution d'anticorps primaire (50 μ L/puits). Les réactifs sont incubés pendant 1h à température ambiante sur un agitateur orbital à 500 tours par minute. La solution de PGE-2 conjuguée est ajoutée (50 μ L/puits) et incubée pendant 2h à température ambiante sur un agitateur orbital à 500 tours par minute. Les puits sont ensuite lavés 3 fois avec du tampon de lavage puis vidés. La solution substrat (200 μ L/puits) est déposée et incubée pendant 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Enfin, la solution stop (100 μ L/puits) permet la révélation de la réaction et la plaque peut être lue par un automate pendant 30 minutes avant altération des résultats.

Après la révélation, les plaques sont lues à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm et les concentrations sont calculées à partir d'une gamme étalon déterminée par le logiciel SkanIt Software pour chacun des tests.

E. Cultures mixtes lymphocytaires (MLR)

Les cultures mixtes lymphocytaires sont des tests fonctionnels permettant de déterminer l'activité immunologique d'une population cellulaire. Dans le cadre de ce travail, deux expérimentations sont menées. La première vise à déterminer l'immunogénicité des CSM-GW face aux cellules mononucléées de sang périphérique (PBMC) d'un donneur sain. La seconde concerne l'immunomodulation des CSM-GW ; en coculture tripartite, les CSM-GW modulent la réaction immunitaire des PBMC d'un donneur dit répondant face aux PBMC irradiées d'un autre donneur servant de stimulant (**Figure 21**).



Figure 21 : Schématisation des tests de cultures mixtes lymphocytaires réalisés

<u> Réactifs :</u>

- Milieu de séparation des lymphocytes (Eurobio, France)
- Milieu 199 avec sels de Hank (GE Healthcare, Autriche)
- Milieu RPMI 1640 sans rouge de phénol (Lonza, Belgique)
- Sérum AB de donneurs sains
- Pénicilline à 100 U/mL Streptomycine à 100 µg/mL (Gibco, France)
- L-Glutamine à 2 mM (Sigma, France
- Tampon PBS de Dulbecco (Eurobio, France)
- Leucoplate (Sobioda, France)
- Sang périphérique de donneurs sains
- Kit Delfia Cell Proliferation (Perkin Elmer, France)
 - Anticorps de marquage : BrdU 5-Bromo-2'-deoxyuridine utilisé à 0,05 % v/v dans du milieu RPMI
 - Solution de fixation
 - Anticorps de révélation : Anti-BrdU utilisé à 0,5% v/v dans du tampon de dilution
 - Tampon de dilution
 - Tampon de lavage 10X dilué 10 fois dans de l'eau stérile
 - Solution de révélation : Delfia Inducer

<u>Matériel :</u>

- Tubes Leucosep stériles 50 mL (Greiner bio-one, Allemagne)
- Tubes stériles 50 mL (Sarstedt, France)
- Tubes stériles 15 mL (Falcon, Mexique)
- Plaques de culture cellulaire 96 puits fond rond (Thermo Scientific, Danemark)
- Plaques Delfia (Perkin Elmer, France)
- Lecteur de plaques multi-détecteur : Victor X4 (Perkin Elmer, France)
- Irradiateur X-Rad 320 (Precision Xray Inc., USA)

Méthodes :

Séparation sur gradient de densité

Le sang total de chaque donneur est transféré dans des tubes Leucosep avec du milieu de séparation lymphocytaire et du milieu 199 pour un volume total de 45 mL, puis centrifugé à 1000g pendant 10 minutes. Les cellules mononucléées (PBMC) sont récupérées dans un tube Falcon de 15 mL puis sont ensuite remises en suspension dans du milieu 199 et centrifugées une fois à 600g pendant 15 minutes puis 2 fois à 400g pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans du milieu RPMI puis

comptées sur cellule de Malassez puis réparties en 2 tubes à une concentration de 1 millions de cellules par mL pour être irradiées ou non. Pour le test à J_0 , les PBMC et les CSM sont irradiées à 40 Gray. Lors des autres tests (J_3 , J_{14} et J_{28}), l'irradiation des PBMC de donneurs sains s'effectue à 25 Gray et les CSM ne sont pas irradiés, leurs capacités de prolifération étant réduites par le biomatériau d'Alg/HA.

Isolement des CSM-GW en culture en monocouche

Les CSM-GW sont utilisées en fin de P₃. Lorsque les flacons de culture sont à 80% de confluence, les CSM-GW sont décollées à la trypsine puis lavées et comptées sur cellule de Thoma. Elles sont ensuite réparties en deux tubes à une concentration de 1 million/mL pour être irradiées ou non. L'irradiation s'effectue à 40 Gray pour les CSM utilisées en tests d'immunomodulation.

Préparation des CSM-GW en billes d'Alg/HA

Les billes d'Alg/HA ensemencées en CSM-GW sont utilisées à J_3 , J_{14} et J_{28} de la différenciation chondrocytaire. Les billes sont lavées 2 fois avec du PBS stérile pour bien rincer le CaCl₂ puis conservées dans du milieu RPMI complet jusqu'à la mise en plaque. Les billes d'Alg/HA ne sont pas irradiées.

MLR

Les PBMC et les CSM ensemencées ou non en billes d'Alg/HA sont réparties dans une plaque 96 puits pour 3 jours de coculture. Le volume final déposé dans chaque puits est de 200 μ L sans considération du volume des billes. Les cellules sont ensuite mises en incubateur en normoxie (5% de CO₂, 19% d'O₂) à 37°C. Le milieu n'est pas changé au cours des 3 jours de coculture.

Révélation de la MLR

Au 3^{ème} jour de coculture, le BrDU, un intercalant de l'ADN, est ajouté au milieu de culture et incubé pendant 18h.

Au 4^{ème} jour de coculture, le contenu des puits est transféré dans des plaques Delfia 96 puits. Les puits sont ensuite vidés et les plaques laissées découvertes jusqu'à séchage complet. La solution de fixation est ajoutée pour une incubation de 30 minutes à température ambiante ; les plaques sont vidées puis à nouveau laissées découvertes jusqu'à séchage complet. L'anti-BrDU est ajouté dans tous les puits pour une incubation d'une heure à température ambiante. Les plaques sont vidées, puis lavées 4 fois avec le tampon de lavage du kit Delfia. Les plaques sont ensuite découvertes jusqu'à séchage complet. Le Delfia inducer est ajouté pur dans tous les puits et incubé sous agitation pendant 20 minutes à température ambiante. Les plaques sont ensuite lues par un lecteur de fluorescence à 615 nm (Victor X4, Perkin Elmer).

IV. Analyses statistiques

Toutes les données sont présentées selon leurs moyennes et écart-types sur un minimum de N=3. Les analyses statistiques réalisées sont des tests de Pearson ou de Student pour les paramètres d'avant décongélation, des régressions linéaires pour les facteurs obstétricaux et des analyses de variances pour l'ensemble des autres expérimentations. Une valeur p inférieure à 0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les résultats sont présentés à l'aide du logiciel Prism5 (GraphPad Software, USA).

A. Tests de corrélation

Le contrôle du rôle des paramètres cellulaires avant décongélation sur les indicateurs biologiques (temps de doublements P₁ et P₂, volume des micromasses, sécrétions de collagènes et protéoglycannes, expressions relatives de Sox9, agrécanes et collagène 2 total) a été effectué par recherche des corrélations à l'aide de tests de Student ou de Pearson, suivant la répartition gaussienne ou non des indicateurs. Ces analyses ont été réalisées par M. J-M Virion du service d'Epidémiologie et Evaluation Clinique du CHRU de Nancy à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute, France).

B. Régressions linéaires

Les analyses statistiques ont été réalisées par M. J-M. Virion du service d'Epidémiologie et Evaluation Clinique du CHRU de Nancy. Les corrélations entre les 27 paramètres obstétricaux et les 8 indicateurs biologiques de prolifération cellulaire et différenciation chondrocytaire ont été analysées sur 50 souches avec le logiciel SAS. Tous les échantillons ont été analysés en régression linéaire bivariée. Pour les moyennes qualitatives, les moyennes par modalité ont été considérées et pour les variables quantitatives, les coefficients de corrélation. En cas d'égalité des variances, un test ANOVA à un facteur était réalisé. Sinon, un test de Kruskal-Wallis était effectué pour les variables qualitatives et un test de corrélation pour les variables quantitatives. L'analyse par régression linéaire multivariée n'a été réalisée que pour les facteurs présentant une association significative au seuil 0,15 en régression linéaire bivariée. 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.

C. Analyses de variance

Les analyses de variances simples ou bivariées avec post-test de Bonferroni ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism5 (GraphPad Software, USA).

Troisième partie : Résultats et Discussion

I. Influence des facteurs obstétricaux sur le comportement cellulaire

Dans le but d'une utilisation des CSM-GW en ingénierie du cartilage, il est nécessaire de comprendre comment ces cellules réagissent à leur environnement et comment cet environnement pourrait moduler leurs capacités. 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 (136). Certaines pathologies d'origine circulatoire peuvent également produire un effet similaire. Il est donc légitime de rechercher une influence de ces facteurs obstétricaux sur les propriétés des CSM contenues dans le cordon ombilical. Les facteurs obstétricaux retrouvés dans la littérature sont nombreux, et on peut les différencier en 3 principaux groupes : relatifs à la parturiente, au travail et à l'accouchement, au nouveau-né. Penolazzi et al. montrent que l'âge de la patiente au moment de la grossesse a une influence sur le potentiel de différenciation ostéocytaire des CSM-GW. D'autres auteurs ont retrouvé des corrélations entre facteurs maternels et tissus fœtaux, notamment les vaisseaux ombilicaux, le placenta et le sang placentaire (44,136,137). Ces recherches utilisaient les facteurs suivants : l'âge maternel, l'indice de masse corporelle (IMC) de la mère, la parité, et certaines pathologies liées à grossesse (l'hypertension artérielle définie comme une tension artérielle supérieure à 14/9 cmHg, la prééclampsie définie comme une hypertension artérielle avec protéinurie positive apparaissant à partir du 2^{ème} 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 lors du suivi de grossesse, notamment les facteurs socio-économiques, les antécédents médicauxchirurgicaux 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.

La plupart des études prennent en compte la voie d'accouchement (accouchement voie basse ou césarienne) (44,137,138), la durée du travail ainsi qu'une souffrance fœtale dans

l'étude de l'impact des facteurs obstétricaux. 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.

Les facteurs étudiés dans la littérature relatifs au nouveau-né sont l'âge gestationnel au moment de la naissance, le poids de naissance, le sexe, un retard de croissance intrautérin (défini comme un poids de naissance rapporté à l'âge gestationnel inférieur au 10^{ème} percentile) et le pH au cordon (139–141). 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, la taille et le périmètre crânien de l'enfant, la douleur néonatale si certains gestes ont été réalisés 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.

Certains de ces facteurs ont montré un impact non seulement sur la prolifération cellulaire mais également sur le potentiel de différenciation des CSM-GW (**Tableau 12**). Les capacités de différenciation mésodermiques et extra-mésodermiques des CSM-GW ont été étudiées, mais jusqu'à présent, l'impact des facteurs obstétricaux sur la différenciation chondrocytaire n'a pas été approfondi.

Facteurs obstétricaux	Propriétés des CSM-GW	Références
Age maternel	Corrélation négative avec l'expression des marqueurs	Alrefaei et al. (35)
	mésenchymateux (CD105/CD29)	
Diabète gestationnel	Différenciation adipogénique améliorée	Pierdomenico et al. (37)
	Capacités prolifératives et viabilité diminuées	Wajid et al. (142)
	Prolifération diminuée, sénescence précoce, différenciation	Kim et al. (143)
	ostéogénique et adipogénique diminuée, dysfonction	Amrithraj et al. (144)
	mitochondriale	
Obésité maternelle	Différenciation adipogénique améliorée	Boyle <i>et al.</i> (145)
Prééclampsie	Différenciation en cellules gliales améliorée	Joerger-Messerli et al. (146)
Retard de croissance	Augmentation de la prolifération	Sukarieh et al. (147)
intra-utérin		
Accouchement prématuré	Différenciation en cellules gliales similaire au CSM-GW issus	Messerli et al. (148)
	d'accouchement à terme	
Naissance à terme	Potentiel ostéogénique amélioré	Penolazzi et al. (36)

Tableau 12 : Influence des	facteurs obstétricaux sur le	s propriétés des CSM-GW
----------------------------	------------------------------	-------------------------

A. Caractéristiques des échantillons

Les paramètres obstétricaux relatifs à la mère, au déroulé du travail et de l'accouchement et au nouveau-né sont décrits par les **tableaux 13, 14 et 15.**

	Ν	%/Moy	ET*	Médiane	Q1	Q3	Min	Max
Age	50	29.84	4 40	30.00	27.00	32.00	20.00	42.00
$IMC (kg/m^2)$	50	25.45	7.00	23.79	20.43	30.09	17.16	45.91
Catégorie IMC		,	.,				,	
Maigreur	5	10.0						
Normal	25	50,0						
Surpoids	7	14,0						
Obésité modérée	6	12,0						
Obésité sévère	5	10,0						
Obésité morbide	2	4,0						
Tabagisme								
Non	33	66,0						
Oui	17	34,0						
Asthme								
Non	45	90,0						
Oui	5	10,0						
Grossesse Singleton / Gemellaire								
Non	43	86,0						
Oui	7	14,0						
Grossesse normale (tous critères)								
Non	46	92,0						
Oui	4	8,0						
Grossesse normale (critères néonata	aux)							
Non	23	46,0						
Oui	27	54,0						
Grossesse normale (critères materne	els)							
Non	41	82,0						
Oui	9	18,0						
Grossesse normale (critères travail e	et délivr	rance)						
Non	34	68,0						
Oui	16	32,0						
Hyper-tension artérielle								
Non	42	84,0						
HTA non gravidique	4	8,0						
HTA gravidique	4	8,0						
Prééclampsie								
Non	46	92,0						
Modérée	2	4,0						
Sévère	2	4,0						
Survenue de la prééclampsie (SA)	4	33,13	5,18	33,30	28,65	37,60	28,30	37,60
Diabète gestationnel								
Non	43	86,0						
Oui	7	14,0						
Menace d'accouchement prématuré								
Non	47	94,0						
Oui	3	6,0						
Dysthyroïdie								
Non	44	88,0						
Oui	6	12,0						
Maladie inflammatoire								
Non	46	92,0						
Oui	4	8,0						

Tableau 13: Descriptif des facteurs obstétricaux relatifs à la mère

Tableau 14: Descriptif des facteurs obstétricaux relatifs aux nouveau-nés

	Ν	%/Moy	ET*	Médiane	Q1	Q3	Min	Max
Semaines d'aménorrhées	49	39.38	2.56	39.90	39.00	40.90	28.30	41.70
Terme	44	88,0	,					
Prématuré modéré	4	8,0						
Prématurissime	2	4,0						
Sexe								
Manquant	1							
M	21	42,9						
F	28	57,1						
Poids Naissance (g)	49	3 161,80	649,19	3 230,00	2 920,00	3 480,00	760,00	4 310,00
Catégorie Poids								
Manquant	1							
Normal	36	73,5						
Retard de croissance intra- utérin	10	20,4						
Macrosomie	3	6,1						
рН	45	7,24	0,07	7,26	7,20	7,29	7,08	7,36
Lactates (mmol/L)	44	3,05	1,51	2,45	2,10	3,60	1,50	7,80
Souffrance fœtale objectivée à l	a naissa	ince						
Non	39	78,0						
Oui	11	22,0						

Tableau 15: Descriptif des facteurs obstétricaux relatifs au travail et à l'accouchement

	N	%/Moy	ET*	Médiane	Q1	Q3	Min	Max
Accouchement voie basse								
Non	16	32,0						
Oui	34	68,0						
Déclenchement								
Non	31	62,0						
Oui	19	38,0						
Travail dirigé								
Non	37	74,0						
Oui	13	26,0						
Syntocinon pendant le travail								
Non	25	50,0						
Oui	25	50,0						
Durée du travail (h)	44	6,07	2,87	5,50	4,00	7,75	1,00	14,00
Travail long								
Manquant	6							
Non	35	79,5						
Oui	9	20,5						
Poids du placenta (g)	49	535,02	106,00	530,00	460,00	600,00	243,00	721,00

B. Caractérisation des CSM-GW

Les CSM-GW ont été décongelées après 2 ans de congélation. Elles étaient adhérentes au plastique et avaient une forme fibroblastique. La viabilité et le phénotype des cellules ont été évalués, respectivement, sur 4 et 5 souches par cytométrie en flux. Les résultats montrent que la viabilité après décongélation était supérieure à 90%, que les cellules n'exprimaient pas les marqueurs hématopoïétiques ni HLA-DR et exprimaient les marqueurs mésenchymateux pour plus de 85%. Leurs capacités clonogéniques ont été confirmées à la fin du passage 2 par des tests de CFU-F. Le potentiel de différenciation mésodermique – adipocytaire et ostéocytaire – des cellules a été démontré après stimulation adéquate par des marquages au rouge Alizarine pour les dépôts calciques et à l'AdipoRed pour les vésicules lipidiques (**Figure 22**).



Figure 22 : Caractérisation des CSM-GW

Le test de viabilité, apoptose, nécrose (a) a été réalisé juste après décongélation (N=4). L'analyse phénotypique (b), les capacités clonogéniques (c; échelle = 1 cm) et la différenciation mésodermique (d; échelle = 100 µm) ont été évaluées en fin de P_2 (N=5).

C. Influence des paramètres avant décongélation sur la prolifération et la différenciation chondrocytaire

Afin de vérifier que l'impact des paramètres obstétricaux sur les propriétés prolifératives et chondrocytaires des CSM-GW n'était pas dû à d'autres paramètres, l'influence des paramètres cellulaires avant décongélation a été évaluée à l'aide de tests statistiques. Pour ce faire, le temps passé en P₀, le nombre de cellules isolées en fin de P₀, ainsi que le temps passé en congélation pour chaque échantillon ont été corrélés avec les paramètres biologiques des CSM-GW après décongélation – prolifération cellulaire, capacités de différenciation chondrocytaire. Les analyses ne montrent pas d'impact de la capacité proliférative des cellules en P₀ sur les propriétés des CSM-GW après décongélation ($p \ge 0,2358$; **Tableau 16**). Seul le temps passé en congélation a montré un impact sur la différenciation chondrocytaire et précisément la synthèse de protéoglycannes et de collagènes dans la MEC ($p \le 0,0198$; **Tableau 17**). Par conséquent, ce paramètre a été pris en compte dans la suite de l'étude pour l'analyse statistique concernant la corrélation entre les paramètres biologiques cellulaires et la capacité de sécrétion des protéoglycannes et les collagènes (**Tableau 19**).

	Nombre (x1000) de cellules congelées en fin de Po Régression bivariée		Nombre de jour passés en Po	
			Régression bivariée	
	Moy/r*	P**	Moy/r*	P**
Tps dblemt P1 (h)	0,12	0,4532	-0,17	0,2431
Tps dblemt P2 (h)	-0,05	0,7312	-0,17	0,2358
Volume (mm ³)	0,13	0,4069	-0,19	0,1959
SOX9/RP29 (x10000)	-0,14	0,3631	-0,13	0,3670
AGGR/RP29 (x10000)	-0,14	0,3631	-0,16	0,2680
COLL2T/RP29	0,04	0,7901	-0,11	0,4502
(x10000)				
Protéoglycannes (%)	-0,11	0,4927	-0,02	0,9057
Collagènes (%)	0,13	0,3949	-0,06	0,6843

Tableau 16 : Corrélation entre les propriétés des CSM-GW en P₀ et après décongélation

* 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

Tableau 17 : Corrélation entre le temps passé en congélation et les propriétés des CSM-GW après décongélation

	< 800 jours N=32 (64,0%)		≥ 800 jours N=18 (36,0%)				
	N	%/Moy	ET*	N	%/Moy	ET*	P**
Tps dblemt P1 (h)	32	88,31	73,99	18	84,20	78,97	0,8548
Tps dblemt P2 (h)	32	70,87	31,23	18	63,26	18,66	0,3510
Volume (mm ³)	32	0,88	0,34	18	0,87	0,32	0,9056
SOX9/RP29 (x10000)	31	0,59	0,97	17	0,91	1,37	0,3562
AGGR/RP29 (x10000)	31	7,48	7,23	17	11,60	7,92	0,0744
COLL2T/RP29 (x10000)	31	7,23	7,89	17	14,27	18,52	0,0713
Protéoglycannes (%)	32	24,70	20,28	18	37,78	14,41	0,0198
Collagènes (%)	32	90,28	7,97	18	77,06	13,74	< 0,0001

* Ecart-type ** Test issu d'un test de Student

D. Prolifération

Les cellules ont été ensemencées à 1 000 cellules/cm² et mises en culture dans des conditions d'hypoxie jusqu'à l'obtention de 80% de confluence. Le temps de doublement a été calculé à partir du nombre de jours passé en P1 et en P2 pour caractériser les capacités prolifératives des cellules. Le temps de doublement a diminué entre le passage 1 et 2 (86,8 \pm 75h vs 68,1 \pm 27,4h), de manière non significative (Figure 23). On peut cependant remarquer un rétrécissement de la répartition des échantillons.



Figure 23 : Temps de doublement. Distribution des échantillons aux passages 1 et 2

Les analyses statistiques ont montré que le temps de doublement en P₁ était influencé par le travail dirigé (défini par l'usage d'ocytocine synthétique en perfusion pendant le travail et/ou une rupture artificielle des membranes) après régression linéaire bivariée (50,0 \pm 4,6h vs 99,8 \pm 13,7h ; p = 0,0383) et par l'administration d'ocytocine après régression linaire multivariée (61,6 \pm 5,2h vs 112,0 \pm 19,5h ; p = 0,0159 – **Figure 24**). Ces deux facteurs induisent une diminution du temps de doublement. En revanche, ces facteurs n'influencent pas le temps de doublement en P₂ (p = 0,3203 et 0,2157 respectivement en régression linéaire bivariée – **Tableau 19**).



: $\hat{p} \le 0,05$ en régression linéaire multivariée

Dans le but de l'utilisation des CSM-GW en ingénierie cellulaire, l'intérêt est de récolter des cellules avec une capacité proliférative optimale. En prenant en considération la répartition des échantillons, un seuil de temps de doublement en P₁ à 100 h a été déterminé. Les deux groupes ainsi déterminés – inférieur ou supérieur à 100h de temps de doublement en P₁ – montrent des différences significatives sur 5 facteurs obstétricaux, détaillés dans le **tableau 18**. De plus, il apparait que l'application de ce seuil impacte significativement le temps de doublement en P₂ (p = 0,0084) et le volume des pellets formés lors de la différenciation chondrocytaire (p = 0,0174).

	Total N= 50 %/moy	P1 > 100h N=12 (24,0%) %/moy	P1 < 100h N=38 (76,0%) %/moy	p*
Semaines d'aménorrhées Tabagisme	39,38	37,92	39,85	0,0212 0,0313
Non	66,0	91,7	57,9	
Oui	34,0	8,3	42,1	
Travail dirigé				0,0185
Non	74,0	100,0	65,8	
Oui	26,0	0,0	34,2	
Syntocinon pendant le tra	avail			0,0469
Non	50,0	75,0	42,1	
Oui	50,0	25,0	57,9	
Poids du placenta (g)	535,02	481,92	552,24	0,0446
Tps dblemt P2 (h)	68,13	85,94	62,51	0,0084
Volume (mm ³)	0,88	0,68	0,94	0,0174
COMP/RP29 (x10000)	44,68	50,06	42,93	0,8091
SUX9/RP29 (X10000)	1,37	2,36	1,05	0,1109
Proteoglycannes (%)	29,41	20,50	32,22	0,0661
Collagenes (%)	85,52	90,78	83,85	0,0842

Tableau 18 : Différences entre les CSM-GW des groupes Temps de doublement P_1 inférieur et supérieur à 100h

* Test du Chi-2 pour variables qualitatives, test issu d'un test de Student pour les variables quantitatives

Ainsi, sur les 50 cordons testés, la moitié provient de femmes ayant reçu du Syntocinon® pendant le travail. Sur ces 25 cordons, 57,9% sont dans le groupe inférieur à 100h, alors que pour ceux n'ayant pas reçu de Syntocinon®, 75% sont dans le groupe supérieur à 100h (p = 0,0469). De même, 26% des cordons proviennent d'un accouchement lors duquel le travail a été dirigé ; tous font partie du groupe inférieur à 100h (p = 0,0185).

Le temps de doublement en P₂ est également influencé par certains facteurs obstétricaux : le poids de naissance ainsi que du placenta, une naissance à terme, le tabagisme maternel, l'absence de troubles néonataux et l'absence de prééclampsie ont un impact favorable sur le temps de doublement des CSM-GW en P₂ ($p \le 0,0482$ en régression linéaire bivariée). En effet, l'augmentation du poids du nouveau-né et du placenta ainsi que du nombre de semaines d'aménorrhée diminuent le temps de doublement en P₂ (**Figure 25**). De même, la naissance à terme, l'absence de troubles néonataux et le tabagisme maternel réduisent le temps de doublement. Dans le cas de la prééclampsie, son apparition au cours de la grossesse détermine une augmentation du temps de doublement en P₂ (**Figure 26**). Ces résultats sont récapitulés dans le **tableau 19**.



Figure 25 : Facteurs quantitatifs ayant une influence sur le temps de doublement en P_2 * : $p \le 0,05$ en régression linéaire bivariée # : $p \le 0,05$ en régression linéaire multivariée



Figure 26 : Facteurs qualitatifs ayant une influence sur le temps de doublement en P_2 * : $p \le 0,05$ en régression linéaire bivariée

E. Différenciation chondrocytaire

L'influence des facteurs obstétricaux sur la différenciation chondrocytaire après 28 jours d'induction a d'abord été étudiée au niveau macroscopique. La synthèse matricielle était évaluée grâce au volume des pellets ainsi que par coloration de lames d'histologie au Rouge Sirius et Bleu Alcian pour détecter respectivement les collagènes et les protéoglycannes. Parmi les facteurs obstétricaux influençant les temps de doublement, seuls deux ont un impact sur les critères macroscopiques de différenciation chondrocytaire (Figure 27) : le travail dirigé augmente la production de protéoglycannes dans la MEC (p = 0,0440 après régression linéaire bivariée) tandis que l'augmentation du poids du placenta induit une diminution de la synthèse des collagènes (p = 0.0212 après régression linéaire multivariée). L'analyse moléculaire de l'expression génique a été réalisée par PCR à la recherche des gènes Sox9, agrécanes et collagène 2 total - respectivement facteur de transcription spécifique du cartilage et protéines matricielles composant le cartilage. Les résultats montrent que le tabagisme maternel diminue la production du facteur de transcription Sox9 à 28 jours de différenciation chondrocytaire (p = 0.0367 après régression linéaire multivariée – Figure 27). Les autres facteurs obstétricaux influençant les temps de doublement n'ont pas d'impact sur la différenciation chondrocytaire ($p \ge 0,1106$).



Figure 27 : Impact des facteurs obstétricaux impliqués dans la prolifération cellulaire sur la différenciation chondrocytaire* : $p \le 0.05$ en régression linéaire bivariée# : $p \le 0.05$ en régression linéaire multivariée
Sept autres facteurs obstétricaux interfèrent avec les paramètres déterminant la différenciation chondrocytaire, qui n'influençaient pas les capacités prolifératives des cellules ($p \le 0,0447$ après régression linéaire bivariée ou $p \le 0,0480$ après régression linéaire multivariée). Pour la MEC, la production de collagène par les CSM-GW est augmentée lorsque le donneur est de sexe féminin, et diminuée lorsque le travail et l'accouchement se sont déroulés normalement. La synthèse de protéoglycannes est augmentée par l'hypertension artérielle pendant la grossesse et diminuée dans le cas d'une grossesse gémellaire. Le volume des pellets est augmenté par un travail et un accouchement normaux, et diminué par un travail long. L'expression relative des gènes Sox9 et Coll2 total à J28 de la différenciation sont augmentés par un travail long et une grossesse normale. Aucun facteur obstétrical n'affecte positivement ou négativement l'expression génique des agrécanes. Ces résultats sont récapitulés dans le **tableau 19**.

