Nancy-Université
Université Henri Poincaré

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 SCD Nancy 1 : theses.sciences@scd.uhp-nancy.fr

LIENS

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

Nancy-Université

Université Henri Poincaré – Nancy 1

École Doctorale Biologie-Santé-Environnement

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ

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

par Leticia BASCIANO

L'effet de l'hypoxie sur les conditions de culture des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse

Date de soutenance : 9 décembre 2011

Membres du jury :

Rapporteurs :	M. Pierre CHARBORD	DR INSERM U972 – Université Paris 11 - Paris
	Mme. Karin TARTE	DR INSERM U917 – Faculté de médecine - Rennes
Examinateurs :	M. Jean-Pol FRIPPIAT	Professeur JE 2537 – UHP - Nancy
	M. Ali DALLOUL	PU-PH EA4369 – UHP - Nancy (directeur de thèse)

Unité de recherche EA4369 – Relations hôte-environnement : Reconnaissance et modulation immunitaires face aux microorganismes commensaux – Faculté de Médecine – Vandœuvre-lès-Nancy

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans l'Unité de recherche EA4369 (Relations hôte-environnement : Reconnaissance et modulation immunitaires face aux microorganismes commensaux), dans la Faculté de Médecine de la Université Henri Poincaré à Nancy.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance à mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Ali DALLOUL, pour la confiance qu'il m'a témoigné, ses remarques et son soutien scientifique.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Madame le Professeur Karine TARTE et à Monsieur le Professeur Pierre CHARBORD d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je les remercie du temps qu'ils m'ont consacré et les remarques qui ont amélioré la présentation de mon manuscrit.

Je remercie également à Monsieur le Professeur Jean-Pol FRIPPIAT d'avoir bien voulu évaluer cette thèse en participant au jury en tant qu'examinateur.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Madame le Docteur Natalia DE ISLA qui a su guider les débuts de ce travail avec une profonde connaissance sur le sujet. Merci pour les nombreux conseils dont tu m'as fait profiter, merci pour ta pédagogie, la confiance que tu as eu dans mon travail et tes encouragements permanents. Y, por supuesto, ¡ gracias por ser una gran amiga !

Je remercie profondément à Monsieur le Docteur Nguyen TRAN et à ses collaboratrices pour m'avoir accueillie chaleureusement dans son laboratoire. Je remercie également à Monsieur le Professeur Bernard FOLIGUET de m'avoir donné l'opportunité de collaborer dans son projet de recherche.

Mes remerciements concernent aussi à Monsieur le Professeur Jean-François STOLTZ et à l'ensemble des chercheurs, doctorants et personnels techniques de son laboratoire. En particulier, je remercie à Madame Ghislaine CAUCHOIS pour sa gentillesse et son soutien constant. Je leur exprime ma profonde reconnaissance aussi à Monsieur Nasser CHARIF, Mesdames Monique GENTILS, Brigitte GUERBER et Karine LORCIN.

Enfin, je remercie à mes amis d'ici, de là-bas et de toujours. Je remercie de tout mon cœur à ma famille, spécialement à ma mère et mon père, à ma sœur et ma nièce. À mon mari, toujours merci !

L'effet de l'hypoxie sur les conditions de culture des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse

Il est maintenant établi que les cellules souches mésenchymateuses (Mesenchymal Stem Cells), résident dans la même niche que les cellules souches hématopoïétiques (Hematopoietic Stem Cells), au sein de la moelle osseuse (MO). Il est également connu que la pression en O_2 (pO_2) de la niche est inférieure à la normale, soit moins de 5% pO_2 contre 12-15 % pO_2 dans le sang artériel [Mohyeldin, 2010; Csete, 2005; Brahimi-Horn, 2007]. Comme nous le développons dans notre revue, cette hypoxie a des conséquences sur le métabolisme, notamment en protégeant les cellules souches contre le stress oxydatif et en favorisant le caractère multipotent de ces cellules. Notre hypothèse est que les MSC cultivées en hypoxie devraient être plus proches de leur condition physiologique et donc plus « multipotentes ». Des MSC de la MO humaine ont été cultivées en pression en O_2 de 21% et de 5%. Leur morphologie, leur capacité de différenciation en ostéocytes et adipocytes, ainsi que leur transcriptome ont été comparés à différents passages. Nous avons observé un ralentissement de la prolifération à des temps précoces en hypoxie, caractérisée par une inhibition de l'expression de gènes impliqués dans la réplication et le cycle cellulaire, puis une augmentation à des passages tardifs. Quel que soit le passage, les gènes codant pour des molécules d'adhérence et de la matrice extracellulaire sont stimulés par l'hypoxie. A des temps tardifs, la capacité de différenciation des MSC est stimulée en hypoxie, les cellules présentent un aspect plus immature et une diminution de synthèse des mitochondries. Surtout, l'hypoxie stimule la synthèse de « gènes de la plasticité » suivant le logiciel « Gene Ontology » (GO), et de nombreux gènes impliqués dans le développement épithélial et neuronal. En conclusion, la culture des MSC de MO en hypoxie semble plus physiologique et pourrait être utile pour des applications en médecine régénératrice. Les effets potentiels sur le caractère immunosuppresseur des MSC sont également discutés.

Mots clés : cellules souches mésenchymateuses ; moelle osseuse ; différenciation ; hypoxie ; plasticité.

The effects of hypoxia in the culture conditions of mesenchymal stem cells derived from the human bone marrow

It is now settled that mesenchymal stem cells (MSC), reside in the same microenvironment or niche than hematopoietic stem cells (HSC), within the bone marrow (BM). It is also known that the O_2 tension (pO_2) of the niche is below 5% as compared to 21% O_2 in the air and 12-15% in the arterial blood [Mohyeldin, 2010; Csete, 2005; Brahimi-Horn, 2007]. As developed in our recent review, this physiological hypoxia protects stem cells from oxidative stress and maintains their multipotential state. Our hypothesis is that MSC cultured in hypoxia should be closer to their physiological condition and therefore more "multipotent". MSC from human BM were cultured et 21% and at 5% pO_2. Their morphology, their ability to differentiate into osteocytes and adipocytes, and their transcriptome were compared at different passages. We observed a decrease of proliferation rate in early times in hypoxia, characterized by inhibition of the expression of genes involved in cell replication and cell cycle, and an increase in later passages. Whatever the passage, the genes encoding adhesion molecules and extracellular matrix are stimulated by hypoxia. At later times, the ability of MSC differentiation is stimulated by hypoxia, the cells look to be more immature and show decreased synthesis of mitochondria. Indeed, hypoxia stimulates the synthesis of plasticity genes according to “Gene Ontology” (GO) terms, and of several genes involved in neuronal- and epithelial-cell development. In conclusion, the culture of MSC from BM in hypoxia seems to be more physiological and may be useful for regenerative medicine applications. The potential effects on the immunosuppressive nature of MSC are also discussed.

Keywords: mesenchymal stem cells; bone marrow; differentiation; hypoxia; plasticity.

Table des Matières

Introduction Générale 1

Chapitre 1. Études Bibliographiques 3

1.1 Les cellules souches 4

1.1.1 Définition des cellules souches 4

1.1.1.1 Auto-renouvellement 5

1.1.1.1.1 Modèle symétrique 5

1.1.1.1.2 Modèle asymétrique 5

1.1.1.2 Clonalité 6

1.1.1.3 Potentialité 6

1.1.2 Caractéristiques des cellules souches 7

1.1.3 Les cellules souches et leurs niches 9

1.1.4 Les différentes sources et catégories de cellules souches 10

1.1.4.1 Les cellules souches embryonnaires (Embryonic Stem Cells) 11

1.1.4.2 Les cellules souches fœtales 12

1.1.4.3 Les cellules souches du sang de cordon ombilical 12

1.1.4.4 Les cellules souches adultes 13

1.2 Les cellules souches mésenchymateuses 15

1.2.1 La découverte des MSC 15

1.2.2 Les MSC de différents tissus 16

1.2.3 Le caractère « souche » des MSC 16

1.2.3.1 La multipotence des MSC 17

1.2.3.2 La capacité d'auto-renouvellement des MSC 19

1.2.3.3 La plasticité du système mésenchymateux 19

1.2.4 Le phénotype des MSC de la moelle osseuse humaine 21

1.2.5 Les caractéristiques de la culture in vitro des MSC 22

1.2.6 Les MSC et leurs applications cliniques 24

1.3 Le rôle de l'hypoxie....25
1.3.1 L'hypoxie dans le microenvironnement des cellules souches....27
1.3.2 L'effet de l'hypoxie dans la culture in vitro des cellules souches....28
1.3.2.1 Les effets géniques de la culture en hypoxie....28
1.3.2.2 Les effets dans le métabolisme cellulaire....29
1.3.2.3 Les effets dans la croissance et la capacité à se différencier des cellules....30
1.3.2.4 Les effets sur les fonctions antiinflammatoires, immunomodulatrices et protectrices des cellules....30
1.3.3 L'hypoxie et la fonction mitochondriale....31
1.3.3.1 Les mitochondries et l'adaptation à l'hypoxie....32
1.3.3.2 La biogenèse mitochondriale....32
1.3.3.3 Mitochondries et apoptose....32

Chapitre 2. Objectifs de l'étude....34

Chapitre 3. Matériels et Méthodes....36
3.1 La culture cellulaire des MSC....37
3.1.1 Réactifs....37
3.1.2 Protocoles....39
3.1.2.1 Obtention des prélèvements et mise en culture des MSC....39
3.1.2.2 Passages en sous-culture et amplification....39
3.1.2.3 Comptage des CFU-F....40
3.1.2.4 Congélation des cellules....40
3.1.2.5 Différenciation des MSC....40
3.1.2.6 Coloration des cellules différenciées....41
3.2 Techniques analytiques....41
3.2.1 Cytométrie en flux....41
3.2.1.1 Principes....41
3.2.1.1.1 Expression des marqueurs de surface cellulaire....42
3.2.1.1.2 Marquage des mitochondries par sondes directes....42

3.2.1.2 Réactifs 42
3.2.1.3 Protocoles....42
3.2.1.3.1 Expression des marqueurs de surface cellulaire....42
3.2.1.3.2 Marquage des mitochondries par sondes directes....43
3.2.2 Réaction de polymérisation en chaîne 43
3.2.2.1 Principes....43
3.2.2.1.1 Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR pour polymerase chain reaction) 43
3.2.2.1.2 PCR quantitative en temps réel (Quantitative real-time PCR où qPCR) 44
3.2.2.2 Réactifs 44
3.2.2.3 Protocoles....46
3.2.2.3.1 Extraction des ARN totaux....46
3.2.2.3.2 Rétrotranscription des ARNm....47
3.2.2.4 Réaction de PCR qualitative....47
3.2.2.4.1 Electrophorèse des produits de PCR....48
3.2.2.4.2 PCR en temps réel (PCR quantitative)....48
3.2.3 Analyse des données d'expression issues des puces à ADN....49
3.2.3.1 Principe....49
3.2.3.2 Réactifs....49
3.2.3.3 Protocole....50
3.2.3.3.1 Synthèse et marquage fluorescent d'ARNc....50
3.2.3.3.2 Purification des ARNc marqués....50
3.2.3.3.3 Hybridation et lavage des puces 50
3.2.3.3.4 L'analyse des biopuces....51
3.2.4 Études microscopiques 52
3.2.4.1 Microscopie électronique....52
3.2.4.1.1 Principes....52
3.2.4.1.2 Réactifs....52
3.2.4.1.3 Protocole....52

Chapitre 4. Résultats.... 54
4.1 L'effet de l'hypoxie sur l'expansion des MSC....55

4.2 Caractérisation phénotypique des MSC en différentes conditions d'0_2.....57
4.3 La culture des MSC en hypoxie et sa relation avec la biogenèse mitochondriale.....59
4.4 La culture en hypoxie à long terme stimule la différenciation des MSC.....60
4.5 Les MSC hypoxiques expriment des gènes de différenciation.....61
4.6 Analyse de l'expression des gènes par puces à ADN.....63

Chapitre 5. Discussion..... 67

Chapitre 6. Conclusion..... 75

Chapitre 7. Perspectives..... 78

Références Bibliographiques..... 80

Publication..... 98

Liste des publications et communications

Publications

- Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. Basciano, L.; Némos, C.; Foliguet, B.; de Isla, N.; de Carvalho, M.; Tran, N.; Dalloul, A. *BMC Cell Biology* 12; 12 (2011).
- Effet et applications potentielles de la culture des cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse en condition d'hypoxie. Némos, C.; Basciano, L.; Dalloul, A. *Pathologie Biologie* (2011).

Communications dans des congrès

- The role of culture conditions on the expansion of MSC from adult BM. Basciano, L.; de Isla, N.; Cauchois, G.; Decot, V.; Stoltz, JF.; Dalloul, A. *6th Marie Curie Cutting Edge InVENTS Conference on Stem cells: from the Petri dish to the clinical application* (2008).
- Cultivo y expansión inicial de células madre mesenquimales en condiciones de normoxia e hipoxia. Basciano, L.; de Isla, N.; Cauchois, G.; Decot, V.; Stoltz, JF.; Riquelme, B.; Dalloul, A. *Sociedad de Biología de Rosario (SBR)* (2008).
- Calibration in fluorescence correlation spectroscopy for measurements of stem cell differentiation kinetic. Riquelme, B.; Dumas, D.; Castellini, H.; Basciano, L.; de Isla, N.; Stoltz, JF. *14th European Microscopy Congress* (2008).

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
APC	allophycocyanine
ARN	acide ribonucléique
CFU-F	test d'unité formant des colonies type-fibroblaste
DMEM	Dulbecco’s modified eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	acide ethylènedinitrilotétraacétique
EGC	cellules germinales embryonnaires
ESC	cellules souches embryonnaires
FITC	fluorescein isothiocyanate
FSC	forward scatter
GO	gene ontology
GVHD	graft versus host disease
HBSS	tampon Hank's balanced salts solution
HIF	facteur de transcription induit par l'hypoxie
HSC	cellules souches hématopoïétiques
ICM	masse cellulaire interne
IMDM	Iscove's modified dulbecco's medium
iPSC	induced pluripotent cells
ITS	insuline-transferrine-acide sélénique
MAPC	multipotent adult progenitor cells
MET	microscopie électronique à transmission
MNC	cellules mononucléaires
MSC	cellules souches mésenchymateuses
NSC	cellules souches neurales
PAF	paraformaldéhyde
PBS	tampon phosphate salin
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PE	phicoeritrine
SCN	cellules souches nerveuses
SSC	side scatter
SVF	sérum de veau fœtal
TGF-β	facteur de croissance transformant-β
VEGF	facteur de croissance vasculaire endothéliale
α-MEM	α-MEM Eagle avec EBSS

Liste des Figures

Figure 1 : Modèles de division asymétrique....5
Figure 2 : Classification des cellules souches humaines....10
Figure 3 : Lignages cellulaires à partir d'ICM de blastocystes humains....11
Figure 4 : Modèles de différentiation des MSC....17
Figure 5 : Modèle de plasticité cellulaire....20
Figure 6 : Concentration d'O_2 dans des différents compartiments de cellules souches....26
Figure 7 : Régulation de la fonction d'HIF....29
Figure 8 : Image des MSC avec le microscope optique....55
Figure 9 : Image représentative des colonies cultivées en N ou H à différents passages....56
Figure 10 : L'effet de la pression en O_2 sur le nombre des CFU-F en différents passages....56
Figure 11 : L'effet de la pression en O_2 sur la taille des CFU-F en différents passages....57
Figure 12 : Stabilité du phénotype des MSC dans la culture....58
Figure 13 : Aspect morphologique des MSC....59
Figure 14 : La culture en hypoxie augmente le potentiel des MSC à se différencier dans les différents lignages mésenchymateux....61
Figure 15 : Les gènes représentatives des lignages ostéocytaire (ALPL, RUNX2) et adipocytaire (LPL, PPARgamma) ont été amplifiés par RT-PCR....62
Figure 16 : Reprogrammation génétique des MSC en hypoxie à P0....62
Figure 17 : Reprogrammation génétique des MSC en hypoxie à P2....64
Figure 18 : Certains transcrits ont été validés par PCR en temps réel....64

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Marqueurs des MSC humaines de la moelle osseuse.....22
Tableau 2 : Anticorps impliqués dans les immunomarquages directs.....43
Tableau 3 : Amorces pour l'amplification des gènes spécifiques de la différenciation par PCR qualitative.....45
Tableau 4 : Amorces pour l'amplification de gènes par qPCR.....46
Tableau 5 : Étude comparative du transcriptome des MSC à P0 en hypoxie versus normoxie.....65
Tableau 6 : Étude comparative du transcriptome des MSC à P2 en hypoxie versus normoxie.....66

Introduction Générale

La multipotence des cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques dans la moelle osseuse serait assuré par l'état hypoxique de la niche. La plupart des études sur les effets de l'hypoxie sur les MSC ont été faites dans un court temps d'exposition à la faible pression en oxygène. Cependant, des résultats des études faites sur un temps d'exposition à long terme peuvent être plus pertinents.

À cette fin, nous avons effectué des études morphologiques, de différenciation et du profil de la transcription des MSC cultivées tant en normoxie (21% pO_2) qu'en hypoxie (5% pO_2) jusqu'à passage 2. Les cellules au passage 0 et au passage 2 ont été comparées. Les MSC cultivées en condition d'hypoxie jusqu'à passage 0 ont générée des colonies moins nombreuses et plus petites que celles cultivées en normoxie. En parallèle, les MSC ont montré une inhibition dans l'expression de gènes (> 4 fois) impliqués dans le métabolisme de l'ADN, la progression du cycle cellulaire et la cohésion des chromosomes. Par contre, la transcription des gènes impliqués dans l'adhésion et le métabolisme cellulaire (CD93, ESAM, VWF, PLVAP, ANGPT2, LEP, TCF1) ont été stimulées en hypoxie. Par rapport à ces cellules cultivées en normoxie, les cellules hypoxiques sont morphologiquement moins différenciées et contiennent moins de mitochondries.

Au passage 2, après une phase de latence, le nombre des cellules cultivées en hypoxie a été supérieur. Aussi bien l'expression de certains gènes impliqués dans l'assemblage de la matrice extracellulaire (SMOC2), de neurones et du développement musculaire (NOG, GPR56, SNTG2, LAMA) et du développement épithélial (DMKN) a été augmentée en hypoxie. Le programme Gene Ontology attribue ces gènes, décrits ici pour la première fois dans ce type d'étude, au groupe de « gènes de la plasticité ».

Le temps d'incubation en hypoxie est critique dans la capacité de différenciation des MSC. Même dans des conditions favorisant la croissance, l'hypoxie soutient un programme génétique qui maintient les cellules indifférenciées et pluripotentes. Cette condition peut être un reflet de l'expression de gènes *in vivo* des MSC, avec des implications potentielles en médecine régénérative.

Chapitre 1. Études Bibliographiques

1.1 Les cellules souches

Trois catégories de cellules de base constituent le corps humain :

1) les cellules germinales qui sont les cellules qui donnent naissance à des gamètes (ovules et spermatozoïdes)

2) les cellules somatiques, qui constituent la majeure partie des cellules qui aboutissent à l'homme adulte et chacune de ces cellules à l'état différencié, a sa propre copie du génome ; la seule exception étant les cellules sans noyau, à savoir les globules rouges

3) les cellules souches, qui selon la définition canonique, sont des cellules qui ont la capacité de se diviser indéfiniment *in vivo* en donnant à la fois des cellules souches à partir d'une cellule individuelle (auto-renouvellement) aussi que à des cellules spécialisées matures (multipotentialité) [Alison, 2002].

1.1.1 Définition des cellules souches

Les cellules souches sont définies fonctionnellement comme des cellules qui ont aussi bien la capacité d'auto-renouvellement que de générer des cellules différenciées [Smith, 2001; Weissman, 2001]. Spécifiquement, les cellules souches peuvent générer des cellules filles identiques à leur mère (auto-renouvellement), ainsi que produire des descendants avec un potentiel plus restreint (cellules différenciées). Cette définition simple et large peut être satisfaisante pour les cellules souches embryonnaires ou fœtales qui ne subsistent pas pendant toute la vie d'un organisme. Mais cette définition ne permet pas de distinguer les cellules progénitrices adultes transitoires, qui ont une capacité réduite d'auto-renouvellement, des cellules souches adultes. Il est donc important quand nous décrivons les cellules souches adultes de restreindre cette définition aux cellules qui s'auto-renouvellent tout au long de la vie de l'animal [van der Kooy, 2000]. Un autre paramètre à considérer est la potentialité, c'est à dire, la capacité de générer ou pas de multiples types de cellules différenciées. Ainsi, une caractérisation plus complète d'une cellule souche comprend un test de la capacité de réplication, de la clonalité et de la potentialité.

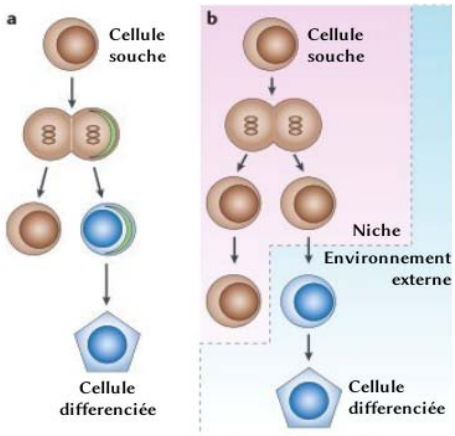

Figure 1 : Modèles de division asymétrique. À gauche, modèle asymétrique-intrinsèque. À droite, modèle asymétrique-extrinsèque (d'après Wilson, 2006).

1.1.1.1 Auto-renouvellement

L'auto-renouvellement définit la capacité qu'ont les cellules souches de proliférer tout en maintenant au fil des générations leurs potentialités [Pittenger, 1999]. Deux types d'auto-renouvellements sont possibles : symétrique ou asymétrique.

1.1.1.1.1 Modèle symétrique

Dans le modèle « symétrique », chaque cellule souche se divise et génère deux cellules filles identiques et équivalentes entre-elles mais également à la cellule mère. Lorsque les signaux contrôlant positivement l'auto-renouvellement viennent à manquer ou lorsque des signaux contrôlant positivement la détermination apparaissent, l'ensemble des cellules souches s'engage alors vers la différenciation (engagement symétrique). Par exemple, l'œuf fécondé se divise en deux, puis en quatre cellules identiques (car chacune d'entre elles peut donner encore un embryon complet).

1.1.1.1.2 Modèle asymétrique

Il existe deux mécanismes par lesquels cette asymétrie peut être atteinte, selon qu'elle se produit avant (division asymétrique) ou après (asymétrie environnementale) la division cellulaire.

Dans la division asymétrique, les déterminants spécifiques présents dans le cytoplasme (ARNm et/ou protéines) se redistribuent inégalement avant le début de la division cellulaire. Pendant la mitose, le plan de clivage est orienté de façon à ce qu'une seule cellule fille reçoive ces déterminants.

Par conséquent, sont produites deux cellules filles non identiques. Une des cellules restera cellule souche, tandis que l'autre se différencie (Figure 1a).

Une autre façon d'atteindre l'asymétrie est l'exposition des deux cellules filles à des signaux extrinsèques différents fournis par des microenvironnements locaux distincts (Figure 1b). Par conséquent, une cellule souche va suivre d'abord une division symétrique avec la production de deux cellules filles identiques. Une de ces cellules filles reste dans le microenvironnement, en conservant ce destin de cellule souche et l'autre reçoit des signaux produits par un microenvironnement différent, qui la conduisent vers la différenciation.

Dans ce modèle, chaque cellule se divise pour donner une cellule identique à elle-même plus une cellule différenciée [Wilson, 2006].

1.1.1.2 Clonalité

L'entité clonogénique de la cellule souche est peut être la caractéristique la plus importante : c'est une cellule individuelle avec la capacité de se multiplier. Bien que certains phénomènes soient bien compris, il reste plusieurs questions pratiques auxquelles il faut répondre. Par exemple, comment est constituée une lignée cellulaire ? La réponse serait « une population clonale ou apparemment homogène de cellules qui peuvent être amplifiées en culture, congelées, décongelées, puis repiquées *in vitro* ». Mais il faut reconnaître que les cultures cellulaires qui ne proviennent pas d'une seule cellule peuvent être issues d'une population mixte contenant des cellules souches et d'une population de cellules de « soutien », des cellules nécessaires à la propagation des cellules souches présumées. Par conséquent, une lignée de cellules souches doit faire référence à sa provenance.

1.1.1.3 Potentialité

Le terme « potentialité » d'une cellule est couramment utilisé pour décrire la capacité de développement de cellules souches. La totipotence est un terme que certains utilisent pour identifier une cellule souche qui peut se différentier, permettant le développement complet d'un individu . A l'origine de la vie d'un organisme il existe une cellule souche, il s'agit d'une cellule unique totipotente. Cette cellule peut donner lieu à une descendance de cellules spécialisées des tissus embryonnaires ou adultes. La cellule souche ultime, cet à dire l'œuf fécondé, se divise pour donner naissance à des branches (lignages) de cellules qui forment les divers organes différenciés. Au cours des 3 à 4 premières divisions, chaque cellule fille conserve sa totipotence. Ensuite, à travers une série de divisions et de différenciations, les cellules souches embryonnaires perdent leur totipotence et

acquièrent de fonctions des cellules plus différenciées. Ce processus est connu sous le nom de « engagement ». Au cours du renouvellement de tissu dans les organes adultes, les cellules souches tissulaires donnent lieu à une descendance qui se différencie en cellules fonctionnelles matures (cellules progénitrices). Ces cellules sont pluripotentes. Elles ont l'aptitude de donner plusieurs types de cellules des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme), mais pas l'organisme tout entier.

Les cellules multipotentes donnent naissance à plusieurs types cellulaires, comme par exemple les cellules souches myéloïdes de la moelle osseuse . Il existe également des exemples de populations de cellules souches qui sont tripotentes, bipotentes ou bien unipotentes, comme les cellules souches épidermiques [Bongso, 2009].

1.1.2 Caractéristiques des cellules souches

Comme il a été mentionné antérieurement, quand une cellule souche se divise, les cellules filles peuvent soit prendre un chemin conduisant à la formation d'une cellule différenciée spécialisée, soit s'auto-renouveler, ce qui assure une réserve de cellules souches pour réapprovisionner constamment l'organe adulte. Ce mécanisme physiologique est nécessaire pour le maintien de la composition cellulaire des tissus et organes du corps. D'autres atouts des cellules souches leur permettent entre autre de se différencier en différents types cellulaires au-delà des tissus dans lesquels elles résident habituellement. Cette propriété est connue comme « plasticité » des cellules souches. Les cellules souches sont également très clonogéniques et en général représentent un faible pourcentage du total des cellules qui composent un organe particulier [Gardner, 2002].

Les cellules souches peuvent également être classées en totipotentes, pluripotentes et multipotentes. Parmi les cellules pluripotentes il existe quatre catégories de cellules souches : les cellules souches embryonnaires, les cellules germinales embryonnaires, les cellules de carcinome embryonnaire et les cellules progénitrices multipotentes adultes de la moelle osseuse [Smith, 2001]. Seules ces dernières sont physiologiques, car elles sont présentes chez l'adulte normal. Il est possible que les cellules germinales embryonnaires aient une capacité relativement limitée par rapport aux cellules souches embryonnaires parce que les premières sont plus en aval dans le schéma du développement embryonnaire. Les lignées de cellules de carcinomes embryonnaires humains sont dérivées de tumeurs de cellules germinales et elles ont servi longtemps pour l'étude du développement humain et de la différenciation *in vitro* [Andrews, 2002].

L'équipe de Verfaillie a démontré l'existence de cellules souches plutipotentes adultes isolées de la moelle osseuse de souris, appelées MAPC (Multipotent Adult Progenitor Cells) [Jiang, 2002]. Ces cellules, sélectionnées dans des conditions spéciales, seraient capables de se différencier en types cellulaires caractéristiques des trois feuillets embryonnaires, y compris des HSC capables de reconstitution à long terme [Sohni, 2011]. Une étude a démontré que la transplantation des MAPC chez des souris irradiées permet une reconstitution hématopoïétique avec production de HSC et des différentes populations cellulaires hématopoïétiques [Serafini, 2007].

Les MAPC ont été comparées aux cellules souches embryonnaires du fait de leur capacité de différenciation, mais en contrepartie, elles ont été difficiles à reproduire dans d'autres laboratoires. Cependant, ces données laissent ouverte la possibilité qu'il existe au sein des couches stromales une population mineure avec un double potentiel très faible, qui pourraient être sélectionnée en utilisant des conditions de culture spécifiques. Une autre possibilité est que la production de cellules pluripotentes pourrait résulter de la sélection des vestiges des cellules souches embryonnaires ayant été hébergées dans la moelle osseuse. Par ailleurs, cette population pourrait être le résultat d'une reprogrammation, similaire à ce qui se passe pour les cellules pluripotentes induites à partir de fibroblastes dermiques [Takahashi, 2006; Charbord, 2011].

La multipotence est la capacité de donner lieu à un nombre limité de types cellulaires et de tissus en fonction de leur emplacement, par exemple, les cellules souches du sang donnent lieu à des globules rouges, globules blancs et plaquettes, tandis que des cellules souches de la peau donnent naissance à différents types de cellules de la peau. Des rapports récents suggèrent que les cellules souches adultes, comme les cellules souches hématopoïétiques, les cellules souches neuronales et les cellules souches mésenchymateuses, pourraient se différencier en cellules de différents tissus [Bjornson, 1999; Clarke, 2000; Jackson, 1999; Krause, 2001]. Ce phénomène de plasticité des cellules souches adultes a été appelé «transdifférenciation» et semble défier les règles canoniques de l'engagement strict de la lignée embryonnaire au cours du développement embryonnaire.

La différenciation *in vitro* peut être spontanée ou contrôlée. Plusieurs scientifiques croient qu'*in vivo* il existe certains environnements qui pourraient être permissifs pour la fusion cellulaire, et que la fusion cellulaire pourrait être une autre explication pour certains événements de transdifférenciation des cellules souches somatiques. Le phénomène de transdifférenciation n'est pas aussi simple qu'il y paraît. Des événements rares de transdifférenciation pourraient être le reflet d'une erreur dans la spécification des cellules qui n'a pas été détectée ou pourrait peut-être représenter un mécanisme de réparation facultative en réponse à des lésions tissulaires graves.

1.1.3 Les cellules souches et leurs niches

Les niches de cellules souches sont des endroits spécialisés, dans les tissus, responsables du maintien de l'homéostasie tissulaire, c'est-à-dire, le maintien de l'équilibre entre les différents types de cellules qui composent un tissu. La niche est décrite comme un compartiment anatomique défini, comprenant des composants cellulaires et non-cellulaires (matrice extracellulaire, cytokines, chimiokines, facteurs de croissance d'action locale), capable d'intégrer des signaux systémiques et locaux qui régulent la biologie de ces cellules [Jones, 2008a]. Cette niche ou microenvironnement assure l'équilibre entre l'auto-renouvellement et la différenciation, et la production de cellules matures fonctionnelles [Moore, 2006].

Des cellules, des vaisseaux sanguins et des glycoprotéines de la matrice font partie d'une structure tridimensionnelle qui fournit un microenvironnement hautement spécialisé ou le contact et la communication entre eux sont essentiels. En autre, le milieu métabolique formé par des facteurs de croissance, des protéines de signalisation cellulaire et la pression partielle en oxygène aident à conformer la niche [Scadden, 2010].

Dans les années 1970, un modèle de microenvironnement inductif de l'hématopoïèse a été décrit (revue dans [Trentin, 1989]). En 1977, Dexter a proposé l'utilisation d'une couche de cellules stromales adhérentes pour le maintien des HSC de souris en culture à long terme [Dexter, 1977]. Ces systèmes ont contribué à approfondir le concept de niche par Robert Schofield en 1978. Il a énoncé l'hypothèse que les HSC ne pouvaient maintenir leur caractère souche, autrement dit, l'équilibre entre l'auto-renouvellement et la détermination vers les lignages hématopoïétiques, qu'en gardant un contact physique avec un stroma approprié, constitué de cellules stromales associées à leur matrice extracellulaire [Schofield, 1978].

La notion de niche est aujourd'hui largement confirmée et peut être appliquée à la plupart des cellules souches. Des exemples de niches bien étudiées sont ceux des cellules souches intestinales et du follicule pileux. Les HSC de la moelle osseuse constituent la population de cellules souches la mieux caractérisée. Mais, au contraire des exemples cités antérieurement, peu d'information *in situ* est disponible pour définir les relations anatomiques et structurales entre les cellules souches, leur descendance et les cellules du microenvironnement. Plusieurs publications ont décrit deux modèles de niche hématopoïétique. Le modèle de la niche ostéoblastique, dans laquelle la composante stromale est le résultat de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes et le modèle de la niche vasculaire, dont le stroma est constitué par des cellules du sinus vasculaire. Un grand nombre de voies de régulation participe au contrôle moléculaire des HSC par les cellules

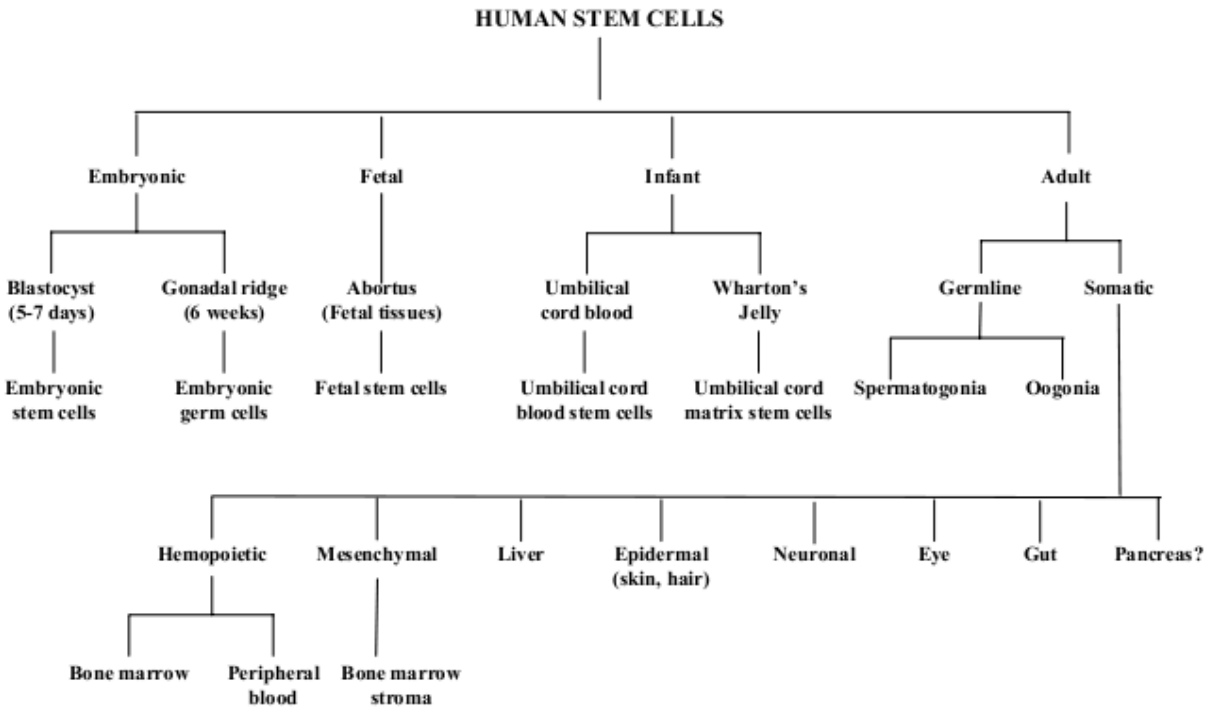

Figure 2: Classification des cellules souches humaines (d'après Bongso, 2005).

stromales. Des voies d'adhésion sont indispensables, ainsi bien que des voies de cytokines ou de morphogènes, même si elles sont redondantes (revue dans [Charbord, 2011]).

1.1.4 Les différentes sources et catégories de cellules souches

Les cellules souches peuvent être classées en quatre grandes catégories en fonction de leur origine, à savoir : cellules souches d'embryons, cellules souches provenant du fœtus, cellules souches du cordon ombilical et cellules souches adultes. Chacune d'elles peuvent être regroupées en sous-types (Figure 2). Enfin, au sein d'un organisme, une cellule souche donnée peut être extraite de plusieurs tissus différents. Ainsi, des HSC existent dans la MO mais aussi le foie du fœtus. Des MSC existent dans la MO mais aussi dans de très nombreux tissus de l'adulte. Bien que ces cellules partagent un grand nombre de caractères morphologiques et fonctionnels communs, elles ne sont pas strictement identiques. C'est pourquoi l'origine anatomique d'une cellule souche, en particulier d'une MSC reste un paramètre important dans l'interprétation des résultats expérimentaux.

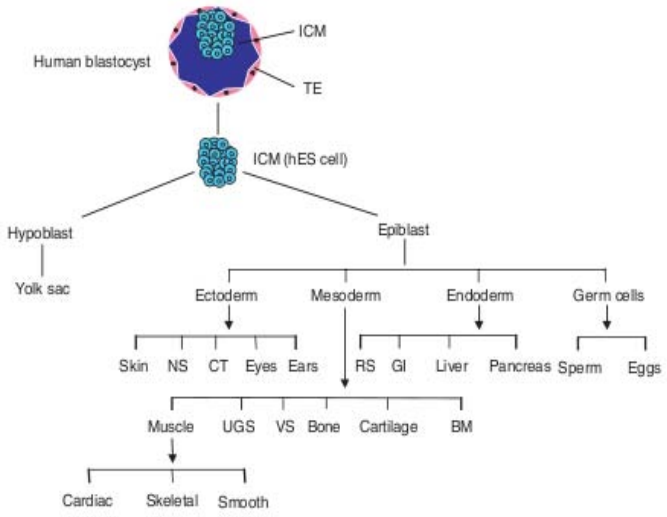

Figure 3 : Lignages cellulaires à partir d'ICM de blastocystes humains (d'après Bongso, 2005).

1.1.4.1 Les cellules souches embryonnaires (Embryonic Stem Cells)

Elles sont dérivées de la masse cellulaire interne (inner cell mass) de blastocystes de mammifères. L'ICM de blastocyste humain de 5-6 jours constitue la source d'ESC pluripotentes (Figure 3). Au cours du développement embryonnaire, l'ICM forme deux couches de cellules distinctes, l'épiblaste et l'hypoblaste. L'hypoblaste forme le sac vitellin. L'épiblaste se différencie en trois couches germinales primordiales (ectoderme, mésoderme et endoderme) pour donner le soma complet de l'organisme adulte. Les cellules embryonnaires endodermiques sont plutôt limitées dans leurs voies de développement. Une petite population de cellules multipotentes, appelée « endoderme définitif », donne lieu à tous les organes dérivés de l'endoderme chez l'adulte. L'endoderme définitif est séparé pendant la gastrulation des cellules pluripotentes d'ICM immédiatement après l'implantation. L'endoderme définitif comprend une feuille épithéliale d'environ 600 cellules qui recouvrent la surface ventrale de l'embryon. Cette feuille formera plus tard l'intestin [National Research Council, 2002]. Connaître ce qui conduit aux différentes voies de développement est crucial pour comprendre les facteurs et les événements qui conduisent à la différenciation des ESC vers des tissus désirés.

La sous-culture continue *in vitro* et l'expansion des ICM isolées sur une couche nourricière de fibroblastes embryonnaires (humains ou murins) conduit au développement d'une lignée d'ESC. Cependant, dans la nature, les ESC sont éphémères et présentes seulement dans l'ICM des blastocystes.

Les ESC peuvent se propager très facilement *in vitro* et, dans des conditions optimales de culture, se diviser symétriquement pour donner deux cellules filles. Les lignées d'ESC expriment le gène de la télomérase et sa protéine, ce qui garantit que les extrémités des télomères chromosomiques sont conservées à chaque division cellulaire, empêchant les cellules d'entrer en sénescence. Ces cellules conservent également un caryotype normal après le passage en continu *in vitro*, ce qui les rend vraiment immortelles. Elles peuvent donner toutes les cellules tissulaires mais pas les annexes extra-embryonnaires, comme le placenta.

Parmi les cellules embryonnaires il existe d'autres types de cellules : les cellules germinales embryonnaires humaines (Embryonic Germinal Stem Cells). Elles sont aussi une forme de cellules souches, qui ont été isolées des cellules germinales primordiales (précurseurs diploïdes des cellules germinales qui existent transitoirement dans l'embryon avant d'entrer en association avec les cellules somatiques de gonade et de devenir irréversiblement engagées vers des cellules germinales) de la crête gonadale de fœtus de 5-9 semaines issue d'une interruption volontaire de grossesse. Shamblott *et al* ont signalé le succès de l'isolement et la caractérisation de lignées cellulaires EGC [Shamblott, 2001; Shamblott, 1998]. Les cellules EGC sont pluripotentes et sont capables de former les trois couches germinales primordiales.

1.1.4.2 Les cellules souches fœtales

C'est un type de cellules primitives qui se trouvent dans les organes du fœtus et qui finissent par se développer dans les différents organes du corps. La recherche avec les cellules souches fœtales a été limitée jusqu'ici à quelques types cellulaires seulement en raison de l'indisponibilité de fœtus. Les cellules souches de la crête neurale, cellules souches hématopoïétiques fœtales et îlots des progéniteurs pancréatiques ont été isolées des produits d'avortement [Beattie, 1997].

1.1.4.3 Les cellules souches du sang de cordon ombilical

Ce sont des cellules souches en circulation qui comprennent de cellules souches hématopoïétiques et cellules souches non hématopoïétiques. Elles ont montré des caractéristiques multipotentes en étant capables de se différencier en neurones et en cellules hépatiques [Rogers, 2004]. Tandis que les cellules souches de sang de cordon et plus spécifiquement leur stockage pour une utilisation ultérieure ont attiré l'attention, il a été également écrit que la matrice du cordon ombilical contient des cellules souches potentiellement utiles [Mitchell, 2003]. Cette matrice appelée gelée de Wharton a été une source d'isolement des cellules souches mésenchymateuses. Ces cellules

expriment des marqueurs typiques de cellules souches, et montrent une activité télomérase élevée. Elles ont été amplifiées sur une longue période et peuvent être induites à se différencier *in vitro* en neurones.