+ : impact positif (temps de doi	R ² =	Temps de congélation (j)	Grossesse normale : Critères maternels	Travail long	Durée du travail	Hypertension artérielle	Grossesse normale : Travail et délivrance	Jumeaux	Sexe : F	Poids du placenta	Syntocinon pendant le travail	Travail dirigé	Prééclampsie	Grossesse normale : Critères néonataux	Tabagisme	Naissance à terme	Semaines d'aménorrhée	Poids de naissance (g)	Facteurs
iblement diminué ou au	0,12										+	+							doublement P1 (h)
igmentation d'un marq	Non concerné									+	+	+			+		+		oublement P1 < 100h
ueur de différenciation	0,14									+				+	+	+	+	+	doublement P2 (h)
chondrocytaire)	0,13				,		+												Volume (mm³)
	0,25	+				+						+							Protéoglycanes (%)
	0,25	ī							+	ł									Collagènes (%)
	0,23			+															Sox-9/ RP29
	0																		Aggrecans/ RP29
	0,16		+																Coll2T/ RP29

Tableau 19 : Récapitulatif des facteurs influençant les capacités des CSM-GW

F. Discussion

Grâce à leurs propriétés, les CSM-GW sont des cellules prometteuses pour l'avenir de la thérapie cellulaire et tissulaire. Dans le contexte des médicaments de thérapie innovante, il est encore nécessaire de définir des critères de production permettant de produire des lots cellulaires de qualité de manière reproductible. L'âge du donneur étant connu pour influencer l'expansion des CSM-MO, il était nécessaire de définir si les facteurs obstétricaux pouvaient influencer l'expansion et la différenciation des CSM-GW. Plusieurs études ont déjà démontré l'influence d'un à cinq facteurs obstétricaux sur les CSM-GW, mais cette étude est la première à étudier l'impact d'un large panel de facteurs sur la prolifération et la différenciation chondrocytaire. A cet effet, nous avons étudié l'impact de 27 facteurs obstétricaux relatifs à la mère et la grossesse, au travail et l'accouchement, ainsi qu'au nouveau-né.

En raison des variations introduites par les méthodes d'isolement cellulaire et de cryoconservation, les paramètres de pré-décongélation ont également été pris en compte. Dans l'optique d'une utilisation thérapeutique planifiée, il est inévitable de traverser des stades de cryoconservation et de stockage en banque cellulaire. L'utilisation immédiate des cellules après décongélation permet d'avoir des CSM utilisables directement, supprimant un délai lié à l'expansion cellulaire. Cependant, la cryoconservation des cellules demeure un processus stressant pour les cellules et pourrait altérer leurs propriétés telles que la les capacités prolifératives. de viabilité. le phénotype, différenciation et immunomodulatrices. Ce travail montre que la viabilité après décongélation est supérieure à 90%, résultat en accord avec d'autres études récentes explorant l'utilisation de CSM cryoconservées (149-151). En revanche, nous mettons en évidence un temps de doublement en P₁ parfois long et très variable selon les souches, comparé au temps de doublement en P₂ (P₁ = $86.8 \pm 75h vs P_2 = 68.1 \pm 27.4h$), ce qui suggère que les cellules congelées/décongelées ont un potentiel prolifératif diminué. En P1, 23,5% des souches présentaient un temps de doublement supérieur à 100h. Cependant, le temps de doublement diminue en P2, démontrant une amélioration des capacités prolifératives des cellules. La restauration des propriétés des CSM après 2 passages post-décongélation (fin de P₂) a été confirmée par la vérification des critères ISCT, incluant le phénotype cellulaire, les capacités clonogéniques et de différenciation. Ainsi, un stade de culture semble utile pour rétablir la prolifération cellulaire. Le temps de doublement en P2 reste cependant significativement augmenté lorsque le P₁ est supérieur à 100h (p = 0,0084 – **Tableau 18**), suggérant que certaines modifications ne peuvent pas être totalement inversées par un passage. Différentes études montrent un effet controversé de la congélation des CSM. Plusieurs travaux montrent que la congélation n'altère pas les propriétés des CSM *in vitro* (150,152) ou les fonctionnalités des CSM utilisées immédiatement après décongélation *in vivo* (153), tandis que d'autres études montrent une réduction de la viabilité cellulaire (154), du potentiel prolifératif (155) et des capacités immunomodulatrices des CSM (151,154,155). A la lumière de ces travaux, il parait donc impératif d'effectuer un contrôle qualité complet des cellules après décongélation et de définir les facteurs capables de contrebalancer les dommages de la cryoconservation subis par les cellules.

Les thérapies cellulaires et l'ingénierie tissulaire requièrent une grande quantité de cellules (156), et les CSM-GW, grâce à leurs hautes compétences prolifératives, sont des alternatives cruciales aux CSM-MO. De plus, le prélèvement des CSM-GW est indolore, non invasif et mène à l'isolement d'une quantité de cellules plus importante. Enfin, leurs capacités immunologiques plus larges en font les candidates idéales en thérapie allogénique. Cette étude montre que la prolifération des CSM-GW peut être améliorée en sélectionnant les cordons ombilicaux en fonction de certains facteurs obstétricaux. De manière intéressante, la prolifération des CSM-GW était influencée par différents facteurs en P₁ et P₂, suggérant une possible majoration des effets. En P₁, deux facteurs diminuent significativement le temps de doublement cellulaire : le travail dirigé et l'administration d'ocytocine - Syntocinon® - pendant le travail (voir tableau 4 pour les définitions des facteurs obstétricaux). Ces facteurs semblent compenser les effets délétères de la congélation puisque le temps de doublement en P₁ est fortement diminué dans le groupe Syntocinon® (Avec Syntocinon = $61,6 \pm 5,2$ h vs Sans Syntocinon = $112 \pm 19,5$ h). Le travail dirigé ayant été défini dans l'étude comme résultant de l'utilisation de Syntocinon® et/ou d'une rupture artificielle des membranes, ces deux facteurs sont en lien étroit. Le Syntocinon® est un ocytocique de synthèse de constitution et de propriétés pharmacologiques identiques à celle de l'hormone ocytocique, ou ocytocine. Cette hormone neuro-hypophysaire sécrétée dans l'hypothalamus a un rôle bien connu dans la contraction utérine, la sécrétion du lait maternel et les fonctions cardiovasculaires (157). Cette hormone est très fréquemment utilisée en obstétrique pour accélérer le travail et la naissance. Récemment, plusieurs études ont révélé un effet stimulateur de différentes doses

d'ocytocine sur la viabilité et la prolifération de CSM en P3 différenciées ou non (158-160). Noiseux et al. démontrent que les CSM-MO expriment le récepteur à l'ocytocine, un récepteur couplé à la protéine G, capable d'activer une protéine kinase mitogène et donc d'induire la prolifération cellulaire (160). Dans notre étude, l'administration de Syntocinon® pendant le travail a pu améliorer la prolifération cellulaire directement après la décongélation. Cette hormone traverse la barrière placentaire par diffusion simple jusque dans le cordon ombilical (161) et pourrait alors interférer avec les propriétés des CSM-GW. L'ocytocine a une demi-vie courte et son administration pendant le travail reste ponctuelle en comparaison de la durée de la grossesse, ce qui conduit à une imprégnation courte du cordon ombilical. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'effet bénéfique de l'ocytocine n'est observé qu'en P₁ et plus en P₂. Le seuil de temps de doublement en P₁ inférieur à 100h permet de déterminer un groupe de CSM-GW plus intéressant pour l'ingénierie cellulaire, favorisé par le travail dirigé et l'administration d'ocytocine pendant le travail. De manière intéressante, d'autres facteurs permettent d'obtenir un P₁ inférieur à 100h, comme le nombre de semaines d'aménorrhées à la naissance, le tabagisme maternel et le poids du placenta, facteurs retrouvés comme impactant significativement le temps de doublement à P2. Ces 5 facteurs obstétricaux (Tableau 18) déterminant l'appartenance des CSM-GW à l'un des deux groupes permettent de faire le lien entre le P₁ et le P₂. Ainsi, même si les facteurs obstétricaux influençant ces deux passages sont différents, il apparait que des facteurs communs agissent sur les deux passages et l'appartenance au groupe de cellules plus prolifératives – P₁ inférieur à 100 h (Tableau 19). De surcroit, l'application de ce seuil impacte significativement le temps de doublement en P_2 (p = 0,0084, temps de doublement diminué par rapport au groupe $P_1 > 100h : 62,51h vs 85,94h$) et le volume des pellets formés lors de la différenciation chondrocytaire (p = 0.0174, volume augmenté par rapport au groupe $P_1 > 100h$: 0.94 mm³ vs 0.68 mm³). Ces facteurs induisent donc des CSM-GW au potentiel prolifératif supérieur et une capacité de production de MEC améliorée.

Les facteurs influençant la prolifération cellulaire à P_2 sont le poids à la naissance, le nombre de semaines d'aménorrhée à la naissance, la naissance à terme, l'absence de troubles néonataux, le poids du placenta, le tabagisme maternel et l'absence de prééclampsie (**Tableau 19**). La plupart de ces facteurs sont liés au terme avec un impact positif significatif, ces résultats indiquent donc que la naissance à terme est un facteur

majeur améliorant la prolifération cellulaire des CSM-GW. Concernant l'impact négatif de la prééclampsie sur le temps de doublement en P₂, une étude récente montre une diminution de la prolifération des CSM de la veine ombilicale suite à une prééclampsie précoce (162). Ce résultat est cohérent avec la naissance à terme puisqu'une mère déclarant une prééclampsie précoce atteint rarement le terme de la grossesse. Par conséquent, le cordon ombilical d'une grossesse avec prééclampsie ne devrait pas être prélevé.

Notre étude montre que le tabagisme maternel a un impact positif sur la prolifération cellulaire et un impact négatif sur l'expression de Sox9 à 28 jours de différenciation chondrocytaire. Parmi les composants du tabac, la nicotine, grâce à sa composition liposoluble, traverse facilement le placenta (163) et pourrait interférer avec les propriétés des CSM-GW. A cause de la pression sociale associée au tabagisme pendant la grossesse, il est possible que les femmes enceintes sous-estiment leur consommation, ce qui rend difficile une appréciation exacte de l'imprégnation tabagique et nicotinique des CSM-GW. De plus, le recueil de donné n'incluait pas la quantité de cigarette fumée par jour. Une étude récente montre que l'exposition prénatale à la nicotine induit une mauvaise qualité de cartilage articulaire (163). Ceci pourrait être en lien avec la diminution de l'expression de Sox9 pendant la différenciation chondrocytaire des CSM-GW issues de mères fumeuses. Plusieurs études ont évalué l'effet de l'apport de différentes doses de nicotine lors de la culture de CSM sur la prolifération et la différenciation chondrocytaire des cellules (164-166). Deux études portant sur le rôle de la nicotine sur différents paramètres de la différenciation chondrocytaire n'ont montré d'impact que sur un marqueur – le collagène de type II pour l'une, les agrécanes pour l'autre (164,165). A propos de la prolifération, Ying et al. montrent que la nicotine est un facteur favorisant (164), tandis que Zeng et al. reportent une diminution de la prolifération des CSM-GW de manière dose dépendante (166). Une étude récente d'une équipe partenaire opérée sur les mêmes cellules que notre travail montre que l'ajout de nicotine n'a pas d'impact sur la viabilité cellulaire mais altère la prolifération et les capacités de différenciation des CSM-GW (167). En particulier, Yang et al. indiquent une diminution du nombre de cellules, une quantité de matrice colorée au bleu Alcian moindre ainsi qu'une diminution significative de l'expression des gènes Sox9, collagène 2 total et agrécanes dans le groupe traité à la nicotine. Ces résultats contradictoires proviennent peut-être de conditions expérimentales différentes, puisque les études *in vivo* explorent une longue imprégnation nicotinique tout au long de la grossesse alors que les études *in vitro* résultent d'administrations ponctuelles. Contrairement à l'administration d'ocytocine, l'imprégnation tabagique se fait au long court ce qui pourrait expliquer pourquoi l'impact du tabagisme maternel est observé à P₂. L'effet prolifératif du tabagisme maternel pendant la grossesse doit cependant être complété par une étude des propriétés fonctionnelles des CSM-GW.

Nous avons évalué la différentiation chondrocytaire aux niveaux transcriptionnel et matriciel. Les critères de différentiation au niveau transcriptionnel étaient l'expression de Sox9, facteur de transcription spécifique de la différenciation chondrocytaire, des agrécanes et du collagène II total. L'analyse matricielle a reposé sur le volume des pellets et la présence de protéoglycannes et de collagènes en histologie. Les facteurs obstétricaux influençant la prolifération cellulaire n'ont pas montré d'impact significatif et global, positif ou négatif, sur la différenciation chondrocytaire. Par exemple, le travail dirigé qui améliore la prolifération cellulaire a un impact sur la synthèse matricielle de protéoglycannes, mais pas sur les autres marqueurs de différenciation chondrocytaire. Cet impact est limité à un seul critère de différenciation et ne peut mener à une conclusion sur la différenciation de manière globale. Ces résultats indiquent que les facteurs obstétricaux qui améliorent la prolifération cellulaire doivent être considérés pour l'expansion cellulaire. En outre, si le but final est l'ingénierie tissulaire du cartilage, ces facteurs obstétricaux peuvent être pris en compte. En effet, ils n'ont pas d'impact négatif sur la différenciation chondrocytaire et une phase d'expansion préalable à la phase de différenciation est nécessaire. Cependant, d'autres études montrent que la différenciation des CSM-GW est modulée par des facteurs obstétricaux impactant la prolifération cellulaire. L'ocytocine inhiberait la différentiation adipocytaire mais stimulerait les différenciations ostéocytaire, neuronale, et angiogéniques des CSM (158,159,168,169). Il a également été rapporté que la naissance à terme influencerait le potentiel ostéogénique des CSM-GW (36) et que la prééclampsie améliorerait l'expression de marqueurs neurogliaux (146). Comme indiqué dans le tableau 19, six autres facteurs obstétricaux influencent un ou deux marqueurs de différenciation chondrocytaire sans influencer la prolifération cellulaire. Leurs effets semblent limités et n'impactent pas la totalité des marqueurs de différenciation chondrocytaire. Dans la suite de ce travail, ces différents résultats ont été pris en compte pour l'utilisation des CSM-GW.

Article publié

Ces résultats ont donné lieu à la publication d'un article dans la revue Stem Cell Research and Therapy en 2017 (IF = 4,211) :

Avercenc-Léger L, Guerci P, Virion JM, Cauchois G, Hupont S, Rahouadj R, Magdalou J, Stoltz JF, Bensoussan D, Huselstein C, Reppel L. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells: predictive obstetric factors for cell proliferation and chondrogenic differentiation. Stem Cell Res Ther. 2017;8(1):161.

Avercenc-Léger et al. Stem Cell Research & Therapy (2017) 8:161 DOI 10.1186/s13287-017-0609-z

RESEARCH

Stem Cell Research & Therapy



Open Access

Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells: predictive obstetric factors for cell proliferation and chondrogenic differentiation

Léonore Avercenc-Léger^{1,3,7}, Philippe Guerci⁵, Jean-Marc Virion⁴, Ghislaine Cauchois^{1,3,7}, Sébastien Hupont⁷, Rachid Rahouadj^{3,6}, Jacques Magdalou^{1,3,7}, Jean-François Stoltz^{1,2,3,7}, Danièle Bensoussan^{1,2,3,7}, Céline Huselstein^{1,3,7} and Loïc Reppel^{1,2,3,7*}

Abstract

Background: The umbilical cord is becoming a notable alternative to bone marrow (BM) as a source of mesenchymal stromal cells (MSC). Although age-dependent variations in BM-MSC are well described, less data are available for MSC isolated from Wharton's jelly (WJ-MSC). We initiated a study to identify whether obstetric factors influenced MSC properties. We aimed to evaluate the correlation between a large number of obstetric factors collected during pregnancy and until peripartum (related to the mother, the labor and delivery, and the newborn) with WJ-MSC proliferation and chondrogenic differentiation parameters.

Methods: Correlations were made between 27 obstetric factors and 8 biological indicators including doubling time at passage (P)1 and P2, the percentage of proteoglycans and collagens, and the relative transcriptional expression of Sox-9, aggrecans, and total type 2 collagen (Coll2T).

Results: Amongst the obstetric factors considered, birth weight, the number of amenorrhea weeks, placental weight, normal pregnancy, and the absence of preeclampsia were identified as relevant factors for cell expansion, using multivariate linear regression analysis. Since all the above parameters are related to term, we concluded that WJ-MSC from healthy, full-term infants exhibit greater proliferation capacity. As for chondrogenesis, we also observed that obstetric factors influencing proliferation seemed beneficial, with no negative impact on MSC differentiation.

Conclusions: Awareness of obstetric factors influencing the proliferation and/or differentiation of WJ-MSC will make it possible to define criteria for collecting optimal umbilical cords with the aim of decreasing the variability of WJ-MSC batches produced for clinical use in cell and tissue engineering.

Keywords: Chondrogenic differentiation, Mesenchymal stromal cells, Obstetric factors, Proliferation, Umbilical cord, Wharton's jelly

* Correspondence: loic.reppel@univ-lorraine.fr

¹UMR 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, 54500 Vandoeuvre-Les-nancy, France ²CHRU de Nancy, Unité de Thérapie Cellulaire, Banque de Tissus, 54500

Vandœuvre-lès-Nancy, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Due to their capacity for self-renewal, their ability to differentiate into multiple lineages [1], and their immunoregulatory and anti-inflammatory properties [2, 3], mesenchymal stromal cells (MSC) are promising tools for new cell and tissue engineering developments for regenerative medicine and autoimmune/inflammatory disorders.

Bone marrow (BM) is usually regarded as the most common source of adult MSC [4]. MSC isolated from BM (BM-MSC) have been used in up to 200 clinical trials and in various indications (https://www.clinicaltrials.gov; accessed December 2016). However, BM 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 [1], and that in vitro differentiation potential and proliferation capacity decreases with donor age [5-7]. This interdonor variability is also reported in animal models where the tissue regeneration capacity of MSC isolated from old donors is impaired [8]. Thus, alternative sources of MSC must be considered, including fetal tissue such as the umbilical cord.

Umbilical cord is becoming a notable alternative source of MSC to BM [4]. The conjunctive tissue of the umbilical cord, namely the Wharton's jelly (WJ), is an abundant and promising source of MSC for clinical applications. Although MSC from Wharton's jelly (WJ-MSC) share similar characteristics with BM-MSC, they present many advantages: higher frequency and proliferation potential, differentiation in different ways [4, 9–11] and, a priori, no age-dependent variations. Besides, WJ-MSC are more immature according to immunological properties, making them good candidates for allogeneic therapy [12].

The potential for proliferation and in vitro expansion is an essential factor to obtain enough cells to produce clinical batches for patient treatment. Therapeutic doses vary from 1 to 10×10^6 cells/kg, depending on the different clinical protocols (www.clinicaltrials.gov; accessed December 2016). Moreover, it was reported that in vitro culture conditions, such as hypoxia, have a beneficial effect on the proliferative capacities of WJ-MSC [11, 13].

Obstetric factors such as mode of delivery, maternal age, fetal weight, parity, presence of preeclampsia, or hypertension were previously reported as modulating the cells or tissues of the umbilical cord [14–16]. Some studies reported the influence of different obstetric factors on WJ-MSC properties and the main results are summarized in Table 1 [17–23]. This table shows that some obstetric factors such as gestational diabetes could impact not only cell proliferation but also WJ-MSC differentiation potential [18, 19]. In Table 1, several mesodermal and extra-mesodermal differentiations were studied, but none focused on the impact of obstetric factors on chondrogenic differentiation.

However, many studies demonstrated the potential for multilineage differentiation of WJ-MSC, especially for chondrogenesis [4, 11, 24-26]. Due to their chondrogenic differentiation potential, WJ-MSC are a promising source of MSC for cell and tissue engineering for cartilage repair and/or regeneration. In three-dimensional cultures, cultivated for 3 to 4 weeks in chondrogenic medium supplemented or not with growth factors (such as transforming growth factor (TGF)-\u03b31 and TGF-\u03b33), several groups including our own reported that WJ-MSC showed chondrogenic induction with expression of specific cartilage-related genes and matrix proteins (Sox9, proteoglycans, type 2 collagen, cartilage oligomeric matrix protein (COMP)) [4, 11, 24-26]. However, a recent study was more reserved, showing poor chondrogenesis from MSC isolated from umbilical cord [27].

As few data on parameters influencing WJ-MSC behavior are available, we wondered whether the donor, i.e., the newborn, and its environment, the mother, and the labor and delivery events influenced WJ-MSC proliferation and differentiation. Whilst the previously mentioned studies described the influence of only one and up to five obstetric factors on cell properties, we sought to evaluate the correlation between a large number of obstetric factors (27), collected during pregnancy and until peripartum, with WJ-MSC proliferation and chondrogenic differentiation parameters. The knowledge of

Table 1 Influence of obstetric factors on Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cell (WJ-MSC) properties

Obstetric factors	WJ-MSC properties	References		
Maternal age	Negative correlation with mesenchymal markers (CD105/CD29) expression	Alrefaei et al. [17]		
Gestational diabetes	Improved adipogenic differentiation	Pierdomenico et al. [18]		
	Decreased proliferation capacity and viability	Wajid et al. [19]		
Obese mothers	Improved adipogenic differentiation	Boyle et al. [20]		
Preeclampsia	Improved neuroglial differentiation	Joerger-Messerli et al. [21]		
Preterm birth	Similar neuroglial differentiation potential as full-term birth	Messerli et al. [22]		
Full-term birth	Enhanced osteoblastic potential	Penolazzi et al. [23]		

obstetric factors influencing proliferation or differentiation of WJ-MSC will enable us to define the criteria for selecting optimal umbilical cords to be used for the production of clinical batches of WJ-MSC for cell or tissue engineering.

Methods

Human umbilical cord harvest and collection of related obstetric factors

Umbilical cords, considered as surgical waste at the time of collection, were obtained after the signing of an informed consent form by pregnant mothers in compliance with French national legislation regarding human sample collection, manipulation, and personal data protection. This collection was approved by the Nancy Hospital ethics committee and French ministry of research (No. DC-2014-2114). Fifty samples were randomly harvested at the Maternity Unit of Nancy University Hospital.

In parallel, for each umbilical cord collected, a large number of related obstetric factors, including maternal-, labor-, delivery-, and newborn-related factors, were recorded anonymously in a database created with File-Maker Pro 11 Advanced software (FileMaker, Santa Clara, CA, USA). After data extraction, only the most relevant and representative obstetric factors, 14 related to the mother, 7 related to the labor and delivery, and 6 related to the newborn, making a total of 27 factors, were used for the study (Additional file 1: Tables S1–S3).

Isolation and freezing of WJ-MSC

WJ-MSC were isolated as previously described [11]. After collection, umbilical cord samples from fifty donors were rinsed with 70% ethanol and Hanks' balanced salt solution (HBSS). Umbilical cord vessels were first removed and Wharton's jelly was aseptically cut into small pieces (2 to 3 mm³) plated in a six-well plate with complete medium (minimal essential medium alpha (a-MEM; Lonza, Walkersville, MD, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2.5 µg/mL amphotericin B). They were incubated at 37 °C under hypoxic conditions in a tri-gas incubator (MCO-18 M, Sanyo) with humidified gas mixtures of composition <5% O_2 , 5% CO_2 , and >95% $\mathrm{N}_2.$ After 7 days of contact with a plastic surface the cells had migrated and, as enough adherent cells were obtained, pieces were removed, the medium replaced, and cultures continued until cell subconfluence (80-90%). Complete culture medium was changed twice a week and, after 2 weeks, WJ-MSC were harvested with 0.25% trypsin- ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells were counted and cryopreserved in FBS with 10% v/v dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma) at −80 °C over 24 h and then stored at −150 °C. To control

the potential role of pre-thawing parameters on proliferation and chondrogenic differentiation of thawed WJ-MSC, the time to confluence at passage (P)0, the number of cells isolated at the end of P0, and time of cryopreservation were recorded for further analyses.

Thawing and culture of WJ-MSC

WJ-MSC were quickly thawed, washed with complete medium, and counted with trypan blue (Sigma) dye exclusion test. They were seeded at 1000 cells/cm² in complete medium and cultivated at 37 °C under hypoxic conditions, as previously described. After reaching subconfluence (80–90%), WJ-MSC were harvested with 0.25% trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) and grown up to P2.

Characterization of WJ-MSC

Characterization of WJ-MSC was performed using five samples. Viability was evaluated just after thawing. Phenotypic analysis, clonogenicity assays, and multilineage differentiation were performed at the end of P2.

Viability, apoptosis, and necrosis analysis

Apoptosis and necrosis of cells were analyzed after thawing by flow cytometry using the Vybrant/Apoptosis™ kit based on the Annexin V/propidium iodide (PI) staining procedure (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cells were suspended in 100 µL of 1× 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 1× Annexin V buffer was added to each sample. Cells were then 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, USA). Negative (unlabeled cells) and positive controls (apoptosis and necrosis) were performed. For all analyses, at least 5000 events were analyzed. Viable cells were Annexin V and PI negative.

Phenotypic analysis

Briefly, to perform phenotypic analysis, WJ-MSC were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE) conjugated mouse anti-human antibodies CD34-PE, CD45-FITC, HLA-DR-FITC, CD90-FITC, CD73-PE, CD105-PE, and CD166-PE (Beckman Coulter) for 30 min at room temperature. Negative and isotype (FITC and PE) controls were performed. After immunofluorescence staining, for each sample, 10,000 events were counted by Gallios flow cytometer (Beckman Coulter).

Clonogenicity assays

For colony-forming unit fibroblast (CFU-F) assays, WJ-MSC were harvested and seeded in a six-well plate at 10 cells/cm². They were cultured in complete medium for 10 days in hypoxic conditions. Then, they were washed with phosphate-buffered saline (PBS), stained with cristal violet solution (Sigma) and rinsed with water. CFU-F of more than 50 cells were scored and data expressed as total colony number per 100 cells.

Multilineage differentiation

The differentiation potential of WJ-MSC was evaluated under normoxic condition (5% CO₂, 21% O₂, 37 °C). Osteogenic and adipogenic differentiation potential were assessed according to the manufacturer's instructions (Differentiation Media BulletKits, Lonza). To induce osteogenesis, WJ-MSC were harvested and seeded at 3.1×10^3 cells/cm² in complete medium in a 12-well plate. After 24 h, the osteogenesis induction medium (Lonza) was added to the adherent cells; the medium was replaced twice a week and differentiation was continued for 21 days. At day 21, calcium mineralization was assessed by coloration with Alizarin Red (Sigma). For adipogenic differentiation, after harvesting, WJ-MSC were seeded at 2.1×10^4 cells/cm² in complete medium in an eight-well Lab-Tek* (Nunc, Rochester, NY, USA). At 100% confluence, three cycles of induction/maintenance were performed. Each cycle consisted of feeding WJ-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, WJ-MSC were incubated with adipogenic maintenance medium until 21 days and the medium was replaced twice a week. At day 21, fluorescent staining with AdipoRed™ (Lonza) was performed to detect lipid droplets.