1.1.4.4 Les cellules souches adultes

Elles sont également connues sous le nom de cellules souches somatiques, ce qui est un abus de langage dans la mesure où il existe des cellules souches germinales chez l'adulte, et peuvent être trouvées dans divers tissus et organes :

- Les cellules souches hématopoïétiques (moelle osseuse et sang périphérique). La moelle osseuse possède des cellules souches d'origines hématopoïétiques et mésenchymateuses. L'hématopoïèse est la production et l'entretien des cellules souches du sang ainsi que leur prolifération et différenciation en cellules du sang périphérique. Les cellules souches hématopoïétiques sont dérivées au début de l'embryogenèse à partir du mésoderme et se déposent dans des sites très spécifiques d'hématopoïèses dans l'embryon. Ces sites comprennent la moelle osseuse, le foie et le sac vitellin. Les cellules souches hématopoïétiques sont les cellules adultes les plus étudiées ; elles peuvent être purifiées en utilisant des anticorps monoclonaux (des cellules progénitrices lymphoïdes communes et des myéloïdes-érythrocytaires ont été isolées et caractérisées). Les HSC ont été largement utilisées en milieu clinique depuis plus de 40 ans et constituent la base du succès de transplantation de moelle osseuse. Malheureusement, les HSC sont rares et difficiles à isoler *in vivo* de leurs nombreuses niches. Dans l'organisme humain néonatal et adulte, le pourcentage de cellules CD34-positives (marqueur ubiquitaire des HSC) est de 0,2-0,5% dans le sang, de 0,5-1% dans la MO et 1% dans le thymus [Dalloul, 1999; Canque, 2000]. En réalité ces cellules sont très hétérogènes dans chaque tissu et sont à des stades de différenciation très divers. Seuls des tests de culture à long terme (long term initiating cells) [Sutherland, 1989], des tests de reconstitution hématopoïétiques *in vivo*, on permis d'évaluer le nombre de « véritables » HSC capables de reconstituer la totalité des lignages sanguins. On estime grâce à ces techniques que, environ 1 sur 100 000 cellules de la moelle osseuse seulement est une HSC [Spradling, 2001], soit approximativement une cellule CD34+/100 chez l'homme.

- Les cellules souches mésenchymateuses sont une composante du stroma de la moelle osseuse, c'est-à-dire des cellules nourricières non sanguines de ce tissu. Le tissu stromal de la moelle

est constitué d'une population hétérogène de cellules qui comprend des cellules réticulaires, des adipocytes, des cellules ostéogéniques, des cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales et des macrophages [Bianco, 1998]. Les MSC sont une population de cellules souches adultes bien caractérisées. Elles sont répandues dans la moelle osseuse à faible quantité (1 sur 10^4 – 10^5 cellules mononucléées). On pense qu'elles sont capables de réparer une blessure locale grâce à la participation d'une population de cellules souches trouvées dans le tissu stromal. Elles se divisent *in vitro* dans des milieux de culture appropriés pour produire des cellules filles qui se différencient en plusieurs types de tissus mésodermiques, y compris l'os, le cartilage, le muscle, le stroma de la moelle, les tendons, les ligaments, la graisse et une variété d'autres tissus conjonctifs [Caplan, 1994; Short, 2003]. La caractérisation des MSC a été facilitée par la simplicité de leur culture. En outre, des études récentes ont montré que les MSC peuvent également se différencier en cellules neuronales, en exprimant des marqueurs typiques de neurones matures. Plusieurs rapports on fait allusion au fait que les MSC peuvent donner lieu à une variété de types cellulaires en laboratoire, à savoir les cellules adipeuses, du cartilage, d'os, des tendons et des ligaments, des cellules musculaires, des cellules de la peau et même des cellules nerveuses [Baksh, 2004; Delorme, 2006; Zhang, 2007].

Outre le stroma de la moelle osseuse, les MSC peuvent également être dérivées du périoste, de la graisse et de la peau. Certaines preuves montrent que les MAPC, qui sont des cellules rares parmi les MSC peuvent donner lieu, non seulement à des tissus mésodermiques, mais aussi à des tissus endodermiques [Jiang, 2002].

- Parmi les cellules souches adultes il existe aussi des cellules originaires de l'intestin, du foie, de l'os, du cartilage, de l'épiderme (peau et cheveux), du système nerveux, du pancréas et de l'œil [Gronthos, 1999; Luskin, 1993; Nuttall, 1998; Reynolds, 1992; Tropepe, 2000; Wright, 2000; Zulewski, 2001].

1.2 Les cellules souches mésenchymateuses

Les MSC sont une population de cellules souches multipotentes adultes, non-hématopoïétiques, présente dans tous les tissus conjonctifs. Elles ont été identifiées initialement au sein de la moelle osseuse, où elles fournissent le microenvironnement approprié pour le soutien de l'hématopoïèse. Ces cellules conforment une population hétérogène qui génèrent, *in vivo*, toutes les cellules du squelette. Elles sont des cellules adhérentes *in vitro*, capables de se différencier dans des lignages mésodermiques, lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions appropriées.

Par leur potentiel de différenciation, leur production de cytokines, de facteurs trophiques et leurs actions immuno-suppressives, elles sont un outil thérapeutique tant en médecine régénérative que dans le traitement des pathologies immunitaires et inflammatoires.

1.2.1 La découverte des MSC

C'est Alexander Friedenstein, un chercheur soviétique, qui, dans les années 1960 a mis en évidence l'existence de précurseurs du tissu fibreux et des ostéoblastes dans la moelle osseuse de souris. Quand les cellules de la moelle osseuse de rongeurs étaient ensemencées à faible densité dans des milieux liquides contenant du sérum, il a observé, après quelques jours, l'apparition de colonies de cellules adhérentes au plastique, allongées et d'apparence fibroblastique. Chaque colonie, ensemencée individuellement sous la capsule rénale a généré du tissu fibreux, de l'os ou des trabécules osseux contenant de la moelle hématopoïétique quelques semaines après. L'utilisation d'animaux chimériques pour cette expérience a permis de montrer que le tissu fibreux et l'os provenaient bien du donneur, tandis que les cellules hématopoïétiques provenaient du receveur. Ces expériences ont conduit donc à deux hypothèses principales :

1) L'existence au sein de la moelle osseuse de progéniteurs capables de générer *in vivo* du tissu fibreux et de l'os, stade final dans le développement fonctionnel des MSC. La démonstration de l'existence de MSC a reposé principalement sur des tests rétrospectifs. Le test standard pour identifier des MSC utilisé depuis les années 1970 est le test d'unité formant des colonies type-fibroblaste (CFU-F). Ce test, au minimum, identifie les cellules adhérentes, en forme de fuseau qui prolifèrent pour former des colonies [Friedenstein, 1970].
2) L'existence de niches de cellules souches où certains composants cellulaires et/ou moléculaires du tissu osseux, générateur de CFU-F, avaient une fonction stromale de soutien de l'hématopoïèse.

1.2.2 Les MSC de différents tissus

Les MSC ont été isolées de plusieurs espèces, notamment des humains [Castro-Malaspina, 1980; Haynesworth, 1992; Bruno, 2009] et des souris [Gindraux, 2007; Sung, 2008]. Elles sont présentes dans de nombreux tissus autres que la moelle osseuse, comme du sang périphérique [Zvaifler, 2000], du sang de cordon [Erices, 2000], des cellules de cordon de la gelée de Wharton [Sarugaser, 2005], du tissu adipeux [Zuk, 2002], du liquide amniotique [In 't Anker, 2003], de l'os compact [Guo, 2006], du périoste [Nakahara, 1991; De Bari, 2001; De Bari, 2006], de la membrane synoviale [De Bari, 2001; De Bari, 2003] et du liquide synovial [Jones, 2004] du cartilage articulaire [Dowthwaite, 2004] et des tissus fœtaux [Campagnoli, 2001; Miao, 2006]. Les cellules provenant de tissus différents montrent une hétérogénéité phénotypique et elles possèdent différentes capacités de croissance. Aussi bien, elles montrent des similitudes dans leur potentiel de différenciation dans les lignages mésenchymateuses et dans l'expression de marqueurs de surface communes [Baksh, 2007].

Malgré des années de recherche, le lieu et le rôle exactes des MSC natives au sein de leur tissu d'origine *in vivo* ne sont pas connus, principalement dû à l'absence de marqueurs spécifiques permettant leur identification [Bianco, 2008; Jones, 2008b]. Le phénotype des MSC natives est différent de celui *in vitro*. Elles subissent des réarrangements phénotypiques en perdant l'expression de certains marqueurs et en acquérant de nouvelles, dû à la suppression de leur environnement naturel et l'utilisation des produits chimiques et des conditions de croissance qui pourraient modifier leurs caractéristiques [Jones, 2002; Delorme, 2009].

1.2.3 Le caractère « souche » des MSC

Les critères minimaux pour définir les cellules souches adultes de tissus sont : (1) qu'elles constituent une population hétérogène de cellules immatures, (2) capables de régénérer leur tissu d'origine et donc à haut potentiel prolifératif (en général, multipotentes), (3) et capables de s'auto-renouveler. Un autre critère est celui de flexibilité, parfois associé aux critères précédents, puisque certaines des propriétés des cellules souches, notamment leur potentiel de prolifération et de différenciation, ne sont pas définitivement fixés. En effet, les cellules souches sont susceptibles de passer d'un état quiescent à un état prolifératif et vice-versa [Loeffler, 1997; Loeffler, 2002; revue dans [Charbord, 2010]). Ces critères sont évalués ci-dessous dans le cas des cellules souches mésenchymateuses immatures adultes.

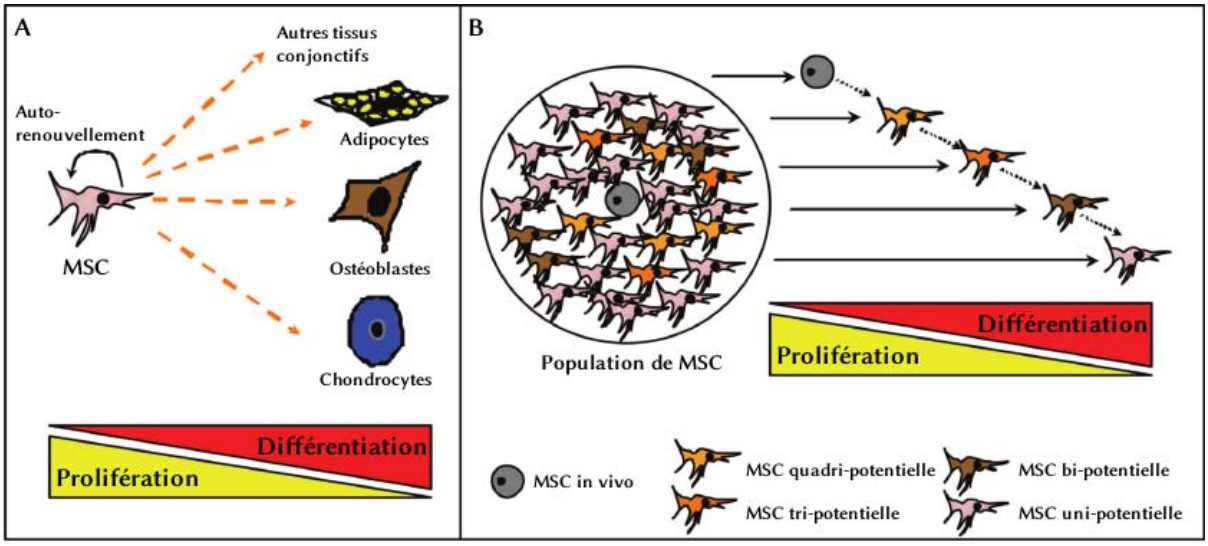

Figure 4 : Modèles de différentiation des MSC. A) Les MSC ont la capacité de se différencier vers les différents lignages cellulaires du tissu conjonctif. B) Les MSC in vivo comprennent des cellules qui ont différents potentiels de différenciation (d'après Baksh, 2004).

1.2.3.1 La multipotence des MSC

La multipotence est une des caractéristiques des MSC. Ces cellules sont capables de se différencier, dans des conditions de culture appropriées, non seulement en adipocytes (A) [Dennis, 1999], chondrocytes (C) [Kadiyala, 1997] et ostéoblastes (O) [Bruder, 1997; Bruder, 1998], mais aussi en cellules musculaires vasculaires lisses [Kashiwakura, 2003; Kobayashi, 2004; Delorme, 2009; Kurpinski, 2010]. Ces cellules peuvent donc, être considérées comme quadripotentes. Il faut souligner que la différenciation doit être strictement démontrée au niveau clonal. En effet, l'observation qu'une population multi-clonale donne plusieurs lignages peut s'expliquer par la coexistence de populations unipotentes, chacune pour un des quatre lignages.

Il est établi depuis longtemps qu'il existe des différences dans la capacité des clones des MSC à se différencier dans les trois lignées principales (A, O et C). Pittenger *et al* ont été les premiers à tester l'hypothèse que la moelle osseuse contient des MSC individuels, capables de donner A, O et C. Dans cette étude, certains clones donnent des populations de cellules capables de se différencier en tous les trois lignages, tandis que d'autres populations clonales n'étaient pas capables de se différencier que dans un ou deux lignages. Notamment, tous les clones ont pu donner des ostéocytes [Pittenger, 1999]. Donc, un modèle de hiérarchie sur la base d'études de clones a été proposé. Des nombreuses populations des MSC humains étaient capables de donner A, O, et C, mais qu'elles perdent séquentiellement leur potentiel à se différentier. En fait, la différenciation ostéoblastique

apparait comme la voie par défaut en suggérant l'existence d'un modèle de hiérarchie pendant la différenciation [Muraglia, 2000] (Figure 4).

Certains articles rapportent un potentiel de différenciation plus large, confinant dans quelques cas à celui des cellules souches embryonnaires. La différenciation en tenocytes [Hoffmann, 2006], en cellules endothéliales [Oswald, 2004], en cellules musculaires squelettiques et cardiaques [Wakitani, 1995 ; Quevedo, 2009], en cellules neurales [Woodbury, 2000; Tondreau, 2008], en hépatocytes [Snykers, 2011] et en cellules épithéliales [Spees, 2003; Wang, 2005] a été raportée.

Néanmoins, l'existence de MSC à très large potentiel de différenciation est mise en question. Il faudra prendre en considération : la fusion *in vivo*, les critères de différenciation, la capacité de reprogrammation et la sélection de populations rares par des conditions de culture cellulaire non standard. Dans certaines études où la différenciation est observée *in vivo*, un processus de fusion avec des cellules différenciées présentes dans les sites de nichage des MSC paraît avoir eu lieu [Alvarez-Dolado, 2003]. Les critères de différenciation doivent être rigoureusement définis. Le processus de différenciation doit être confirmé par l'expression d'un certain nombre de marqueurs, y compris des facteurs de transcription essentiels. Comme exemple, nous avons les MSC, qui expriment des protéines du cytosquelette habituellement exprimées dans des cellules souches neurales, des hépatocytes, des cellules biliaires et musculaires, sans exprimer des facteurs de transcription clé neuronales, hepatocytic ou myogéniques [Delorme, 2009]. Certains des différenciations observées peuvent résulter de la reprogrammation. Dans une étude, les MCS de la moelle osseuse de rongeurs ou bien humaines peuvent être reprogrammées dans des cellules ayant un potentiel à donner du muscle squelettique après traitement spécifique avec des cytokines, puis transfert de gène. Les cellules ainsi traitées expriment des facteurs de transcription squelettiques et sont capables de régénérer le muscle après transplantation dans des lésions musculaires de modèles animaux [Dezawa, 2005].

Les conditions de culture doivent être standardisées, sinon dans le cas contraire, des populations rares des cellules ayant un potentiel de différenciation plus large peuvent être sélectionnées. Ceci pourrait être le cas pour les cellules à différenciation neurale. En outre, la génération de cellules pluripotentes pourrait résulter de la sélection des certaines cellules souches embryonnaires ayant nichés dans la moelle osseuse, ou bien, elles pourraient résulter d'une reprogrammation selon un processus qui reproduirait *in vivo* l'induction *in vitro* des iPSC (Induced Pluripotent Cells).

1.2.3.2 La capacité d'auto-renouvellement des MSC

Une autre caractéristique qui définit les cellules souches est leur potentiel d'auto-renouvellement. Il est défini comme la capacité pour une cellule de donner des copies identiques à elle-même après la division mitotique, en conservant cette propriété pendant une longue période de temps (éventuellement, pendant toute la vie d'un organisme). Les cellules filles conservent leur potentiel de différenciation et de prolifération.

Il a été montré que des populations de MSC provenant de la moelle osseuse, ont un potentiel important mais très variable d'auto-renouvellement *in vitro* [Bruder, 1997; Colter, 2000]. Le marquage continu avec de la thymidine tritiée de MSC de la moelle osseuse a révélé que les CFU-F sont en phase G0 du cycle cellulaire *in vivo* [Friedenstein, 1970], et que leur entrée dans le cycle cellulaire et le développement de colonies dépendent des facteurs de croissance présents dans le sérum. En fait, une augmentation dans le nombre de duplication de la population (PD pour population doublings) (> 50) a été obtenue suite à de l'ajout de facteurs de croissance spécifiques [par exemple, fibroblast growth factor-2 (FGF-2)], au milieu de culture de base [Bianchi, 2003]. Ainsi, la densité d'ensemencement cellulaire joue un rôle important dans la capacité d'expansion des MSC. Par exemple, Colter *et al* ont démontré que le taux maximal d'expansion des MSC peut être atteint lorsque l'ensemencement est à faible densité (1.5-3 cellules/cm²), comparé à une forte densité (12 cellules/cm²). L'expansion passe respectivement de 2000 fois à 60 fois. Ce travail et d'autres suggèrent que les MSC et les MSC isolées de clones sont hétérogènes par rapport à leur capacité d'auto-renouvellement [Colter, 2000].

La preuve de qu'une population de cellules souches est capable de s'auto-renouveller est, en effet, sa capacité à se régénérer *in vivo,* donnant des cellules identiques à la fraction d'abord implantée.

Des études récentes, faites par l'équipe de Bianco, ont montré que de cellules humaines clonogéniques CD146 (+) sont capables de s'auto-renouveler. Une colonie CD146 (+) a été implantée en sous-cutanée dans une souris immunodéficiente et quelques semaines après, des cellules CD146 (+) ont été récupérées. Suite à la mise en culture à faible densité, des colonies du même phénotype ont été obtenues [Sacchetti, 2007].

1.2.3.3 La plasticité du système mésenchymateux

Dans le système mésenchymateux, la différenciation ne semble pas être un processus irréversible. Des cellules qui semblent être à la fin de leur différenciation peuvent déplacer leurs

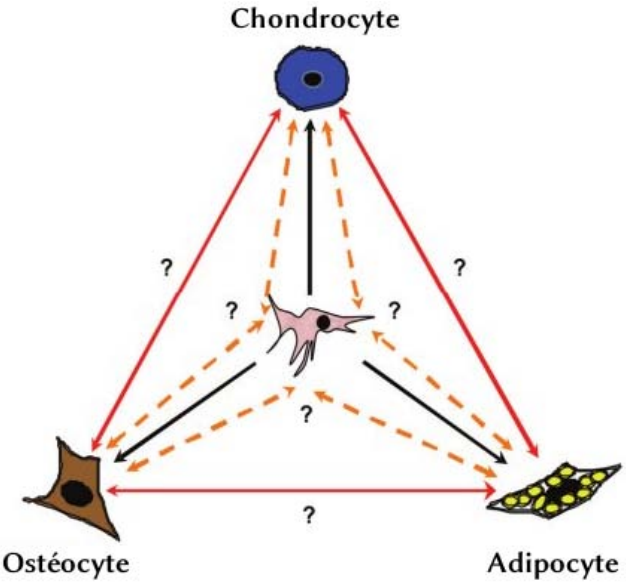

Figure 5: Modèle de plasticité cellulaire. Les MSC peuvent suivre un voie de transdifférenciation ou de dé-différenciation en fonction des conditions de culture spécifiques (d'après Baksh, 2004).

parcours de différenciation si l'on change certaines conditions *in vitro*. En modifiant les conditions de culture, des clones des MSC différentiées peuvent donner des autres cellules du lignage mesenchymateux. Des clones d'ostéoblastes peuvent donner des chondrocytes et des adipocytes, ainsi que des clones de cellules vasculaires de muscle lisse peuvent donner des chondrocytes, des ostéocytes ou des adipocytes [Song, 2004; Delorme, 2009].

En utilisant une stratégie de différenciation *in vitro*, Song et Tuan ont montré que les cellules dérivées des MSC complètement différenciées en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes peuvent changer leurs phénotypes. Elles seraient capables de générer d'autres lignages mésenchymateux en réponse à des stimuli extracellulaires spécifiques [Song, 2004]. Pendant ce processus de trans-différenciation, la prolifération cellulaire est éteinte. Les cellules perdent leur phénotype d'engagement spécifique de lignage avant de reprendre un état de cellules semblables aux cellules souches primitives. En outre, après induction, ces cellules dé-différenciées sont capables d'acquérir à nouveau un phénotype différencié, c'est à dire, qu'elles suivent un processus de re-différenciation (Figure 5).

La plasticité et l'auto-renouvellement sont deux propriétés compétitives. La possibilité qu'une cellule parmi la descendance d'une cellule souche puisse récupérer ce potentiel de différenciation complet supprime le besoin d'une capacité d'auto-renouvellement indéfinie, nécessaire pour le maintien d'un « potentiel souche ». Les MSC possèdent des propriétés plastiques, tant au niveau du

phénotype morphologique que au niveau de la dé-différenciation et de la trans-différenciation. Tous ces éléments peuvent contribuer à l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des MSC en culture. Ceci suggère que les mécanismes moléculaires conduisant à la plasticité, impliquent des changements stochastiques dans les MSC.

Il a été proposé que l'hétérogénéité cellulaire au sein d'une population clonale résulterait du « bruit génique ». Dans ce modèle, le niveau de multipotence dépend des profils d'expression génique, des concentrations de protéines et de facteurs épigénétiques. Les fluctuations stochastiques de ces événements intracellulaires pourraient être la base de l'hétérogénéité et le facteur principal dans le processus de différenciation cellulaire observé dans les populations de MSC [Pevsner-Fischer, 2011].

Un autre modèle qui peut expliquer la plasticité est celui de « lineage priming » [Delorme, 2009]. Selon ce modèle, les cellules expriment certains gènes caractéristiques de lignage avant toute induction de différenciation. Les MSC expriment PPARG, RUNX2 et SOX9 avant l'induction de différenciation. Au moment de la différenciation, le gène correspondant à la voie induite est augmenté tandis que les autres facteurs diminuent. Il existerait de nombreux états de différenciation intermédiaires qui permettraient de diminuer le nombre de gènes à induire au moment de la différenciation. Nous avons d'ailleurs nous même observé que les gènes cités plus haute sont exprimés dans les MSC cultivées en hypoxie (voir plus loin).

1.2.4 Le phénotype des MSC de la moelle osseuse humaine

La plupart des informations sur le phénotype des MSC proviennent d'études *ex vivo* réalisées sur des cellules cultivées. Des études en cytométrie en flux montrent que ces cellules expriment une variété de marqueurs de surface cellulaire non-spécifiques (Tableau 1). Fait essentiel, elles sont négatives pour le marqueur ubiquitaire des cellules sanguines nucléées CD45, ainsi que pour le CD34.

Dans une étude récente, Delorme et collègues ont décrit les protéines de la membrane plasmique des cellules en culture, en sélectionnant les molécules n'appartenant pas aux cellules hématopoïétiques. Certaines protéines d'entre elles seraient utiles pour trier les MSC natives à partir des cellules mononucléées. C'est le cas de la protéine CD200, qui semble être l'un des marqueurs les plus efficaces pour purifier les MSC natifs, capables de se différencier dans A, O et C, et de former de l'os *in vivo* [Delorme, 2008].

Des autres marqueurs de surface ont été utilisés pour purifier des MSC à partir de la moelle osseuse, comme CD146 [Sacchetti, 2007] ou CD271 [Quirici, 2002].

Une analyse phénotypique et fonctionnelle des MSC natives permettrait de répondre à certaines questions, mais l'un des obstacles majeurs est l'absence d'un marqueur phénotypique exclusif pour l'identification et la purification des MSC, comme par exemple la molécule CD34 combinée au CD45 pour les cellules souches hématopoïétiques.

Marqueur	Propriété	MSC en culture	MSC natifs
Stro-1	Antigène inconnu	+	+
GD2	Ganglioside	+	+
SSEA4	Stage-specific embryonic antigen	+	+
CD29	Intégrine β1 (VLA-β)	+	
CD44	Récepteur d'acide hyaluronique (Pgp-1)	+	
CD49a	Intégrine α1	+	+
CD49b	Intégrine α2	+	
CD49c	Intégrine α3	+	
CD49e	Intégrine α5	+	
CD51	Intégrine aV	+	
CD73	Ecto-5-endonucléase	+	+
CD90	Thy-1	+	+
CD105	Transforming growth factor-β receptor III (TGF-βRIII)	+	+
CD106	Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)	+	+
CD133	Prominin (AG133)	-	+
CD140b	Platelet-derived growth factor receptor-β (PDGF-Rβ)	+	+
CD146	Melanoma-cell adhesion molecule (Mel-CAM)	+	+
CD166	Activated lymphocyte cell adhesion molecule (ALCAM)	+	+
CD200	OX-2	+	+
CD271	Neural growth factor receptor (NGFR)	-	+

Tableau 1 : Marqueurs des MSC humaines de la moelle osseuse (d'après Pontikoglou, 2011).

1.2.5 Les caractéristiques de la culture *in vitro* des MSC

La sélection des cellules adhérentes après 2 à 4 jours de culture [Pittenger, 1999] et les passages nécessaires pour se débarrasser des cellules hématopoïétiques contaminantes (habituellement 1-2

passages pour les humaines et 4-6 pour les cultures murines), peuvent conduire à une population plus homogène. Toutefois, l'homogénéité de la population de cellules en culture dépend des conditions de culture. Déjà en 1981, Mets et Verdonk ont décrit la présence de deux types de cellules différentes dans les cultures cellulaires [Mets, 1981]. À partir des observations des MSC en culture, ils ont montré qu'il existait deux sous-populations en culture : des cellules rondes et petites, d'environ 7 µm de diamètre, qui sont auto-renouvelées rapidement (RS-MSC pour rapid self-renewing MSC) et des cellules ayant une morphologie de fibroblastes, plus matures, d'entre 15 et 50 µm, de renouvellement lent (SR-MSC pour slow self-renewing MSC). La coexistence de ces deux types de cellules peut s'expliquer comme suit. Les RS-MSC sont prédominantes dans les phases de latence et exponentielle de la courbe de croissance et elles donnent lieu aux cellules SR-MSC. Ces cellules SR-MSC sont plus matures, elles se divisent lentement et deviennent dominantes dans les cultures qui s'approchent de la sénescence. Les deux sous-populations peuvent être distinguées par des différences dans leurs épitopes de surface et aussi dans leur potentiel de différenciation. Contrairement aux SR-MSC, les RS-MSC expriment faiblement ou pas certains antigènes (CD90, Stro-1, CD10, CD147, PDGFR, EGFR) tandis qu'elles expriment des antigènes non exprimés par les SR-MSC (VEGFR2, TRK, CD71, ANXA2, KIT, CD4) [Colter, 2000; Colter, 2001].

Dans les conditions actuelles de culture *in vitro*, qui comprennent l'utilisation de sérum de veau fœtal, les calculs montrent que la prolifération des MSC reste dans la limite de Hayflick de 50 doublements *in vitro*. Par contre, les MSC obtenues à partir de donneurs âgés présentent une diminution de leur prolifération avec un maximum de 25 doublements [Stenderup, 2003]. La limite de Hayflick prend en compte le nombre total de divisions cellulaires qui ont eu lieu *in vivo* plus les divisions en culture. Ceci explique pourquoi les cellules en culture deviennent sénescentes et pourquoi la sénescence peut survenir plus tôt dans les cultures de cellules des personnes âgées. Cette forme de sénescence est causée par plusieurs facteurs, notamment le raccourcissement progressif des télomères au cours de la culture continue *in vitro* [Stenderup, 2003] attribuable à l'absence d'activité télomérase [Simonsen, 2002]. Dans certaines études, des populations de MSC qui sont « télomérase positive » ont été isolées [Gronthos, 2003]. Il a été démontré que le phénotype de sénescence des MSC en culture peut être modifié par la sur-expression du gène de la hTERT, grâce au rétablissement de l'activité télomérase [Simonsen, 2002]. Ces MSC présentent une durée de vie prolongée et maintiennent leur caractère souche [Abdallah, 2005]. Malheureusement, la prolifération des cellules immortalisées par hTERT *in vitro* conduit à une transformation des MSC en culture due à une instabilité génétique après environ 250 doublements de la population (PD) [Serakinci, 2004]. Ainsi, la

sur-expression conditionnée de hTERT où la stimulation chimique transitoire de son expression est une approche plus appropriée. La trichostatine A a été utilisée à cette fin [Serakinci, 2006].

1.2.6 Les MSC et leurs applications cliniques

Les MSC sont des cellules très intéressantes du point de vue de l'application clinique dû à leur grande capacité d'expansion *in vitro*, leur capacité à se différencier en plusieurs types cellulaires et à leur propriétés immuno-modulatrices [Nauta, 2007]. De plus, elles peuvent être obtenues directement à partir du patient, éliminant ainsi les complications associées au rejet immunitaire des tissus allogéniques.

Depuis les années 1990, les MSC cultivées *ex vivo* ont été utilisées dans de nombreux essais cliniques tant pour le traitement des pathologies immunes que pour la médecine régénérative.

Une des propriétés les plus intéressantes des MSC en clinique est leur capacité immunosuppressive unique, à l'aide de facteurs solubles inductibles. Grâce à ces facteurs qu'inhibent les principaux effecteurs de l'immunité, elles ont été utilisées pour traiter des maladies autoimmunes sévères, le rejet d'organe ou la maladie aiguë du greffon contre l'hôte (graft versus host disease ou GVHD) [Le Blanc, 2004]. Des études *in vivo* ont montré que les MSC pourraient migrer du sang vers des tissus lésés ou enflammés et exercer des effets immunosuppresifs et antiinflamatoires. Des intégrines, des sélectines et des récepteurs des cytokines sont impliqués dans la migration de MSC à travers l'endothélium où elles interagissent directement avec des cellules présentatrices d'antigène et libèrent des facteurs de croissance et des cytokines solubles trophiques [Brooke, 2008; Chapel, 2003; Chavakis, 2008].

La GVHD est une complication de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, utilisées dans le traitement de nombreuses hémopathies malignes. Elle se caractérise par une destruction des tissus du receveur reconnus comme étrangers par les cellules immunitaires présentes dans le greffon. La principale étude dans des patients atteints de GVHD sévère corticorésistante, traités par infusion de MSC ont révélée que plus de la moitié des patients ont répondu au traitement à base de MSC et ont atteint une survie globale très élevé [Le Blanc, 2008].

Ces cellules ont été également utilisées dans le traitement de maladies autoimmunes comme la polyarthrite rhumatoïde [Bouffi, 2009], le lupus érythémateux [Zhang, 2010] et le diabète sucré où la transplantation des MSC a exercée un effet protecteur. Des études sur des modèles de diabète ont montré que les MSC pourraient atteindre le pancréas après leur infusion par voie intraveineuse et baisser sensiblement le niveau de glucose dans le sang [Ezquer, 2008].

La propriété de réparer des tissus fonctionnels avec les MSC a été utilisée pour la régénération du tissu osseux. Des MSC de moelle osseuse de souris normales ont été injectées à des souris mutées sur le gène collagène 1. Une augmentation significative de collagène et de minéraux dans l'os un mois après la transplantation est alors observée [Pereira, 1998]. De même, chez les patients jeunes atteints d'*ostéogènesis imperfecta* (OI) administrés avec des MSC allogéniques de la moelle, la vitesse de croissance et la taille du corps ont été augmentées et en même temps le taux de fractures a été diminué. De plus, la teneur en minéraux osseux a été augmentée chez certains patients et seulement quelques cellules de donneurs ont été détectées suite à l'expansion de MSC de la moelle osseuse, de l'os ou de la peau, 4-6 semaines après la transplantation [Horwitz, 2001; Horwitz, 2002].

Dans un cas récent, il a été possible de reconstituer une bronche allogénique déplétée au préalable de ces cellules et ensemencée avec des MSC cultivées à partir de moelle osseuse de la patiente. La greffe de cette bronche reconstituée a été cliniquement efficace, simplement par « remplissage fonctionnel » [Macchiarini, 2008].

Les MSC de moelle peuvent être utilisées dans des maladies autres que celles qui affectent l'os ou le cartilage en raison de leur potentiel de différenciation. Une première cible, est celle des maladies vasculaires puisque les MSC se différencient en cellules vasculaires de muscle lisse qui constituent les parois des vaisseaux, des artères aux veines [Dennis, 2002]. Dans la thérapie cardiaque, les MSC ont fourni des avantages fonctionnels dans des infarctus du myocarde et dans la cardiomyopathie ischémique [Psaltis, 2008; Ohnishi, 2007].

Les avances récents de la biologie des cellules souches sont très encourageantes et permettent d'envisager un futur prometteur. Pourtant, il restent plusieurs questions à définir, comme la source optimale de tissu à utiliser, les méthodes d'expansion des cellules, les doses et durée des traitements, les procédures de surveillance pour suivre le destin des cellules. Les réponses proviendront probablement des études fondamentales et contribueront à mieux comprendre les mécanismes impliqués.

1.3 Le rôle de l'hypoxie

Le taux physiologique d'oxygène est régulé dans les tissus des mammifères où leur concentration varie. La pression partielle en oxygène de l'air inspiré dans les alvéoles pulmonaires est de 21% pO_2 et diminue progressivement jusqu'au moment où il atteint les organes et les tissus (2%-9% pO_2) [Brahimi-Horn, 2007].

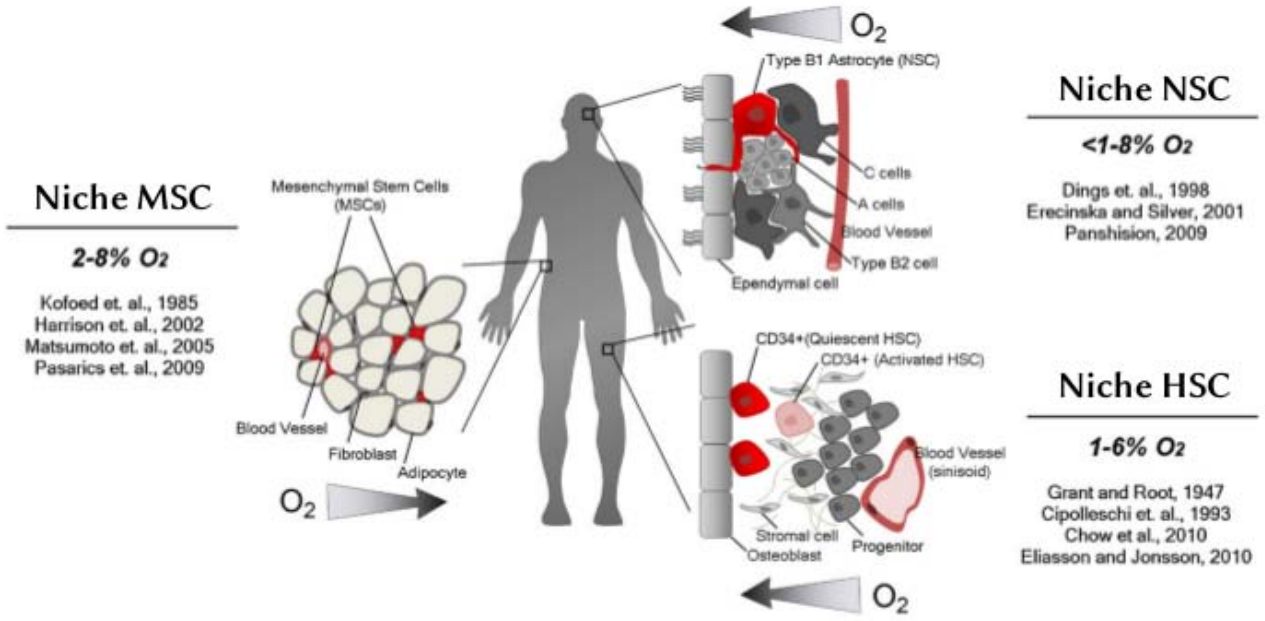

Figure 6 : Concentration d'O_2 dans des différents compartiments de cellules souches. Les cellules en couleur rouge représentent des HSC, des MSC et des NSC dans leurs niches respectives (d'après Mohyeldin, 2010).

Dans certains tissus adultes qui présentent une faible densité vasculaire et dans certaines régions du cerveau la concentration en oxygène peut diminuer jusqu'à 1% pO_2 [Yu, 2005; Erecinska, 2001]. Cette faible concentration en oxygène est appelée « hypoxie » par rapport à la concentration en oxygène de l'air ambiant, considéré comme « normoxie» (Figure 6). En réalité, la normoxie physiologique est sans doute de l'ordre de 12% pour les tissus les plus vascularisés [Mohyeldin, 2010].

Le microenvironnement des cellules souches fournit des conditions physiologiques favorables au maintien de l'état souche et la concentration d'oxygène joue un rôle central à ce sujet. L'oxygène sert à la fois comme substrat métabolique et comme molécule de signalisation. Son effet, tant sur l'auto-renouvellement et la différenciation cellulaire *in vivo* que dans la culture *in vitro* des cellules souches, dépend de la pression partielle d'oxygène et du type cellulaire.

Il existe l'hypothèse qu'une faible pression en oxygène dans les niches de cellules souches offre un avantage sélectif, adaptée à leur rôle biologique particulier [Cipolleschi, 1993]. Autrement dit, toutes les cellules qui subissent un métabolisme aérobie sont soumises à un stress oxydatif dû à la génération d'ions peroxydes (appelés ROS, pour Reactive Oxygen Species) qui peuvent endommager l'ADN. En résidant dans des compartiments anatomiques soumis à une concentration d'oxygène relativement faible (1% -5% pO_2), les cellules sont protegées et, de cette façon évitent le risque de nuire à leur ADN.

1.3.1 L'hypoxie dans le microenvironnement des cellules souches

Connaître les conditions spécifiques du microenvironnement des cellules *in vivo* sert à la compréhension de leurs fonctions ainsi que de leur comportement *in vitro*.

Par exemple, les cellules souches embryonnaires vivent à faible concentration en oxygène, depuis l'implantation jusqu'au développement du fœtus. Cette ambiance hypoxique est due à un manque d'accès à la circulation maternelle et l'oxygène arrive par diffusion [Rodesch, 1992]. Au début de la grossesse, la surface de l'utérus est à une concentration moyenne en oxygène de 2% pO_2. Même après l'établissement d'une connexion entre le fœtus et le système vasculaire de la mère, les niveaux d'oxygène placentaire augmentent seulement d'environ 8% [Genbacev, 1997].

De façon similaire, les cellules souches adultes vivent dans des conditions hypoxiques *in vivo*. La preuve la plus flagrante est celle des HSC, qui partagent leur niche avec des MSC de la moelle osseuse. Une série d'expériences au début des années 1990, ont postulé que la niche dans la moelle osseuse était hypoxique par rapport à d'autres tissus [Cipolleschi, 1993; Dello Sbarba, 1987]. Ce modèle a été basé sur l'observation que les HSC quiescentes étaient localisées dans des régions de la moelle osseuse éloignées des vaisseaux sanguins [Grant, 1947]. Plusieurs cellules stromales et progénitrices se situent entre les HSC et le vaisseau sanguin le plus proche, et entrent en compétition avec elles pour les nutriments et l'oxygène, déjà rares [Mohyeldin, 2010]. Des modèles mathématiques basés sur des études faites sur l'animal prédisent que la pression en oxygène peut atteindre jusqu'à 1% pO_2 dans la niche [Chow, 2001].

Les MSC peuvent être isolées de la moelle osseuse, du tissu adipeux, du placenta et du cordon ombilical, entre autres sources [Erices, 2000 ; Zuk, 2002]. Par analogie avec les HSC, il est postulé que les MSC de la moelle osseuse sont situées au sein d'une niche stromale caractérisée par une faible pression partielle en oxygène. En faveur de cette hypothèse, une étude récente montre une association physique étroite entre des HSC et des MSC dans la niche chez la souris. Les auteurs ont montré que des MSC-nestin(+) sont capables d'auto-renouvellement *in vivo*. La dépletion de ces cellules réduit considérablement le « homing » des HSC dans la niche [Méndez-Ferrer, 2010]. Cet article a démontré pour la première fois une fonction des MSC *in vivo*.

Un autre exemple de la niche hypoxique est celui des cellules souches neurales (Neural Stem Cell). Dans la niche neurale humaine, les NSC sont maintenues dans un état indifférencié dû, au moins en partie, à la faible pression en oxygène [Mazumdar, 2010].

1.3.2 L'effet de l'hypoxie dans la culture *in vitro* des cellules souches

Étant donné que pour une variété de niches de cellules souches, les conditions de faible pression en oxygène sont physiologiques, l'hypoxie a été incorporée aux techniques de culture cellulaire. Actuellement les études directes de l'hypoxie sur les MSC s'établissent principalement grâce aux cultures de cellules sous une atmosphère pauvre en O_2 (1%-8% pO_2) et contrôlée grâce à des incubateurs ou des chambres à hypoxie [Kinnaird, 2004; Liu, 2008; Okuyama, 2006].

Une variété d'études montre un bénéfice significatif en termes de prolifération et de maintient du « caractère souche » ou « stemness » des cellules souches quand elles sont soumises à une faible pression en oxygène.

Les ESC humaines cultivées *in vitro* à une pression en O_2 de 21% se différencient spontanément. Fait remarquable, le taux de différenciation est considérablement réduit lorsque les ESC sont cultivées à 3%-5% pO_2 [Ezashi, 2005]. De la même façon, l'hypoxie maintient les HSC dans un état immature, avec une apparence type-fibroblaste, un phénotype primitif et une capacité de prise de greffe augmentée [Eliasson, 2010]. Des études faites avec des NSC *in vitro* montrent que, en condition d'hypoxie, elles maintiennent un état indifférencié. Morrison et ses collègues ont montré que, après la culture en hypoxie des NSC de la crête neurale de rat, elles avaient une capacité plus large à proliférer et à former des colonies par rapport aux cellules cultivées dans des conditions normoxiques [Morrison, 2000]. Les auteurs ont également montré que les colonies cultivées dans des conditions hypoxiques étaient multipotentes. En ce qui concerne les MSC, il est démontré que le nombre et la taille des CFU-F ainsi que la prolifération des cellules après confluence des colonies sont augmentées par l'hypoxie [Basciano, 2011]. Il est cependant nécessaire d'évaluer les conséquences de l'hypoxie sur les MSC au niveau génétique, métabolique et enfin sur leur capacité de différenciation.