Proliferation of WJ-MSC

The proliferation capacity of WJ-MSC during monolayer expansion was evaluated using all samples. This parameter was determined at P1 and P2 by the doubling time, according to the following formula:

Doubling time
$$(h) = T \times \frac{\log 2}{\log Ch - \log Cs}$$

where

T = passage time (h); C_h = harvested cell number; and C_s = seeded cell number

Chondrogenic differentiation of WJ-MSC

For the chondrogenic differentiation step, 2.5×10^5 WJ-MSC from all the samples in P3 were centrifuged in a 15-mL tube at 150 g for 5 min to form a pellet. Chondrogenic differentiation was processed by the threedimensional culture method and a chondro-inductive medium composed of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose 4.5 g/L with L-glutamine supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 2.5 µg/mL amphotericin-B (Gibco), 10 µg/mL sodium pyruvate, 5 µg/mL ascorbate, 4 µg/ mLL-proline, 2 mML-glutamine, 10 nM dexamethasone (Sigma), insulin-transferrin-selenium (ITS) + Premix 1% v/v (BD Biosciences, Bedford, MA, USA), and 10 ng/mL TGF-β1 (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA). Cells were incubated during 28 days under hypoxia (5% CO2, 2% O2, 37 °C) and the chondrogenic medium was changed twice a week.

Pellet measurements

Pellets were considered as ellipsoidal objects considering their irregular shape. Pellets were measured to obtain their height, width, and depth. The volume was then calculated as follows:

Volume
$$(mm^3) = \frac{4}{3} \pi abc$$

where

a = height/2; b = width/2; and c = depth/2

Histology and quantification of the matrix synthesis

In preparation for imaging, pellets were fixed in paraformaldehyde 4% p/v phosphate buffered saline (Sigma) and embedded in paraffin. Five micrometer slides were cut and stained with Sirius Red (Sigma) or Alcian Blue (Sigma) and Red Kernechtrot (Merck, Darmstadt, Germany) to determine collagen and proteoglycan synthesis, respectively. Each histological section of pellets was observed by transmitted light Macrofluo Z16APOA A LEICA (Leica, Nanterre, France). Acquisition parameters were defined to be constant, i.e., 65% brightness for Red Sirius staining and 61% brightness for Alcian Blue/ Red Kernechtrot. Images were obtained with a LEICA DFC310FX color camera. Images were obtained at 1.51 μ m side length square pixel size in 1392 × 1040 matrices at × 5 main objective magnification and × 0.75 macro zoom magnification (combined numerical aperture = 0.125).

A semiquantitative study of the distribution of stained descriptors was processed using Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). A custom-written

Image J program was used to measure the percentage area from the whole section of the pellet. In order to reduce image histogram variability both between and within images, we first used contrast-limited adaptive histogram equalization by using the «Auto Image J» function that will automatically optimize brightness and contrast based on an analysis of the image's histogram. It was necessary to separate the subject from the background of the image to overcome the contribution to the transmitted light. Then, we proceeded to a chromatic segmentation of each histological stain using the hue, saturation, and brightness properties of the images with the «Color Thresholder ImageJ» function. Images are 8-bit encoded. According to our instrumental settings, the Alcian Blue signature corresponds to the filter hue histogram (137-159). The Red Kernechtrot Chroma is the segmentation interval (195-237). Regarding to the Red Sirius, segmentation was based on the saturation component of the image by filtering the channels (250-255) (Additional file 2: Figure S1).

Real-time polymerase chain reaction

After 28 days of differentiation, pellets were collected and cryopreserved in 0.5 mL QIAzol (Qiagen, Gaithersburg, MD, USA) before treatment. Total RNA was extracted using the RNeasy Plus Microkit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions, except for the cell lysis made with a Teflon pestle and 200 µL chloroform (Carbo Erba Reagents, Rodano, Milan, Italy) for 1 mL QIAzol. Reverse transcription was performed with 300 ng of total RNA and iScript cDNA Synthesis kit (Biorad, Hercules, CA, USA) following the manufacturer's instructions in a Thermal Cycler (Biorad). Quantitative polymerase chain reaction (PCR) was made as previously described [26] with the following primers: Sox-9 (forward) 5'-GAG CAG ACG CAC ATC TC-3' and (reverse) 5'-CCT GGG ATT GCC CCG A-3'; Aggrecans (forward) 5'-TCG AGG ACA GCG AGG CC-3' and (reverse) 5'-TCG AGG GTG TAG CGT GTA GAG A-3'; total type 2 collagen (Coll2T) (forward) 5'-ATG ACA ATC TGG CTC CCA AC-3' and (reverse) 5'-GAA CCT GCT ATT GCC CTC TG-3'; and as control, RP29 (forward) 5'-AAG ATG GGT CAC CAG CAG CTC TAC TG-3' and (reverse) 5'-AGA CGC GGC AAG AGC GAG AA-3', the expression of which was not modified by the hypoxia culture conditions. Values were normalized to expression of RP29 mRNA.

Design of the study

Eight biological parameters were analyzed: doubling time at P1 and P2, the volume of pellets, the percentage of proteoglycans and collagens, and the relative transcriptional expression of Sox-9, aggrecans, and Coll2T. Experiments were processed on 50 samples. Two samples could not be analyzed by RT-PCR because of the lack of biological material. Correlations between the 27 obstetric factors and the 8 biological indicators were analyzed.

Statistical analysis

Control of the role of pre-thawing parameters on the eight biological indicators (doubling time at P1 and P2, volume of the pellets, percentage of proteoglycans and collagens, relative transcriptional expression of Sox-9, aggrecans and Coll2T) were assessed with SAS (SAS Institute, Brie Comte Robert, France) with a Pearson test or a Student's t test. Quantitative and qualitative data of the studied obstetric factors are presented as number of events, with mean and standard deviation when applicable. Correlations between the 27 obstetric factors and the 8 biological indicators were analyzed on the 50 samples with SAS (SAS Institute, Brie Comte Robert, France). All samples were analyzed in bivariate regression, for which mean per class are presented for qualitative variables and correlation coefficient for quantitative variables. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed in case of equal variances; if not, Kruskal-Wallis test was performed for qualitative variables and correlation test for quantitative variables. For multivariate regression, only the effects significantly associated at threshold 0.15 in bivariate regression were candidates. The stepwise selection method variable was used with significance level for entering effects at 0.1 and a significance level for removing effects at 0.05. Variables that do not appear in the multivariate regression do not meet those criteria. A statistically significant correlation was assumed for $p \leq 0.05$.

Results

Characterization of WJ-MSC

Cell viability after thawing was higher than 90% (Fig. 1a). Cells adhered to the plastic dishes and had a fibroblastic morphology. They positively expressed mesenchymal markers such as CD73, CD90, CD105, and CD166 with expression levels greater than 80%. The expression of hematopoietic markers CD34 and CD45 was negative, as was that of HLA-DR (Fig. 1b). Clonogenic capacities and mesodermic differentiation potential were confirmed at the end of P2 (Fig. 1c and d).

Impact of pre-thawing parameters on proliferation and chondrogenic differentiation

Statistical analysis of pre-thawing parameters (time to confluence at P0 and number of cells isolated at the end of P0) showed no impact on biological indicators of proliferation ($p \ge 0.2358$). Only the time of cryopreservation influenced chondrogenic differentiation through the matrix synthesis of proteoglycans and collagens ($p \le$



0.0198) (Additional file 1: Table S4). Thus, this parameter was taken into account in the multivariate analysis of correlations between the 27 obstetric factors and the 8 biological indicators (Table 2).

Proliferation

Cells were seeded at 1000 cells/cm² and incubated until subconfluence (80–90%) was reached. Days of culture were counted and doubling time was calculated in order to analyze cell proliferation potential. Doubling time was reduced between passage 1 and 2 (86.8 ± 75 h vs 68.1 ± 27.4 h). Although the difference was not significant, a marked decrease in the variations between samples was observed (Fig. 2).

Impact of obstetric factors

P1 doubling time was influenced by managed labor (defined by oxytocin infusion and/or artificial rupture of membranes) after bivariate regression analysis (50.0 ± 4.6 h vs 99.8 ± 13.7 h, p = 0.0383) and oxytocin infusion after multivariate regression analysis (61.6 ± 5.2 h vs 112.0 ± 19.5 h, p = 0.0159), as shown in Fig. 3a. Both significantly decreased P1 doubling time, so their application during labor was positive for cell proliferation. However, none of them impacted P2 doubling time (p = 0.3203 and 0.2157 after bivariate regression analysis). Studying factors influencing P1 doubling time according to a threshold of 100 h, several factors made it possible to obtain a P1 less than 100 h such as oxytocin infusion

(57.9% vs 25%, p = 0.0469), managed labor (34.2% vs 0%, p = 0.0185), amenorrhea weeks at birth (39.85 vs 37.92, p = 0.0212), maternal smoking (42.1% vs 8.3%, p = 0.0313), and placental weight (552.24 vs 481.92, p = 0.0446).

For P2 doubling time, birth weight, amenorrhea weeks at birth, full-term birth, maternal smoking, absence of neonate disorders, absence of preeclampsia, and placental weight all had an impact on cell proliferation ($p \le$ 0.0482 after bivariate regression analysis). As birth weight, amenorrhea weeks, and placental weight increased, P2 doubling time decreased. Similarly, full-term birth, absence of neonate disorders, and maternal smoking were beneficial for proliferation since P2 doubling time also decreased in both cases (respectively 94.5 h vs 64.5 h, 76.5 vs 61 h, and 73.6 h vs 57.5 h; Fig. 3b). However, the onset of preeclampsia increased P2 doubling time (65.8 h vs 94.6 h; Fig. 3b) Amenorrhea weeks at birth was the only factor which influenced P2 doubling time after multivariate regression analysis (p = 0.0094).

Chondrogenic differentiation

Obstetric factor effects were first studied on macroscopic biological data after 28 days of chondrogenic induction through pellet volumes, and Alcian blue and Sirius red surface coloration, respectively, for the presence of proteoglycans and collagens. Among obstetric factors that modulated doubling time in P1 and/or P2 only two had an impact on macroscopic criteria for

Avercenc-Léger et al. Stem Cell Research & Therapy (2017) 8:161

Obstetric factors	P1 doubling time (h)	P2 doubling time (h)	Volume (mm ³)	Proteoglycans (%)	Collagens (%)	Sox-9/ RP29	Aggrecans/RP29	Coll2T/RP29
Birth weight (g)		+						
Amenorrhea weeks at birth		+						
Full-term birth		+						
Maternal smoking		+				- 22		
Normal pregnancy: neonatal criteria		+						
Preeclampsia		-						
Managed labor	+			+				
Oxytocin infusion	+							
Placental weight		+			-			
Twins				-				
Normal pregnancy (labor and delivery criteria)			+					
Arterial hypertension				+				
Labor duration			-					
Long labor			_			+		
Normal pregnancy (maternal criteria)								+
Cryopreservation duration (days)				+	-			
$R^2 =$	0.12	0.14	0.13	0.25	0.25	0.23	0	0.16

Table 2 Imr	pact of obste	tric factors or	proliferation	and chondro	genic differentiation
-------------	---------------	-----------------	---------------	-------------	-----------------------

+ positive impact (i.e., decreased doubling time or increased marker of chondrogenic differentiation), – negative impact (i.e., increased doubling time or marker of chondrogenic differentiation). Coll2T total collagen type 2, P passage

chondrogenic differentiation: managed labor increased the production of proteoglycans in the extracellular matrix (p = 0.0440 after bivariate regression analysis; Fig. 4a), and when placental weight increased collagen production decreased (p = 0.0230 after bivariate regression analysis). Birth weight, amenorrhea weeks at birth, term birth, no neonate disorders, preeclampsia, and oxytocin infusion did not impact chondrogenic



differentiation ($p \ge 0.1106$). Considering molecular biology parameters, Sox-9 relative expression at day 28 of differentiation was reduced in the event of maternal smoking, which correlated with decreased P2 doubling time (p = 0.0367 after multivariate regression analysis; Fig. 4b).

Chondrogenic differentiation was influenced by six other obstetric factors which did not impact proliferation either positively or negatively ($p \le 0.0447$ after bivariate regression analysis or $p \le 0.0480$ after multivariate regression analysis; Table 2). Proteoglycan synthesis was increased by arterial hypertension in the mother and decreased by delivery of twins (Fig. 5a). Furthermore, the volume of pellets was increased by normal pregnancy with regard to labor and delivery criteria and decreased by long labor (defined as >8 h for primipara and >6 h for multipara) (Fig. 5b). Relative transcriptional expression of Sox-9 and Coll2T at day 28 of differentiation was increased in the presence of long labor and normal pregnancy. No obstetric factors were found to affect aggrecan mRNA expression.

Discussion

Given their particular properties, WJ-MSC are promising cells for use in cell and tissue engineering therapy. However, in the context of advanced therapy medicinal



product (ATMP) production, criteria which contribute to obtaining reproducible batches of WJ-MSC need to be defined. As donor age is now known to influence BM-MSC expansion, we wondered whether obstetric parameters could also impact WJ-MSC expansion and chondrogenic differentiation. Indeed, some studies previously reported the influence of between one to five obstetric factors on WJ-MSC (Table 1). However, this study is the first to explore the impact of a wide range of obstetric factors (27 obstetric factors related to the mother, the labor and delivery, and the newborn) on WJ-MSC proliferation and chondrogenic differentiation. Due to the variability introduced by cell isolation and cryopreservation, pre-thawing parameters that could affect the biology of thawed cells were taken into account in this analysis of correlations between the 27 obstetric factors and the 8 biological indicators.



Blue, was measured using a custom-written image J program. Bivariate regression analysis showed an increase in proteogriguant, santhesis by differentiated cells in the presence of managed labor. **b** Sox-9 expression relative to RP29 was assessed by RT-PCR. Multivariate regression analysis showed a significantly reduced expression of Sox-9 at day 28 of differentiation in cells from smoking mothers. * $p \le 0.05$ after bivariate regression analysis analysis ** $p \le 0.05$ after bivariate regression analysis



In light of planned therapeutic use, cell banking and cryopreservation are necessary steps. Immediate postthaw use allows MSC to be directly available, abolishing any delay caused by culture expansion. However, cryopreservation remains an inherently stressful process for cells, and could alter cell properties such as viability, phenotype, growth kinetics, differentiation capacities, and immunomodulatory properties. Our study demonstrated that post-thaw viability was higher than 90% and was consistent with recent papers examining the use of cryopreserved MSC [28, 29]. However, we highlighted a long and variable doubling time at P1 (first passage immediately after thawing) compared to P2 (86.8 ± 75 h vs 68.1 ± 27.4 h), suggesting that freeze-thawed cells have impaired proliferative potential. At P1, 23.5% of the samples presented a doubling time higher than 100 h. In contrast, a decreased doubling time was observed at P2, suggesting an improvement in cell proliferative capacity. Restoration of MSC properties after two passages (P2) following thawing was confirmed by cells that exhibited the minimum criteria defining MSC including phenotype, clonogenic, and mesodermic differentiation capacities. The clonogenic potential represents a relevant biological parameter that could also be included in the study of correlation with the obstetric factors. Thus, a culture step seemed useful to restore cell proliferation. However, doubling time at P2 remained significantly higher when P1 was over 100 h (p < 0.0084), suggesting that some modifications could not be completely reversed. Different studies reported a controversial impact of cryopreservation on MSC. Several reports demonstrated that cryopreservation did not alter MSC properties in vitro [28, 30, 31] or MSC functionalities in vivo [31, 32] immediately after thawing, whilst other reports

claimed that cryopreservation did reduce cell viability [33], proliferative potential [34], and immunomodulatory capacities of MSC [29, 33, 34]. It is therefore relevant to control cell quality after thawing and to define factors that may counteract cryopreservation impairments on cells.

Cell and tissue engineering protocols require large amounts of cells [35], and, as highly proliferative cells, WJ-MSC are a crucial alternative to BM-MSC. Indeed, their collection is painless, non-invasive and more productive, and their immunological features make them the ideal cells for allogeneic therapy. Our study showed that their proliferation could be improved by choosing umbilical cords as a function of certain obstetric factors. Interestingly, proliferation was influenced by different factors at P1 and P2. With regard to cell proliferation, managed labor and oxytocin infusion were the two factors that significantly decreased doubling time at P1. Furthermore, those factors seemed to counteract any impairment related to cryopreservation as doubling time in the oxytocin group was decreased (61.6 ± 5.2 h). Also, we sought a threshold below which certain factors could significantly influence P1. Doubling time at P1 was less than 100 h (57.9% vs 25%, p = 0.0469) when parturient women had received an oxytocin infusion. Similarly, we observed that doubling time at P1 was less than 100 h (34.2% vs 0%, p = 0.0185) only when managed labor was performed. Oxytocin infusion is related to managed labor as it is used during labor. This neuro-hypophyseal hormone secreted in the hypothalamus with a wellknown role in uterine contraction, milk secretion, and cardiovascular functions [36] is the main therapeutic drug frequently used in obstetrics to accelerate labor and birth. Recently, several studies revealed a

stimulatory effect of various amounts of oxytocin on the viability and proliferation of undifferentiated and differentiated MSC at P3 [37-39]. Noiseux et al. demonstrated that BM-MSC express the oxytocin receptor, a G-protein-coupled receptor, which activates a mitogenactivated protein kinase, thereby stimulating cell proliferation [39]. In our work, oxytocin administration during labor may have improved cell proliferation directly after thawing. Oxytocin crosses the placental barrier by simple diffusion into the umbilical cord [40] and might therefore interfere with WJ-MSC properties. Oxytocin has a short half-life and its infusion during labor remains punctual leading to only a short impregnation of the umbilical cord. This could explain why the beneficial effect of oxytocin is only observed at P1 and no longer at P2. Other factors made it possible to obtain a P1 less than 100 h such as amenorrhea weeks at birth, maternal smoking, and placental weight. These factors also significantly impact cell proliferation at P2 which clearly indicates that impairment of cryopreservation could hide their effects at P1 in the overall analysis.

The main parameters influencing cell proliferation at P2 were birth weight, amenorrhea weeks at birth, fullterm birth, no neonate disorders, placental weight, and absence of preeclampsia. As they are all related to term, with a significant positive impact, our study indicates that full-term birth is a major factor for enhancing cell proliferation of WJ-MSC. Considering the negative impact of preeclampsia on P2 doubling time, a recent study showed the inhibition of human umbilical vein endothelial cell proliferation by early-onset of preeclampsia during pregnancy [41]. This result is consistent with fullterm birth since a pregnant mother with preeclampsia rarely carries to term. Accordingly, umbilical cords from parturient women suffering from preeclampsia should not be retained.

Our study showed that maternal smoking had a positive impact on cell proliferation, with regard to P2 doubling time, and a negative impact on Sox-9 expression, considered to be the main transcriptional factor of chondrogenesis, at day 28 of chondrogenic differentiation. Pregnant mothers often underestimate their tobacco consumption because of social pressure, suggesting that tobacco exposure throughout the pregnancy was high. As a component of tobacco, nicotine, which is lipidsoluble and easily diffuses across the placenta [42], might interfere with WJ-MSC properties. Indeed, a recent study showed that prenatal nicotine exposure induces poor quality of articular cartilage [42]. This could be related to the decrease in Sox-9 expression during nicotine exposure and would be consistent with the impaired Sox-9 expression that we observed in smoking mothers. Several studies evaluated the effect of supplementing MSC cultures with various amounts of nicotine on MSC proliferation and chondrogenic differentiation [43-45]. Concerning chondrogenic differentiation from adult MSC, two studies screening different specific markers of chondrogenesis only reported one (type II collagen or aggrecan) increased in the presence of various concentrations of nicotine [43, 44]. Concerning proliferation, Ying et al. showed that nicotine promotes BM-MSC proliferation [43] whereas Zeng et al. reported decreased proliferation of MSC from the umbilical cord in the presence of nicotine in a dose-dependent manner [45]. These contradictory findings may result from experimental conditions as in vivo studies report long nicotine impregnation during pregnancy whereas in vitro studies report only occasional administrations. Unlike oxytocin infusion, nicotine exposure during pregnancy leads to long impregnation that could explain why the impact of maternal smoking is observed at P2. The proliferative effect of maternal smoking during pregnancy has nonetheless to be completed by a study on the functional properties of WJ-MSC.

We assessed chondrogenesis on transcriptional and matrix synthesis steps. Differentiation criteria for the transcriptional step were the expression of Sox-9, a chondrogenesis-specific transcriptional factor, aggrecans, and total type 2 collagen. As for matrix synthesis, the volume of pellets and the presence of proteoglycans/collagens were analyzed. Obstetric factors influencing cell proliferation did not show any significant or global impact, either positive or negative, on chondrogenic differentiation. For example, managed labor that enhanced cell proliferation did have an impact on proteoglycan synthesis but not on any other chondrogenic differentiation criteria. This impact was limited to one criterion of the matrix component and could not lead to a specific conclusion as to the effect of managed labor on chondrogenesis. These results indicate that obstetric factors improving cell proliferation should be considered for cell expansion. Moreover, if the final purpose is cartilage tissue engineering, obstetric factors should be taken into account since they had no negative impact on chondrogenic differentiation. However, other studies showed that MSC differentiation was modulated by the obstetric factors described in our study such as cell proliferation enhancement. Oxytocin inhibited adipogenesis but stimulated osteogenesis, neurogenesis, and angiogenesis of MSC [37, 38, 46, 47]. Moreover, it was reported that fullterm birth influences WJ-MSC osteoblastic potential [23] and preeclampsia enhances their neuroglial marker expression [21]. As shown in Table 2, six other obstetric factors influenced one or two criteria of chondrogenesis without influencing cell proliferation. Their effect remained limited and did not impact overall chondrogenesis. In our opinion, many chondrogenesis criteria may be influenced by one or several related obstetric factors.

Conclusions

In conclusion, we demonstrated a correlation between several obstetric factors and cell proliferation and chondrogenic differentiation parameters. Amongst the obstetric factors considered, multivariate linear regression analysis identified birth weight, the number of amenorrhea weeks, placental weight, normal pregnancy, and absence of preeclampsia as critical factors for cell expansion. All are related to the notion of full-term birth. The WJ-MSC issuing from a healthy term infant showed a greater proliferation capacity. Further investigation could explain the role of managed labor and especially that of oxytocin in cell proliferation and resistance to freezing and, by extension, their importance for cell banking. Regarding chondrogenesis, we showed that obstetric factors acting on proliferation seemed to have a positive effect or no impact on MSC differentiation. It is important to be aware of relevant obstetric factors before harvesting umbilical cord in order to optimize the selection of umbilical cord donors and collect WJ-MSC with most promising properties for use in cell and tissue engineering.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Maternal factors. Table S2. Labor and delivery factors. Table S3 Newborn factors. Table S4. Impact of pre-thawing parameters on proliferation and chondrogenic differentiation. (DOCX 47 kb)

Additional file 2: Figure S1. Histological analysis of chondrogenic differentiation. Pellets slides were cut and stained with Alcian Blue and Red Kernechtrot (A–C) or Sirius Red (D–F) to determine proteoglycan and collagen synthesis, respectively. A semiquantitative study of the distribution of stained descriptors was processed using Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). A custom-written Image J program was used to measure the percentage area from the whole section of the pellet. A chromatic segmentation of each histological stain was performed using the hue, saturation, and brightness properties of the images with the «Color Thresholder Image]» function. (DOCX 2164 kb)

Abbreviations

ATMP: Advanced therapy medicinal product; BM: Bone marrow; CD: Cluster of differentiation; CFU-F: Colony-forming unit fibroblast; Coll2T: Total type 2 collagen; COMP: Cartilage oligomeric matrix protein; DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; DMSO: Dimethylsulfoxide; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid; FBS: Fetal bovine serum; FITC: Fluorescein isothiocyanate; HBSS: Hank's balanced salt solution; HLA: Human leukocyte antigen; mRNA: Messenger ribonucleic acid; ac-MEM: Minimum essential medium alpha; MSC: Mesenchymal stromal cells; P: Passage; PBS: Phosphate-buffered saline; PE: Phycoerythrin; PI: Propidium iodide; RT-PCR: Real-time polymerase chain reaction; TGF: Transforming growth factor; WJ: Wharton's jelly

Acknowledgements

The authors would like to thank the imaging facility (PTIBC IBISA Nancy) at the Molecular, Cellular and Therapeutic Bioengineering Unit of the French National Center of Scientific Research (FB3209 CNR5 - BMCT) based at Lorraine University for relevant training and use of macroscope imaging systems. The authors would also like to thank Dr. Florence Vial and the staff from the Maternity Unit of Nancy University Hospital for their support in collecting umbilical cords and donors.

Funding

This work was partially supported by the project ANR-15-CE18-0025/ATYPiCAL, from the "Agence Nationale de la Recherche".

Availability of data and materials

Not applicable.

Authors' contributions

LA-L: Collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing. PG: Conception and design, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation. J-MV: Statistical analysis. GC: Collection and/or assembly of data, data analysis. SH and RR: Collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation. JM and J-FS: Conception and design, financial support. DB and CH: Conception and design, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation. LR: Conception and design, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

All authors were involved in revising the manuscript, and the final manuscript was read and approved by all authors.

Ethics approval and consent to participate

Umbilical cords, considered as sugical waste at the time of collection, were obtained after the signing of an informed consent form by pregnant mothers in compliance with French national legislation regarding human sample collection, manipulation, and personal data protection. This collection was approved by the Nancy Hospital ethics committee and French ministry of research (No. DC-2014-2114).

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹UMR 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, 54500 Vandoeuvre-Les-nancy, France. ²CHRU de Nancy, Unité de Thérapie Cellulaire, Banque de Tissus, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France. ³Université de Lorraine, 54000 Nancy, France. ⁴CHRU de Nancy, Unité de Epidémiologie et Evaluation Cliniques, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France. ⁶CHRU de Nancy, Maternité Régionale Universitaire, Département d'Anesthésie-Réanimation, 54000 Nancy, France. ⁶UMR 7563 CNRS-Université de Lorraine, LEMTA, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France. ⁷FR3209 CNRS BMCT – Bio-Ingénierie Moléculaire Cellulaire et Thérapeutique, Faculté de Médecine, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

Received: 20 January 2017 Revised: 9 May 2017 Accepted: 14 June 2017 Published online: 05 July 2017

References

- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multillineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999; 284(5411):143–7.
- Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, Bron D, Toungouz M, Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: a gathering of regulatory immune cells. Cytotherapy. 2016;18(2):160–71.
- Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, De Bruyn C, Bron D, Toungouz M, Lagneaux L. Immune-related antigens, surface molecules and regulatory factors in human-derived mesenchymal stromal cells: the expression and impact of inflammatory priming. Stem Cell Rev. 2012; 8(4):1188–98.
- 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.