1.3.2.1 Les effets géniques de la culture en hypoxie

Au niveau des gènes intervenants dans le cycle cellulaire, une faible pression en O_2 induit dans des MSC, des augmentations des transcrits de gènes qui régulent positivement le cycle cellulaire (activation de la voie Akt, diminution/augmentation de Bax/Bcl2, activation des gènes de pluripotence comme Rex-1 et Oct-4) et donc délivre un signal de multiplication fort [Li, 2009; Li, 2007; Lord-Dufour, 2009; Okuyama, 2006; Pacary, 2007]. Ce signal assez constant dans les modèles

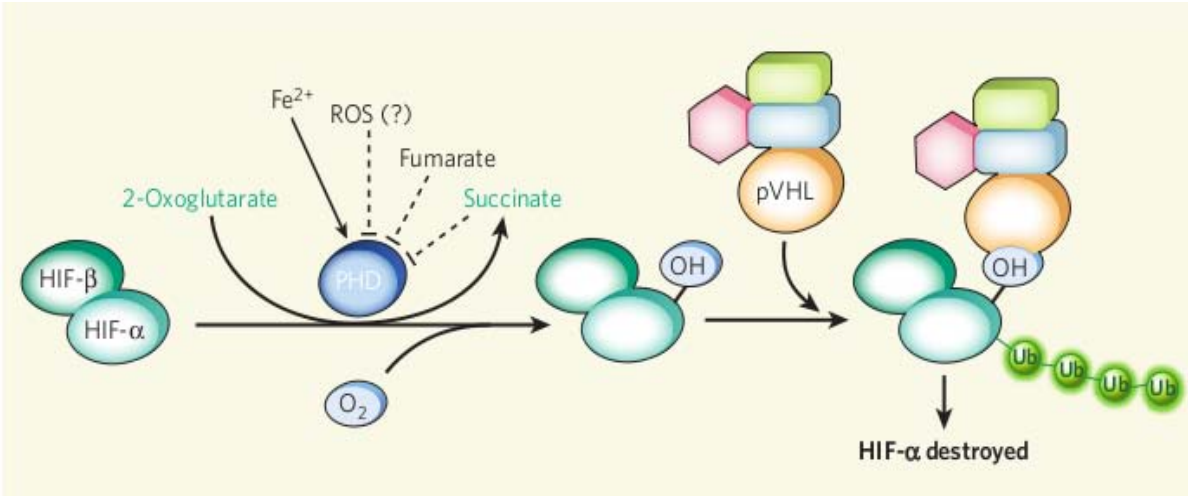

Figure 7 : Régulation de la fonction d'HIF. HIF est un hétérodimère composé d'une sous-unité α et d'une sous-unité β. En présence d'O_2, HIF-α est hydroxylée par des membres de la famille des enzymes PHD (propyl hydroxylase domain). En plus de l'O_2, ces enzymes nécessitent du 2-oxoglutarate, un intermédiaire du cycle de Krebs, et du Fe2+. Elles sont inhibées par des concentrations élevées de certains autres métabolites du cycle de Krebs tels que le fumarate, le succinate et peut-être par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (d'après Kaelin, 2010).

étudiés est accompagné par une action de l'hypoxie sur la différenciation cellulaire. Ainsi, il a été rapporté que l'hypoxie était associée à la multiplication mais aussi à la différenciation chondrocytaire [Kanichai, 2008], neuronale [Pacary, 2007], osseuse [Potier, 2007], cardiomyocytaire [Xie, 2006] et stromale [Risbud, 2004]. Enfin et toujours précocement, l'hypoxie entraîne, chez les MSC, des modifications de l'expression des gènes codant pour des constituants de la matrice extracellulaire, ou des enzymes qui la modifient.

1.3.2.2 Les effets dans le métabolisme cellulaire

Le métabolisme est modifié au niveau de la transcription et de la dégradation du facteur de transcription induit par l'hypoxie ou HIF (Hypoxia-Inducible Factor). L'HIF est un hétérodimère formé d'une chaîne alpha et une chaîne beta, structurellement proches. En condition de normoxie, les protéines HIF-α sont reconnues et ubiquitinées par la protéine suppresseur de tumeur Von Hippel Lindau (pVHL), qui fait partie du complexe de l'ubiquitine ligase E3. La pVHL reconnaît l'HIF-α hydroxylée. En condition d'hypoxie, l'HIF-α qui est le facteur limitant n'est pas reconnu par la pVHL et se dimérise avec son partenaire HIF-β et se lie à d'autres co-activateurs. Ce complexe migre dans le noyau où il agit comme facteur de transcription de nombreux gènes impliqués notamment dans l'angiogenèse [Ezashi, 2005] (Figure 7).

Les MSC répondent à l'hypoxie en produisant de l'ATP par la voie de la glycolyse [Mylotte, 2008]. Dans ce schéma, une molécule de glucose produit 2 pyruvates et 4 ATP. Les cellules hypoxiques accroissent leur consommation en sucres par activation de la glycolyse et passent à une respiration de type anaérobie. Elle est caractérisée par une augmentation de production de lactates à partir de l'acide pyruvique, qui ont un effet amplificateur sur les HIF [Chen, 2008].

1.3.2.3 Les effets dans la croissance et la capacité à se différencier des cellules

L'hypoxie stimule la croissance et la survie des MSC par l'induction des HIF. Cet effet n'est pas propre aux MSC mais bien à toutes les cellules indifférenciées des mammifères [Carmeliet, 1998]. La culture en hypoxie prévient la différenciation des cellules souches embryonnaires [Ezashi, 2005] et contribue à l'homéostasie des HSC dans leur niche [Cipolleschi, 1993]. On a postulé par analogie avec les HSC, que les MSC seraient situées dans la même niche hypoxique de la moelle osseuse [Baksh, 2004 ; Méndez-Ferrer, 2010]. De nombreux travaux ont été faits sur l'expansion de MSC en hypoxie, tout en conservant un caractère indifférencié [Carrancio, 2008 ; Grayson, 2006 ; Tsai, 2011 ; Dos Santos, 2009].

La culture en hypoxie favorise la différenciation des MSC en chondrocytes [Kanichai, 2008]. Des MSC cultivées dans du milieu spécifique complémenté en TFG-β dans un environnement à 2% d'O_2 génèrent plus de chondrocytes. Ceux-ci produisent plus de collagène II et de protéoglycanes parallèlement à une stimulation de la voie de survie AKT, ainsi que de la voie de stress p38 MAP kinase. Ces deux voies sont responsables de la stimulation de l'expression d'HIF-α par l'hypoxie. L'hypoxie favorise aussi la différenciation des MSC en ostéocytes et en adipocytes [Chen, 2008; Carrancio, 2008; Grayson, 2006; Zou, 2011; Valorani, 2010] bien que ce dernier point soit controversé [Martin-Rendon, 2007].

1.3.2.4 Les effets sur les fonctions antiinflammatoires, immunomodulatrices et protectrices des cellules

Il est démontré actuellement que les MSC n'induisent pas de réponse immune après transfert chez un hôte allogénique ou xénogénique que ce soit au sein d'un tissu ou par injection intraveineuse [Krampera, 2007; Lietchy, 2000]. Il a été ensuite démontré que les MSC ont une action immunosuppressive dans des modèles allogéniques et xénogéniques [Le Blanc, 2003; Ishida, 1994; Imanishi, 2008]. Il n'existe actuellement pas d'études sur la modulation de ces fonctions par

l'hypoxie. En revanche, une fonction potentiellement importante des MSC est leur capacité à protéger des tissus hypoxiques de l'apoptose. En effet, il est clair que suite à un infarctus les cellules privées d'oxygène (cardiaques ou nerveuses) meurent par nécrose. Ces cellules libèrent alors des facteurs toxiques qui déclenchent la mort des cellules avoisinantes (effet « bystander ») mais cette fois par apoptose. Ce dernier effet est contré par les MSC injectées localement en partie grâce à leur sécrétion de SDF1/CXCL12 [Zhang, 2007].

Les MSC produisent du VEGF et favorisent l'angiogenése et la revascularisation du tissu infarci. L'hypoxie active les voies de STAT3 et de la p38 MAP kinase et elles mêmes stimulent l'expression et la production de VEGF [Sadat, 2007; Wang, 2007]. De plus, l'apoptose expérimentale des cardiomyocytes est prévenue par l'injection des adipocytes dérivés de MSC [Sadat, 2007].

1.3.3 L'hypoxie et la fonction mitochondriale

Il est bien connu que la densité et l'activité des mitochondries varient dans les différents types de cellules en raison des différents niveaux de la demande d'énergie [Williams, 1986]. De plus, l'importance de la fonction mitochondriale dans la différenciation des cellules somatiques a été démontrée dans des plusieurs types cellulaires tels que les érythroblastes [Kaneko, 1988], les neurones [Vayssiere, 1992], les myoblastes [Herzberg, 1993], des préadipocytes [Moyes, 1997] et les ostéoblastes [Komarova, 2000].

Chez les eucaryotes, la plus grande partie de la formation d'ATP aérobie se déroule dans la mitochondrie, ou l'accepteur ultime d'électrons est l'oxygène. Ce processus est appelé respiration aérobie, contrairement aux métabolismes qui n'utilisent pas l'oxygène comme accepteur d'électrons, appelé respiration anaérobie.

Lors d'une hypoxie, la cellule doit s'assurer la synthèse d'ATP. Une diminution critique de la synthèse d'ATP peut induire une accumulation de Ca^{2+} dans la mitochondrie qui provoque des lésions cellulaires irréversibles [Snyder, 2009]. Cependant, la cellule a la possibilité de moduler son métabolisme et de produire de l'ATP par voie anaérobique. Plusieurs mécanismes d'adaptation à l'hypoxie permettent aux cellules de détecter des variations dans la pression en oxygène et d'exprimer de gènes par activation d'HIF [Semenza, 1994]. La mitochondrie pourrait jouer un rôle central dans cette adaptation cellulaire.

1.3.3.1 Les mitochondries et l'adaptation à l'hypoxie

La mitochondrie est, depuis longtemps, suggérée comme pouvant être un détecteur de la quantité d'oxygène au sein de la cellule. Les transporteurs d'électrons sont organisés sur la membrane interne mitochondriale en complexes respiratoires. Lors d'une hypoxie, la production des espèces radicalaires de l'oxygène serait le signal initiateur de plusieurs mécanismes d'adaptation cellulaire, comme la régulation d'HIF. Il apparaît que l'hydroxylation d'HIF-α pourrait être prévenue par la génération des espèces radicalaires de l'oxygène mitochondriaux [Bell, 2007; Schumacker, 2005; Loor, 2008; Chandel, 2000]. Cela s'appuie sur le fait que les cellules dépourvues d'ADN mitochondrial semblent incapables d'assurer la stabilisation d'HIF-α au cours de l'hypoxie. De même, l'administration d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale inhibe la stabilisation hypoxique d'HIF-α [Chandel, 2000].

1.3.3.2 La biogenèse mitochondriale

L'homéostasie mitochondriale est déterminée par des interactions complexes entre la biogenèse, la dégradation, la dynamique et les fonctions de l'organelle. Parmi d'autres fonctions, le système HIF est le régulateur principal de la densité mitochondriale [Zhang, 2007], par induction de MXI1, un modulateur négatif de la biogenèse mitochondriale et un membre de la famille Myc [Corn, 2005]. Dans ce mécanisme de suppression, le facteur de transcription oncogénique Myc est impliqué. Dans des conditions normales, Myc peut dimériser avec son partenaire activé Max et directement transactiver des gènes nécessaires à la réplication de l'ADN mitochondrial et pour l'expression de la protéine TFAM (Transcription Factor A Mitochondrial) [Li, 2005]. TFAM est essentielle pour l'expression du génome mitochondrial. En condition d'hypoxie, HIF active MXI, qui déplacera Max pour inactiver Myc, ce qui diminue l'expression de TFAM, la masse mitochondriale, et par conséquent la respiration [Jezek, 2010]. Cependant, le mécanisme est plus complexe, parce que tant Myc que HIF coopèrent pour stimuler l'expression d'autres gènes de régulation [Kim, 2007].

1.3.3.3 Mitochondries et apoptose

Des études des MSC cultivées en hypoxie montrent qu'elles ont une survie augmentée quand elles sont implantées dans des tissus ischémiques. L'activation d'Akt induite par l'hypoxie réduit l'expression du gène pro-apoptotique Bax et augmente l'expression de Bcl-2. La réduction globale de l'apoptose s'éleve à 80% par rapport aux contrôles. Quand les cellules sont exposées à l'hypoxie pour un court temps, Bax s'accumule dans les mitochondries en augmentant le rapport Bax/Bcl-2. Ceci

provoque un dysfonctionnement mitochondrial et l'activation secondaire de la caspase-3 qui conduit à l'apoptose [Zhu, 2006]. Comme une réaction de survie, la phosphorylation d'Akt et de p38 conduit à la stabilisation de HIF-1α [Kanichai, 2008] et à l'augmentation de Bcl-2. Bcl-2 peut alors contrebalancer l'accumulation de Bax, et protège les cellules de l'apoptose [Das, 2010].

Chapitre 2. Objectifs de l'étude

Dans cette étude, nous avons eu comme objectif d'analyser l'effet de la pression en oxygène sur les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine en culture. Nous avons décrit plus haut la présence des MSC de la MO dans une niche hypoxique. Notre hypothèse principale est que la culture de MSC à pression en oxygène de 5% les rapproche de leurs propriétés physiologiques *in vivo*, la propriété principale étant leur caractère multipotent. Cette multipotence doit se traduire par une expression génique et un potentiel de différenciation distincts entre des MSC cultivées à 5% pO_2 et des MSC cultivées, comme décrit par la plupart des équipes, à 21% pO_2. L'hypothèse secondaire est que la biogenèse mitochondriale devrait être diminuée en condition d'hypoxie. Enfin, un effet possible de l'hypoxie sur le phénotype de ces cellules analysées par immunomarquage a été exploré.

Nous avons comparé le taux de croissance cellulaire et de formation de CFU-F des MSC cultivées sous des conditions d'oxygène de 21% et 5%, et l'expression des marqueurs de surface des cellules au début (P0) et après deux moins en culture (P2), dans chacune des conditions d'oxygène.

Le potentiel des cellules à générer des lignages adipocytaires et osteocytaires a été évalué. La morphologie des MSC et la quantité de mitochondries intracellulaires ont été comparées par microscopie électronique après culture prolongée des cellules.

Le profil de la transcription des MSC cultivées tant en normoxie qu'en hypoxie aux passages 1 et 2 ont été comparés à l'aide des « puces à ADN ». Les gènes différentiellement exprimés ont été groupés. Pour ce faire, le programme Gene Ontology a été utilisé [Ashburner, 2000].

Les résultats obtenus au cours de ces études indiquent que la culture des MSC en condition d'hypoxie à long temps ont confirmé notre hypothèse. Ils montrent que l'hypoxie stimule la croissance des MSC et suggère surtout que leur potentiel multipotent est augmenté car plusieurs gènes impliqués dans le développement de cellules nerveuses et épithéliales ont été induits.

Chapitre 3. Matériels et Méthodes

3.1 La culture cellulaire des MSC

Nous avons utilisé des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine (Hôpital d'Enfants – CHU Brabois – Vandœuvre-lès-Nancy). Ces cellules sont cultivées à partir de moelle osseuse de donneurs sains. Ces prélèvements sont réalisés conformément aux procédures approuvées par les comités éthiques des hôpitaux.

3.1.1 Réactifs

- α-MEM Eagle avec EBSS (α-MEM) (réf. BE12-169F, Lonza, France)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose (4,5 g/L) (DMEM-HG) (réf. 41965, Invitrogen, France)
- DMEM sans rouge de phénol (réf. 11880, Invitrogen, France)
- Antibiotiques :
  - Pénicilline (réf. 15070, Invitrogen, France)
  - Amphotéricine B (réf. 15290, Invitrogen, France)
- Glutamine (réf. 25030, Invitrogen, France)
- Sérum de veau fœtal (SVF) (réf. 10270-106, Invitrogen, France)
- Tampon Hank's balanced salts solution sans Ca2+ ni Mg2+ stérile (HBSS) (Réf. H2387, Sigma-Aldrich, France)
- Trypsine-EDTA à 0,05% (réf. 25300, Invitrogen, France)
- Tampon phosphate salin (PBS) (réf. 14190, Invitrogen, France)
- Diméthyl sulfoxyde (DMSO) (réf. D5879, Sigma-Aldrich, France)
- Solution de cristal violet (réf. HT90132, Sigma-Aldrich, France)
- Dexaméthasone (réf. D4902, Sigma-Aldrich, France)
- Acide L-ascorbique (réf. A4544, Sigma-Aldrich, France)
- TGF-β1 (réf. T0793, Sigma-Aldrich, France)
- Insuline-transferrine-acide sélènique (ITS) (réf. I1884, Sigma-Aldrich, France)
- Pyruvate de sodium (réf. P5280, Sigma-Aldrich, France)
- L-Proline (réf. P5607, Sigma-Aldrich, France)

- Indométhacine (réf. 57413, Sigma-Aldrich, France)
- Insuline (réf. I5500, Sigma-Aldrich, France)
- Bleu de trypan (réf. T8154, Sigma-Aldrich, France)
- Solution de congélation : DMSO à 10% ; SVF à 90%
- Oil red O solution (réf. O0625, Sigma-Aldrich, France)
- Alizarin red solution (pH: 4.1; réf. A5533 Sigma-Aldrich, France)

Composition des milieux de culture :

◆ Milieu complet pour la culture des MSC (milieu de croissance) :

Milieu α-MEM
SVF à 10% (décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C)
Glutamine 2 mM
Pénicilline 100 U/mL
Amphotéricine B 2,5 µg/mL

◆ Milieu de différenciation en adipocytes (milieu de différenciation A) :

Milieu α-MEM
Dexamethasone 1 µM
Indométhacine 60 µM
Insuline 5 µg/mL
Sérum de veau fœtal 10%
Glutamine 2 mM
Pénicilline 100 U/mL
Amphotéricine B 2,5 µg/mL

◆ Milieu de différenciation en ostéocytes (milieu de différenciation O) :

Milieu α-MEM
Acide L-ascorbique 60 µM
β-glycérol phosphate 10 mM
Dexaméthasone 0.1 µM
Sérum de veau fœtal 10%
Glutamine 2 mM
Pénicilline 100 U/mL
Amphotéricine B 2,5µg/mL

3.1.2 Protocoles

3.1.2.1 Obtention des prélèvements et mise en culture des MSC

Les prélèvements du sang de la moelle osseuse sont obtenus par ponction de la crête iliaque du donneur. Pour éviter la formation d'un caillot sanguin l'héparine est utilisée comme anticoagulant. Les cellules sont lavées avec du milieu de culture complet en les centrifugeant à 300g pendant 10 minutes. Les cellules sont suspendues dans du milieu de culture complet et comptées avant d'être ensemencées. Le comptage est réalisé en utilisant la solution Leucoplate® qui lyse les globules rouges. Avec cette solution les globules rouges sont lysés après 3 minutes d'incubation et les cellules mononucléaires (MNC pour mononuclear cells) restantes sont comptées dans une cellule de Thoma (réf. A4500T, Bioblock, France). Elles sont mises en culture dans des flacons stériles en plastique de 75 cm^2 de surface et à une densité cellulaire de 50.000 cellules nucléées par cm^2 dans 10mL de milieu de croissance. Les cellules sont incubées dans une étuve à 37°C et avec des conditions d'oxygène variables selon le type de culture souhaité, soit dans un incubateur à 21% O_2 (normoxie) soit à 5% O_2 (hypoxie). Le premier changement de milieu est effectué deux jours après pour éliminer les cellules non adhères. Le milieu est renouvelé deux fois par semaine pendant 21 jours.

3.1.2.2 Passages en sous-culture et amplification

Au bout de trois semaines en culture primaire les cellules se divisent jusqu'à 70-80% de confluence et ceci sera le passage 0 (P0). Afin de les amplifier, les cellules sont détachées et remises en culture à faible densité et cultivées pendant 2 semaines pour chaque passage (P1, P2 et P3), dans flacons stériles en plastique de 75 cm^2 de surface. À bout de 2 semaines en culture les cellules sont lavées deux fois avec tampon HBSS afin d'éliminer les traces de sérum que inhiberaient l'action de la trypsine et ensuite détachées en les incubant pendant 2-5 minutes avec de la trypsine-EDTA à 37°C, qui est la température à laquelle la trypsine est active. Les cellules sont récupérées sous la forme de culot cellulaire, puis suspendues dans du milieu de culture et comptées en les diluant 2x avec le colorant bleu de trypan. Les cellules vivantes ne retiennent pas le colorant et cette propriété les distingue des cellules mortes qui sont colorées en bleu. On peut alors compter les cellules vivantes à l'aide de la chambre de Thoma. Après le comptage elles sont ensemencées à une densité de 500 cellules par cm^2 à 37°C avec 5% CO_2. Nous avons trouvé que la concentration de 500 cellules/cm^2 était un bon compromis entre la quantité de CFU-F formées et le nombre de cellules obtenues (selon

les résultats des essais de culture dans des boîtes de Petri de 60 cm^2). La pression en oxygène pour la culture et l'amplification des MSC étant de 21% O_2 où 5% O_2 selon le mode de culture en P0.

3.1.2.3 Comptage des CFU-F

Pour le comptage des CFU-F, les cellules sont cultivées dans des boîtes de Petri de 60 cm^2 à une densité de 1000 et 10000 MNC/cm^2 pour le P0 et à une densité de 100 et 1000 cellules/cm^2 pour P1, P2 et P3. Deux semaines après la mise en culture, les CFU-F sont comptées en utilisant une solution de cristal violet. Les boîtes sont lavées 2 fois avec 5mL du PBS à 37°C, 5mL de cristal violet sont ajoutés et les plaques sont laissées sous agitation pendant 15 minutes. Ensuite, les boîtes sont bien rincées avec de l'eau distillée. Les colonies sont violettes maintenant et par conséquent nous pouvons les compter. Les boîtes sont scannées pour déterminer la taille des colonies contenant plus de 30 cellules par colonie en utilisant le software « Image J ». Les essais ont été faites tant en normoxie comme en hypoxie, selon le mode de culture des cellules en P0.

3.1.2.4 Congélation des cellules

Les cellules qui sont trypsinées et qui ne sont pas utilisées tout de suite peuvent être stockées pendant de longues périodes à la température de l'azote liquide (180°C). Les cellules trypsinées sont lavées avec du milieu de culture et centrifugées. Le culot cellulaire obtenu est suspendu à 10^6 cellules/mL dans du milieu de congélation qui empêche la formation de cristaux de glace délétères pour les cellules. La suspension est répartie dans des cryotubes à raison de 1mL/tube et les cryotubes déposés dans une boîte de congélation, qui fait descendre lentement la température des cellules. 24 heures après, le tube est mis dans l'azote liquide.