Avercenc-Léger et al. Stem Cell Research & Therapy (2017) 8:161

- 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.
- 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.
- Li Y, Charif N, Mainard D, Bensoussan D, Stoltz JF, de Isla N. Donor's age dependent proliferation decrease of human bone marrow mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity. Biomed Mater Eng. 2014; 24(1 Suppl):47–52.
- Bruna F, Contador D, Conget P, Erranz B, Sossa CL, Arango-Rodriguez ML. Regenerative potential of mesenchymal stromal cells: age-related changes. Stem Cells Int. 2016;2016:1461648.
- Can A, 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.
- Majore I, Moretti P, Stahl F, Hass R, Kasper C. Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. Stem Cell Rev. 2011;7(1):17–31.
- Reppel L, Margossian T, Yaghi L, Moreau P, Mercier N, Leger 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. Curr Stem Cell Res Ther. 2014;9(4):306–18.
- El Omar R, Beroud J, Stoltz JF, Menu P, Velot E, Decot V. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? Tissue Eng Part B Rev. 2014;20(5):523–44.
- Nekanti U, Dastidar S, Venugopal P, Totey S, Ta M. Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Whatton's jellyderived mesenchymal stromal cells under hypoxia. Int J Biol Sci. 2010;6(5): 499–512.
- Barbieri C, Cecatti JG, Surita FG, Costa ML, Marussi EF, Costa JV. Area of Wharton's jelly as an estimate of the thickness of the umbilical cord and its relationship with estimated fetal weight. Reprod Health. 2011;8:32.
- Omori A, Hirai M, Chiba T, Takahashi K, Yamaguchi S, Takahashi TA, 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.
- Blanco MV, Vega HR, Giuliano R, Grana DR, Azzato F, Lerman J, Milei J. Histomorphometry of umbilical cord blood vessels in preeclampsia. J Clin Hypertens. 2011;13(1):30–4.
- Alrefaei GI, Ayuob NN, Ali SS, Al-Karim S. Effects of maternal age on the expression of mesenchymal stem cell markers in the components of human umbilical cord. Folia Histochem Cytobiol. 2015;53(3):259–71.
- Pierdomenico L, Lanuti P, Lachmann R, Grifone G, Cianci E, Gialò L, Pacella S, Romano M, Vitacolonna E, Miscia S, et al. Diabetes mellitus during pregnancy interferes with the biological characteristics of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. Open Tissue Eng Regen Med J. 2011;4:103–11.
- Wajid N, Naseem R, Anwar SS, Awan SJ, Ali M, Javed S, Ali F. The effect of gestational diabetes on proliferation capacity and viability of human umbilical cord-derived stromal cells. Cell Tissue Bank. 2015;16(3):389–97.
- Boyle KE, Patinkin ZW, Shapiro AL, Baker 2nd PR, Dabelea D, Friedman JE. Mesenchymal Stem Cells From Infants Born to Obese Mothers Exhibit Greater Potential for Adipogenesis: The Healthy Start BabyBUMP Project. Diabetes. 2016;65(3):647–59.
- Joerger-Messerli M, Bruhlmann E, Bessire A, Wagner A, Mueller M, Surbek DV, Schoeberlein A. Preeclampsia enhances neuroglial marker expression in umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. J Matern Fetal Neonatal Med. 2015;28(4):464–9.
- Messerli M, Wagner A, Sager R, Mueller M, Baumann M, Surbek DV, Schoeberlein A. Stem cells from umbilical cord Wharton's jelly from preterm birth have neuroglial differentiation potential. Reprod Sci. 2013; 20(12):1455–64.
- Penolazzi L, Vecchiatini R, Bignardi S, Lambertini E, Torreggiani E, Canella A, Franceschetti T, Calura G, Vesce F, Piva R. Influence of obstetric factors on osteogenic potential of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. Reprod Biol Endocrinol. 2009;7:106.
- De Bruyn C, Najar M, Raicevic G, Meuleman N, Pieters K, Stamatopoulos B, Delforge A, Bron D, 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.

- Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, Tukun A, Uckan D, Can A. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. Stem Cells. 2007;25(2):319–31.
- Reppel L, Schiavi J, Charif N, Leger L, Yu H, Pinzano A, Henrionnet C, Stoltz JF, Bensoussan D, Huselstein C. Chondrogenic induction of mesenchymal stromal/stem cells from Wharton's jelly embedded in alginate hydrogel and without added growth factor: an alternative stem cell source for cartilage tissue engineering. Stem Cell Res Ther. 2015;6:260.
- Islam A, Hansen AK, Mennan C, Martinez-Zubiaurre I. Mesenchymal stromal cells from human umbilical cords display poor chondrogenic potential in scaffold-free three dimensional cultures. Eur Cell Mater. 2016;31:407–24.
- Luetzkendorf J, Nerger K, Hering J, Moegel A, Hoffmann K, Hoefers C, Mueller-Tidow C, Mueller LP. Cryopreservation does not alter main characteristics of Good Manufacturing Process-grade human multipotent mesenchymal stromal cells including immunomodulating potential and lack of malignant transformation. Cytotherapy. 2015;17(2):186–98.
- Moll G, Alm JJ, Davies LC, von Bahr L, Heldring N, Stenbeck-Funke L, Hamad OA, Hinsch R, Ignatowicz L, Locke M, et al. Do cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunomodulatory and therapeutic properties? Stem Cells. 2014;32(9):2430–42.
- de Lima PK, de Santis GC, Orellana MD, Palma PV, Brassesco MS, Covas DT. Cryopreservation of umbilical cord mesenchymal cells in xenofree condicions. Cytotherapy. 2012;14(6):694–700.
- Barcia RN, Santos JM, Teixeira M, Filipe M, Pereira AR, Ministro A, Agua-Doce A, Carvalheiro M, Gaspar MM, Miranda JP, et al. Umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells maintain immunomodulatory and angiogenic potencies after cryopreservation and subsequent thawing. Cytotherapy. 2017;19(3):360–70.
- Gramlich OW, Burand AJ, Brown AJ, Deutsch RJ, Kuehn MH, Ankrum JA. Cryopreserved mesenchymal stromal cells maintain potency in a retinal ischemia/reperfusion injury model: toward an off-the-shelf therapy. Sci Rep. 2016;6:26463.
- Francois M, Copland IB, Yuan S, Romieu-Mourez R, Waller EK, Galipeau J. Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon-gamma licensing. Cytotherapy. 2012;14(2):147–52.
- Lechanteur C, Briquet A, Giet O, Delloye O, Baudoux E, Beguin Y. Clinicalscale expansion of mesenchymal stromal cells: a large banking experience. J Transl Med. 2016;14(1):145.
- Capelli C, Pedrini O, Valgardsdottir R, Da Roit F, Golay J, Introna M. Clinical grade expansion of MSCs. Immunol Lett. 2015;168(2):222–7.
- Gutkowska J, Jankowski M. Oxytocin revisited: its role in cardiovascular regulation. J Neuroendocrinol. 2012;24(4):599–608.
- Kim YS, Kwon JS, Hong MH, Kang WS, Jeong HY, Kang HJ, Jeong M, Ahn Y. Restoration of angiogenic capacity of diabetes-insulted mesenchymal stem cells by oxytocin. BMC Cell Biol. 2013;14:38.
- Jafarzadeh N, Javeri A, Khaleghi M, Taha MF. Oxytocin improves proliferation and neural differentiation of adipose tissue-derived stem cells. Neurosci Lett. 2014;564:105–10.
- Noiseux N, Borie M, Desnoyers A, Menaouar A, Stevens LM, Mansour S, Danalache BA, Roy DC, Jankowski M, Gutkowska J. Preconditioning of stem cells by oxytocin to improve their therapeutic potential. Endocrinology. 2012;153(11):5361–72.
- Malek A, Blann E, Mattison DR. Human placental transport of oxytocin. J Matern Fetal Med. 1996;5(5):245–55.
- Escudero C, Roberts JM, Myatt L, Feoktistov I. Impaired adenosine-mediated angiogenesis in preeclampsia: potential implications for fetal programming. Front Pharmacol. 2014;5:134.
- Tie K, Tan Y, Deng Y, Li J, Ni Q, Magdalou J, Chen L, Wang H. Prenatal nicotine exposure induces poor articular cartilage quality in female adult offspring fed a high-fat diet and the intrauterine programming mechanisms. Reprod Toxicol. 2016;60:11–20.
- Ying X, Zhang W, Cheng S, Nie P, Cheng X, Shen Y, Wang W, Xue E, Chen Q, Kou D, et al. Nicotine-induced chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells in vitro. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2012;20(11):2329–36.
- Roux C, Pisani DF, Yahia HB, Djedaini M, Beranger GE, Chambard JC, Ambrosetti D, Michiels JF, Breuil V, Ailhaud G, et al. Chondrogenic potential of stem cells derived from adipose tissue: a powerful pharmacological tool. Biochem Biophys Res Commun. 2013;440(4):786–91.

Avercenc-Léger et al. Stem Cell Research & Therapy (2017) 8:161

- Zeng HL, Qin YL, Chen HZ, Bu QQ, Li Y, Zhong Q, Han XA, Chen J, Yu PX, Liu GX. Effects of nicotine on proliferation and survival in human umbilical cord mesenchymal stem cells. J Biochem Mol Toxicol. 2014; 28(4):181–9.
- Lefy, Kor A., Sasillais A, Beaupied H, Breuil V, Wagner N, Scheideler M, Zaragosi LE, Massiera F, Lemichez E, Trajanoski Z, et al. Oxytocin controls differentiation of human mesenchymal stem cells and reverses osteoporosis. Stem Cells. 2008;26(9):2399–407.
- Leuner B, Caponti JM, Gould E. Oxytocin stimulates adult neurogenesis even under conditions of stress and elevated glucocorticoids. Hippocampus. 2012;22(4):861–8.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at www.biomedcentral.com/submit



II. Détermination des conditions optimales mimant un contexte inflammatoire *in vitro*

Suite à leur activation, les lymphocytes T sécrètent des cytokines stimulantes. Ces cytokines sont principalement l'IFN- γ , l'IL-1 α , l'IL-1 β et le TNF- α . Dans le cadre de mises en situation in vitro, différents protocoles de stimulation sont décrits dans la littérature. Selon l'International Society for Cellular Therapy, l'IFN- γ seul suffit à stimuler les CSM et peut servir à induire un phénotype fonctionnel (11), cependant, cet effet est amplifié par le TNF-α. In vitro notamment, la suppression de la prolifération des lymphocytes T est plus importante lorsque les CSM sont « primées » avec de l'IFN-y seul ou associé à du TNF-a (170–172). Des dosages de l'ordre de 10ng/mL d'IFN- γ et 15 ng/mL de TNF- α pendant 12 à 48h semblent adéquats pour activer les CSM (83,84,85). Différentes équipes ont montré des effets délétères de ces stimulations sur les CSM. En particulier, Liu et al. ont testé différentes doses d'IFN- γ et de TNF- α (de 10 à 200 ng/mL) et étudié la viabilité et l'apoptose cellulaire (173). Leurs résultats montrent une diminution du nombre de cellules vivantes après traitement avec une action synergique de l'IFN- γ et du TNF- α qui agiraient par la voie du Fas ligand. Li et al. ont travaillé sur des CSM-GW avec des doses d'IFN-y à 50ng/mL et de TNF-α de 5 à 20 ng/mL. Leurs résultats montrent une augmentation d'IL-6 et une diminution de la viabilité cellulaire lorsque les doses de TNF- α augmentent (174). Une troisième étude montre que le dosage d'IFN-γ et de TNF-α à 20 ng/mL permet d'augmenter la capacité des CSM de placenta à induire la différenciation de populations Treg et augmentent l'expression de PD-L2 par les CSM (175). Une étude récente de Leijs et al. montre l'effet d'une stimulation de CSM-MO en biomatériaux d'alginate pendant 24h avec 50 ng/mL d'IFN- γ et 50 ng/mL de TNF- α (176). Les résultats d'analyses par PCR indiquent une augmentation de l'expression des molécules d'IL-6 et IDO, une diminution du TGF-β et une absence de variation de VEGF. Cependant, aucune analyse n'est effectuée sur les surnageants de culture.

Dans le but d'une implantation *in vivo*, la culture des CSM-GW a été réalisée dans un biomatériau d'alginate/acide hyaluronique dont les propriétés mécaniques et supportrices de la différenciation ont été démontrées dans les travaux précédents de l'équipe (132). Cette culture a été réalisée sans apport de facteurs de croissance, afin de respecter les bonnes pratiques de laboratoire pour un usage clinique. Pour valider une méthode de culture en situation allogénique, les cellules ensemencées en biomatériaux ont été stimulées avec

différentes doses d'IFN- γ et de TNF- α de manière séparée ou combinée. La différenciation chondrocytaire a été validée à la lumière des travaux précédents de l'équipe. Cette étude s'est particulièrement focalisée sur l'impact des cytokines inflammatoires sur les cellules. Il était donc nécessaire de tester (i) si l'IFN- γ et/ou le TNF- α étaient en mesure de stimuler les CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA, (ii) le dosage le plus efficace au regard de la viabilité cellulaire et de la sécrétion de cytokines et (iii) si ce dosage pouvait avoir une influence sur la qualité de la différenciation chondrocytaire.

A. Différenciation chondrocytaire

La différenciation chondrocytaire des CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA sans apport de facteurs de croissance a été démontrée par Reppel *et al.* (132). Cette étude réalisée par notre équipe et à laquelle j'ai contribué reposait sur la fabrication des hydrogels d'Alg/HA par pulvérisation. Des analyses par cytométrie en flux, biologie moléculaire, histologie, immunofluorescence et immunohistochimie, ont montré que les CSM-GW sont capables d'initier une différenciation chondrocytaire en 28 jours. Brièvement, cette étude montre une diminution significative des marqueurs mésenchymateux par rapport aux CSM avant différenciation ainsi qu'une augmentation de l'expression relative des gènes Sox9, COMP, agrécanes et collagène 2 total (**Figure 28**). De plus, les analyses en microscopie montrent une synthèse matricielle péricellulaire et la présence, à J₂₈ de la différenciation, de collagènes de type I et II, tandis que le collagène de type X est plus faiblement exprimé. Ces résultats sont en accord avec les analyses par cytométrie en flux et biologie moléculaire.

Sur la base de ces travaux, la différenciation chondrocytaire a été menée dans les mêmes conditions à l'exception de la formation du biomatériau qui n'a pas été réalisée par pulvérisation mais par la formation de billes d'Alg/HA ensemencées avec des CSM-GW. La densité cellulaire à l'ensemencement est identique pour les deux techniques.



Figure 28 : Mise en évidence de la différenciation chondrocytaire des CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA (adapté de Reppel et al. 2015)

A : Immunophénotypage par cytométrie en flux avant et après mise en biomatériaux montrant l'évolution de l'expression des marqueurs mésenchymateux pendant la différenciation chondrocytaire. Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type, $N \ge 3$, *: $p \le 0.05$ **: $p \le 0.01$; ***: $p \le 0.001$ par rapport au résultat en monocouche. B : Expression relative des gènes spécifique du cartilage évaluée par RT-PCR pendant 28 jours de différenciation chondrocytaire. Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type, $N \ge 3$, **: $p \le 0.01$ par rapport au résultat à J₃. COMP : cartilage oligo-matrix protein, COL : collagène.

C: Synthèse matricielle à J_{28} de la différenciation chondrocytaire par immunofluorescence et immunohistochimie. Echelle = 100 µm.

a. Sans stimulation

i. Histologie

La différenciation chondrocytaire a été validée par histologie grâce à des colorations à l'HES, au bleu Alcian et au rouge Sirius. Ces colorations marquent respectivement les cellules et leurs organites, la présence de protéoglycannes et les collagènes. La **figure 29** présente des images de coupes colorées de billes d'Alg/HA ensemencées en CSM-GW à J₃₀ de la différenciation chondrocytaire. Les images montrent, en coloration HES, la présence de cellules vivantes et de vacuoles péricellulaires dans les billes de biomatériaux, ainsi que la synthèse de protéoglycannes – coloration au bleu Alcian – et de collagènes – coloration au rouge Sirius – en périphérie des cellules.



Figure 29 : Mise en évidence de la différenciation chondrocytaire en histologie

La différenciation chondrocytaire des CSM-GW ensemencées en biomatériaux d'Alg/HA et non stimulées à l'IFN- γ et au TNF- α a été mise en évidence à J₃₀ en histologie par des colorations à l'HES, au bleu Alcian et au rouge Sirius. Les images montrent une sécrétion matricielle péricellulaire en faveur de la différenciation chondrocytaire. N=3, seule une expérimentation est montrée ici ; objectif x40 ; échelle = 100 µm.

ii. Cytométrie en flux

La différenciation chondrocytaire a également été validée en cytométrie en flux par marquage des collagènes I et II. Le collagène I est sécrété par les CSM-GW non différenciées tandis que le collagène II est sécrété par les CSM du stade de chondroprogéniteur jusqu'au stade du chondrocyte. Dans notre travail, les CSM-GW en début de différenciation chondrocytaire en biomatériaux d'Alg/HA ainsi qu'à J₃₀ ont été marquées par des anticorps anti-collagènes I et II et analysées en cytométrie en flux. Les résultats sont montrés en ratio d'intensité moyenne de fluorescence sur la **figure 30**. On peut observer une diminution de l'expression du collagène I par les CSM-GW entre J₉ et J₃₀ de la différenciation chondrocytaire (33,5 ± 4,5 *vs* 20,5 ± 1,2). A l'inverse, les CSM- GW à J_{30} semblent exprimer plus de collagène de type II qu'à J_9 (16,1 ± 2 vs 12,45 ± 0,45) ; cependant, cette différence n'est pas significative.



Figure 30 : Expression des collagènes de type I et II par les CSM-GW à J_9 et J_{30} de la différenciation chondrocytaire Les cellules ensemencées en biomatériaux d'Alg/HA ont été isolées et analysées par cytométrie en flux à J_9 et J_{30} de la différenciation. Les résultats montrent que les cellules expriment moins de collagène de type I à J_{30} par rapport à J_9 , tandis que l'expression de collagène II semble augmenter. Toutefois, ces différences ne sont pas statistiquement significatives. Les résultats sont exprimés en ratio d'intensité moyenne de fluorescence pour chacun des marqueurs, N=3.

b. Avec stimulation

L'IFN- γ et le TNF- α ont été utilisés pour stimuler les cellules, seuls, à des doses comprises entre 0 et 100ng/mL, ou en double stimulation, à des doses comprises entre 0 et 30 ng/mL. Chaque stimulation a été effectuée pendant 48h à différents temps de la différenciation (J7, J14 et J28). L'impact des stimulations à l'IFN- γ et/ou au TNF- α sur la différenciation chondrocytaire a été évalué en histologie par des colorations à l'HES, au bleu Alcian et au rouge Sirius. Toutes les conditions de stimulation ont été testées, sans qu'aucune différence ne soit observable au niveau de la morphologie des cellules ou de leur synthèse matricielle (**Figures 31, 32 et 33**).





L'impact des différentes doses de stimulations à l'IFN- γ et au TNF- α sur le comportement des CSM-GW ensemencées en biomatériaux d'Alg/HA a été évalué à J₃₀ en histologie par coloration à l'HES. Les images ne semblent pas montrer de différences entre les cellules non stimulées et les stimulations à l'IFN- γ et au TNF- α , quelles que soient les doses utilisées. N=3, seule une expérimentation est présentée ici ; objectif x40 ; échelle = 100 µm.



Figure 32 : Comparaison histologique de l'impact des stimulations sur la différenciation chondrocytaire - coloration au bleu Alcian

L'impact des différentes doses de stimulations à l'IFN- γ et au TNF- α sur le comportement des CSM-GW ensemencées en biomatériaux d'Alg/HA a été évalué à J₃₀ en histologie par coloration au bleu Alcian. Les images ne semblent pas montrer de différences entre les cellules non stimulées et les stimulations à l'IFN- γ et au TNF- α , quelles que soient les doses utilisées.

N=3, seule une expérimentation est présentée ici ; objectif x40 ; échelle = 100 μ m.



Figure 33 : Comparaison histologique de l'impact des stimulations sur la différenciation chondrocytaire - coloration au rouge Sirius

L'impact des différentes doses de stimulations à l'IFN- γ et au TNF- α sur le comportement des CSM-GW ensemencées en biomatériaux d'Alg/HA a été évalué à J₃₀ en histologie par coloration au rouge Sirius. Les images ne semblent pas montrer de différences entre les cellules non stimulées et les stimulations à l'IFN- γ et au TNF- α , quelles que soient les doses utilisées.

N=3, seule une expérimentation est présentée ici ; objectif x40 ; échelle = 100 μ m.

B. Viabilité

La viabilité des cellules a été évaluée par cytométrie en flux à l'aide d'un test de viabilité, apoptose, nécrose. Les viabilités retrouvées pour les stimulations simples n'ont montré aucune différence entre les dosages et les temps de stimulation (résultats non montrés). Les viabilités obtenues en double stimulation sont montrées par la **figure 34**. A J9, la double stimulation semble diminuer la viabilité cellulaire par rapport au contrôle non stimulé et à la stimulation simple ; cependant, cet effet n'est significatif que pour la stimulation au dosage d'IFN- $\gamma = 20$ ng/mL (p < 0,05). Aux autres temps, l'ajout d'IFN- γ et/ou de TNF- α ne semble pas avoir d'impact sur la viabilité des CSM-GW par rapport aux cellules non stimulées. Les résultats montrent également une augmentation significative de la viabilité des cellules stimulées à l'IFN- γ + TNF- α au cours du temps entre le J9 et le J₃₀ (p^{IFN10} < 0,05 ; p^{IFN20} < 0,001 ; p^{IFN30} < 0,01). Lors de la stimulation simple, cet effet est significatif entre J₁₆ et J₃₀ (p < 0,05). Concernant l'apoptose et la nécrose, les cellules mortes étaient très majoritairement en apoptose à J9 et J₁₆, tandis qu'à J₃₀, la quantité de cellules nécrotiques était équivalente à celle des cellules en apoptose (résultats non montrés).



Figure 34 : Viabilité cellulaire en fonction du temps et de la stimulation Les cellules en biomatériaux d'Alg/HA ont été stimulées par différentes doses d'IFN- γ et de TNF- α à différents temps de la différenciation chondrocytaire. L'impact de cette stimulation sur la viabilité cellulaire a été évalué par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés en moyenne + écart type. A Jo, la viabilité est diminuée de manière non significative en double stimulation par rapport aux cellules non stimulées. Cet effet n'est plus retrouvé lors des temps suivants. Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type, N=3, *: $p \le 0.05$ **: $p \le 0.01$; *** : $p \le 0.001$; IFN = Interféron- γ ; TNF = Tumor Necrosis Factor- α

C. Sécrétion de facteurs solubles

La sécrétion de facteurs solubles par les CSM-GW durant la différenciation, avec ou sans stimulation, a été évaluée par ELISA à la recherche des cytokines IL-6, IL-10, TGF- β , des facteurs de croissance HGF et VEGF et du facteur soluble PGE-2. Les sécrétions d'IL-10 et HGF des CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA sont en dessous du seuil de détection des tests ELISA utilisés, même avec les échantillons purs. Cependant, des tests effectués au laboratoire par une méthode en cytométrie en flux ont permis de quantifier ces sécrétions et ces résultats seront montrés dans la partie suivante.

La sécrétion d'IL-6 (**Figure 35**) par les CSM non stimulées ne varie pas au cours du temps. La monostimulation n'induit pas de réponse des cellules au contraire de la stimulation double qui provoque une augmentation la sécrétion à J₉ (valeurs stimulées 9 fois plus importantes que sans stimulation). Cet effet tend à diminuer au cours de la différenciation et est significatif à J₃₀ (moyennes des stimulations : J₉ = 7 808 ± 1 830 pg/mL ; J₁₆ = 5 404 ± 1 133 pg/mL ; J₃₀ = 2 019 ± 550 pg/mL).



Figure 35 : Influence des différentes stimulations sur la sécrétion d'IL-6 par les CSM-GW en cours de différenciation Après ensemencement des CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA sous forme de billes, les cellules ont été stimulées avec différentes doses d'IFN- γ et TNF- α à différents temps de la différenciation. Après 48h de stimulation, les surnageants de culture ont été prélevés et analysés par test ELISA. Les résultats montrent une augmentation de la sécrétion d'IL-6 lors de la double stimulation par rapport à la stimulation simple, ainsi qu'une diminution de la sécrétion d'IL-6 au cours du temps, quelles que soient les doses d'IFN- γ combiné au TNF- α utilisées. Les résultats sont exprimés en moyenne et écarttype, N=3, * $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$, *** $p \le 0.001$. NS = non stimulé ; IL-6 = Interleukine 6 ; IFN = Interféron- γ ; TNF = Tumor Necrosis Factor- α .

La sécrétion de TGF- β (**Figure 36**) par les CSM non stimulées ne varie pas de manière significative au cours du temps (1 269 ± 44,3 pg/mL). Les monostimulations semblent induire une baisse de la sécrétion de TGF- β sans interférence du temps de différenciation. En revanche, la double stimulation ne provoque pas de variation significative (moyennes des stimulations : J₉ = 1 216 ± 45,4 pg/mL ; J₁₆ = 950 ± 35 pg/mL ; J₃₀ = 921 ± 77,2 pg/mL).



Figure 36 : Influence des différentes stimulations sur la sécrétion de TGF- β par les CSM-GW en cours de différenciation

Après ensemencement des CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA sous forme de billes, les cellules ont été stimulées avec différentes doses d'IFN- γ et TNF- α à différents temps de la différenciation. Après 48h de stimulation, les surnageants de culture ont été prélevés et analysés par test ELISA. Les résultats ne montrent pas de bénéfices de la stimulation sur la sécrétion de de TGF- β au cours du temps, quelles que soient les doses d'IFN- γ combiné au TNF- α utilisées. Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type, N=3, * $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$, *** $p \le 0.001$. NS = non stimulé ; IFN = Interféron- γ ; TNF = Tumor Necrosis Factor- α .

La sécrétion de PGE-2 (**Figure 37**) par les CSM non stimulées ne varie pas significativement au cours du temps (776 ± 61,1 pg/mL). La monostimulation au TNF- α induit une augmentation statistiquement significative à J₉ (3 587 ± 325 pg/mL) et J₁₆ (2 827 ± 105 pg/mL). Cet effet n'est plus visible à J₃₀ (674 ± 70,8 pg/mL). La monostimulation à l'IFN- γ n'induit pas de réponse des cellules quel que soit le temps de différenciation. De même que pour la stimulation au TNF- α seul, la double stimulation induit une augmentation de la sécrétion de PGE-2 diminuant au cours du temps de différenciation, mais dans une proportion moindre (moyennes des stimulations à J₉ : monostimulation TNF- α = 3 587 ± 325 pg/mL ; double stimulation = 2 302 ± 56,7 pg/mL).



Figure 37 : Influence des différentes stimulations sur la sécrétion de PGE-2 par les CSM-GW en cours de différenciation

Après ensemencement des CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA sous forme de billes, les cellules ont été stimulées avec différentes doses d'IFN- γ et TNF- α à différents temps de la différenciation. Après 48h de stimulation, les surnageants de culture ont été prélevés et analysés par test ELISA. Les résultats montrent une augmentation de la sécrétion de PGE-2 plus importante en stimulation au TNF seul. Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type, N=3, * $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$, *** $p \le 0.001$. NS = non stimulé ; IFN = Interféron- γ ; TNF = Tumor Necrosis Factor- α .

La sécrétion de VEGF (**Figure 38**) par les CSM non stimulées diminue au cours du temps ($J_9 = 2.711 \pm 167 \text{ pg/mL}$; $J_{16} = 1.027 \pm 337 \text{ pg/mL}$; $J_{30} = 685 \pm 502 \text{ pg/mL}$) et ce, dès J₁₆, de manière significative (p < 0,05). La monostimulation comme la double stimulation induisent une chute de la sécrétion de VEGF par les CSM-GW à J₉ de la différenciation chondrocytaire. En monostimulation, cet effet est retrouvé jusqu'à la fin de la différenciation chondrocytaire alors qu'il semble s'inverser à J₃₀ en double stimulation. Toutefois, les écarts-types des résultats sont élevés, indiquant une forte disparité des capacités sécrétoires des souches testées.



Figure 38 : Influence des différentes stimulations sur la sécrétion de VEGF par les CSM-GW en cours de différenciation

Après ensemencement des CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA sous forme de billes, les cellules ont été stimulées avec différentes doses d'IFN- γ et TNF- α à différents temps de la différenciation. Après 48h de stimulation, les surnageants de culture ont été prélevés et analysés par test ELISA. Les résultats montrent que la sécrétion de VEGF des CSM-GW non stimulées diminue au cours du temps de même qu'avec une stimulation à l'IFN- γ et/ou au TNF- α . Cet effet est particulièrement visible à J₂. Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type, N=3, * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01. NS = non stimulé ; IFN = Interféron- γ ; TNF = Tumor Necrosis Factor- α .

D. Discussion

La validation de la méthode de culture en situation inflammatoire a été réalisée, sur les cellules ensemencées en biomatériaux, après stimulation par différentes doses d'IFN-y et de TNF-a de manière séparée ou combinée. Trois critères ont été évalués, la viabilité cellulaire, la sécrétion des principaux effecteurs de l'immunomodulation médiée par les CSM et la différenciation chondrocytaire. La viabilité cellulaire n'est pas affectée par la stimulation à l'IFN- γ /TNF- α , double ou simple, sauf à J₉ de la différenciation chondrocytaire en stimulation double où elle diminue de moitié. La sécrétion de cytokines par les CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA non stimulées varie peu au cours du temps sauf pour le VEGF qui diminue. La stimulation par IFN- γ /TNF- α provoque une franche augmentation de la sécrétion de PGE-2 et IL-6 à J₉, bien que la sécrétion de PGE-2 soit encore supérieure en stimulation simple au TNF- α . Cependant, cet impact de la stimulation sur la production d'IL-6 et de PGE-2 diminue au cours de la différenciation chondrocytaire. La sécrétion de TGF- β ne montre aucune variation, que ce soit au cours du temps ou selon les stimulations utilisées. La sécrétion de VEGF quant à elle est diminuée d'environ 2,5 fois à J₉ de la différenciation chondrocytaire, en stimulation simple et double. Cet effet diminue au cours de la différenciation et n'est plus visible à J₃₀. La différenciation chondrocytaire n'est pas modifiée par les stimulations.

L'induction de la différenciation chondrocytaire est démontrée par différentes flux. biologie méthodes : cvtométrie en moléculaire. immunofluorescence, immunohistochimie et histologie. Elle est réalisée sans apport de facteurs de croissance afin que le procédé soit aisément transposable dans des conditions de grade clinique. L'hydrogel d'alginate utilisé est un polysaccharide naturel biocompatible qui créé une microstructure poreuse. Cet environnement est viable pour les cellules et représente une matrice 3D propice à la différenciation chondrocytaire (177). L'expression des marqueurs mésenchymateux avant et après la mise en biomatériaux d'Alg/HA a été détectée par cytométrie en flux. Le marqueur CD73 a un rôle régulateur de contrôle de la différenciation chondrocytaire via des mécanismes impliquant l'adénosine (178). Le CD105, une molécule d'adhésion et un composant du récepteur au TGF- β (179), est également un marqueur du potentiel chondrogénique des cellules (180). Nos résultats montrent une très haute expression des marqueurs mésenchymateux CD73, CD90 et CD105 par les CSM-GW en monocouche, ce qui est en faveur d'un bon potentiel de différenciation chondrocytaire. Lors de la différenciation, le marqueur CD73 reste élevé tandis que CD90 et 105 diminuent. En parallèle, l'expression du collagène de type I a tendance à baisser au cours de la différenciation. Le collagène de type I, largement présent dans la matrice ombilicale, est sécrété par les CSM, mais également par les cellules engagées dans la différenciation chondrogénique (181). Ces résultats sont concordants avec plusieurs études sur les CSM d'origine diverses (178,180,182,183) et montrent une perte du caractère indifférencié des CSM-GW - diminution de CD90, CD105 et coll I - ainsi qu'une orientation vers la voie chondrocytaire - maintien de l'expression de CD73. Cet engagement vers la voie chondrocytaire a été confirmé par les analyses de biologie moléculaire réalisées en amont dans une étude de Reppel et al (132). En effet, l'expression du facteur de transcription Sox9, spécifique de la chondrogenèse, est fortement augmentée entre J₃ et J₂₈ de la culture en biomatériaux d'Alg/HA (p < 0.01). La synthèse matricielle des CSM-GW en cours de différenciation y est également démontrée par biologie moléculaire et en microscopie. La matrice du cartilage hyalin est composée de plusieurs molécules spécifiques assurant un maillage dont le rôle est de garantir les propriétés fonctionnelles et la résistance du tissu. Les principales molécules composant cette matrice ont été recherchées dans l'étude de Reppel et al.: COMP, agrécanes et collagène II total. Les résultats montrent une augmentation statistiquement significative des transcrits relatifs au cartilage. Ces résultats sont cohérents avec d'autres études menées sur des CSM différenciées avec apport de facteurs de croissance (184,185), bien que dans nos conditions de culture, la différenciation chondrogénique soit guidée par la nature du biomatériau et non par apport de facteurs de croissance. Les contrôles de synthèse de collagène de type X en immunofluorescence et immunohistochimie valident la méthode de différenciation en montrant que les CSM-GW différenciées ne sont pas au stade trop avancé du chondrocyte hypertrophique. L'impact de la stimulation par IFN- γ /TNF- α sur la différenciation chondrocytaire des CSM est très peu décrit dans la littérature. Nos résultats en histologie ne montrent pas de différence significative sur la synthèse matricielle des CSM-GW en cours de différenciation, quelles que soient les doses d'IFN- γ et de TNF- α utilisées. En revanche, une étude menée chez le cheval fait état d'une diminution de l'expression de Sox9, du collagène de type II et des agrécanes par les CSM de liquide synovial en présence d'IFN- γ ou de TNF- α (186). Audelà de la différence d'espèce, les conditions de stimulation des cellules sont très différentes de celles utilisées dans notre travail, puisque les cellules étaient stimulées par 100 ng/mL d'IFN- γ ou 10 ng/mL TNF- α , tout au long de la différenciation. Il est probable
que le temps de stimulation de 48h soit court en regard du temps de différenciation -9, 14 ou 28 jours – et ne permette pas d'impacter négativement la synthèse matricielle.

Plusieurs études ont évalué la viabilité des CSM-GW en biomatériaux d'alginate. Si les procédés sont sensiblement différents, les conclusions sont unanimes sur la qualité de l'alginate pour garantir la viabilité cellulaire (187–190). Dans nos conditions de culture, la viabilité cellulaire est diminuée à J₉, principalement du fait de la technique de mise en biomatériaux des cellules. En effet, d'autres résultats montrent que la viabilité des cellules en biomatériaux d'Alg/HA après stérilisation par autoclave est diminuée à J₃ par rapport à la viabilité en monocouche, avec une amélioration progressive au cours de la différenciation (130). Ces observations ont été retrouvées au sein du laboratoire et publiées dans un récent article comparant le comportement cellules en fonction de la méthode de stérilisation de l'Alg/HA (121). Elles peuvent également être expliquées par les traitements subis par les cellules : trypsine, formation des hydrogels, polymérisation en bain de calcium. La méthode de formation des hydrogels d'Alg/HA impacte la viabilité cellulaire, comme nous l'avons montré dans notre étude publiée en 2015. Il existe une différence de viabilité des CSM-MO entre la méthode en spray et la méthode des billes, au bénéfice de la méthode de formation d'hydrogels en billes (132). Au-delà de la viabilité cellulaire au sein du biomatériau, notre hypothèse était d'élucider l'impact de la stimulation par IFN- γ /TNF- α sur les cellules encapsulées. A l'exception de J₉ en stimulation à l'IFN- γ au dosage de 20 ng/mL avec différentes doses de TNF-α, les doses utilisées ne modifient pas la viabilité cellulaire de manière significative par rapport au contrôle non stimulé de chaque temps. Les seules différences visibles concernent des temps différents, alors que nous venons de montrer que la viabilité des cellules augmente au cours de la différenciation. Cette variation ne peut donc pas être attribuée à la seule stimulation à l'IFN- γ /TNF- α . Cependant, certaines études montrent une baisse de la viabilité des CSM lors d'une stimulation avec ces cytokines pro-inflammatoires (173-175). Si les doses utilisées sont proches, ces études résultent de la stimulation des cellules en monocouche, tandis que nous avons utilisé des billes d'Alg/HA qui peuvent avoir diminué la quantité de cytokines effectivement en contact des cellules.

Les CSM sécrètent des facteurs solubles qui leur permettent d'interagir avec le système immunitaire. Bien que réalisées, les analyses de la sécrétion d'HGF par les CSM-GW n'ont malheureusement pas conduit à des résultats interprétables. La technique ELISA que nous

avons utilisée pour l'IL-10 n'a pas permis sa quantification au cours de la culture en billes d'Alg/HA pour chacune des stimulations testées, en raison d'une sécrétion hors gamme inférieure, même avec une utilisation des surnageants de culture purs. D'autres tests ont permis de détecter cette interleukine en CMF, et confirment qu'elle est sécrétée en quantité faible. Ces résultats seront montrés et discutés dans la partie suivante. La sécrétion d'IL-6 est fortement augmentée par la stimulation double et cet effet est visible jusqu'à J₁₆ de la différenciation. Ce profil sécrétoire est également retrouvé pour la PGE-2. Bien que la stimulation simple au TNF- α soit suffisante pour induire la sécrétion de PGE-2, la double stimulation IFN- γ /TNF- α est particulièrement efficace pour stimuler la sécrétion combinée d'IL-6 et de PGE-2. Ces deux cytokines ont un rôle fondamental dans l'immunomodulation médiée par les CSM-GW (191); en effet, l'IL-6 empêche la maturation des cellules dendritiques et par conséquent le priming des lymphocytes T naïfs (78,192), tandis que la PGE-2 provoque la sécrétion d'IL-10 par les macrophages (86) tout en inhibant la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T (193). La sécrétion de TGF- β ne varie ni au cours du temps de différenciation, ni selon la stimulation. Seule la stimulation à l'IFN- γ à J₉ est réduite par rapport au contrôle. Le TGF-β interagit avec les cellules immunitaires et particulièrement les lymphocytes T et les cellules dendritiques. Les lymphocytes T prolifèrent moins et ne sécrètent plus d'IFN-y. En parallèle, les cellules dendritiques expriment moins de molécules de costimulation et de CMH de classe II, tout en sécrétant moins de TNF-α, ce qui diminue également leurs possibilités d'activer les lymphocytes T (194). Le TGF-B favorise également l'émergence et la survie des lymphocytes T régulateurs (195). Selon les études, les doses immunologiquement actives de TGF-β varient entre 100 et 10 000 pg/mL (196–198). Bien que non modifiée par l'IFN- γ /TNF- α , la sécrétion de TGF- β dans nos échantillons se situe entre 157 et 2 428 pg/mL avec une médiane à 1 011 pg/mL, ce qui semble suffisant pour agir sur les cellules immunitaires. La sécrétion de VEGF est largement diminuée par la stimulation par IFN- γ /TNF- α , en stimulation simple ou double. Nous n'avons pas trouvé d'autres études confirmant ce résultat, la sécrétion de VEGF étant rarement quantifiée, particulièrement lors d'une différenciation des CSM ou bien d'une stimulation de celles-ci par IFN-γ/TNF-α. Le VEGF a démontré dans plusieurs études ses capacités de réparation tissulaire et de modulation de l'inflammation (176,199-201). En revanche, Marsano et al. montrent que le blocage de sa sécrétion par des CSM-MO en culture en pellets induit une différenciation chondrocytaire spontanée améliorée (202). De plus, la constitution d'une MEC par les chondrocytes induit un environnement antiangiogénique (104,105). Cet impact de la stimulation par IFN- γ /TNF- α pourrait en définitive être bénéfique pour la différenciation chondrocytaire des CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA. De même, la diminution de l'expression basale de VEGF pourrait être un contrôle de la différenciation chondrocytaire des CSM-GW, d'autant plus que ce facteur de croissance est exprimé par les chondrocytes hypertrophiques (203). En conclusion, la stimulation par IFN- γ /TNF- α est possible sur les CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA et permet l'induction d'une sécrétion cytokinique variée favorable aux propriétés immunomodulatrices des CSM-GW, ainsi que de leur différenciation chondrocytaire.

La littérature fait état de l'utilisation de plusieurs profils de stimulation des CSM par des cytokines pro-inflammatoires, que ce soit pour une stimulation *in vitro* ou bien pour « primer » les CSM avant contact avec des cellules immunitaires. Si l'IFN-y devrait suffire à cette stimulation, nous pouvons constater que la plupart des équipes choisissent d'utiliser une cytokine supplémentaire – parfois l'IL-1 β , beaucoup plus souvent le TNF- α . Les dosages utilisés varient en général entre 10 et 50 ng/mL, pendant 12 à 48h. Nous avons choisi de tester un panel de profils de sécrétion à l'IFN- γ et au TNF- α pendant 48h, à différents temps de la différenciation chondrocytaire. Dans le but d'une production de CSM-GW selon les bonnes pratiques de laboratoires pour les préparations à usage clinique, l'ISCT a dressé une liste de critères permettant de comparer les propriétés immunitaires des CSM (12). Dans ce cadre, notre étude permet de connaitre les conditions de priming des CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA et en conditions de différenciation chondrocytaire. Nos résultats montrent l'intérêt de la double stimulation qui est indiscutable au regard du panel de sécrétion cytokinique qu'elle engendre et n'est délétère ni pour la viabilité cellulaire, ni pour la différenciation chondrocytaire. Cependant, il n'existe pas de différence évidente entre les différentes combinaisons de doses de ces 2 cytokines. Une équipe avec laquelle nous avons travaillé et publié un article a testé le comportement de CSM adultes (MO et tissu adipeux) avec une stimulation par IFN-y/TNFα de 20 et 30 ng/mL (204). Afin de pouvoir comparer nos résultats sur les CSM-GW à ceux obtenus par cette équipe avec les CSM-adultes, nous avons finalement choisi d'utiliser ce même profil de stimulation.

III. Evaluation des propriétés immunomodulatrices des CSM-GW au cours de la différenciation chondrocytaire

La suite de ce travail analyse les propriétés des CSM-GW durant la différenciation chondrocytaire avec et sans stimulation à 20 ng/mL d'IFN- γ et 30 ng/mL de TNF- α , ou bien en situation allogénique.

A. Caractérisation des CSM-GW pendant la différenciation chondrocytaire : phénotype et profil sécrétoire

a. HLA-DR et marqueurs de costimulation

L'expression d'HLA-DR par les cellules non stimulées au cours du temps est inférieure à 1,5%. Avec stimulation, à J_9 , $6 \pm 3\%$ des cellules expriment HLA-DR, tandis qu'à J_{30} , ce pourcentage est de $3.4 \pm 1.1\%$. Cependant, quels que soient le temps et la stimulation, le ratio d'intensité moyenne de fluorescence reste inférieur à 1,47 (Figure 39 - **Tableau 20**). CD80 est exprimé au maximum à J_0 par 2,7 ± 0,7% des cellules, avec un ratio d'intensité moyenne de fluorescence de 1,97. CD86 est exprimé à J₀ par $1.6 \pm 0.3\%$ des cellules. A J₉ de la différenciation chondrocytaire, les cellules expriment CD86, avec ou sans stimulation à l'IFN- γ /TNF- α , à plus de 24% (CD86-J₉^{Non Stimulé} = 30,4 ± 9,38 %, CD86-J₉^{Stimulé} = 24,3 \pm 5,97 %). A J₃₀, cette expression diminue (CD86-J₃₀^{Non Stimulé} = 5,8 \pm 3,2 %, CD86-J₃₀^{Stimulé} = 7,3 \pm 4,9 %). La différence d'expression de CD86 entre les cellules stimulées ou non à J₉ n'est pas significative (p > 0.05); en revanche, les différences d'expression entre J_0 et J_9 pour les cellules non stimulées, ainsi qu'entre J_9 et J_{30} pour les cellules stimulées ou non sont statistiquement significatives (p < 0.05). Toutefois, les ratios d'intensité moyenne de fluorescence restent faibles voire négatifs selon un seuil de positivité à 2 (Tableau 20). Lors de l'expansion en monocouche, 21 ± 11.8 % des CSM-GW non stimulées expriment CD40 - Figure 39. En biomatériaux d'Alg/HA sans stimulation, cette proportion diminue dès J₉ (CD40-J₉^{Non Stimulé} = $3,6 \pm 0,8$ et CD40-J₃₀^{Non} Stimulé = 1,4 \pm 0,3). En revanche, la stimulation par IFN- γ /TNF- α induit l'expression de CD40 lors de la différenciation chondrocytaire à J₉ comme J₃₀ (CD40-J₉^{Stimulé} = 17.5 ± 8.71 %, CD40-J₃₀^{Stimulé} = 14,8 \pm 6,9 %, p > 0.05). Cependant, aucune différence de l'expression de CD40 par les CSM-GW en monocouche ou en cours de différenciation n'est

significative. De plus, les intensités moyennes de fluorescence sont négatives ou proches de 2 (**Tableau 20**).



Figure 39 : Expression d'HLA-DR, CD40 et des molécules de costimulation en fonction du temps et de la stimulation Lors de la différenciation chondrocytaire, les CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA ont été stimulées ou non avec 20 ng/mL d'IFN- γ et 30 ng/mL de TNF- α au début et à la fin de l'induction de la différenciation. En monocouche à confluence, ou en biomatériaux après 48h avec ou sans stimulation, les CSM-GW ont été isolées et analysées par cytométrie en flux. Les résultats montrent que seuls le CD40 et le CD86 sont exprimés par les CSM-GW. Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type du nombre de cellules positives à chacun des marqueurs, N=3, * $p \le 0.05$ par rapport au J₉ de chaque condition. IFN = Interféron- γ ; TNF = Tumor Necrosis Factor- α .

Tableau 20 : Ratio d'intensités moyennes de fluorescence d'HLA-DR et des marqueurs de costimulation par	rapport
au contrôle en fonction du temps et de la stimulation	

NS = Non Stimulé; $S = Stimulé avec 20 ng/mL d'IFN- \gamma et 30 ng/mL de TNF- \alpha$ Les analyses statistiques ont comparé toutes les colonnes entre elles.

	J0	<i>J9 NS</i>	J9 S	J30 NS	J30 S	p
HLA-DR	$1,03 \pm 0,09$	$1,01 \pm 0,03$	$1,47 \pm 0,23$	$1,17 \pm 0,15$	$1,4 \pm 0,28$	> 0,05
<i>CD40</i>	$2,24 \pm 0,56$	$1,33 \pm 0,18$	$2,01 \pm 0,7$	$1,04 \pm 0,14$	$2,06 \pm 0,6$	> 0,05
CD80	$1,79 \pm 0,34$	$1,42 \pm 0,13$	$1,68 \pm 0,28$	$0,92 \pm 0,2$	$1,27 \pm 0,34$	> 0,05
<i>CD86</i>	$1,18 \pm 0,18$	$2,9 \pm 0,47$	$2,95 \pm 0,4$	$1,89 \pm 0,44$	$1,68 \pm 0,39$	> 0,05

b. Molécules immunomodulatrices i. IDO et HLA-G

Les expressions de l'enzyme IDO et d'HLA-G ont été recherchées par cytométrie en flux (Figure 40 – Tableau 21). Si l'enzyme IDO est exprimée par 49,1 ± 11,6 % des CSM-GW cultivées en monocouche, après 9 jours de différenciation chondrocytaire en biomatériaux d'Alg/HA, cette proportion diminue significativement pour atteindre $2.07 \pm$ 0.78 % (p < 0.01). Ces résultats sont confirmés par le ratio d'intensité moyenne de fluorescence (Monocouche = 6.85 ± 1.2 vs CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA < 2). Aucune différence n'est visible en présence de cytokines inflammatoires. Ce profil d'expression est retrouvé avec HLA-G dont différents isoformes ont été recherchés. Deux anticorps ont été utilisés provenant de 2 clones différents, 2A12 marquant les molécules HLA-G solubles, et MEM-G9 marquant les molécules HLA-G membranaires. Les CSM-GW en monocouche expriment les deux types de molécules HLA-G, membranaires et solubles, avec une expression plus importante des isoformes solubles, bien que non significative (HLA-G-monocouche^{Soluble} = $86 \pm 13,5$ % vs HLA-G-monocouche^{Membranaire} = 33.9 ± 15.5 %, p > 0.05). Ce résultat est également confirmé par les intensités moyennes de fluorescence ($16 \pm 7 vs 5, 24 \pm 2, 03, p > 0, 05$). Lors de la différenciation chondrocytaire, les isoformes membranaires ne sont plus détectées (Proportion de cellules positives < 5 % et intensités moyennes de fluorescence < 2). Les isoformes solubles ne sont pas détectées à J₉ de la différenciation chondrocytaire. Cependant, une tendance à l'augmentation de l'expression d'HLA-G soluble semble visible à J₃₀ quelle que soit la stimulation (HLA- G^{Soluble} - $J_{30}^{\text{Non stimulé}} = 13 \pm 11.4 \%$, HLA- G^{Soluble} - $J_{30}^{\text{Stimulé}} = 9.6 \pm 8.32 \%$). Le ratio des intensités moyennes de fluorescence reste, lui, inférieur à 2.



d'IDO d'HLA-G en Figure *40* : Expression et fonction du temps et de la stimulation Lors de la différenciation chondrocytaire, les CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA ont été stimulées ou non avec 20 ng/mL d'IFN-y et 30 ng/mL de TNF- α au début et à la fin de l'induction de la différenciation. En monocouche à confluence, ou en biomatériaux après 48h avec ou sans stimulation, les CSM-GW ont été isolées et analysées par cytométrie en flux. Les résultats montrent qu'IDO n'est exprimé que par les CSM-GW en monocouche. Les molécules HLA-G membranaires et solubles sont exprimées par les CSM-GW en monocouche, mais seul le marqueurs 2A12 est détecté lors de la différenciation chondrocytaire, avec une majoration à J_{30} . Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type du nombre de cellules positives, N=3, $*p \le 0.05$, $**p \le 0.01$, $***p \le 0.001$ par rapport au J_9 de chaque condition. IFN = Interféron- γ ; $TNF = Tumor Necrosis Factor-\alpha$.

Tableau 21 : Ratio d'intensités moyennes de fluorescence d'IDO et HLA- G par rapport au contrôle en fonction du temps et de la stimulation

NS = Non Stimulé; $S = Stimulé avec 20 ng/mL d'IFN- \gamma et 30 ng/mL de TNF- \alpha$ Les analyses statistiques ont comparé toutes les colonnes entre elles.

	J0	J9 NS	J9 S	J30 NS	J30 S	p
IDO	$6,85 \pm 1,2$	$1,2 \pm 0,04$	$1,3 \pm 0,18$	$1,5 \pm 0,31$	$1,46 \pm 0,23$	> 0,05
2A12	16 ± 7	$1,71 \pm 0,16$	$1,4 \pm 0,24$	$1,7 \pm 0,52$	$1,6 \pm 0,48$	> 0,05
MEM-G9	$5,24 \pm 2,03$	$1,81 \pm 0,3$	$1,26 \pm 0,21$	$1,15 \pm 0,07$	$1,08 \pm 0,16$	> 0,05

ii. Facteurs solubles

Nous avons ici fait le choix de confronter les résultats précédents concernant l'IL-6, TGF- β , PGE-2 et VEGF avec la sécrétion des CSM-GW en monocouche. Les cellules ont été stimulées pendant 48h avec 20 ng/mL d'IFN- γ et 30 ng/mL de TNF- α au cours de l'expansion en monocouche puis à J₇, J₁₄ et J₂₈ de la différenciation chondrocytaire. A l'issue de la stimulation, les surnageants de culture ont été prélevés et analysés (**Figure 41**). La sécrétion d'IL-6 est significativement diminuée après ensemencement en biomatériaux d'Alg/HA (IL-6-J₀^{Non Stimulé} = 95 773 ± 13 235 pg/mL *vs* IL-6-J₉^{Non Stimulé} = 629 ± 282 pg/mL, p < 0,001). En revanche, la sécrétion d'IL-6 par les CSM-GW stimulées par IFN- γ /TNF- α est augmentée de 3 à 17 fois en monocouche et jusque J₁₆ de manière significative (p < 0,01).

La sécrétion de TGF- β par les CSM-GW non stimulées, en monocouche ou en biomatériaux d'Alg/HA ne varie pas de manière significative (Moyenne globale = 1 256 ± 64,4 pg/mL). A l'exception du J₉, la stimulation par IFN- γ /TNF- α semble induire une diminution de la sécrétion qui n'est significative qu'à J₃₀. Seules les concentrations de TGF- β sécrété par les CSM-GW stimulées à J₁₆ et J₃₀ sont significativement diminuées par rapport aux cellules en monocouche (p < 0,05).

La sécrétion de PGE-2 est diminuée de manière significative dès J₉ de la différenciation chondrocytaire (p < 0,001). La sécrétion par les CSM-GW en cours de différenciation sans stimulation reste stable au cours du temps (776 ± 33,2 pg/mL), tandis que la stimulation induit une augmentation significative des concentrations de PGE-2 à J₉ (J₉^{Non Stimulé} = 801 ± 58,1 pg/mL vs J₉^{Stimulé} = 2 113 ± 71 pg/mL, p < 0,05). Cet effet semble s'atténuer au cours de la différenciation chondrocytaire.

La sécrétion de VEGF par les CSM-GW non stimulées est augmentée de manière non significative à J₉ de la différenciation chondrocytaire. La stimulation par IFN- γ /TNF- α induit une augmentation de la concentration de VEGF par les CSM-GW en monocouche $(J_0^{\text{Non Stimulé}} = 1\ 881 \pm 433\ \text{pg/mL vs } J_0^{\text{Stimulé}} = 4\ 160 \pm 458\ \text{pg/mL},\ \text{p} < 0,05)$. Cependant, cet effet n'est pas retrouvé lors de la différenciation en biomatériaux d'Alg/HA, et les concentrations de VEGF sont significativement diminuées par rapport au J₀ stimulé dès J₁₆ (p < 0,001).



Figure 41 : Sécrétion d'IL-6, TGF- β , PGE-2 et VEGF en fonction du temps et de la stimulation Lors de la différenciation chondrocytaire, les CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA ont été stimulées ou non avec 20 ng/mL d'IFN- γ et 30 ng/mL de TNF- α à différents temps de culture. En monocouche à confluence, ou en biomatériaux après 48h avec ou sans stimulation, les surnageants de culture ont été prélevés et analysés par test ELISA. La sécrétion d'IL-6 est augmentée par la stimulation et diminuée dès J₉ de la différenciation chondrocytaire. Cependant, le taux de sécrétion est élevé jusqu'à J₂₈. La sécrétion de TGF- β par les CSM-GW non stimulées est stable au cours du temps. La stimulation semble induire une diminution de la sécrétion. La sécrétion de PGE-2 est diminuée dès J₉ de la différenciation chondrocytaire. La stimulation augmente la sécrétion de VEGF en monocouche, mais semble la diminuer en biomatériaux d'Alg/HA. Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type, N=3, * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001. IFN = Interféron- γ ; TNF = Tumor Necrosis Factor- α .

B. Caractérisation des propriétés immunogènes et immunomodulatrices des CSM-GW lors de la différenciation chondrocytaire en situation allogénique

La mise en situation allogénique a permis d'étudier d'une part l'immunogénicité des CSM-GW et d'autre part leur capacité à moduler une réaction immunitaire. Pour ce faire, nous avons mis en coculture des CSM avec des PBMC de donneurs sains à J₀, J₃, J₁₄ et J₂₈ de la différenciation chondrocytaire. Les CSM-GW étaient en suspension à J₀ et maintenues dans des billes d'Alg/HA pour les temps suivants. L'immunogénicité est démontrée par la mise en culture des CSM-GW avec les PBMC d'un donneur tandis que l'immunomodulation s'effectue en coculture tripartite. Les PBMC d'un donneur irradié servant de stimulant et les PBMC d'un donneur non irradié servant de répondant, les CSM-GW modulent la réaction immunitaire entre les PBMC des deux donneurs. Lors des cocultures avec des biomatériaux d'Alg/HA, 2 billes étaient nécessaires pour que les différentes populations cellulaires soient en quantités égales. Le contrôle représente la coculture d'un témoin répondant avec un second témoin stimulant. Le résultat de cette culture est normalisé à 100%.

Ces résultats montrent une très faible immunogénicité des CSM-GW, et ce, jusqu'à J₂₈ de l'induction de la différenciation (Moyennes à un ratio répondant : CSM équivalent, soit 1:1 ou 1:2 billes : $J_0 = 6,33 \pm 4,21$ %, $J_3 = 1$ %, $J_{14} = 6,4 \pm 5,15$ %, $J_{28} = 3,25 \pm 1,65$ %, p < 0,0001 par rapport au contrôle positif – **Figure 42**).