Pour la décongélation des cellules, elles sont mises à température ambiante et ensuite lavées avec du milieu de culture réchauffé pour éliminer le DMSO présent dans de milieu de congélation. Après le lavage, elles sont suspendues dans du milieu de culture complet et mises en culture selon les conditions requises.

3.1.2.5 Différenciation des MSC

Les cellules MSC à P2 ont été différenciées en adipocytes et ostéocytes. Nous avons choisi des MSC qui ont été cultivées jusqu'à P2 en considérant que la culture devient plus homogène avec les sous-passages. Pour chaque essai de différenciation nous avons fait une mise au point des conditions de culture. La densité de cellules mise en culture et les milieux utilisés sont différents selon le type

des cellules attendues. Pour l'obtention des adipocytes nous avons ensemencés 50 MSC/cm² et pour des ostéocytes, nous avons mis 10 MSC/cm². Les cellules sont cultivées dans des puits de 9,8 cm² ou dans des boîtes de 60 cm² pendant 14 jours avec du milieu de culture. Une fois que les cellules sont amplifiées, le milieu est remplacé par du milieu de différenciation spécifique pour chaque type de cellule : milieu de différenciation A pour adipocytes et O pour ostéocytes. Les cellules sont cultivées pendant 21 jours avec le milieu de différenciation correspondant, qui est renouvelé 2 fois par semaine. La différenciation a été faite en normoxie et en hypoxie.

3.1.2.6 Coloration des cellules différenciées

Après 21 jours de culture avec du milieu de différenciation adipocytaire, les cellules sont rincées avec du PBS, fixées avec du formaldéhyde à 10% et lavées avec l'isopropanol à 60%. Pour la coloration elles sont incubées avec la solution Oil red O pendant 30 minutes.

Pour la coloration des ostéocytes, les cellules cultivées pendant 21 jours avec de milieu de différenciation sont rincées avec du PBS et fixées avec de l'éthanol froid à 70%. Puis, elles sont incubées avec la solution de coloration Alizarin red S (pH: 4.1) pendant 20 minutes.

3.2 Techniques analytiques

3.2.1 Cytométrie en flux

3.2.1.1 Principes

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

3.2.1.1.1 Expression des marqueurs de surface cellulaire

Les récepteurs exprimés à la surface des cellules sont reconnus spécifiquement par un anticorps directement couplé à un fluorochrome.

3.2.1.1.2 Marquage des mitochondries par sondes directes

La sonde diffuse passivement à travers la membrane plasmique de la cellule et s'accumule spécifiquement dans les mitochondries actives. Le réactif chimique MitoTracker orange CMTMRos est une sonde qui à l'état réduit n'est pas fluorescente jusqu'à ce qu'elle entre dans les cellules vivantes. Elle réagit avec les protéines de la mitochondrie par réaction d'oxydoréduction et de couplage covalent et reste séquestrée dans la mitochondrie où elle devient fluorescente.

3.2.1.2 Réactifs

- Dulbecco's Modified Eagle Medium sans rouge de phénol (DMEM sans rouge de phénol) (réf. 11800, Invitrogen, France)
- MitoTracker orange CMTMRos (réf. M7510, Invitrogen, France)
- Anticorps (Tableau 2)

3.2.1.3 Protocoles

3.2.1.3.1 Expression des marqueurs de surface cellulaire

Les MSC en culture sont détachées des flacons de culture en utilisant la trypsine, dénombrées et lavées avec du milieu de culture DMEM sans rouge de phénol. Elles sont réparties à une concentration de 100 cellules/µl dans un volume de 100µl de milieu DMEM par tube à hémolyse. L'étape suivante est une incubation avec les anticorps correspondants, mentionnés dans le Tableau 2. La quantité d'anticorp ajoutée varie selon le fournisseur (20µl pour BC et BD, 5µl pour SC). Après une incubation de 20 minutes à l'abri de la lumière, le marquage est arrêté en ajoutant 500µl de DMEM sans rouge de phénol, suivi d'une centrifugation à 1400 rpm pendant 5 minutes. Ensuite, le culot est suspendu dans 350µl de DMEM sans rouge de phénol.

Anticorps	Conjugué	Isotype	Référence
Anti-CD34	FITC	IgG1 Mouse	IM1870, BC
Anti-CD45	FITC	IgG1 Mouse	A07782, BC
Anti-CD90	PE	IgG1 Mouse	IM3600U, BC
Anti-CD105	PE	IgG3,k Mouse	A07414, BC
Anti-CD271	PE	IgG1, k Mouse	557196, BD
Anti-CD106	PE	IgG1, k Mouse	555647, BD
Anti- CD166	PE	IgG1, k Mouse	559263, BD
Anti-CD73	PE	IgG1, k Mouse	550257, BD
Anti-CD29	APC	IgG1, k Mouse	559883, BD
Anti-CD44	APC	IgG2b, k Mouse	559942, BD
Anti-STRO-1	PE	IgM Mouse	sc-47733, SC
Contrôle Isotypique	APC	IgG2b, k Mouse	555745, BD
Contrôle Isotypique	PE	IgG1, k Mouse	555749, BD
Contrôle Isotypique	PE	IgM Mouse	sc-2870, SC
Contrôle Isotypique	APC	IgG1, k Mouse	555751, BD
Contrôle Isotypique	FITC	IgG1, Mouse	A07795, BC
Contrôle Isotypique	PE	IgG1, Mouse	A07796, BC

Tableau 2 : Anticorps impliqués dans les immunomarquages directs : BC (Beckman Coulter) ; BD (BD Biosciences) ; SC (Santa Cruz). FITC: Fluorescein isothiocyanate; PE: Phycoérythrine; APC: Allophycocyanine.

3.2.1.3.2 Marquage des mitochondries par sondes directes

Les MSC en culture sont incubées avec de Mitotracker orange CMTMRos à une concentration de 100 nM, pendant 45 min at 37°C. Elles sont lavées, trypsinées et réparties à une concentration de 100 cellules/µl dans un volume de 100µl de milieu DMEM sans rouge de phénol par tube à hémolyse.

3.2.2 Réaction de polymérisation en chaîne

3.2.2.1 Principes

3.2.2.1.1 Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR pour polymerase chain reaction)

La PCR amplifie une séquence d'ADN donnée. Deux types d'oligonucléotides d'ADN, sens ou antisens, servent d'amorce pour la synthèse du gène désirée sur des simples brins de l'ADN. La réaction de synthèse est catalysée *in vitro* par une enzyme ADN Taq polymérase isolée d'une

bactérie thermophile, stable à des températures élevées. L'ADN a amplifier est mis en présence de la Taq Polymerase, des amorces sens et antisens, de dNTP, et subit plusieurs cycles (jusqu'à 35) d'amplification en thermocycleur. Chaque cycle double la quantité d'ADN synthétisé. La longueur de l'ADN (en pair de bases) correspond à la distance entre les deux amorces d'origine.

L'ADN d'intérêt peut être aussi bien de l'ADN génomique que de l'ADN complémentaire obtenu par transcription inverse à partir d'un extrait d'ARN messagers (ARN poly-A). Étant donné que l'ARN est instable, il est transformé en ADN complémentaire (ADNc) par la transcriptase inverse des rétrovirus. Cette technique est appelée RT-PCR (reverse transcriptase-PCR) [Alberts, 2007].

3.2.2.1.2 PCR quantitative en temps réel (Quantitative real-time PCR où qPCR)

La méthode de la qPCR est basée sur la détection d'un signal fluorescent qui est produit de façon proportionnelle à l'amplification du produit de PCR. Elle nécessite un thermocycleur couplé à un système de lecture optique qui mesure une émission de fluorescence. Une sonde nucléotidique est synthétisée de telle sorte qu'elle puisse s'hybrider sélectivement à l'ADN d'intérêt. Le SYBR est une molécule qui s'intercale au niveau des chaînes double brin d'ADN et qui ne devient fluorescent que s'il se lie à l'ADN double brin et dont l'augmentation de fluorescence est proportionnelle au produit de PCR.

3.2.2.2 Réactifs

- RNeasy® Mini Kit (réf. 74104, Qiagen, France)
- Éthanol absolu (réf.32221, Sigma-Aldrich, France) utilisé à 70% (v/v dans de l'eau sans nucléase)
- iScriptTM cDNA Synthesis Kit (réf. 170-8891, Bio-Rad, France).
- Eau DEPC (réf. 750024, Invitrogen, France)
- Solution de dNTP Mix10mM (réf. 18427-013, Invitrogen, France).
- Platinum® Taq DNA Polymérase (réf. 10966-034, Invitrogen, France)
- Tampon de PCR 10x (sans $MgCl_2$) (réf. y02028, Invitrogen, France)
- Solution de $MgCl_2$ 10mM (réf. y02018, Invitrogen, France)
- Amorces pour l'amplification des gènes spécifiques de la différenciation des MSC (Tableau 3) et amorces utilisés pour développer la qPCR (Tableau 4)

- Tampon de charge 5x : Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, glycérol 25% (p/v), EDTA 5 mM, bleu de bromophénol 0.2% (p/v), Xylène Cyanol FF 0.2% (p/v) (réf, 161-0767, Bio-Rad, France)
- Agarose (réf. H070928, Euromedex, France) utilisée à 1,2% (dans un tampon d'électrophorèse TEB 0,5x)
- Tampon d'électrophorèse TEB 10x : acide borique 0,89 M, EDTA 20 mM, Tris 0,89 M (réf. 161-0733, Bio-Rad, France) dilué 10x dans l'eau distillée
- Bromure d'éthidium (réf. E-8751, Sigma-Aldrich, France) utilisé à 0,5 µg/mL
- Marqueur de taille d'ADN de 100pb (réf. 15628-019, Invitrogen, France)
- Power SYBR Green Master Mix (réf. 4367659, Applied Biosystems, USA)

Gène	**Amorces**	**Taille, bp**
GAPDH (NM_002046.3)	Fw: 5'-AATCCCATCACCATCTTCCAGG-3' Rv: 5'-AGAGGCAGGGATGATGTTCTGG-3'	417
ALPL (NM_000478)	Fw: 5'-CTGGACCTCGTTGACACCTG-3' Rv: 5'-GCGGTGAACGAGAGAATGTC-3'	546
LPL (NM_000237.2)	Fw: 5'-AAAGCCCTGCTCGTGCTGAC-3' Rv: 5'-ACAGGATGTGGCCCGGTTTA-3'	406
PPARG (NM_005037.5)	Fw: 5'-GGAGAAGCTGTTGGCGGAGA-3' Rv: 5'-CACAATGCTGGCCTCCTTGA-3'	431
RUNX-2 (NM_001015051.2)	Fw: 5'-AACTTCCTGTGCTCGGTGCTG-3' Rv: 5'-GGGGAGGATTTGTGAAGACGG-3'	268

Tableau 3 : Amorces pour l'amplification des gènes spécifiques de différenciation par PCR qualitative (GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; ALPL : alkaline phosphatase ; RUNX2 : runt-related transcription factor 2 ; PPARG : peroxisome proliferator-activated receptor-γ ; LPL : lipoprotein lipase ; pb : pair de bases).

Gène	Amorces	Taille, bp
HoxA11 (NM_005523.5)	Fw: 5'-TTGAGCATGCGGGACAGTT-3' Rv: 5'-GTACCAGATCCGAGAGCTGGAA-3'	87
OXCT-2 (NM_022120.1)	Fw: 5'-GAGTTCAACGGCGACCACTT-3' Rv:5'-GCGCTTCTCCTGAAGACCA-3'	110
v-KIT (NM_000222.2)	Fw: 5'-GGCGACGAGATTAGGCTGTT-3' Rv: 5'-CATTCGTTTCATCCAGGATCTCA-3'	77
CCL2 (NM_002982.3)	Fw: 5'-ACTCTCGCCTCCAGCATGAA-3' Rv: 5'-GGGAATGAAGGTGGCTGCTA-3'	72
CX3CL1 (NM_002996.3)	Fw: 5'-TGACATCAAAGATACCTGTAGC-3' Rv: 5'-CTCGTCTCCAAGATGATTGC-3'	88
WNT4 (NM_030761.4)	Fw: 5'-AGCAACTGGCTGTACCTG-3' Rv: 5'-CTGGATCAGGCCCTTGAG-3'	87
GAPDH (NM_002046.3)	Fw: 5'-CGCTCTCTGCTCCTCCTGTT-3' Rv: 5'-CCATGGTGTCTGAGCGATGT-3'	81

Tableau 4 : Amorces pour l'amplification de gènes par qPCR (HoxA11 : homeboxA11 ; OXCT-2 : 3-oxoacid CoA transferase 2 ; v-KIT : Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog ; CCL2 : chemokine (C-C motif) ligand 2 ; CX3CL1 : chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 ; WNT4 : wingless-type MMTV integration site family, member 4 ; GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

3.2.2.3 Protocoles

3.2.2.3.1 Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN des cellules est faite avec du matériel « RNase-free ». Le protocole est fait selon les indications du RNeasy® Mini Kit. Les cellules sont lavées avec du PBS froid pour éliminer des traces du milieu de culture. Ensuite, elles sont détachées à l'aide d'un grattoir, dissociées et homogénéisées avec du tampon RTL (600µl/10cm²). Pour éviter qu'il reste des agrégats de cellules, le lysat est passé 5 fois dans une aiguille de 0.9 mm de diamètre. Le lysat est homogénéisé avec 1 volume d'éthanol 70%. Les ARN sont alors purifiés sur une colonne RNeasy Mini. Le lysat versé dans une colonne est centrifugée 15 sec à 8000g. Le filtrat est éliminé et les ARN restent sur la colonne. Ils sont digérés par la DNase en ajoutant 700µl de tampon RW1 suivi d'une centrifugation de 15sec à 8000g. Le filtrat est éliminé et 500µl du tampon RPE sont ajoutés pour laver la colonne. On effectue deux lavages. Les échantillons sont centrifugés 2 min à 8000g pour laver la colonne. Ensuite, une deuxième centrifugation est faite pour sécher la membrane de la colonne. Pour la filtration de l'ARN, la colonne est transférée sur un nouveau tube collecteur de 1,5mL. 40µl d'eau sans nucléase sont

déposés sur la membrane et les colonnes centrifugées pour 1 min à 8000g. Les ARN peuvent être conservées à -70°C.

3.2.2.3.2 Rétrotranscription des ARNm

Une quantité de 100 fg jusqu'à 1µg d'ARN obtenue dans l'étape antérieure est utilisée pour la synthèse de l'ADNc. À cette fin sont utilisées des amorces de polydT que se fixent sur la séquence poly-Adénylée des ARNm et synthétisent de l'ADNc par la méthode de transcription inverse. La rétrotranscription est réalisée dans un volume final de 20µl :

iScript Reaction Mix 5x	4µl
iScript Reverse Transcriptase	1µl
Eau sans nucléase	xµl
Brin d'ARN	xµl
Volume total	20µl

La réaction s'effectue par des incubations de 5 minutes à 25°C, 30 minutes à 42°C, 5 minutes à 85°C et puis le tube est maintenu à 4°C. La réaction est exécutée dans un MyCycler® (Bio-Rad, USA). Les ADNc peuvent être gardés à -70°C jusqu'à la réalisation de la PCR.

3.2.2.4 Réaction de PCR qualitative

L'amplification des ADNc obtenus dans l'étape précédente est réalisée dans un volume final de 50µl. Les amorces utilisées sont cités dans le Tableau 4.

Composant	**Volume**	**Concentration finale**
Tampon de PCR10X (-Mg)	5µl	1X
10 mM dNTP mixture	1µl	0,2 mM chaque un
50 mM $MgCl_2$	1,5µl	1,5 mM
Amorce Forward 10 µM	1µl	0,2 µM
Amorce Reverse 10 µM	1µl	0,2 µM
Taq Polymérase	0,2µl	1.0 unit
ADNc	2µl	
eau DEPC	c.s.p. 50µl	

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

- 30 secondes de dénaturation à 94°C

- 60 secondes d'hybridation des amorces à 58°C
- 60 secondes d'élongation à 72°C

Ce cycle est répété 30 fois, puis les échantillons sont soumis à 10 minutes d'élongation à 72°C. Ensuite ils sont maintenus à 4°C. Les ADNc peuvent être gardés à -70°C jusqu'à la réalisation de l'électrophorèse.

3.2.2.4.1 Electrophorèse des produits de PCR

Les produits d'amplification de PCR sont mis en évidences par migration dans un gel d'agarose. À cet effet, une quantité variable d'agarose est dissoute dans de tampon d'électrophorèse TEB 0.5x, puis le tout est chauffé jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissoute. Le gel est alors transféré dans une cuve dans laquelle est placé un peigne. Lorsque le gel est polymérisé, le peigne est retiré formant ainsi des puits pour déposer les échantillons d'ADN. Pour la migration on dépose 8µl d'échantillon d'ADN mélangés avec 2µl de tampon de charge 5x dans les puits de gel. Parallèlement, 4µl de marqueur de taille sont déposés. La migration est réalisée à un voltage constant de 80V pendant 90 minutes environ dans du tampon TEB 0.5x. Puis le gel est coloré au bromure d'éthidium pendant 20 min. Les fragments d'ADN amplifiés sont visualisés sous rayonnement ultra-violet (Bio-Rad gel doc 1000, USA) et photographiés. La taille des fragments est comparée à un marqueur de taille. L'analyse densitométrique est alors réalisée avec le logiciel d'image Quantity One (BioRad, USA).

3.2.2.4.2 PCR en temps réel (PCR quantitative)

L'amplification d'ADNc des cellules cultivées tant en normoxie qu'en hypoxie est réalise par qPCR en utilisant les amorces nommées dans le Tableau 4. Les réactions sont faites dans un volume de 25µL contenant de l'ADNc et du Master Mix. Elles suivent un processus en deux étapes : 15 sec à 95°C plus 1 min à 60°C, pendant 40 cycles. La détection est faite avec le système Mastercycler® eprealplex real-time PCR (Eppendorf). La quantité relative d'ARN est calculée en utilisant l'équation $2^{-\Delta Ct}$ avec GAPDH comme calibreur.

3.2.3 Analyse des données d'expression issues des puces à ADN

3.2.3.1 Principe

La technologie des puces à ADN (ou microarrays) est une technique qui permet d'obtenir des mesures de la concentration relative des ARN messagers d'une cellule dans un état physiologique donné. Il s'agit des lames garnies d'un grand nombre de fragments d'ADN (50-70mer), chacune contentant une séquence des nucléotides qui sert de sonde pour un gène spécifique. La position et la séquence exacte de chaque sonde sur la puce est connue, de cette façon tout fragment nucléotidique qui s'hybride sur une sonde peut être identifié. L'utilisation d'une puce à ADN pour suivre l'expression génique commence par l'extraction des ARNm dans les cellules à étudier. Dans notre étude, nous utilisons un type particulier de puces à ADN qui requiert de la génération d'ARN complémentaire (ARNc) fluorescent. Dans la procédure de synthèse des ARNc fluorescents, un amorce contenant un fragment poly-dT et un promoteur T7 polymerase s'hybride avec la queue poly-A de l'ARN. Ensuite, une enzyme transcriptase inverse synthétise le premier et deuxième brin d'ADNc. Enfin, l'ARNc est synthétisé à partir de l'ADNc double brin à l'aide d'une enzyme T7 ARN polymérase, qui intègre simultanément de la cyanine marquée (excitée par un laser à 532 nm). Une fois que le marquage est terminé, la puce est hybridée avec les échantillons d'ARN. Les gènes dont l'expression diffère entre les échantillons sont facilement identifiables en utilisant un système de détection laser. L'interprétation biologique des données nécessite de corréler les résultats à des informations contenues dans certaines bases de données, comme par exemple Gene Ontology (GO). GO est un projet bio-informatique qui permet de cadrer des gènes ou leurs produits d'expression selon une ontologie commune à toutes les espèces. Sur des bases des données, trois ontologies ont été développées. À l'aide de GO nous pouvons associer un gène à un processus biologique, à une fonction moléculaire et/ou à une localisation cellulaire.

La GO permet d'analyser une expérience de puce à ADN dans sa globalité.

3.2.3.2 Réactifs

- RNeasy® Mini Kit (réf. 74104, Qiagen, France)
- Agilent Whole Human Genome Oligo Microarray Kit (Catalog 60-mer Oligo, Agilent Technologies Inc., CA, USA)

- Agilent's Low ARN Input Linear Amplification Kit PLUS (réf. 5188-5339, Agilent Technologies Inc., CA, USA)
- Agilent 4×44K Whole Human Genome GE arrays (Agilent Design #014850, Agilent Technologies Inc., CA, USA)
- Agilent Feature Extraction Software (Version 9.5.3.1, Agilent Technologies Inc., CA, USA)
- Agilent GeneSpring GX10 (Agilent Technologies Inc., CA, USA)

3.2.3.3 Protocole

3.2.3.3.1 Synthèse et marquage fluorescent d'ARNc

Pour la réalisation de l'analyse de l'expression de gènes avec Agilent Whole Human Genome Oligo Microarray Kit nous avons utilisé l'ARN total de MSC traitées dans des conditions normoxiques où hypoxique, à P0 et à P2. Pour chaque échantillon, une synthèse d'ADNc et puis d'ADN double brin est faite à partir de 350ng d'ARN total. À l'aide d'Agilent's Low ARN Input Linear Amplification Kit PLUS, cet ADN est utilisé comme support pour la synthèse et le concomitante marquage d'ARNc avec du Cyanine3-CTP (cy3). Après l'obtention des ARNc marqués, les échantillons sont déposes sur un module de Nanodrop pour puces à ADN pour mesurer l'efficacité du marquage et les quantifier.