Figure42:ImmunogénicitédesCSM-GWensituationallogéniqueLes CSM-GW en monocouche ou en biomatériaux d'Alg/HA à différents temps de la différenciation chondrocytaire ont
été mises en coculture avec des PBMC de donneurs sains. L'alloprolifération des cellules mononucléées sanguines a été
évaluée par incorporation de BrdU dans les cellules en division. Les résultats montrent une faible immunogénicité des
CSM-GW en monocouche comme en biomatériaux, tout au long de la différenciation chondrocytaire. Les résultats sont
exprimés en moyenne \pm ET, N=3, *** p \leq 0.001.

Concernant l'immunomodulation, les CSM-GW à J₀ comme en biomatériaux sont capables d'inhiber la prolifération des PBMC. En effet, les ratios 1:1:2 et 1:1:1 à J₀, et 1:1:2 billes à J₉ induisent une diminution significative de la prolifération des PBMC. A J₀, les CSM-GW au ratio 1:1:2 induisent une très forte diminution de la prolifération des PBMC ($2,25 \pm 0,95 \%$, p < 0,0001). Cette inhibition est moins importante à mesure que la quantité de CSM-GW diminue (**Figure 43**) tout au long de la différenciation. Ces résultats montrent également que l'inhibition de la prolifération des PBMC par les CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA est efficace à J₃ au ratio 1:1:2 billes (31,2 ± 15,1 %, p < 0,05), mais n'est plus significative dès J₁₄.



Figure 43 : Immunomodulation des CSM-GW en situation allogéniqueLes CSM-GW en monocouche ou en biomatériaux d'Alg/HA à différents temps de la différenciation chondrocytaire onété mises en coculture avec une culture mixte lymphocytaire de PBMC de donneurs sains. L'alloprolifération des cellulesmononucléées sanguines a été évaluée par incorporation de BrdU dans les cellules en division. Les résultats montrentune augmentation de l'alloprolifération des PBMC tandis que le nombre de CSM-GW diminue, en monocouche commeen biomatériaux d'Alg/HA. Cette alloprolifération augmente également, pour une concentration cellulaire donnée, aucours de la différenciation chondrocytaire. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ET, N=3, * p \leq 0.001.

Nous avons voulu vérifier le rôle du biomatériau dans l'immunomodulation des CSM-GW. Pour ce faire, nous avons réalisé des MLR avec des billes blanches – non ensemencées en CSM. Les premiers résultats montrent une très forte augmentation de la prolifération en présence de CaCl₂ – **Figure 44 : Avec CaCl₂ résiduel**. Le CaCl₂ fait partie du milieu de culture des CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA car il permet le maintien de l'intégrité du biomatériau. Lors de la préparation de ces billes blanches pour la MLR, nous avions conservé ces billes dans une plus grande concentration de CaCl₂ pour maintenir la structure de l'Alg/HA. Or, selon des résultats préliminaires non montrés, nous avons trouvé une interaction du CaCl₂ avec la méthode au BrdU, qui semble confirmée par ces résultats. Nous avons voulu vérifier cette théorie en conservant les billes blanches sans CaCl₂ avant la MLR – **Figure 44 : Sans CaCl₂ résiduel**. Ces résultats montrent une diminution de la prolifération des PBMC par rapport au test avec CaCl₂ résiduel. Toutefois, dans ces conditions, la prolifération des PBMC est augmentée par rapport au contrôle sans billes. Enfin, nous avons voulu déterminer le rôle du biomatériau en contact avec les PBMC et avons donc réalisé une dernière MLR avec les billes en transwell au-dessus de la coculture de PBMC réalisée au fond de plaques 6 puits – **Figure 44 : En transwell**. Dans ces conditions, les PBMC ne sont plus en contact avec le biomatériau. Aucune variation de la prolifération n'est visible.



Contrôles billes blanches

Figure 44 : Vérification du rôle du biomatériau dans les MLR – N=2

Les billes d'Alg/HA sans CSM ont été mises en coculture avec des PBMC de donneurs sains. L'alloprolifération des cellules mononucléées sanguines a été évaluée par incorporation de BrdU dans les cellules en division. Les résultats montrent une augmentation de l'alloprolifération des PBMC en contact avec les billes blanches. En transwell, les billes blanches n'interfèrent pas. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm ET, N=2.$

C. Discussion

Pour analyser les propriétés immunologiques des CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA durant la différenciation chondrocytaire sans apport de facteurs de croissance, nous avons étudié plusieurs caractéristiques cellulaires.

En premier lieu, l'immunogénicité des CSM-GW a été évaluée à travers le phénotype des cellules et notamment l'expression d'HLA-DR et des molécules de costimulation CD80, CD86 et CD40. Nos résultats montrent qu'HLA-DR, la principale molécule impliquée dans l'activation des lymphocytes T, n'est pas exprimée par les CSM-GW, que ce soit en monocouche ou en biomatériaux, avec, ou sans stimulation à l'IFN- γ /TNF- α . Parmi les molécules de costimulation, le CD40 est exprimé en monocouche et lors de la stimulation à l'IFN- γ /TNF- α tandis que le CD86 est exprimé à J₉ de la différenciation chondrocytaire. Néanmoins, la quantité de molécules de costimulation exprimée à la surface des CSM-GW reste faible au regard des ratios d'intensité moyenne de fluorescence. Concernant CD80, cette molécule n'est jamais exprimée dans nos conditions de culture et de stimulation. Les molécules HLA de classe II garantissent la présentation antigénique aux lymphocytes T CD4⁺. Les molécules de costimulation quant à elles permettent l'activation des lymphocytes T qui, en leur absence, entrent en anergie. Selon nos résultats, les CSM-GW n'expriment jamais HLA-DR, ni en monocouche, ni lors de la différenciation chondrocytaire, et ce quel que soit la stimulation. Ceci indique alors que même différenciées, ces cellules maintiennent une incapacité à amorcer le signal d'activation des lymphocytes T. Par conséquent, la présentation antigénique aux lymphocytes T CD4⁺ ne peut pas avoir lieu par leur intermédiaire. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus à partir de CSM adultes que nous avons publiés en 2016 avec l'équipe du Pr Carosella. Dans cette étude, les CSM adultes différenciées n'expriment pas HLA-DR, sans impact de la stimulation à l'IFN- γ /TNF- α . En revanche, et contrairement aux CSM-TA (tissu adipeux) et CSM-GW, les CSM-MO stimulées en monocouche expriment HLA-DR (204). Une autre étude sur les CSM-MO confirme que celles-ci, lorsqu'elles sont en monocouche et stimulées avec de l'IFN- γ , expriment des molécules HLA de classe II (205). Il apparait alors que selon leur origine tissulaire, les CSM n'ont pas les mêmes caractéristiques immunogènes. Des données concordantes sont décrites dans une étude de Neofytou et al. Selon ces auteurs, les CSM-TA sont moins immunogènes et plus (206). immunomodulatrices que les CSM-MO, tandis que les CSM de cordon ombilical sont

moins rejetées *in vivo* que d'autres CSM d'origine extra-embryonnaire. Ces résultats sont en faveur d'une utilisation des CSM-GW et AT en contexte allogénique, avec une réserve quant aux CSM-MO. Une autre étude montre une absence d'expression des molécules HLA-DR, CD80 et CD86 par les CSM-GW en monocouche et à J₁₄ de la différenciation chondrocytaire (207). Ces résultats sont en accord avec les nôtres puisque nous montrons une expression de CD86 uniquement à J₉ de la différenciation, avec un ratio d'IMF positif mais très faible. L'expression de CD40 par les CSM-GW est positive, et ce résultat est confirmé par une autre étude qui retrouve un pourcentage de cellules positives équivalent (208). Toutefois, les expressions de CD40 et CD86 dans nos échantillons, compte tenu de l'absence d'HLA-DR, restent en faveur d'une faible immunogénicité des CSM-GW quelles que soient les conditions de culture et de stimulation. L'analyse de la proportion de cellules positives corrélées aux ratios d'intensités moyennes de fluorescence (IMF) montre cependant que si une proportion conséquente des cellules exprime ces marqueurs, peu de marqueurs sont présents à la surface des cellules, l'IMF ne dépassant jamais 2,95. Ces résultats renforcent l'idée que les CSM-GW sont faiblement immunogènes.

La mise en situation allogénique des CSM-GW a permis de montrer qu'elles ne sont pas immunogènes, en monocouche et durant les 30 jours de différenciation. Plusieurs études confirment l'absence d'immunogénicité des CSM en monocouche et lors de la différenciation chondrocytaire (204,205,209). Du *et al.* ont récemment montré que les CSM adultes en monocouche ou en biomatériaux d'Alg/HA ne sont pas immunogènes, même lorsque les cellules sont « primées » à l'IFN- γ /TNF- α (204). Ces résultats sont en accord avec l'absence ou la faible expression d'HLA-DR et des molécules de costimulation par les CSM-GW lors de la différenciation chondrocytaire. Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage et d'une situation allogénique comme lors d'une greffe, ce caractère hypo-immunogène des cellules est un atout majeur.

Nous avons également analysé les propriétés immunomodulatrices des CSM-GW. Premièrement, nous avons recherché les molécules IDO et HLA-G membranaires et solubles par CMF. L'enzyme IDO est exprimée par les CSM-GW en monocouche, mais aucun signal n'est détecté dès lors que les cellules sont en biomatériaux. Le même profil d'expression est retrouvé pour les molécules HLA-G, avec des ratios d'intensité moyenne de fluorescence négatifs dès J₉ de la différenciation chondrocytaire. Ces molécules possèdent de fortes capacités d'immunomodulation. Bien qu'exprimées de manière importante par les CSM-GW en monocouche, que ce soit en pourcentage de cellules positives ou en IMF, nos résultats montrent une franche diminution de l'expression par les CSM en biomatériaux d'Alg/HA. Seules les molécules HLA-G solubles semblent être exprimées durant la différenciation chondrocytaire, avec un ratio d'IMF inférieur à 2. Prasanna et al. ont recherché l'enzyme IDO et son activité dans les CSM-MO et CSM-GW (171). Dans leurs conditions de culture, des transcrits de l'enzyme IDO sont détectés dans les CSM-MO stimulées à l'IFN- γ et les CSM-GW stimulées à l'IFN- γ ou TNF- α , avec une meilleure expression par les CSM-GW. Contrairement à ce que nous rapportons, les cellules non stimulées ne semblent pas produire IDO, ce qui est confirmé dans leur étude par des tests de détection de la kynurénine. Une autre étude de Montanucci et al. recherche l'expression d'IDO et d'HLA-G membranaires et solubles par des CSM-GW après 5 jours seulement en billes d'alginate (210). Ces analyses, réalisées en PCR et western blot, montrent la présence d'IDO et HLA-G soluble lorsque les CSM-GW en biomatériaux d'alginate sont stimulées par de l'IFN-y avec et sans coculture avec des PBMC, mais aucune quantification n'est réalisée et les tests ne sont pas réalisés sur les cellules en monocouche. A l'inverse, nos résultats montrent une expression d'IDO par les CSM-GW en monocouche non stimulées mais plus après la mise en biomatériaux d'Alg/HA, avec ou sans stimulation. Ces différences entre nos résultats et les études de Prasanna et Montanucci peuvent être expliquées par des conditions de culture différentes et l'origine des cellules hypoxie, nature de la source cellulaire et facteurs environnementaux associés - qui peuvent modifier l'expression de ces molécules. Les molécules HLA-G ont été recherchées sur des CSM-MO et CSM-TA par Du et al., avant et après leur mise en biomatériaux d'Alg/HA selon notre procédé d'induction de la différenciation chondrocytaire (204). Leurs résultats confirment que l'expression des molécules HLA-G membranaires et solubles est dépendante des conditions de culture. En particulier, leurs résultats montrent en microscopie confocale une expression d'HLA-G par les CSM-MO et CSM-TA en biomatériaux en hypoxie, mais cette expression devient nulle en cytométrie en flux après 48h en normoxie. Leurs résultats montrent également des différences d'expression d'HLA-G d'une souche à une autre, dans les mêmes conditions de culture. Ici encore, les différences entre les études quant à la sécrétion d'HLA-G proviennent probablement des conditions de culture et/ou de la source de CSM.

Les résultats préliminaires de détection d'IL-10 en CMF confirment que cette interleukine est sécrétée à des doses trop basses par rapport aux limites de détection du kit ELISA $(31 - 2\ 000\ \text{pg/mL})$, hors zone discriminante de la gamme – **Figure 45**). Bien que l'IL-10 soit détectée par cette méthode, ces résultats ne sont pas interprétables.



Figure 45 Sécrétion d'IL-10 en fonction du temps et de la stimulation Lors de la différenciation chondrocytaire, les CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA ont été stimulées ou non avec 20 ng/mL d'IFN-y et 30 ng/mL de TNF- α à différents temps de culture. En monocouche à confluence, ou en biomatériaux après 48h avec ou sans stimulation, les surnageants de culture ont été prélevés et analysés par test Legendplex en CMF. La sécrétion d'IL-10 est détectable mais faible comparée aux autres cytokines sécrétées par les CSM-GW en monocouche comme lors de la différenciation chondrocytaire. Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type, $N \ge 1$. IFN = Interféron- γ ; TNF = Tumor Necrosis Factor- α ; HGi = Hors gamme inférieure.

Les facteurs solubles IL-6 et PGE-2, fortement sécrétés en monocouche, sont nettement diminués à J₉. Bien que diminuant au cours du temps, leur sécrétion est améliorée par la stimulation à l'IFN- γ /TNF- α . La sécrétion du TGF- β varie peu entre la culture en monocouche et en biomatériaux, et n'est diminuée de manière significative qu'à J_{30} . La sécrétion de VEGF est impactée par la stimulation à l'IFN- γ /TNF- α . De manière surprenante, cet impact est différent entre la culture en monocouche et la différenciation chondrocytaire en biomatériaux d'Alg/HA. En effet, les CSM-GW en monocouche stimulées sécrètent plus de VEGF par rapport aux cellules non stimulées, tandis que les CSM-GW stimulées en biomatériaux en sécrètent moins. Balasubramanian et al. détectent de très faibles concentrations de VEGF dans les surnageants de culture de CSM-GW comparé aux CSM-MO (211), ce qui pourrait indiquer que les propriétés immunomodulatrices des CSM-GW sont peu dépendantes de ce facteur de croissance. Lors de la différenciation chondrocytaire en biomatériaux d'Alg/HA, la sécrétion des facteurs solubles connus pour participer à l'immunomodulation des CSM-GW montre une large tendance à la diminution. Nos résultats montrent en effet des différences significatives entre les sécrétions d'IL-6, TGF- β , PGE-2 et VEGF entre la culture en monocouche et le J₃₀ de la différenciation chondrocytaire. Montanucci retrouve des

sécrétions d'IL-6 et IL-10 dans des proportions comparables à nos résultats, avec des CSM-GW en biomatériaux d'alginate – à J_5 – stimulées à l'IFN- γ ou bien en coculture avec des PBMC (210). Deux autres études montrent une diminution de la sécrétion d'IL-6 par les CSM-MO au cours de la différenciation chondrocytaire (176,212), dont une confirme également l'augmentation de son expression par la stimulation à l'IFN- γ /TNF- α par les CSM-MO en billes d'alginate. Selon certains auteurs, l'IL-6 est un facteur pouvant favoriser la réparation du cartilage et la différenciation chondrocytaire par les CSM (212), cependant dans nos conditions de différenciation, les CSM-GW en biomatériaux non stimulées n'en sécrètent pas. En revanche, la stimulation par IFN- γ /TNF- α induit une augmentation significative d'IL-6 à J₉ et J₁₆ de la différenciation. Le priming des CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA avant implantation pourrait donc avoir un avantage non seulement sur leurs propriétés immunomodulatrices mais également leurs capacités chondrogéniques. A l'inverse, d'autres études considèrent l'IL-6 comme un facteur proinflammatoire favorisant l'arthrose (213,214). Cependant, ces études montrent uniquement des effets synergiques de l'IL-6 avec d'autres facteurs comme l'IL-1a, l'IL-1b, l'IL-8 ou encore l'ostéopontine. Il conviendrait alors de vérifier si ces facteurs sont présents dans les cultures pour écarter la possibilité d'un effet délétère de l'IL-6 sécrété par les CSM-GW. Le TGF-ß est une cytokine très régulièrement utilisée dans les études comme facteur favorisant la différenciation chondrocytaire. Plusieurs publications rapportent son expression en PCR et dans les surnageants de culture lors de la différenciation chondrocytaire des CSM (207,210), mais aucune cinétique d'expression de ce facteur n'est documentée. Une étude de Leijs et al. recherche l'expression de TGF-B1 par les CSM-MO en monocouche et en billes d'alginate à J_2 et J_{30} , avec et sans stimulation à l'IFN- γ /TNF- α , et confirme une diminution induite par la stimulation (176). Les sécrétions d'IL-10 et HGF sont faibles dans nos conditions de culture. Ces résultats sont confirmés pour l'IL-10 dans une étude de Prasanna et al. qui mesure les sécrétions de CSM-GW en monocouche, en coculture avec des PBMC, ou bien stimulées par de l'IFN- γ ou du TNF- α (171). Ces résultats montrent que les capacités sécrétoires des CSM-GW ont tendance à diminuer lors de la différenciation chondrocytaire, mais persistent. Il est alors légitime de se demander à quels dosages de ces cytokines les propriétés immunomodulatrices des CSM-GW sont encore visibles. Les tests fonctionnels permettent d'éclairer ce point.

Selon les résultats de nos tests fonctionnels, les CSM-GW présentent des propriétés immunomodulatrices dépendantes du nombre de cellules. Plus il y a de CSM-GW, plus l'immunomodulation est forte. D'autres études corroborent ces résultats avec des CSM-GW ou bien des CSM adultes (204,205,215). Il apparait aussi que ces propriétés sont plus importantes, à concentrations cellulaires équivalentes, en monocouche et à J₃ de la différenciation chondrocytaire par rapport aux temps suivants. Dans un récent article, Montanucci et al. utilisent des CSM-GW en biomatériaux d'alginate stimulées avec de l'IFN-y ou des PBMC (210). Les résultats montrent de manière surprenante une inhibition de la prolifération des PBMC inversement proportionnelle à la concentration des CSM-GW, la meilleure inhibition ayant lieu aux concentrations de PBMC:CSM de 100:1 par rapport à 1:1. Ce résultat n'est cependant pas retrouvé dans d'autres études. L'immunomodulation a également été testée par Le Blanc et al., et les résultats montrent, après 6 ou 12 jours de différenciation, des capacités immunomodulatrices réduites par rapport aux CSM-MO en monocouche ou bien différenciées en adipocytes ou ostéocytes. Du *et al.* montrent des résultats différents avec les CSM de tissus adultes (204). Dans cette étude, les CSM adultes ont été cultivées en biomatériaux d'Alg/HA pendant 14 à 28 jours. Cependant, les biomatériaux ont été dissous et les CSM ont été mises en coculture avec les PBMC. Leurs résultats ne montrent pas de diminution de l'immunomodulation entre les CSM en monocouche et les CSM après différenciation. Leurs tests montrent également qu'à un ratio plus faible de CSM en coculture, le « priming » des CSM à l'IFN- γ /TNF- α permet d'améliorer leurs propriétés immunomodulatrices. En prenant en considération ces résultats et la baisse de sécrétion des facteurs solubles lors de la différenciation chondrocytaire, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une interaction de la matrice sécrétée par les CSM dans leur immunomodulation. L'hypothèse soulevée serait que dans le biomatériau, les échanges sont possibles conformément à nos résultats à J_3 . En revanche, dès que les cellules commencent à fabriquer une MEC au cours de la différenciation chondrocytaire, ces échanges sont plus difficiles et les CSM-GW ne peuvent plus interagir aussi facilement avec leur environnement. Pour confirmer cette hypothèse, la réalisation de MLR avec les CSM-GW au même temps, avec et sans biomatériaux, permettrait de comparer leurs capacités d'immunomodulation.

Pour Montanucci *et al.*, la contribution du biomatériau d'alginate dans la prolifération des lymphocytes T est évidente (210). Selon ces auteurs, les résultats peuvent varier en

fonction de la pureté de l'alginate et induire, en cas de présence d'endotoxines et de protéines indésirables, la prolifération des lymphocytes. Dans leurs expérimentations, l'alginate de grade clinique est, selon eux, capable à lui seul de diminuer la prolifération des lymphocytes T grâce à sa structure moléculaire et l'absence d'impuretés. Pour Follin et al., le biomatériau d'alginate permet également d'augmenter la capacité des CSM de tissu adipeux à inhiber la prolifération lymphocytaire ainsi que la maturation des cellules dendritiques par rapport aux contrôles cultivés sans alginate (216). Cependant, une autre étude de Leijs et al. montre un effet inverse des biomatériaux d'alginate non ensemencés en CSM qui stimulent la prolifération de lymphocytes T stimulés (176). En revanche, ceuxci empêchent la migration des CSM vers d'autres compartiments et permettent une action locale et ciblée de celles-ci. Des cocultures ont été réalisées par Du et al. pour évaluer l'impact de notre biomatériau dans les propriétés immunologiques des CSM adultes. Pour ce faire, les cocultures ont été menées dans des boites de culture T25 avec des PBMC et des CSM adultes, avec ou sans le biomatériau d'Alg/HA. Leurs résultats montrent que les biomatériaux ne diminuent ni l'immunogénicité ni l'immunomodulation des CSM adultes. Nos résultats de MLR avec des billes blanches montrent une forte interférence du CaCl₂, soit avec la prolifération des PBMC, soit avec la méthode de détection au BrdU. En revanche, avec un lavage adéquat des billes, cet effet est très largement diminué, voire même annulé en transwell. Ceci semble bien indiquer un rôle du CaCl₂ comme nous l'avions vu avec des résultats préliminaires personnels, sans pour autant que nous puissions en déterminer le mécanisme exact. En considérant l'absence d'impact des biomatériaux en transwell, c'est-à-dire sans contact direct avec les PBMC, comparé au contrôle en condition standard, il semble que le biomatériau augmente la détection de la prolifération des PBMC. Il semble également que la méthode de coculture influence la possibilité d'interaction des PBMC avec le biomatériau. En effet, les tests de Du et al., réalisés avec le même biomatériau, montrent des résultats inverses. En comparaison des différentes études précitées sur le sujet, il est cohérent d'expliquer ce mécanisme par le biomatériau luimême, qui n'est pas de grade clinique dans notre étude. Il est donc possible qu'il contienne des protéines et/ou endotoxines, et qu'un contact rapproché avec les PBMC induise une prolifération. Cependant, ces impuretés semblent incapables de traverser la membrane du transwell. A la lumière de ces résultats, il apparait en conclusion que si l'effet de notre biomatériau, dans nos conditions de MLR, augmente la prolifération des PBMC stimulées, la résultante lorsque ces mêmes biomatériaux sont ensemencés en CSM-GW est une

diminution de la prolifération des PBMC. Nous pouvons donc en conclure que l'immunomodulation induite par les CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA que nous montrons est sous-estimée puisqu'elle compense le rôle stimulant du biomatériau. Dans ce contexte, il serait intéressant d'évaluer les compétences immunomodulatrices des CSM-GW à J₁₄ et J₂₈ de la différenciation chondrocytaire après dissolution des billes d'Alg/HA. Ces résultats complèteraient nos données, bien que ne représentant pas les conditions réelles en cas de greffe que nous avons voulu privilégier dans cette étude.

Quatrième partie : Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse a permis de démontrer la corrélation entre plusieurs facteurs obstétricaux et les paramètres de prolifération cellulaire et de différenciation chondrocytaire. Parmi les facteurs considérés, les analyses statistiques ont identifié le poids de naissance, le nombre de semaines d'aménorrhées, le poids du placenta, la grossesse normale et l'absence de prééclampsie comme des facteurs critiques pour l'expansion cellulaire. Tous ces facteurs sont en lien étroit avec la notion de naissance à terme. Les CSM-GW provenant d'un enfant né à terme et en bonne santé montrent de meilleures capacités prolifératives. Des analyses supplémentaires pourraient expliquer le rôle du travail dirigé et de l'administration d'ocytocine sur la prolifération et la résistance à la congélation, et, par extension, leur importance pour le banking cellulaire. Concernant la différenciation chondrocytaire, nous avons montré que les facteurs obstétricaux influençant la prolifération cellulaire ont un impact positif ou aucun effet sur la différenciation des cellules. Il est important de connaitre les facteurs obstétricaux avant la collecte des cordons ombilicaux dans le but d'optimiser la sélection des donneurs et d'isoler des CSM-GW avec les meilleures propriétés dans le cadre d'une utilisation en ingénierie cellulaire et tissulaire. Ces résultats ont permis de sélectionner les cordons utilisés afin d'améliorer le processus de culture cellulaire, particulièrement en termes de prolifération des CSM-GW.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons pu montrer que la stimulation des CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA par IFN- γ et/ou TNF- α était possible et non délétère pour la viabilité cellulaire et la différenciation chondrocytaire aux concentrations utilisées. La stimulation par IFN- γ /TNF- α semble même positive pour la sécrétion des facteurs solubles responsables de l'immunomodulation des CSM, IL-6 et PGE-2, et n'induit pas de variation pour le TGF- β . La sécrétion de VEGF est diminuée par la stimulation, mais comme nous l'avons discuté, cette diminution pourrait en définitive être favorable à la différenciation chondrocytaire.

La troisième partie de ce travail nous permet d'affirmer que les propriétés immunomodulatrices des CSM-GW diminuent lors de leur différenciation chondrocytaire, mais que leur hypo-immunogénicité est maintenue jusqu'au terme de nos conditions de

culture. Cette affirmation est étayée par la diminution de l'expression d'IDO et des molécules HLA-G, la diminution de la sécrétion des facteurs solubles sécrétés par les CSM-GW en monocouche, et les résultats des MLR que nous avons réalisées. L'hypoimmunogénicité des CSM-GW, tout au long de la différenciation, est démontrée par l'absence d'expression d'HLA-DR même en conditions pro-inflammatoires et les tests réalisés avec des PBMC de donneurs sains. Nous pouvons noter que le contexte proinflammatoire créé par la stimulation à l'IFN- γ /TNF- α augmente la sécrétion d'IL-6 et de PGE-2, et qu'il est possible que cet effet permette aux CSM-GW de conserver leurs propriétés immunomodulatrices lors du début de la différenciation chondrocytaire – possiblement jusqu'à J₉. Ces données sont alors en faveur d'une utilisation des CSM-GW dès la mise en biomatériaux, afin d'utiliser au mieux leurs propriétés immunomodulatrices. L'environnement pro-inflammatoire que nous avons créé n'induit pas l'expression d'HLA-DR, ce qui est particulièrement rassurant concernant la possibilité de greffe d'un tel substitut cartilagineux dans un contexte d'arthrose.

Ces données méritent d'être confirmées en analyses *in vivo* chez le petit animal pour déterminer l'efficacité de la méthode dans la réparation du cartilage lésé. Pour ce faire, il sera nécessaire dans un premier temps de valider la possibilité d'implantation du biomatériau ensemencé en CSM-GW en xénogreffe chez des lapins immunocompétents. Une telle expérimentation a déjà été menée par Leijs *et al.* avec des cellules souches mésenchymateuses humaines greffées en sous-cutané chez des rats Winstar immunocompétents (176). Lors de cette expérimentation, aucun rejet n'a été détecté lors des 5 semaines d'expérimentation. L'utilisation de lapins dans notre cas semble plus cohérente, résultant de la nécessité, dans un second temps, de valider l'utilisation de nos biomatériaux ensemencés en CSM-GW sur un modèle de lésions cartilagineuses.

L'utilisation d'anticorps bloquants permettrait également de déterminer l'importance des différents facteurs solubles sécrétés par les CSM-GW dans le cadre de la réparation tissulaire ou de la diminution de l'inflammation induite par les pathologies cartilagineuses. De plus, une nouvelle étude sur les facteurs obstétricaux et leurs éventuels rôles dans les propriétés immunomodulatrices des CSM-GW devrait être envisagée, particulièrement concernant l'expression d'IDO et des molécules HLA-G. Il serait également intéressant de rechercher si l'hypo-immunogénicité démontrée des CSM-GW tout au long de la différenciation chondrocytaire peut permettre une implantation quel que soit le temps de différenciation chondrocytaire *in vitro*, en dépit des propriétés immunomodulatrices.

Quoi qu'il en soit, dans le but d'une application clinique, il est important de limiter les stades de culture des cellules qui sont des procédés longs, coûteux, et nécessitent une augmentation des contrôles qualités. C'est l'idée de l'ANR ATYPICAL DS0412 en lien avec ce projet qui a été obtenue par notre équipe en 2015. Cette ANR porte sur le développement d'un nouveau médicament de thérapie innovante pour le traitement des lésions cartilagineuses composé de cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton et d'une matrice intelligente associées extemporanément. Dans ce projet, les CSM-GW sont associées à un biomatériau stratifié composé d'une membrane ostéo-inductrice d'une part et d'Alg/HA d'autre part. Toutes ces manipulations s'effectuent dans le respect de la législation concernant les cellules souches et les bonnes pratiques de laboratoires pour les préparations à usage clinique, dans le but d'un transfert technologique de la recherche vers la clinique.

La conception d'un tel médicament de thérapie innovante nécessite d'appréhender les différentes obligations auxquelles ces médicaments sont soumis. Notre procédé de fabrication s'oriente vers un recours à des banques de cellules congelées, qui sont destinées à un usage non homologue chez le receveur – différenciation chondrocytaire de cellules souches d'origine extra-embryonnaires, pour un usage autologue. De plus, nos recherches portent sur l'association de CSM-GW avec un biomatériau assimilable à un dispositif médical. Nous nous positionnons donc sur un médicament combiné de thérapie innovante, qui doit répondre aux bonnes pratiques de fabrication applicables aux médicaments à usage humain. Ces médicaments de thérapie innovante, auparavant appelés préparations de thérapie cellulaire, sont de nouveaux médicaments de rupture qui pourraient révolutionner la prise en charge thérapeutique de pathologies incurables telles que la maladie de Parkinson, la dystrophie musculaire ou encore certains cancers. Jusqu'à présent, 6 spécialités ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) en Europe, dont 2 concernent le cartilage : Chondrocelect® et MACI®. Le concept de Chondrocelect® est de greffer des chondrocytes autologues après expansion ex vivo, et possède l'AMM depuis 2009. Le développement du médicament MACI® est aujourd'hui suspendu suite à la fermeture du site de production européen, mais consistait en une association de chondrocytes autologues avec une matrice. L'innovation que nous apportons porte sur

l'usage de cellules allogéniques disponibles immédiatement pour la thérapie tissulaire du cartilage, en association avec un biomatériau capable de régénérer le cartilage mais également l'os sous-jacent. Aucune thérapie de ce type n'existe encore aujourd'hui, et ses potentialités très larges, tant en termes de réparation que de confort pour le patient pourraient constituer une réelle révolution dans le traitement des pathologies du cartilage hyalin.



- 1. International Stem Cell Banking Initiative. Consensus guidance for banking and supply of human embryonic stem cell lines for research purposes. Stem Cell Rev. 2009 Dec;5(4):301–14.
- 2. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006 Aug 25;126(4):663–76.
- 3. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science. 2007 Dec 21;318(5858):1917–20.
- 4. King NM, Perrin J. Ethical issues in stem cell research and therapy. Stem Cell Res Ther. 2014 Jul 7;5(4):85.
- 5. Ilic D, Ogilvie C. Human Embryonic Stem Cells-What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going? Stem Cells Dayt Ohio. 2016 Jun 28;
- Jeter CR, Yang T, Wang J, Chao H-P, Tang DG. Concise Review: NANOG in Cancer Stem Cells and Tumor Development: An Update and Outstanding Questions. Stem Cells Dayt Ohio. 2015 Aug;33(8):2381–90.
- 7. Zakaria N, Possemiers T, Dhubhghaill SN, Leysen I, Rozema J, Koppen C, et al. Results of a phase I/II clinical trial: standardized, non-xenogenic, cultivated limbal stem cell transplantation. J Transl Med. 2014 Mar 3;12:58.
- 8. Bargues L, Prat M, Leclerc T, Bey E, Lataillade J-J. [Present and future of cell therapy in burns]. Pathol Biol (Paris). 2011 Jun;59(3):e49-56.
- 9. Rasulov MF, Vasilchenkov AV, Onishchenko NA, Krasheninnikov ME, Kravchenko VI, Gorshenin TL, et al. First experience of the use bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. Bull Exp Biol Med. 2005 Jan;139(1):141–4.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315–7.
- 11. Galipeau J, Krampera M, Barrett J, Dazzi F, Deans RJ, DeBruijn J, et al. International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. Cytotherapy. 2016 Feb;18(2):151–9.
- Krampera M, Galipeau J, Shi Y, Tarte K, Sensebe L, MSC Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. Cytotherapy. 2013 Sep;15(9):1054– 61.
- 13. Collet AJ, Des Biens G. Evolution of mesenchymal cells in fetal rat lung. Anat Embryol (Berl). 1975 Sep 25;147(3):273–92.
- 14. Sager R, Kovac P. Pre-adipocyte determination either by insulin or by 5-azacytidine. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 Jan;79(2):480–4.
- 15. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc. 1991 Sep;9(5):641–50.

- 16. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. 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 Jul 3;98(14):7841–5.
- Liang J, Wu S, Zhao H, Li S-L, Liu Z-X, Wu J, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly differentiate into cholinergic-like neurons in vitro. Neurosci Lett. 2013 Jan 4;532:59–63.
- 18. Prasajak P, 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.
- 19. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2005;7(5):393–5.
- 20. Fajardo-Orduña GR, Mayani H, Montesinos JJ. Hematopoietic Support Capacity of Mesenchymal Stem Cells: Biology and Clinical Potential. Arch Med Res. 2015 Nov;46(8):589–96.
- 21. Garcia J, Wright K, Roberts S, Kuiper JH, Mangham C, Richardson J, et al. Characterisation of synovial fluid and infrapatellar fat pad derived mesenchymal stromal cells: The influence of tissue source and inflammatory stimulus. Sci Rep. 2016 Apr 13;6:24295.
- 22. Chong P-P, Selvaratnam L, Abbas AA, Kamarul T. Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells. J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc. 2012 Apr;30(4):634–42.
- Trivanović D, Kocić J, Mojsilović S, Krstić A, Ilić V, Djordjević IO, et al. Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. Srp Arh Celok Lek. 2013 Apr;141(3– 4):178–86.
- 24. Brohem CA, de Carvalho CM, Radoski CL, Santi FC, Baptista MC, Swinka BB, et al. Comparison between fibroblasts and mesenchymal stem cells derived from dermal and adipose tissue. Int J Cosmet Sci. 2013 Oct;35(5):448–57.
- Yang H, Gao L-N, An Y, Hu C-H, Jin F, Zhou J, et al. Comparison of mesenchymal stem cells derived from gingival tissue and periodontal ligament in different incubation conditions. Biomaterials. 2013 Sep;34(29):7033–47.
- 26. Ferro F, Spelat R, Baheney CS. Dental pulp stem cell (DPSC) isolation, characterization, and differentiation. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2014;1210:91–115.
- Lee YS, Lee J-E, Park H-Y, Lim Y-S, Lee J-C, Wang S-G, et al. Isolation of mesenchymal stromal cells (MSCs) from human adenoid tissue. Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol. 2013;31(4–5):513–24.
- Rossignoli F, Caselli A, Grisendi G, Piccinno S, Burns JS, Murgia A, et al. Isolation, characterization, and transduction of endometrial decidual tissue multipotent mesenchymal stromal/stem cells from menstrual blood. BioMed Res Int. 2013;2013:901821.
- 29. Trohatou O, Roubelakis MG. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Medicine: Past, Present, and Future. Cell Reprogramming. 2017 Aug;19(4):217–24.

- Abumaree MH, Al Jumah MA, Kalionis B, Jawdat D, Al Khaldi A, AlTalabani AA, et al. Phenotypic and functional characterization of mesenchymal stem cells from chorionic villi of human term placenta. Stem Cell Rev. 2013 Feb;9(1):16–31.
- Batsali AK, Kastrinaki M-C, Papadaki HA, Pontikoglou C. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. Curr Stem Cell Res Ther. 2013 Mar;8(2):144–55.
- 32. Wu LW, Wang Y-L, Christensen JM, Khalifian S, Schneeberger S, Raimondi G, et al. Donor age negatively affects the immunoregulatory properties of both adipose and bone marrow derived mesenchymal stem cells. Transpl Immunol. 2014 May;30(4):122–7.
- 33. Siegel G, Kluba T, Hermanutz-Klein U, Bieback K, Northoff H, Schäfer R. Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. BMC Med. 2013 Jun 11;11:146.
- 34. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Donor age negatively impacts adipose tissuederived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. J Transl Med. 2014 Jan 7;12:8.
- 35. Alrefaei GI, Ayuob NN, Ali SS, Al-Karim S. Effects of maternal age on the expression of mesenchymal stem cell markers in the components of human umbilical cord. Folia Histochem Cytobiol. 2015;53(3):259–71.
- 36. Penolazzi L, Vecchiatini R, Bignardi S, Lambertini E, Torreggiani E, Canella A, et al. Influence of obstetric factors on osteogenic potential of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. Reprod Biol Endocrinol RBE. 2009;7:106.
- 37. Pierdomenico L. Diabetes Mellitus During Pregnancy Interferes with the Biological Characteristics of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells. Open Tissue Eng Regen Med J. 2011;4.
- Margossian T, Reppel L, Makdissy N, Stoltz J-F, 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.
- 39. Watson N, Divers R, Kedar R, Mehindru A, Mehindru A, Borlongan MC, et al. Discarded Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord: A Viable Source for Mesenchymal Stem Cells. Cytotherapy. 2015 Jan;17(1):18–24.
- 40. El Omar R, Beroud J, Stoltz J-F, Menu P, Velot E, Decot V. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? Tissue Eng Part B Rev. 2014 Oct;20(5):523–44.
- 41. Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. Stem Cells Dayt Ohio. 2008 Mar;26(3):591–9.
- 42. Kim D-W, Staples M, Shinozuka K, Pantcheva P, Kang S-D, Borlongan CV. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications. Int J Mol Sci. 2013 May 31;14(6):11692–712.
- 43. Barbieri C, Cecatti JG, Surita FG, Costa ML, Marussi EF, Costa JV. Area of Wharton's jelly as an estimate of the thickness of the umbilical cord and its relationship with estimated fetal weight. Reprod Health. 2011;8:32.

- 44. Blanco MV, Vega HR, Giuliano R, Grana DR, Azzato F, Lerman J, et al. Histomorphometry of umbilical cord blood vessels in preeclampsia. J Clin Hypertens Greenwich Conn. 2011 Jan;13(1):30–4.
- 45. Doorn J, Moll G, Le Blanc K, van Blitterswijk C, de Boer J. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. Tissue Eng Part B Rev. 2012 Apr;18(2):101–15.
- 46. Noll JE, Williams SA, Tong CM, Wang H, Quach JM, Purton LE, et al. Myeloma plasma cells alter the bone marrow microenvironment by stimulating the proliferation of mesenchymal stromal cells. Haematologica. 2014 Jan;99(1):163–71.
- 47. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. Cell Stem Cell. 2013 Oct 3;13(4):392–402.
- 48. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noël D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. Stem Cell Res Ther. 2010 Mar 15;1(1):2.
- 49. Nagy ZA. Alloreactivity: An Old Puzzle Revisited. Scand J Immunol. 2012 May 1;75(5):463-70.
- 50. Lee JM, Jung J, Lee H-J, Jeong SJ, Cho KJ, Hwang S-G, et al. Comparison of immunomodulatory effects of placenta mesenchymal stem cells with bone marrow and adipose mesenchymal stem cells. Int Immunopharmacol. 2012 Jun;13(2):219–24.
- Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Kyurkchiev D, Bochev I, Stoyanova E, Dimitrov R, et al. HLA-G expression is up-regulated by progesterone in mesenchymal stem cells. Am J Reprod Immunol N Y N 1989. 2009 Jul;62(1):25–33.
- 52. Carosella ED. [HLA-G: from feto-maternal tolerance to organ acceptance]. Bull Acad Natl Med. 2014 May;198(4–5):801–811; discussion 812.
- 53. Carosella ED, Rouas-Freiss N, Paul P, Dausset J. HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. Immunol Today. 1999 Feb;20(2):60–2.
- 54. Zidi I, Rizzo R, Bouaziz A, Laaribi AB, Zidi N, Di Luca D, et al. sHLA-G1 and HLA-G5 levels are decreased in Tunisian women with multiple abortion. Hum Immunol. 2016 Apr;77(4):342–5.
- 55. Riteau B, Rouas-Freiss N, Menier C, Paul P, Dausset J, Carosella ED. HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytolysis. J Immunol Baltim Md 1950. 2001 Apr 15;166(8):5018–26.
- 56. LeMaoult J, Krawice-Radanne I, Dausset J, Carosella ED. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 May 4;101(18):7064–9.
- 57. Rouas-Freiss N, Marchal RE, Kirszenbaum M, Dausset J, Carosella ED. The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 May 13;94(10):5249–54.
- Rouas-Freiss N, Gonçalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytolysis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Oct 14;94(21):11520–5.
- Liang S, Ristich V, Arase H, Dausset J, Carosella ED, Horuzsko A. Modulation of dendritic cell differentiation by HLA-G and ILT4 requires the IL-6--STAT3 signaling pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jun 17;105(24):8357–62.

- 60. Carosella ED, Dausset J, Kirszenbaum M. HLA-G revisited. Immunol Today. 1996 Sep;17(9):407-9.
- 61. Morandi F, Rizzo R, Fainardi E, Rouas-Freiss N, Pistoia V. Recent Advances in Our Understanding of HLA-G Biology: Lessons from a Wide Spectrum of Human Diseases. J Immunol Res. 2016;2016:4326495.
- 62. Gimenes F, Teixeira JJV, de Abreu ALP, Souza RP, Pereira MW, da Silva VRS, et al. Human leukocyte antigen (HLA)-G and cervical cancer immunoediting: a candidate molecule for therapeutic intervention and prognostic biomarker? Biochim Biophys Acta. 2014 Dec;1846(2):576–89.
- 63. Kassahn D, Nachbur U, Conus S, Micheau O, Schneider P, Simon H-U, et al. Distinct requirements for activation-induced cell surface expression of preformed Fas/CD95 ligand and cytolytic granule markers in T cells. Cell Death Differ. 2009 Jan;16(1):115–24.
- 64. Xie Y, Zhang H, Li W, Deng Y, Munegowda MA, Chibbar R, et al. Dendritic cells recruit T cell exosomes via exosomal LFA-1 leading to inhibition of CD8+ CTL responses through downregulation of peptide/MHC class I and Fas ligand-mediated cytotoxicity. J Immunol Baltim Md 1950. 2010 Nov 1;185(9):5268–78.
- 65. Colin S, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. Immunol Rev. 2014 Nov;262(1):153–66.
- 66. Surquin M, Buonocore S, Le Moine A, Flamand V, Goldman M, Abramowicz D. [The role of neutrophils during allograft rejection]. Nephrol Ther. 2005 Jul;1(3):161–6.
- 67. Bennouna S, Bliss SK, Curiel TJ, Denkers EY. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. J Immunol Baltim Md 1950. 2003 Dec 1;171(11):6052–8.
- 68. Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. J Leukoc Biol. 2000 Jul;68(1):9–14.
- 69. Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, Bron D, Toungouz M, Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. Cytotherapy. 2016 Feb;18(2):160–71.
- 70. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. J Inflamm Lond Engl. 2005 Jul 26;2:8.
- Romanov YA, Balashova EE, Volgina NE, Kabaeva NV, Dugina TN, Sukhikh GT. Expression of Surface Molecules in Human Mesenchymal Stromal Cells Co-Cultured with Nucleated Umbilical Cord Blood Cells. Bull Exp Biol Med. 2017 Feb;162(4):578–82.
- 72. Ménard C, Tarte K. [Immunosuppression and mesenchymal stem cells: back to the future]. Med Sci MS. 2011 Mar;27(3):269–74.
- 73. Larghero J, Vija L, Lecourt S, Michel L, Verrecchia F, Farge D. [Mesenchymal stem cells and immunomodulation: toward new immunosuppressive strategies for the treatment of autoimmune diseases?]. Rev Med Interne. 2009 Mar;30(3):287–99.
- 74. Selmani Z, Naji A, Gaiffe E, Obert L, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, et al. HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells. Transplantation. 2009 May 15;87(9 Suppl):S62-66.

- 75. Spaggiari GM, Moretta L. Interactions between mesenchymal stem cells and dendritic cells. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2013;130:199–208.
- 76. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. Blood. 2005 Mar 1;105(5):2214–9.
- 77. Zhao Z-G, Xu W, Sun L, You Y, Li F, Li Q-B, et al. Immunomodulatory function of regulatory dendritic cells induced by mesenchymal stem cells. Immunol Invest. 2012;41(2):183–98.
- 78. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. J Immunol Baltim Md 1950. 2006 Aug 15;177(4):2080–7.
- 79. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. Blood. 2009 Jun 25;113(26):6576–83.
- Abumaree MH, Al Jumah MA, Kalionis B, Jawdat D, Al Khaldi A, Abomaray FM, et al. Human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages. Stem Cell Rev. 2013 Oct;9(5):620–41.
- 81. Tipnis S, Viswanathan C, Majumdar AS. Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO. Immunol Cell Biol. 2010 Dec;88(8):795–806.
- 82. Kovach TK, Dighe AS, Lobo PI, Cui Q. Interactions between MSCs and immune cells: implications for bone healing. J Immunol Res. 2015;2015:752510.
- 83. Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. Stem Cells Dayt Ohio. 2008 Jan;26(1):151–62.
- 84. Maqbool M, Vidyadaran S, George E, Ramasamy R. Human mesenchymal stem cells protect neutrophils from serum-deprived cell death. Cell Biol Int. 2011 Dec;35(12):1247–51.
- Kariminekoo S, Movassaghpour A, Rahimzadeh A, Talebi M, Shamsasenjan K, Akbarzadeh A. Implications of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. Artif Cells Nanomedicine Biotechnol. 2016 May;44(3):749–57.
- 86. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. Nat Med. 2009 Jan;15(1):42–9.
- 87. Consentius C, Reinke P, Volk H-D. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stromal cells: what has been seen in vitro and in vivo? Regen Med. 2015;10(3):305–15.
- 88. Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, Kazan HF, De Bruyn C, Bron D, et al. Immune-related antigens, surface molecules and regulatory factors in human-derived mesenchymal stromal cells: the expression and impact of inflammatory priming. Stem Cell Rev. 2012 Dec;8(4):1188–98.
- 89. Moshtagh PR, Emami SH, Sharifi AM. Differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cell into insulin-producing cells: an in vitro study. J Physiol Biochem. 2013 Sep;69(3):451–8.

- 90. Li Y, Sheng Y, Liang J, Ren X, Cheng Y. Glial differentiation of human inferior turbinate-derived stem cells: a new source of cells for nerve repair. Neuroreport. 2017 Feb 4;
- 91. Tian H, Bharadwaj S, Liu Y, Ma PX, Atala A, Zhang Y. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into bladder cells: potential for urological tissue engineering. Tissue Eng Part A. 2010 May;16(5):1769–79.
- 92. Laverdet B, Micallef L, Lebreton C, Mollard J, Lataillade J-J, Coulomb B, et al. Use of mesenchymal stem cells for cutaneous repair and skin substitute elaboration. Pathol Biol (Paris). 2014 Apr;62(2):108–17.
- 93. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jul 8;100(14):8407–11.
- 94. Gonzalo-Gil E, Pérez-Lorenzo MJ, Galindo M, Díaz de la Guardia R, López-Millán B, Bueno C, et al. Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stromal cells ameliorate collagen-induced arthritis by inducing host-derived indoleamine 2,3 dioxygenase. Arthritis Res Ther. 2016 Apr 1;18:77.
- 95. Santos JM, Bárcia RN, Simões SI, Gaspar MM, Calado S, Agua-Doce A, et al. The role of human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells (UCX®) in the treatment of inflammatory arthritis. J Transl Med. 2013 Jan 17;11:18.
- 96. Martins JP, Santos JM, de Almeida JM, Filipe MA, de Almeida MVT, Almeida SCP, et al. Towards an advanced therapy medicinal product based on mesenchymal stromal cells isolated from the umbilical cord tissue: quality and safety data. Stem Cell Res Ther. 2014 Jan 17;5(1):9.
- 97. Archer CW, Dowthwaite GP, Francis-West P. Development of synovial joints. Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev. 2003 May;69(2):144–55.
- Ray A, Singh PNP, Sohaskey ML, Harland RM, Bandyopadhyay A. Precise spatial restriction of BMP signaling is essential for articular cartilage differentiation. Dev Camb Engl. 2015 Mar 15;142(6):1169–79.
- 99. Iwamoto M, Tamamura Y, Koyama E, Komori T, Takeshita N, Williams JA, et al. Transcription factor ERG and joint and articular cartilage formation during mouse limb and spine skeletogenesis. Dev Biol. 2007 May 1;305(1):40–51.
- 100. Koyama E, Shibukawa Y, Nagayama M, Sugito H, Young B, Yuasa T, et al. A distinct cohort of progenitor cells participates in synovial joint and articular cartilage formation during mouse limb skeletogenesis. Dev Biol. 2008 Apr 1;316(1):62–73.
- Pacifici M, Koyama E, Shibukawa Y, Wu C, Tamamura Y, Enomoto-Iwamoto M, et al. Cellular and molecular mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation. Ann N Y Acad Sci. 2006 Apr;1068:74–86.
- 102. Decker RS, Koyama E, Pacifici M. Articular Cartilage: Structural and Developmental Intricacies and Questions. Curr Osteoporos Rep. 2015 Dec;13(6):407–14.
- 103. Archer CW, Francis-West P. The chondrocyte. Int J Biochem Cell Biol. 2003 Apr;35(4):401-4.
- 104. Chen S, Fu P, Wu H, Pei M. Meniscus, articular cartilage and nucleus pulposus: a comparative review of cartilage-like tissues in anatomy, development and function. Cell Tissue Res. 2017 Apr 17;

- 105. Rutges J, Creemers LB, Dhert W, Milz S, Sakai D, Mochida J, et al. Variations in gene and protein expression in human nucleus pulposus in comparison with annulus fibrosus and cartilage cells: potential associations with aging and degeneration. Osteoarthritis Cartilage. 2010 Mar;18(3):416–23.
- 106. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Laverty S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. Clin Orthop. 2001 Oct;(391 Suppl):S26-33.
- 107. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, Goldring MB, et al. Osteoarthritis. Nat Rev Dis Primer. 2016 13;2:16072.
- 108. Wu L, Petrigliano FA, Ba K, Lee S, Bogdanov J, McAllister DR, et al. Lysophosphatidic acid mediates fibrosis in injured joints by regulating collagen type I biosynthesis. Osteoarthritis Cartilage. 2015 Feb;23(2):308–18.
- 109. Ye K, Di Bella C, Myers DE, Choong PFM. The osteochondral dilemma: review of current management and future trends. ANZ J Surg. 2014 Apr;84(4):211–7.
- 110. Johnstone B, Alini M, Cucchiarini M, Dodge GR, Eglin D, Guilak F, et al. Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art. Eur Cell Mater. 2013 May 2;25:248–67.
- 111. Moreira-Teixeira LS, Georgi N, Leijten J, Wu L, Karperien M. Cartilage tissue engineering. Endocr Dev. 2011;21:102–15.
- 112. Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vécsei V, et al. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. Osteoarthritis Cartilage. 2002 Jan;10(1):62–70.
- 113. Chijimatsu R, Ikeya M, Yasui Y, Ikeda Y, Ebina K, Moriguchi Y, et al. Characterization of Mesenchymal Stem Cell-Like Cells Derived From Human iPSCs via Neural Crest Development and Their Application for Osteochondral Repair. Stem Cells Int. 2017;2017:1960965.
- 114. Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. Prog Polym Sci. 35(4):403–40.
- 115. Musumeci G, Castrogiovanni P, Leonardi R, Trovato FM, Szychlinska MA, Di Giunta A, et al. New perspectives for articular cartilage repair treatment through tissue engineering: A contemporary review. World J Orthop. 2014 Apr 18;5(2):80–8.
- 116. Gómez-Leduc T, Hervieu M, Legendre F, Bouyoucef M, Gruchy N, Poulain L, et al. Chondrogenic commitment of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in collagen matrices for cartilage engineering. Sci Rep. 2016 Sep 8;6:32786.
- 117. Ponticiello MS, Schinagl RM, Kadiyala S, Barry FP. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. J Biomed Mater Res. 2000 Nov;52(2):246–55.
- 118. Almeida HV, Eswaramoorthy R, Cunniffe GM, Buckley CT, O'Brien FJ, Kelly DJ. Fibrin hydrogels functionalized with cartilage extracellular matrix and incorporating freshly isolated stromal cells as an injectable for cartilage regeneration. Acta Biomater. 2016;36:55–62.
- 119. Lima EG, Tan AR, Tai T, Bian L, Ateshian GA, Cook JL, et al. Physiologic deformational loading does not counteract the catabolic effects of interleukin-1 in long-term culture of chondrocyte-seeded agarose constructs. J Biomech. 2008 Nov 14;41(15):3253–9.

- 120. Park H, Lee HJ, An H, Lee KY. Alginate hydrogels modified with low molecular weight hyaluronate for cartilage regeneration. Carbohydr Polym. 2017 Apr 15;162:100–7.
- 121. Yu H, Cauchois G, Schmitt J-F, Louvet N, Six J-L, Chen Y, et al. Is there a cause-and-effect relationship between physicochemical properties and cell behavior of alginate-based hydrogel obtained after sterilization? J Mech Behav Biomed Mater. 2017 Apr;68:134–43.
- 122. Shamekhi MA, Rabiee A, Mirzadeh H, Mahdavi H, Mohebbi-Kalhori D, Baghaban Eslaminejad M. Fabrication and characterization of hydrothermal cross-linked chitosan porous scaffolds for cartilage tissue engineering applications. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017 Nov 1;80:532–42.
- 123. Feng Q, Lin S, Zhang K, Dong C, Wu T, Huang H, et al. Sulfated hydrogels with retarded degradation and enhanced growth factor retention promote hMSC chondrogenesis and articular cartilage integrity with reduced hypertrophy. Acta Biomater. 2017 Apr 15;53:329–42.
- 124. Cui L, Wu Y, Cen L, Zhou H, Yin S, Liu G, et al. Repair of articular cartilage defect in non-weight bearing areas using adipose derived stem cells loaded polyglycolic acid mesh. Biomaterials. 2009 May;30(14):2683–93.
- 125. Dounchis JS, Bae WC, Chen AC, Sah RL, Coutts RD, Amiel D. Cartilage repair with autogenic perichondrium cell and polylactic acid grafts. Clin Orthop. 2000 Aug;(377):248-64.
- 126. Kim IG, Ko J, Lee HR, Do SH, Park K. Mesenchymal cells condensation-inducible mesh scaffolds for cartilage tissue engineering. Biomaterials. 2016 Apr;85:18–29.
- 127. Camarero-Espinosa S, Rothen-Rutishauser B, Foster EJ, Weder C. Articular cartilage: from formation to tissue engineering. Biomater Sci. 2016 May 26;4(5):734–67.
- 128. Bruchet M, Melman A. Fabrication of patterned calcium cross-linked alginate hydrogel films and coatings through reductive cation exchange. Carbohydr Polym. 2015 Oct 20;131:57–64.
- 129. Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate hydrogels as biomaterials. Macromol Biosci. 2006 Aug 7;6(8):623–33.
- 130. Tritz-Schiavi J, Charif N, Henrionnet C, de Isla N, Bensoussan D, Magdalou J, et al. Original approach for cartilage tissue engineering with mesenchymal stem cells. Biomed Mater Eng. 2010;20(3):167–74.
- 131. Ma H-L, Hung S-C, Lin S-Y, Chen Y-L, Lo W-H. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. J Biomed Mater Res A. 2003 Feb 1;64(2):273–81.
- 132. Reppel L, Schiavi J, Charif N, Leger L, Yu H, Pinzano A, et al. Chondrogenic induction of mesenchymal stromal/stem cells from Wharton's jelly embedded in alginate hydrogel and without added growth factor: an alternative stem cell source for cartilage tissue engineering. Stem Cell Res Ther. 2015;6(1):260.
- 133. Kaupp JA, Weber JF, Waldman SD. Mechanical stimulation of chondrocyte-agarose hydrogels. J Vis Exp JoVE. 2012 Oct 27;(68):e4229.
- 134. Murphy MK, Huey DJ, Hu JC, Athanasiou KA. TGF-β1, GDF-5, and BMP-2 stimulation induces chondrogenesis in expanded human articular chondrocytes and marrow-derived stromal cells. Stem Cells Dayt Ohio. 2015 Mar;33(3):762–73.