3.2.3.3.2 Purification des ARNc marqués

Le volume total de chaque échantillon obtenu dan l'étape précédente est ajusté à 100µl avec de l'eau « RNase-free ». Ensuite, du tampon RTL et d'éthanol pur sont ajoutées à chaque échantillon et le volume total est transféré sur une colonne RNeasy mini et centrifugé pendant 30 secondes, 13000rpm à 4°c. Après lavage de la colonne deux fois avec 500µl de tampon RPE (additionné d'éthanol pur), les ARN marqués sont élués avec 30µl d'eau « RNase-free », centrifugés 30s à 13000rpm et récupérés dans un tube d'élution annoté. Les échantillons sont dosés au Nanodrop. Ceux qui peuvent être utilisés pour l'hybridation, doivent avoir une quantité totale des ARN ≥ 1,65µg et une activité spécifique {[cy3]/[ARN] x 1000} ≥ 9.

3.2.3.3.3 Hybridation et lavage des puces

Chaque échantillon contenant 1,65µg d'ARNc marqué avec le cy3 est mélange avec du « Agilent 4×44K Whole Human Genome GE arrays10x Blocking » et du « 25x Fragmentation Buffer »,

puis incubé 30min à 60°c pour permettre la fragmentation d'ARNc. Du tampon « 2X GEx Hybridization HI-RPM » est ajouté et le tube est centrifugé 1min à 13000rpm à température ambiante. A la fin, 100µl du mélange sont déposés délicatement, sans bulles d'air, dans chaque chambre puis recouvertes par les puces (Agilent 4×44K Whole Human Genome GE arrays). Les puces, fixées sur leurs supports, sont placées dans le four d'hybridation, à 65°c sous une faible rotation, pendant toute la nuit. Après, les lames sont lavées avec quatre solutions de lavage consécutives : « Gene Expression Wash Buffer 1 » (à T° ambiante) et « Gene Expression Wash Buffer 2 » (à 37°C) mélangées avec 2mL de Triton X-102 à 10%, une solution d'acétonitrile et une solution de stabilisation.

3.2.3.3.4 L'analyse des biopuces

Les lames hybridées sont scannées par un scanner Agilent Microarray Scanner G2565CA, en utilisant le logiciel Agilent Scan Control, et les données sont obtenues sous forme d'un tableau. Les signaux sont détectés selon deux intensités : élevée (100%) et faible (10%). Chaque puce est scannée et les informations contenues dans ces images sont extraites en utilisant le logiciel Agilent Feature Extraction. Ce logiciel donne un rapport du contrôle de qualité de chaque image pendant le processus d'extraction des données. Nous obtenons un histogramme des signaux montrant une courbe des gènes réprimés et exprimés (seuil entre -1 et 5) ainsi que un tableau montrant la statistique linéaire du contrôle interne ou « Spike-in ».

Finalement, les fichiers obtenus par le logiciel Agilent Feature Extraction sont chargés dans le logiciel Agilent GeneSpring®GX10 pour une nouvelle analyse. Les caractéristiques qui ont été marqués par le logiciel d'extraction comme hors ligne, saturées ou bien au dessous d'un seuil sont classée et exclue de l'analyse. Le logiciel compile et analyse les données normalisées (fond soustrait) sur l'expression (cut-off inférieure et supérieure à 20 et 100 respectivement pour 100% du signal) et sur l'erreur (CV<50% à 100% du signal). Seuls les gènes qui sont exprimés de manière différentielle 2 fois, sur 4 puces, sont calculés comme significatifs et utilisés pour l'analyse. Les gènes sont classés selon Gene Ontology ($p<0,1$). Les analyses de l'expression de gènes ont été répétées 4 fois chacun.

Enfin, pour chaque transcrit l'analyse statistique de 3-4 échantillons, a été basée sur le test U de Mann & Whitney.

3.2.4 Études microscopiques

3.2.4.1 Microscopie électronique

3.2.4.1.1 Principes

Le microscope électronique à transmission produit des images à partir des électrons qui traversent l'objet. Le microscope électronique se compose d'une grande colonne creuse qui enferme le faisceau d'électrons et d'une console qui sert à contrôler électroniquement le fonctionnement dans la colonne. Au sommet de la colonne se trouve la cathode de tungstène qui représente la source d'électrons. L'air est extrait de la colonne pour obtenir un vide permettent l'accélération des électrons. La formation de l'image dépend de la dispersion différentielle des électrons par les différentes parties de l'objet. S'il n'y a pas d'échantillon, tout le champ est clair. Par contre, si une partie des électrons frappent les atomes d'un objet, ils sont dispersés proportionnellement à la taille du noyau des atomes qui composent l'objet. La dispersion des électrons pour obtenir le contraste souhaité est augmentée par la fixation et la coloration de la préparation dans des solutions de métaux lourds. On obtient des photographies de l'image en écartant l'écran d'observation et en permettent aux électrons de frapper un film photographique placé sous l'écran.

3.2.4.1.2 Réactifs

- Glutaraldéhyde 2,5% (réf. R1009, Agar Scientific, France)
- Cacodylate de Na (réf. R1102, Agar Scientific, France)
- Oxyde de propylène (réf. 1080, Agar Scientific, France)
- Tétroxyde d'osmium (réf. 19172, Electron Microscopy Sciences, USA)
- EMBED SPI-pon 812 (réf. 13940, Electron Microscopy Sciences, USA)
- DDSA (réf. 26544-38-7, Electron Microscopy Sciences, USA)
- NMA (réf. 25134-21-8, Electron Microscopy Sciences, USA)
- DMP30 (réf. 90-72-2, Electron Microscopy Sciences, USA)

3.2.4.1.3 Protocole

Les cellules sont cultivées en monocouche sur des lames en verre pour le marquage avec du MitoTracker CMTMRos où bien elles sont cultivées dans des flacons stériles, trypsinées et mise en

culot pour poursuivre le processus de fixation. Dans les deux cas les cellules sont cultivées en condition de normoxie et hypoxie. Les cellules sont fixées pendant 2 h à 4°C dans 2,5% de glutaraldéhyde contenant 0,1 M cacodylate de Na, puis rincées pendant 3 h dans du tampon cacodylate et incubées pendant 30 min à température ambiante dans du tampon cacodylate avec 1% de tétroxyde d'osmium. Ensuite, elles sont rincées et déshydratées dans des concentrations croissantes d'éthanol (30, 50, 70, 80, 90%) pendant 5 min, puis dans de l'éthanol à 100% 3x pendant 20 min. Enfin, les cellules sont intégrées dans un mélange 50/50 volume à volume de résine et d'oxyde de propylène. Un volume de 30mL de résine EMS est obtenu en mélangeant 18,2mL d'EMBED (SPI-pon 812), 12,4mL de DDSA, 9,4mL NMA, et de 0,7mL de DMP30. Les cellules sont traitées deux fois avec du xylène à 100% et des sections semi minces (1,5 mm) ou ultra minces (70-90 nm) sont réalisées en utilisant un microtome ultra (Reichert-Yung). Les sections sont observées sur un microscope électronique Phillips CM12 et photographiés.

Pour obtenir les images de microscopie optique de la coloration des mitochondries, les cellules sont incubées avec 100 nM de MitoTracker CMTMRos, pendant 45 min à 37°C, lavées dans du PBS, et photographiées sur un Olympus DP-70 microscope.

Chapitre 4. Résultats

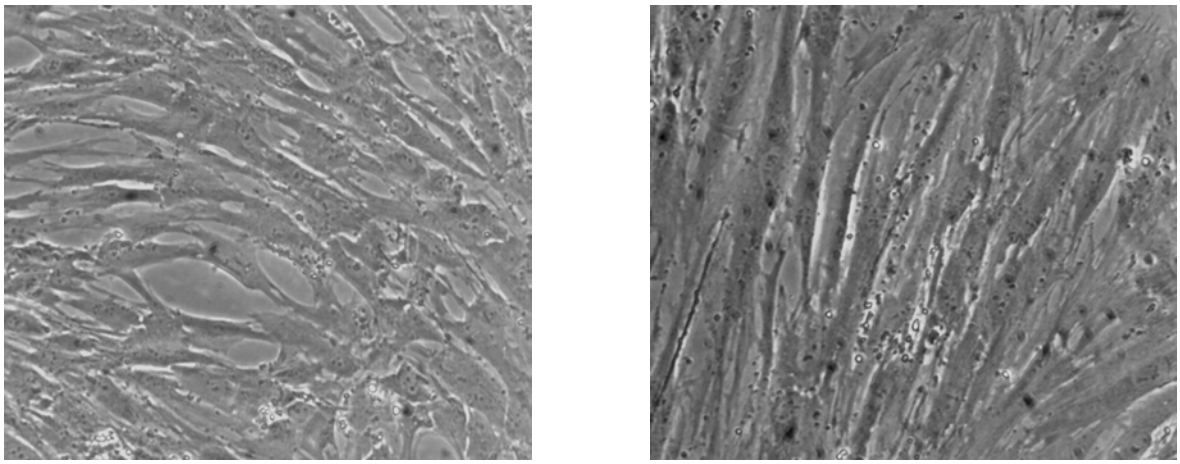

Figure 8: Image des MSC avec le microscope optique (20X).

4.1 L'effet de l'hypoxie sur l'expansion des MSC

L'expansion *in vitro* des MSC (Figure 8) est une étape préalable indispensable à leur utilisation en recherche. En effet, plusieurs études ont montré la sensibilité des MSC à la densité d'ensemencement, au nombre de passages, au milieu de culture et aux facteurs de croissance [Colter, 2000]. À cette fin, nous avons analysé la capacité de formation des colonies et la prolifération cellulaire comme une première partie de notre étude. Nous avons cherché les conditions de culture qui assurent un taux d'expansion optimal des MSC de la moelle osseuse humaine. Pour cela nous avons varié la densité d'ensemencement et la pression en O_2 dans laquelle elles ont été cultivées.

Les cellules ont été cultivées tant en condition de normoxie (21% pO_2) comme en condition d'hypoxie (5% pO_2) à chaque passage (P0, P1, P2 et P3). Nous avons analysé le nombre total de CFU-F et la taille moyenne des colonies obtenues. Pour ceci, les cellules ont été ensemencées tant en normoxie que en hypoxie, et en deux concentrations différentes (Figure 9). Les MNC ensemencés soit à 1000 MNC/cm², soit à 10000 MNC/cm², ont donné moins de colonies et plus petites après 21 jours de culture (P0) avec une pression en O_2 de 5% par rapport aux MNC cultivées à 21% de pression en O_2 ($0.05<p<0.1$). Par contre, cette différence a été moins significative à P1 tant pour les MSC ensemencées à 100 cellules/cm² que à 1000 cellules/cm². À partir de P2, les cellules cultivées en hypoxie montrent une tendance à augmenter le nombre de CFU-F, avec une taille moyenne de colonies similaire entre les deux conditions (Figure 10 et Figure 11). Les résultats sont fondés sur des valeurs moyennes obtenues d'après 3 à 5 expériences indépendantes.

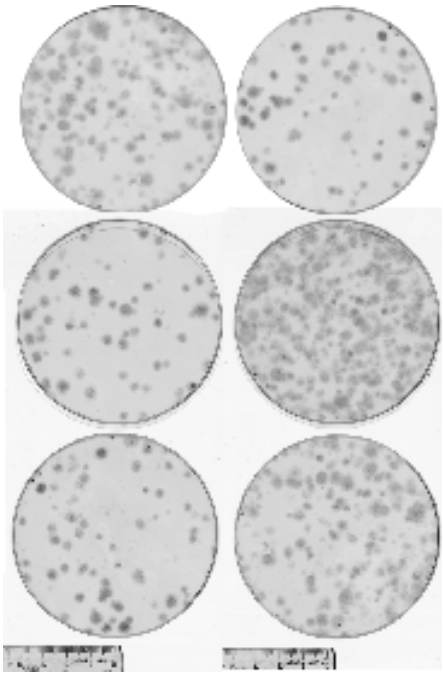

Figure 9: Image représentative des colonies cultivées en N ou H à différents passages.

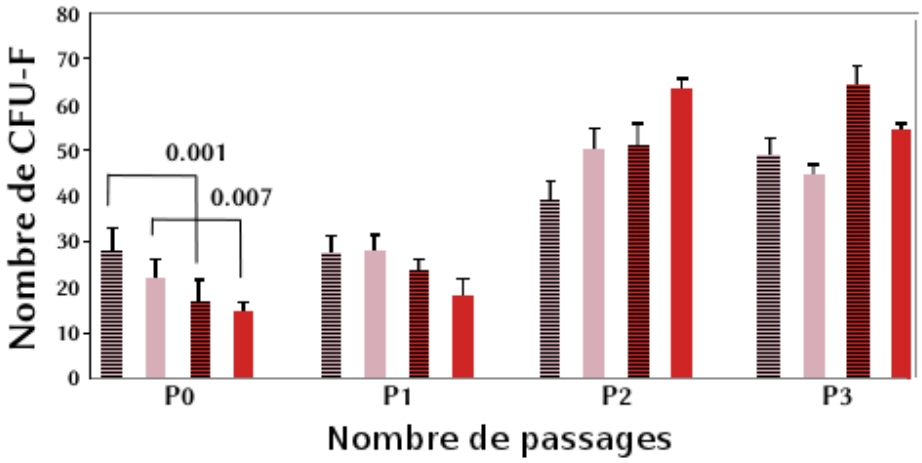

Figure 10 : L'effet de la pression en O_2 sur le nombre des CFU-F en différents passages. Les MSC ont été ensemencés au 100 cellules/cm² (histogrammes à rayures) et 1000 cellules/cm² (histogrammes lisses), sous condition de pression de 5% O_2 (histogrammes rouges) ou de 21% O_2 (histogrammes roses), respectivement. Les chiffres en-dessus de l'histogramme représentent les chiffres significatives calculés en utilisant un test t de Student.

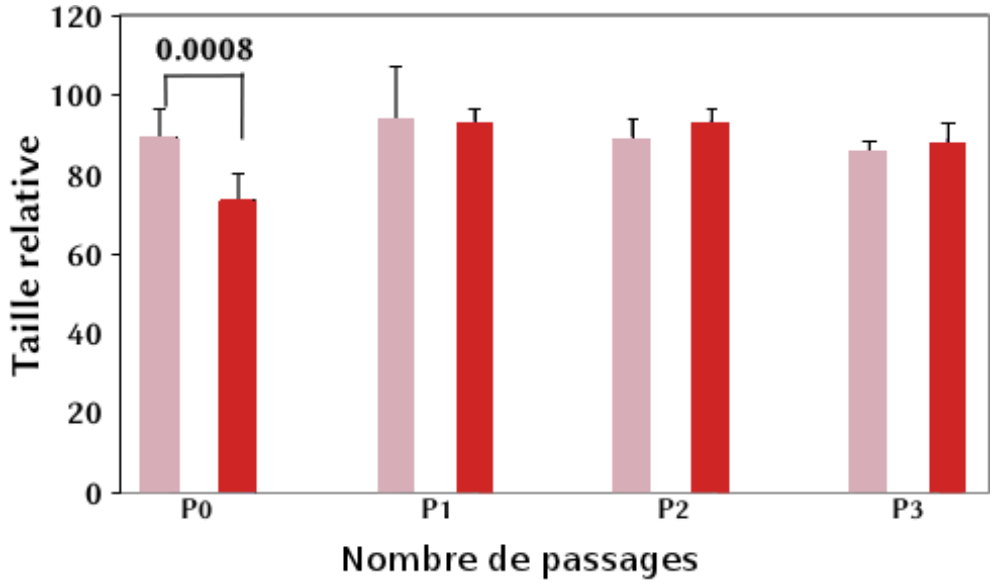

Figure 11 : L'effet de la pression en O_2 sur la taille des CFU-F en différents passages. Les MSC ont été cultivées en condition de pression de 5% O_2 (histogrammes rouges) ou de 21% O_2 (histogrammes roses), respectivement. La chiffre en-dessus de l'histogramme représente les chiffres significatives calculées en utilisant un test t de Student.

En bref, les cellules suivent une phase de latence pendant laquelle les MSC hypoxiques croissent plus lentement que les cellules normoxiques. Cependant, dans les passages ultérieurs, les MSC en hypoxie augmentent progressivement en nombre.

4.2 Caractérisation phénotypique des MSC en différentes conditions d'0_2

L'immunomarquage et la cytométrie en flux ont été réalisés au cours des différents passages. Les MSC n'expriment pas les récepteurs CD45 et CD34, molécules caractérisant les HSC. Par contre, elles sont positives, quoique variables, pour plusieurs autres marqueurs comme : CD90, CD105, CD106, CD166, CD73, CD29, CD44, STRO-1 (Figure 12).

Les cellules cultivées montrent un profil typique de MSC avec un phénotype stable pendant le temps. De plus, elles n'exhibent pas de différences phénotypiques indépendamment de la tension en oxygène dans laquelle elles ont été cultivées. Le marqueur STRO-1 est inhibé dans le 50% des cellules à P0 en condition d'hypoxie et le marqueur CD271 ne s'exprime que faiblement à P0 puisque c'est un marqueur de MSC natifs (voir Tableau 1).

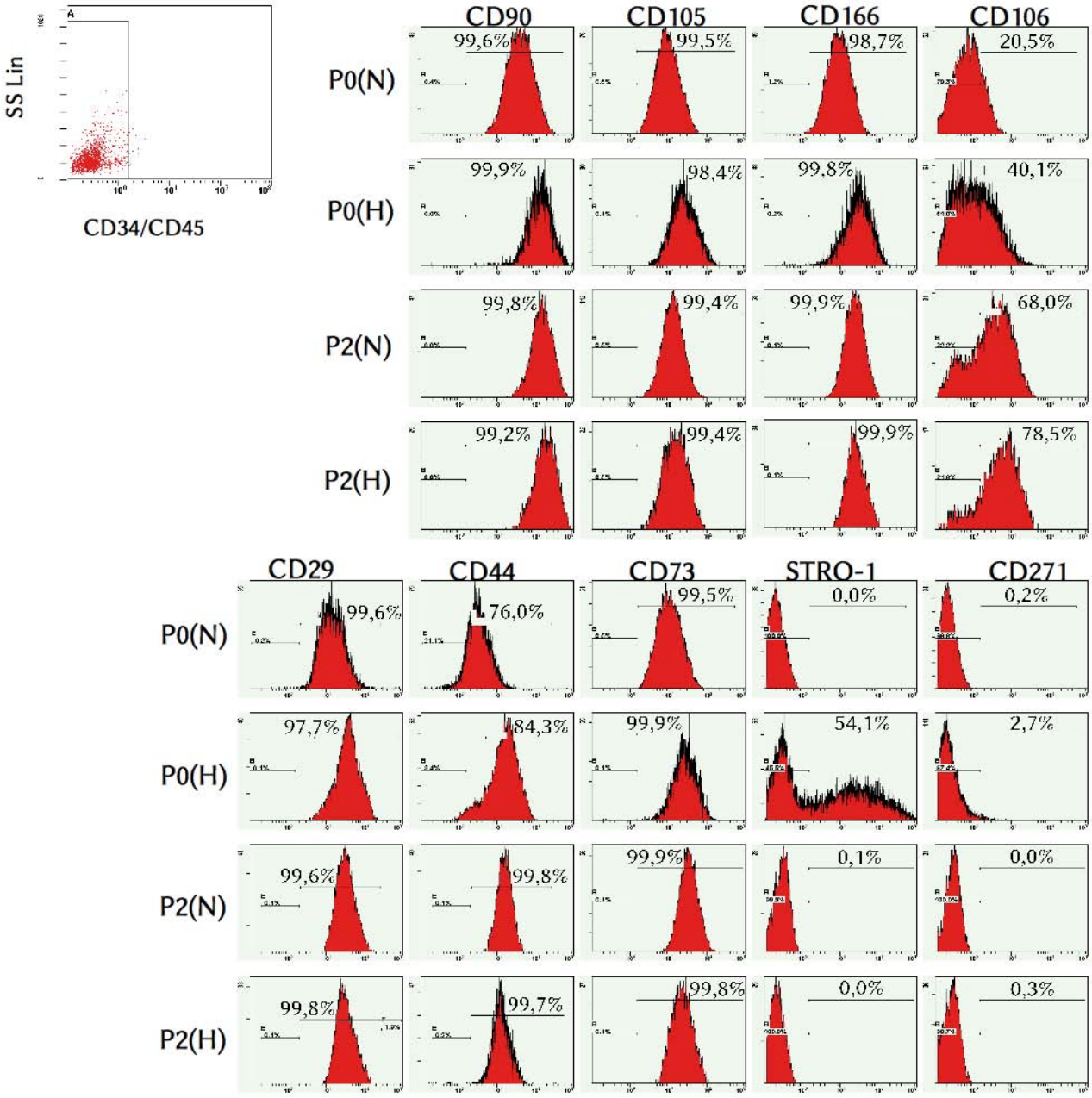

Figure 12 : Stabilité du phénotype des MSC dans la culture. Cytométrie en flux des marqueurs de surface au P0 et P2 en H ou N. Les histogrammes montrent l'intensité de plusieurs marqueurs dans une population des MSC CD34/CD45 négative enrichie de la moelle osseuse.

En conclusion, nous avons observé que l'effet d'une faible pression en O_2 sur les MSC en culture, n'affecte pas le phénotype de la surface cellulaire.