- 135. Reppel L, Margossian T, Yaghi L, Moreau P, Mercier N, Leger L, et al. 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):306–18.
- 136. Delcroix M, Gomez C, Marquis P, Guibert J. Tabac, fertilité et grossesse. Datatraitesob05-46113 [Internet]. 2007 Sep 3 [cited 2017 Mar 2]; Available from: http://emvmsa1a.jouve-hdi.com/article/59459
- 137. Omori A, Manabe M, Kudo K, Tanaka K, Takahashi K, Kashiwakura I. Influence of obstetric factors on the yield of mononuclear cells, CD34+ cell count and volume of placental/umbilical cord blood. J Obstet Gynaecol Res. 2010 Feb;36(1):52–7.
- 138. Hoenicka M, Lehle K, Jacobs VR, Schmid FX, Birnbaum DE. Properties of the human umbilical vein as a living scaffold for a tissue-engineered vessel graft. Tissue Eng. 2007 Jan;13(1):219–29.
- 139. Omori A, Hirai M, Chiba T, Takahashi K, Yamaguchi S, Takahashi TA, et al. Quality-assessments of characteristics of placental/umbilical cord blood associated with maternal age- and parity-related factor. Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis. 2012 Feb;46(1):7–13.
- 140. Javed MJ, Mead LE, Prater D, Bessler WK, Foster D, Case J, et al. Endothelial colony forming cells and mesenchymal stem cells are enriched at different gestational ages in human umbilical cord blood. Pediatr Res. 2008 Jul;64(1):68–73.
- 141. Ebina S, Omori A, Tarakida A, Ogasawara T, Manabe M, Katagiri S, et al. 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 Jul;38(7):997–1003.
- 142. Wajid N, Naseem R, Anwar SS, Awan SJ, Ali M, Javed S, et al. The effect of gestational diabetes on proliferation capacity and viability of human umbilical cord-derived stromal cells. Cell Tissue Bank. 2015 Sep;16(3):389–97.
- 143. Kim J, Piao Y, Pak YK, Chung D, Han YM, Hong JS, et al. Umbilical cord mesenchymal stromal cells affected by gestational diabetes mellitus display premature aging and mitochondrial dysfunction. Stem Cells Dev. 2015 Mar 1;24(5):575–86.
- 144. Amrithraj AI, Kodali A, Nguyen L, Teo AKK, Chang CW, Karnani N, et al. Gestational Diabetes Alters Functions in Offspring's Umbilical Cord Cells With Implications for Cardiovascular Health. Endocrinology. 2017 Jul 1;158(7):2102–12.
- 145. Boyle KE, Patinkin ZW, Shapiro ALB, Baker PR, Dabelea D, Friedman JE. Mesenchymal Stem Cells from Infants Born to Obese Mothers Exhibit Greater Potential for Adipogenesis: The Healthy Start BabyBUMP Project. Diabetes. 2015 Dec 2;
- 146. Joerger-Messerli M, Brühlmann E, Bessire A, Wagner A, Mueller M, Surbek DV, et al. Preeclampsia enhances neuroglial marker expression in umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet. 2015 Mar;28(4):464–9.
- 147. Sukarieh R, Joseph R, Leow SC, Li Y, Löffler M, Aris IM, et al. Molecular pathways reflecting poor intrauterine growth are found in Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. Hum Reprod. 2014 Oct 10;29(10):2287–301.

- 148. Messerli M, Wagner A, Sager R, Mueller M, Baumann M, Surbek DV, et al. Stem cells from umbilical cord Wharton's jelly from preterm birth have neuroglial differentiation potential. Reprod Sci Thousand Oaks Calif. 2013 Dec;20(12):1455–64.
- 149. Bárcia RN, Santos JM, Teixeira M, Filipe M, Pereira ARS, Ministro A, et al. Umbilical cord tissuederived mesenchymal stromal cells maintain immunomodulatory and angiogenic potencies after cryopreservation and subsequent thawing. Cytotherapy. 2017 Mar;19(3):360–70.
- 150. Luetzkendorf J, Nerger K, Hering J, Moegel A, Hoffmann K, Hoefers C, et al. Cryopreservation does not alter main characteristics of Good Manufacturing Process-grade human multipotent mesenchymal stromal cells including immunomodulating potential and lack of malignant transformation. Cytotherapy. 2015 Feb;17(2):186–98.
- 151. Moll G, Alm JJ, Davies LC, von Bahr L, Heldring N, Stenbeck-Funke L, et al. Do cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunomodulatory and therapeutic properties? Stem Cells Dayt Ohio. 2014 Sep;32(9):2430–42.
- 152. de Lima Prata K, de Santis GC, Orellana MD, Palma PVB, Brassesco MS, Covas DT. Cryopreservation of umbilical cord mesenchymal cells in xenofree conditions. Cytotherapy. 2012 Jul;14(6):694–700.
- 153. Gramlich OW, Burand AJ, Brown AJ, Deutsch RJ, Kuehn MH, Ankrum JA. Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells Maintain Potency in a Retinal Ischemia/Reperfusion Injury Model: Toward an off-the-shelf Therapy. Sci Rep. 2016 May 23;6:26463.
- 154. François M, Copland IB, Yuan S, Romieu-Mourez R, Waller EK, Galipeau J. Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon- γ licensing. Cytotherapy. 2012 Feb;14(2):147–52.
- 155. Lechanteur C, Briquet A, Giet O, Delloye O, Baudoux E, Beguin Y. Clinical-scale expansion of mesenchymal stromal cells: a large banking experience. J Transl Med. 2016 May 20;14(1):145.
- 156. Capelli C, Pedrini O, Valgardsdottir R, Da Roit F, Golay J, Introna M. Clinical grade expansion of MSCs. Immunol Lett. 2015 Dec;168(2):222-7.
- 157. Gutkowska J, Jankowski M. Oxytocin revisited: its role in cardiovascular regulation. J Neuroendocrinol. 2012 Apr;24(4):599-608.
- 158. Kim YS, Kwon JS, Hong MH, Kang WS, Jeong H, Kang H, et al. Restoration of angiogenic capacity of diabetes-insulted mesenchymal stem cells by oxytocin. BMC Cell Biol. 2013 Sep 11;14:38.
- 159. Jafarzadeh N, Javeri A, Khaleghi M, Taha MF. Oxytocin improves proliferation and neural differentiation of adipose tissue-derived stem cells. Neurosci Lett. 2014 Apr 3;564:105–10.
- Noiseux N, Borie M, Desnoyers A, Menaouar A, Stevens LM, Mansour S, et al. Preconditioning of stem cells by oxytocin to improve their therapeutic potential. Endocrinology. 2012 Nov;153(11):5361– 72.
- 161. Malek A, Blann E, Mattison DR. Human placental transport of oxytocin. J Matern Fetal Med. 1996 Oct;5(5):245–55.
- 162. Escudero C, Roberts JM, Myatt L, Feoktistov I. Impaired adenosine-mediated angiogenesis in preeclampsia: potential implications for fetal programming. Front Pharmacol [Internet]. 2014 Jun 5 [cited 2016 Feb 23];5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4046493/
- 163. Tie K, Tan Y, Deng Y, Li J, Ni Q, Magdalou J, et al. Prenatal nicotine exposure induces poor articular cartilage quality in female adult offspring fed a high-fat diet and the intrauterine programming mechanisms. Reprod Toxicol Elmsford N. 2016 Apr;60:11–20.
- 164. Ying X, Zhang W, Cheng S, Nie P, Cheng X, Shen Y, et al. Nicotine-induced chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells in vitro. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc Off J ESSKA. 2012 Nov;20(11):2329–36.
- 165. Roux C, Pisani DF, Yahia HB, Djedaini M, Beranger GE, Chambard J-C, et al. Chondrogenic potential of stem cells derived from adipose tissue: a powerful pharmacological tool. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Nov 1;440(4):786–91.
- Zeng H-L, Qin Y-L, Chen H-Z, Bu Q-Q, Li Y, Zhong Q, et al. Effects of nicotine on proliferation and survival in human umbilical cord mesenchymal stem cells. J Biochem Mol Toxicol. 2014 Apr;28(4):181– 9.
- 167. Yang X, Qi Y, Avercenc-Leger L, Vincourt J-B, Hupont S, Huselstein C, et al. Effect of nicotine on the proliferation and chondrogenic differentiation of the human Wharton's jelly mesenchymal stem cells. Biomed Mater Eng. 2017 Jan 1;28(s1):S217–28.
- 168. Elabd C, Basillais A, Beaupied H, Breuil V, Wagner N, Scheideler M, et al. Oxytocin Controls Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells and Reverses Osteoporosis. STEM CELLS. 2008 Sep 1;26(9):2399–407.
- 169. Leuner B, Caponiti JM, Gould E. Oxytocin stimulates adult neurogenesis even under conditions of stress and elevated glucocorticoids. Hippocampus. 2012 Apr;22(4):861–8.
- 170. Cuerquis J, Romieu-Mourez R, François M, Routy J-P, Young YK, Zhao J, et al. Human mesenchymal stromal cells transiently increase cytokine production by activated T cells before suppressing T-cell proliferation: effect of interferon- γ and tumor necrosis factor- α stimulation. Cytotherapy. 2014 Feb;16(2):191–202.
- 171. Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB. Pro-inflammatory cytokines, IFNgamma and TNFalpha, influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. PloS One. 2010 Feb 2;5(2):e9016.
- 172. François M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. Mol Ther J Am Soc Gene Ther. 2012 Jan;20(1):187–95.
- 173. Liu Y, Wang L, Kikuiri T, Akiyama K, Chen C, Xu X, et al. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- γ and TNF- α . Nat Med. 2011 Nov 20;17(12):1594–601.
- 174. Li X, Du W, Ma FX, Feng X, Bayard F, Han ZC. High Concentrations of TNF-α Induce Cell Death during Interactions between Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells and Peripheral Blood Mononuclear Cells. PloS One. 2015;10(5):e0128647.
- 175. Li H, Wang W, Wang G, Hou Y, Xu F, Liu R, et al. Interferon-γ and tumor necrosis factor-α promote the ability of human placenta–derived mesenchymal stromal cells to express programmed death ligand-2 and induce the differentiation of CD4+interleukin-10+ and CD8+interleukin-10+Treg subsets. Cytotherapy. 2015 Nov;17(11):1560–71.

- 176. Leijs MJ, Villafuertes E, Haeck JC, Koevoet WJ, Fernandez-Gutierrez B, Hoogduijn MJ, et al. Encapsulation of allogeneic mesenchymal stem cells in alginate extends local presence and therapeutic function. Eur Cell Mater. 2017 Jan 30;33:43–58.
- 177. Andersen T, Auk-Emblem P, Dornish M. 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. Microarrays Basel Switz. 2015 Mar 24;4(2):133–61.
- 178. Ode A, Schoon J, Kurtz A, Gaetjen M, Ode JE, Geissler S, et al. CD73/5'-ecto-nucleotidase acts as a regulatory factor in osteo-/chondrogenic differentiation of mechanically stimulated mesenchymal stromal cells. Eur Cell Mater. 2013 Jan 8;25:37–47.
- 179. Roemeling-van Rhijn M, Mensah FKF, Korevaar SS, Leijs MJ, van Osch GJVM, Ijzermans JNM, et al. Effects of Hypoxia on the Immunomodulatory Properties of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem cells. Front Immunol. 2013;4:203.
- 180. Jiang T, Liu W, Lv X, Sun H, Zhang L, Liu Y, et al. Potent in vitro chondrogenesis of CD105 enriched human adipose-derived stem cells. Biomaterials. 2010 May;31(13):3564–71.
- 181. Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, Guicheux J, Noël D. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. Trends Biotechnol. 2009 May;27(5):307–14.
- 182. Nagase T, Muneta T, Ju Y-J, Hara K, Morito T, Koga H, et al. 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. 2008 May;58(5):1389–98.
- Lee HJ, Choi BH, Min B-H, Park SR. Changes in surface markers of human mesenchymal stem cells during the chondrogenic differentiation and dedifferentiation processes in vitro. Arthritis Rheum. 2009 Aug;60(8):2325–32.
- 184. Chen X, Zhang F, He X, Xu Y, Yang Z, Chen L, et al. Chondrogenic differentiation of umbilical cordderived mesenchymal stem cells in type I collagen-hydrogel for cartilage engineering. Injury. 2013 Apr;44(4):540–9.
- 185. Nirmal RS, Nair PD. 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 Nov 11;26:234–51.
- 186. Zayed MN, Schumacher J, Misk N, Dhar MS. Effects of pro-inflammatory cytokines on chondrogenesis of equine mesenchymal stromal cells derived from bone marrow or synovial fluid. Vet J Lond Engl 1997. 2016 Nov;217:26–32.
- 187. Vecchiatini R, Penolazzi L, Lambertini E, Angelozzi M, Morganti C, Mazzitelli S, et al. Effect of dynamic three-dimensional culture on osteogenic potential of human periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells entrapped in alginate microbeads. J Periodontal Res. 2015 Aug;50(4):544–53.
- 188. Ramesh A, Kanafi MM, Bhonde RR. Modulus-dependent characteristics of Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJMSC) encapsulated in hydrogel microspheres. J Biomater Sci Polym Ed. 2014;25(17):1946–61.
- 189. Penolazzi L, Tavanti E, Vecchiatini R, Lambertini E, Vesce F, Gambari R, et al. Encapsulation of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in alginate microbeads. Tissue Eng Part C Methods. 2010 Feb;16(1):141–55.

- 190. Liu J, Zhou H, Weir MD, Xu HHK, Chen Q, Trotman CA. Fast-degradable microbeads encapsulating human umbilical cord stem cells in alginate for muscle tissue engineering. Tissue Eng Part A. 2012 Nov;18(21–22):2303–14.
- 191. Zimmermann JA, McDevitt TC. Pre-conditioning mesenchymal stromal cell spheroids for immunomodulatory paracrine factor secretion. Cytotherapy. 2014 Mar;16(3):331–45.
- 192. Djouad F, Charbonnier L-M, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. Stem Cells Dayt Ohio. 2007 Aug;25(8):2025–32.
- 193. Solchaga LA, Zale EA. Prostaglandin E2: a putative potency indicator of the immunosuppressive activity of human mesenchymal stem cells. Am J Stem Cells. 2012 Jun 30;1(2):138–45.
- 194. Daneshmandi S, Karimi MH, Pourfathollah AA. TGF-β1 Transduced Mesenchymal Stem Cells Have Profound Modulatory Effects on DCs and T Cells. Iran J Immunol IJI. 2017 Mar;14(1):13–23.
- 195. Li C, Ebert PJR, Li Q-J. T cell receptor (TCR) and transforming growth factor β (TGF-β) signaling converge on DNA (cytosine-5)-methyltransferase to control forkhead box protein 3 (foxp3) locus methylation and inducible regulatory T cell differentiation. J Biol Chem. 2013 Jun 28;288(26):19127–39.
- Summers KL, O'Donnell JL, Heiser A, Highton J, Hart DN. Synovial fluid transforming growth factor beta inhibits dendritic cell-T lymphocyte interactions in patients with chronic arthritis. Arthritis Rheum. 1999 Mar;42(3):507–18.
- 197. Gunnlaugsdottir B, Maggadottir SM, Ludviksson BR. Anti-CD28-induced co-stimulation and TCR avidity regulates the differential effect of TGF-beta1 on CD4+ and CD8+ naïve human T-cells. Int Immunol. 2005 Jan;17(1):35–44.
- 198. Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, et al. Pillars Article: production of transforming growth factor β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. J Exp Med. 1986. 163: 1037-1050. J Immunol Baltim Md 1950. 2014 Apr 1;192(7):2939–52.
- 199. Zhang J, Liu X, Yu W, Zhang Y, Shi C, Ni S, et al. Effects of human vascular endothelial growth factor on reparative dentin formation. Mol Med Rep. 2016 Jan;13(1):705–12.
- 200. Behr B, Tang C, Germann G, Longaker MT, Quarto N. Locally applied vascular endothelial growth factor A increases the osteogenic healing capacity of human adipose-derived stem cells by promoting osteogenic and endothelial differentiation. Stem Cells Dayt Ohio. 2011 Feb;29(2):286–96.
- 201. Marti LC, Pavon L, Severino P, Sibov T, Guilhen D, Moreira-Filho CA. Vascular endothelial growth factor-A enhances indoleamine 2,3-dioxygenase expression by dendritic cells and subsequently impacts lymphocyte proliferation. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014 Feb;109(1):70–9.
- 202. Marsano A, Medeiros da Cunha CM, Ghanaati S, Gueven S, Centola M, Tsaryk R, et al. Spontaneous In Vivo Chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells by Blocking Vascular Endothelial Growth Factor Signaling. Stem Cells Transl Med. 2016;5(12):1730–8.
- 203. Ahmed N, Dreier R, Göpferich A, Grifka J, Grässel S. Soluble signalling factors derived from differentiated cartilage tissue affect chondrogenic differentiation of rat adult marrow stromal cells. Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol. 2007;20(5):665–78.

- 204. Du W-J, Reppel L, Leger L, Schenowitz C, Huselstein C, Bensoussan D, et al. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Bone Marrow and Adipose Tissue Maintain Their Immunosuppressive Properties After Chondrogenic Differentiation: Role of HLA-G. Stem Cells Dev. 2016 Oct 1;25(19):1454–69.
- 205. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. Exp Hematol. 2003 Oct;31(10):890–6.
- 206. Neofytou E, Deuse T, Beygui RE, Schrepfer S. Mesenchymal stromal cell therapy: different sources exhibit different immunobiological properties. Transplantation. 2015 Jun;99(6):1113–8.
- 207. Liu S, Yuan M, Hou K, Zhang L, Zheng X, Zhao B, et al. Immune characterization of mesenchymal stem cells in human umbilical cord Wharton's jelly and derived cartilage cells. Cell Immunol. 2012 Aug;278(1–2):35–44.
- Fong C-Y, Subramanian A, Biswas A, Bongso A. Freezing of Fresh Wharton's Jelly From Human Umbilical Cords Yields High Post-Thaw Mesenchymal Stem Cell Numbers for Cell-Based Therapies. J Cell Biochem. 2016 Apr;117(4):815–27.
- 209. Kiernan CH, Hoogduijn MJ, Franquesa M, Wolvius EB, Brama PAJ, Farrell E. Allogeneic chondrogenically differentiated human mesenchymal stromal cells do not induce immunogenic responses from T lymphocytes in vitro. Cytotherapy. 2016 Aug;18(8):957–69.
- 210. Montanucci P, Alunno A, Basta G, Bistoni O, Pescara T, Caterbi S, et al. Restoration of t cell substes of patients with type 1 diabetes mellitus by microencapsulated human umbilical cord Wharton jelly-derived mesenchymal stem cells: An in vitro study. Clin Immunol Orlando Fla. 2016 Feb;163:34–41.
- Balasubramanian S, Venugopal P, Sundarraj S, Zakaria Z, Majumdar AS, Ta M. Comparison of chemokine and receptor gene expression between Wharton's jelly and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. Cytotherapy. 2012 Jan;14(1):26–33.
- 212. Kondo M, Yamaoka K, Sakata K, Sonomoto K, Lin L, Nakano K, et al. Contribution of the Interleukin-6/STAT-3 Signaling Pathway to Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. Arthritis Rheumatol Hoboken NJ. 2015 May;67(5):1250–60.
- Cai H, Sun H-J, Wang Y-H, Zhang Z. Relationships of common polymorphisms in IL-6, IL-1A, and IL-1B genes with susceptibility to osteoarthritis: a meta-analysis. Clin Rheumatol. 2015 Aug;34(8):1443– 53.
- Yang Y, Gao S-G, Zhang F-J, Luo W, Xue J-X, Lei G-H. Effects of osteopontin on the expression of IL-6 and IL-8 inflammatory factors in human knee osteoarthritis chondrocytes. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2014;18(23):3580–6.
- 215. Chen H, Zhang N, Li T, Guo J, Wang Z, Yang M, et al. Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells: immune property genes assay and effect of transplantation on the immune cells of heart failure patients. Cell Immunol. 2012 Apr;276(1–2):83–90.
- 216. Follin B, Juhl M, Cohen S, Pedersen AE, Gad M, Kastrup J, et al. Human adipose-derived stromal cells in a clinically applicable injectable alginate hydrogel: Phenotypic and immunomodulatory evaluation. Cytotherapy. 2015 Aug;17(8):1104–18.

Résumé

Ce travail a pour objet de déterminer les conditions optimales de production de substituts allogéniques capables de combler les lésions cartilagineuses dans le cadre du traitement de l'arthrose. Il s'oriente particulièrement sur la composante cellulaire de ces substituts. L'usage de cellules souches mésenchymateuses issues de cordons ombilicaux (CSM-GW) implique de déterminer quels facteurs obstétricaux, liés à l'environnement direct et indirect des CSM-GW, peuvent influencer leur prolifération ainsi que leur différenciation chondrocytaire. Dans une première partie de ce travail, trois types de facteurs ont été étudiés : les facteurs liés à l'enfant donneur, au déroulement de l'accouchement et de la délivrance, à la grossesse et à la mère. Nos données montrent que les CSM-GW ont des capacités prolifératives améliorées lorsque l'accouchement s'est déroulé à terme et sans complication, avec utilisation de Syntocinon® pendant le travail. Sur la base de ces résultats, nous avons utilisé les CSM-GW les plus efficaces dans le cadre de l'ingénierie du cartilage. Il a ensuite été essentiel d'élucider le profil d'action des CSM-GW dans un contexte allogénique. Le deuxième temps de ce travail a donc consisté à chercher le profil de stimulation le plus performant, au regard de la viabilité des cellules et de l'évolution de la sécrétion des facteurs solubles responsables des propriétés immunomodulatrices des CSM-GW au cours de la différenciation chondrocytaire. Nous avons alors mimé, in vitro et en biomatériaux d'Alginate/Acide hyaluronique (Alg/HA) une telle situation en stimulant les CSM-GW avec différentes doses d'IFN-y et de TNF-a. Selon nos résultats, la stimulation par IFN-y et TNF-a sur les CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA est plus efficace lorsque ces deux cytokines sont utilisées conjointement et n'est pas délétère pour la viabilité cellulaire aux concentrations respectives de 20 et 30 ng/mL. Cette double stimulation induit une augmentation de la sécrétion d'IL-6 et de PGE-2 par les CSM-GW, ne modifie pas leur sécrétion de TGF-6, et diminue la sécrétion de VEGF. Nous avons confirmé ces données lors d'une mise en situation fonctionnelle : des cocultures avec des cellules mononucléées de sang périphérique (PBMC) de donneurs sains nous ont permis d'évaluer la réponse des CSM-GW lors d'une situation allogénique. Ces mises en situations allogéniques ont été étudiées à différents temps afin d'évaluer les propriétés immunologiques des CSM-GW au cours du temps passé en biomatériaux. Nos résultats montrent que les CSM-GW peuvent exprimer des molécules HLA-G ainsi qu'IDO, mais ces expressions sont limitées en biomatériaux d'Alg//HA. Les CSM-GW en biomatériaux d'Alg/HA en situation allogénique ne sont pas immunogènes, quel que soit le temps de différenciation. En revanche, leurs capacités immunomodulatrices décroissent au cours du temps et sont plus fortes à J₀ et J₃ de la différenciation chondrocytaire, ce qui oriente vers une utilisation précoce de ces cellules. Les conclusions de ce travail permettent de (i) sélectionner les cordons idoines à l'ingénierie cellulaire et l'ingénierie du cartilage, (ii) définir les conditions permettant de mimer une situation allogénique in vitro, (iii) connaitre les propriétés immunomodulatrices des CSM-GW au cours de la culture en biomatériaux d'Alg/HA, y compris en situation allogénique.

Mots clefs : cellules souches mésenchymateuses, propriétés immunomodulatrices, différenciation chondrocytaire, biomatériaux, allogreffe, médicaments de thérapie innovante.

Abstract

The purpose of this work is to determine the optimal conditions for allogeneic substitutes production, adapted to filling the cartilaginous lesions in osteoarthritis treatment. It focuses on the cellular component of these substitutes. The use of mesenchymal stem cells from umbilical cords (WJ-MSC) involves determining which factors, related to direct and indirect environment of the WJ-MSC, can influence their proliferation and chondrogenic differentiation. In a first part of our work, three types of factors were studied: related to the donor child, the course of labor and delivery, pregnancy and the mother. Our results show that WJ-MSC have enhanced proliferative capacities when coming from full-term birth and without complications, with the use of Syntocinon® during labor. On this basis, we used the most effective WJ-MSC for cartilage engineering. It was then essential to elucidate their action profile in allogeneic context. We stimulated WJ-MSC embedded in Alginate/Hyaluronic Acid (Alg/HA) scaffolds with different concentrations of IFN-γ and TNF-α in order to determine the most effective stimulation profile, with regard to viability of the cells and evolution of immunomodulatory soluble factors secretion. According to our results, the stimulation by IFN-γ and TNF-α on WJ-MSC in Alg/HA scaffolds is more effective when these two cytokines are used together and is not deleterious for cell viability at the concentrations of 20 and 30 ng/mL, respectively. This double stimulation induces an increase in the secretion of IL-6 and PGE-2 by the WJ-MSC, a decrease in the secretion of VEGF and does not modify the secretion of TGF-B. We confirmed these data during a functional study: cocultures with peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors allowed us to evaluate the response of WJ-MSC in an allogeneic situation. These allogeneic situations have been studied at different times to evaluate the immunological properties of WJ-MSC during the time of chondrogenic differentiation. Our results show that WJ-MSC can express HLA-G molecules as well as IDO, but these expressions are limited in Alg/HA biomaterials. Finally, the WJ-MSC in Alg/HA biomaterials in allogeneic conditions are not immunogenic, regardless of the time of differentiation. On the other hand, their immunomodulatory capacities decrease over time and are stronger at day 0 and day 3 of chondrogenic differentiation, which leads to an early use of these cells. Finally, this work allows us to (i) select the umbilical cords suitable for cellular and cartilage engineering, (ii) define the conditions mimicking in vitro an allogeneic situation, (iii) elucidate the immunomodulatory properties of WJ-MSC during Alg/HA biomaterials chondrogenic differentiation, including allogeneic situations.

Keywords: mesenchymal stromal cells, immunomodulatory properties, chondrogenic differentiation, biomaterial, allograft, advanced therapy medicinal products.