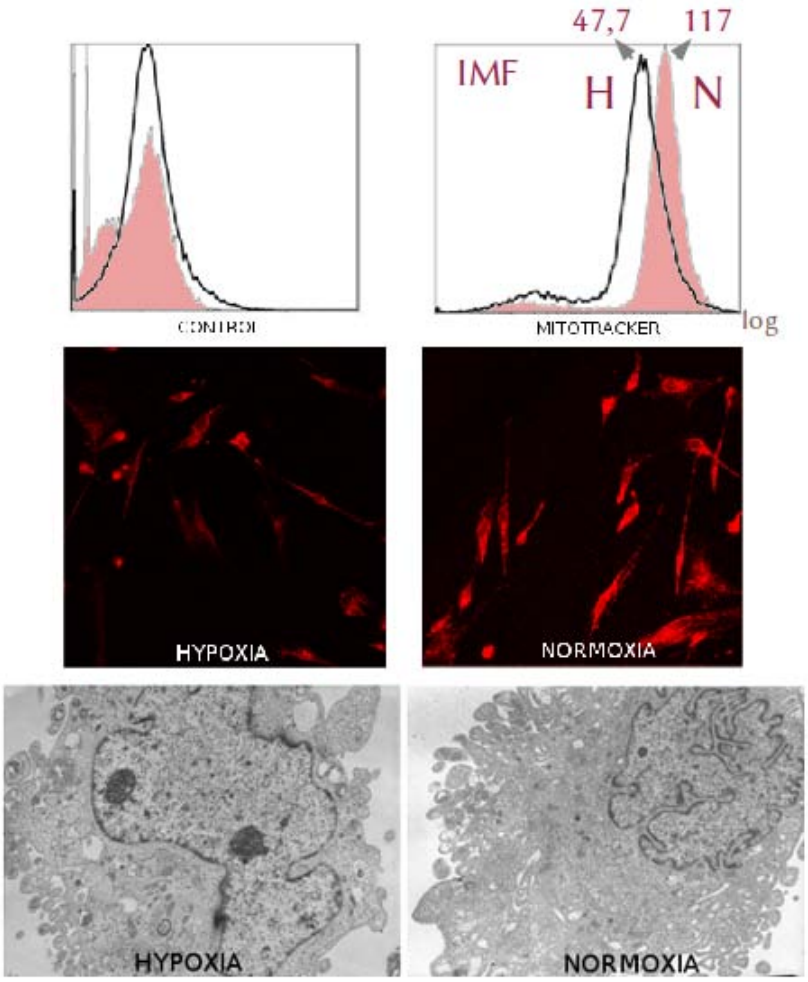

Figure 13 : Aspect morphologique des MSC. L'intensité de fluorescence des mitochondries a été mesure par cytométrie en flux (en haut). Les mitochondries ont été colorées avec de MitoTracker Orange et quantifiées (au centre) et observées par microscopie électronique (en bas). Les expériences ont été réalisées sur des MSC à passage P2, en condition de normoxie ou hypoxie.

4.3 La culture des MSC en hypoxie et sa relation avec la biogenèse mitochondriale

En cherchant des effets qualitatifs de l'hypoxie sur des MSC, nous avons étudié la morphologie des MSC par microscopie optique et électronique, des cellules hypoxiques comme des cellules normoxiques à P2. À cet égard, nous avons marqué des MSC avec du marqueur MitoTracker et elles

ont été analysées par cytométrie en flux. L'intensité de fluorescence moyenne des cellules hypoxiques par rapport aux cellules normoxiques était de 47,7 versus 117 sur les histogrammes (Figure 13, en haut). Le nombre de mitochondries a été évalué aussi par microscopie de fluorescence, dans des MSC marquées avec du MitoTracker, comme le montre la Figure 13 (au centre). En comptant les mitochondries, nous avons observé une inhibition de 50 à 75% de la biogenèse mitochondriale en condition d'hypoxie. Les cellules normoxiques ont montrée plus d'intensité que les cellules hypoxiques. La microscopie électronique à transmission (MET) nous à permis d'examiner la morphologie des cellules (Figure 13, en bas). En hypoxie, elles paraissent être moins différenciées que celles en normoxie, ayant des noyaux plus larges et moins convolutés, et avec plus de nucléoles. Les cellules en hypoxie présentent aussi un rapport noyaux/cytoplasme plus élevé, même si la taille des cellules est très similaire dans les deux conditions.

Avec ceci, on preuve que l'hypoxie inhibe la biosynthèse des mitochondries dans des MSC en culture.

4.4 La culture en hypoxie à long terme stimule la différenciation des MSC

Des MSC ont été cultivées jusqu'à P2 en hypoxie comme en normoxie. Ensuite, le milieu de culture a été changé par du milieu de différenciation spécifique de lignage ostéogénique et adipogénique, respectivement. Des expériences de coloration histologique conventionnelle ont été effectuées après 21 jours de culture avec du milieu de différenciation. Une image des adipocytes colorés avec du Oil red et une image des ostéocytes colorés avec du Alizarin red sont montrées dans la Figure 14, en haut. Les MSC hypoxiques ont été plus efficaces dans la génération des cellules spécifiques de lignages adipocytaires et ostéoblastiques. Comme le montrent ces deux expériences représentatives, le pourcentage des colonies adipocytaires et ostéoblastiques provenant des MSC cultivées en hypoxie a varié entre 50% et 100% par rapport aux cellules cultivées en normoxie (Figure 14, en bas).

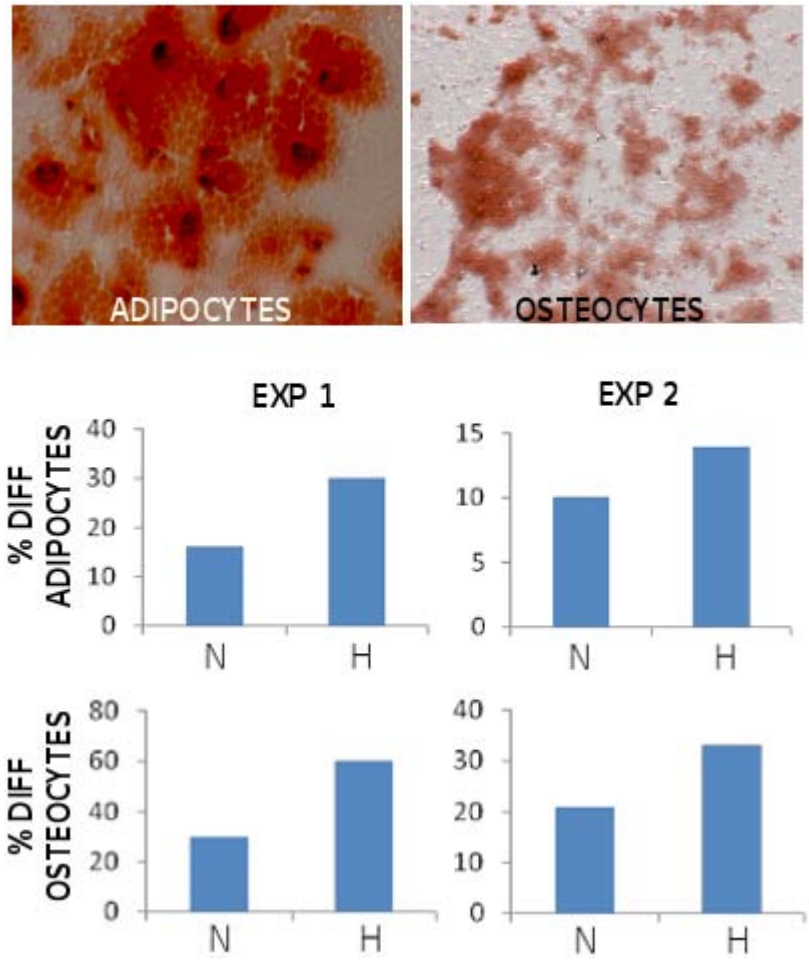

Figure 14 : La culture en hypoxie augmente le potentiel des MSC à se différencier dans les différents lignages mésenchymateux. En haut, les colonies différenciées en adipocytes et ostéocytes sont évidences par coloration cytologique avec les solutions de Oil Red O (adipocytes) ou Alizarin Red (ostéocytes). En bas, les colonies ostéocytaires et adipocytaires ont été comptées.

4.5 Les MSC hypoxiques expriment des gènes de différenciation

L'amplification des transcrits spécifiques de lignage pour adipocytes (LPL et PPARg) et pour ostéocytes (ALPL et RUNX2) a été faite par RT-PCR. Pour ceci, nous avons extraite l'ARN des MSC cultivées jusqu'à la fin du P2, avant de les cultiver avec du milieu de différenciation. Comme le montrent ces deux expériences représentatives, l'expression d'ALPL a été plus élevée en cellules hypoxiques. De plus, RUNX2 ne s'exprime pas dans des cellules en normoxie mais il est exprimé en hypoxie (Figure 15).

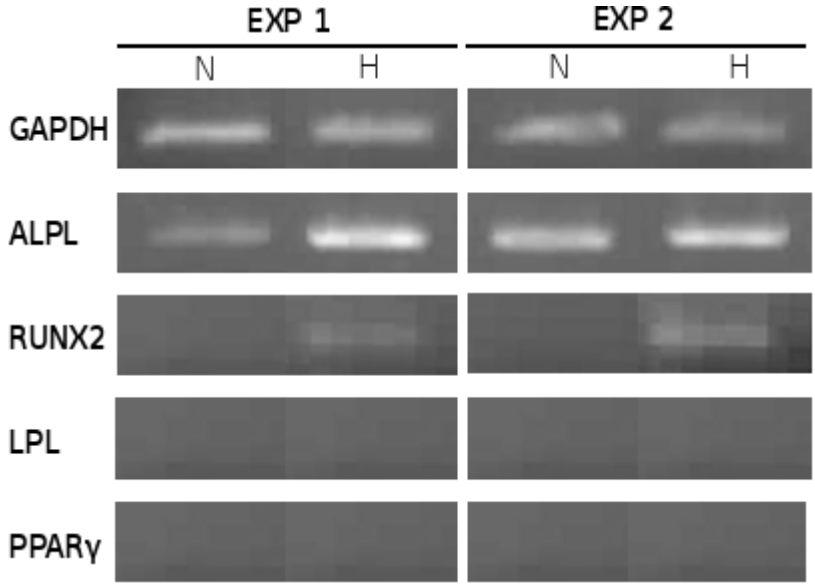

Figure 15 : Les gènes représentatives des lignages ostéocytaire (ALPL, RUNX2) et adipocytaire (LPL, PPARgamma) ont été amplifiés par RT-PCR avec des amorces spécifiques. Le gène de GAPDH a été amplifié comme contrôle.

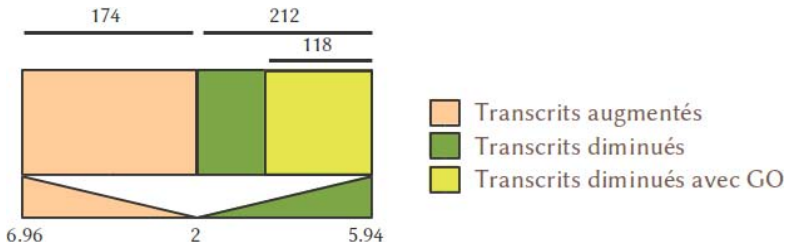

Figure 16 : Reprogrammation génétique des MSC en hypoxie à P0. Les MSC de trois donneurs ont été cultivées jusqu'à P0 avant l'extraction de l'ARN et l'hybridation sur puces à ADN Agilent. L'analyse des transcrits GO exprimés de façon différentielle à P0 est montrée (N=3).

4.6 Analyse de l'expression des gènes par puces à ADN

Les MSC cultivées jusqu'à P0 et à P2 dans des conditions de normoxie et d'hypoxie ont été stockées. À partir de ces échantillons nous avons extrait l'ARN afin de l'hybrider avec des puces. Pour chaque expérience, des cultures des MSC provenant de trois différents donneurs ont été réalisées. L'analyse comparative du transcriptome des MSC en culture pendant 21 jours (P0) en hypoxie par rapport à celui en normoxie a révélé qu'il y avait 386 gènes dérégulés (1% de 41.000 gènes). Parmi ces 386 gènes, 174 ont été « augmentés » (45%) et 212 ont été « diminués » (55%) en condition d'hypoxie. L'analyse GO effectuée sur les 386 gènes dérégulés a révélée une sur-représentation des gènes (122 gènes, $p<0,1$) impliqués dans le métabolisme de l'ADN (cycle cellulaire, réplication, phase M, organisation du fuseau, biogenèse) et/ou codantes de protéines nucléaires (chromosome, fuseau, noyau). Parmi ces 122 gènes, 118 (98%) ont diminué leur expression de 2-6 fois dans le rang correspondant à des gènes NAV2 et RRM2 [2-5,94], respectivement. Dans la Figure 16 et le Tableau 5 nous avons résumé l'analyse et nous montrons les dix premiers gènes, à partir de RRM2 [5,94], dont l'expression est la plus diminuée après la culture à court terme en hypoxie.

Contrairement aux gènes diminués, il n'y a pas une sur-représentation GO considérable des gènes augmentés. Néanmoins, nous avons observé une forte tendance de sur-représentation des gènes codants pour des récepteurs membranaires (CD93, ZP1, ESAM, protocadherine 17) et des facteurs paracrines (leptine, angiopoïétine 2, VWF) avec un rang de sur-expression correspondant aux gènes ALDOC et TCF1 [2-6,96], respectivement.

L'analyse comparative du transcriptome des MSC en culture à P2 en hypoxie par rapport à normoxie, a révélé que 519 transcrits ont été dérégulés, dont 264 ont été augmentés (50,9%) et 255 ont été diminués (49,1%). L'analyse GO effectuée sur 519 gènes a révélé une sur-représentation des gènes impliqués dans la plasticité cellulaire (48 gènes, $p<0,1$) et dans l'adhésion (37 gènes, $p<0,1$). Lorsque nous avons augmenté la rigueur de l'analyse en sélectionnant les gènes qui ont été différentiellement exprimés 4 fois sur 4 essais, nous avons éliminé les gènes GO de l'adhésion cellulaire, mais pas les gènes de la plasticité. Tous ces 48 gènes qui caractérisent la plasticité ont été augmentés dans un rang compris entre 4,2 et 58,3 (Figure 17). Dans le Tableau 6 sont indiqués les dix premiers gènes sur-exprimés après la culture à long terme en hypoxie (P2).

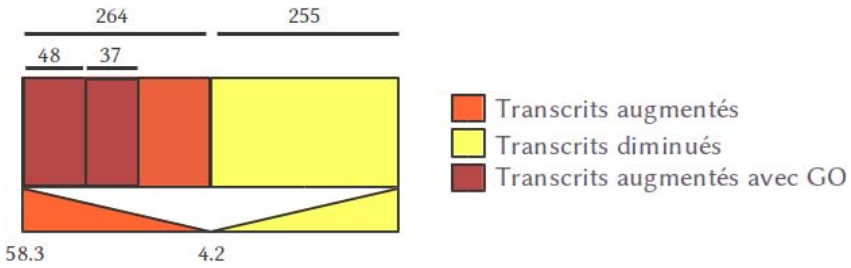

Figure 17: Reprogrammation génétique des MSC en hypoxie à P2. Les MSC de trois donneurs ont été cultivées jusqu'à P2 avant l'extraction de l'ARN et l'hybridation sur puces à ADN Agilent. L'analyse des transcrits GO exprimés de façon différentielle à P2 est montrée (N=3).

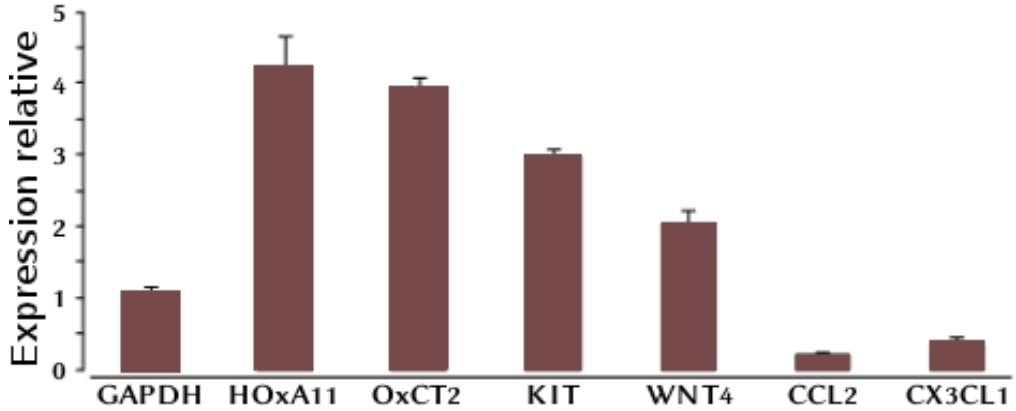

Figure 18: Certains transcrits ont été validés par PCR en temps réel. Les gènes choisis correspondent à ceux gènes avec une expression augmentée (HOXA11, KIT, Wnt4, OXCT2) ou inhibée (CCL2, CX3CL1) en condition d'hypoxie selon les résultats de l'analyse GO (N=3).

Plusieurs transcrits ont été validés par PCR en temps réel (Figure 18). Les résultats correspondent à ceux gènes avec une expression augmentée (HOXA11, KIT, Wnt4, OXCT-2) ou inhibée (CCL2, CX3CL1) en condition d'hypoxie.

Transcrits diminués	Expression: Hypoxie/ Normoxie	Accès Genbank	Fonction putative
RRM2	5.94	NM_001034	Ribonucleotide reductase
XRCC2	5.80	CR749256	X-ray damage DNA repair
KIF24	5.16	AK001795	Kinesin: chromatid assembly
POLQ	4.99	AF090919	DNA polymerase theta
E2F8	4.95	NM_024680	Cell cycle progression
FANCD2	4.93	NM_001018115	DNA repair
ESCO2	4.86	NM_001017420	Sister chromatid cohesion
AURKB	4.74	NM_004217	Chromosome segregation
CENPN	4.48	AK023669	Binding to centromeres
MKI67	4.46	NM_002417	Cell proliferation
Transcrits augmentés			
TCF1	6.96	NM_000545	Hepatic transcription factor
LEP	6.39	NM_000230	Metabolism, apoptosis, angiogenesis
ANGPT2	5.69	NM_001147	Antagonise vascular remodelling
ZP1	5.47	NM_207341	Sperm binding to zona pellucida
VWF	5.41	NM_000552	Platelet binding to endothelium
GIMAP4	5.37	NM_018326	T-cell development, tumor suppressor ?
CD93	4.56	NM_012072	Intercellular adhesion, clearance of apoptotic cells
PLVAP	4.25	NM_031310	Adhesion of vascular endothelial cells ?
ESAM	4.24	NM_138961	Adhesion of endothelial cells
PCDH17	4.14	NM_001040429	Cell-cell connexions in the brain

Tableau 5 : Étude comparative du transcriptome des MSC à P0 en hypoxie versus normoxie.

Transcrits augmentés	**Expression : Hypoxie/ Normoxie**	**Accès Genbank**	**Fonction putative**
SMOC2	58.32	NM_022138	Promotion of matrix assembly
PLEKHA6	13.59	NM_014935	Adhesion
DMKN	10.79	NM_033317	Epithelial cell differentiation
KIT	8.62	NM_000222	Stem cell proliferation
LAMA1	8.49	NM_005559	Development of retina and myocytes
SNTG2	7.52	NM_018968	Eye development
GPR56	6.01	NM_201525	Neural development
OXCT-2	5.81	NM_022120	Ketone body utilisation
NOG	5.13	NM_005450	Neural tube fusion, joint formation
HOXA11	4.79	NM_005523	Uterine development

Tableau 6 : Étude comparative du transcriptome des MSC à P2 en hypoxie versus normoxie.

Chapitre 5. Discussion

Notre travail avait pour but d'analyser l'effet d'une culture prolongée en condition de 5% pO_2 sur le devenir des MSC de la MO humaine. En particulier, il avait pour but de tester l'hypothèse selon laquelle les MSC cultivées ainsi auraient un potentiel de différenciation plus large que celles cultivées en « normoxie ». Par conséquent, cette condition de culture les rapprocherait de leur état physiologique au sein de la niche. A l'appui de cette hypothèse, nous avons en effet trouvé par la technique d'analyse du transcriptome, que les MSC « hypoxiques » expriment plusieurs transcrits (dont certains décrits pour la première fois dans ces cellules) et impliquant un potentiel de différenciation plus grand que les MSC « normoxiques ».

1) Les conditions de culture sont bien entendu essentielles pour le devenir des MSC et peuvent modifier leur potentiel thérapeutique, tant en médecine régénératrice que dans une optique antiinflammatoire/immunomodulatrice. En particulier, la culture de ces cellules à long terme peut aboutir à des conséquences sur le karyotype, bien qu'une étude récente démontre qu'elle n'a pas de conséquence sur le plan de l'oncogénicité des MSC [Tarte, 2010]. La pression en oxygène en culture est également un paramètre majeur de la culture de n'importe quelle cellule mammifère [Carmeliet, 1988]. Or bien que de nombreuses publications aient traité ce sujet concernant les HSC [Guitart, 2010; Guitart, 2011], peu de choses avaient été faites spécifiquement sur les MSC. Les cultures cellulaires sont effectuées pour des raisons pratiques (ou de facilité ?) en air ambiant additionné de CO_2. En réalité, la pO_2 de 21% en l'air alvéolaire chute rapidement dans le sang artériel, suggérant que la « normoxie physiologique » est plutôt de 12 à 15% [Mohyeldin, 2010; Brahimi-Horn, 2007]. La pO_2 de chaque tissu est évidemment très difficile à mesurer, mais elle l'a été pour des échantillons d'aspiration de MO humaine avec des résultats de 1 à 5% [Harrison, 2002]. C'est pourquoi la pression de 5% que nous avons utilisé est assez physiologique concernant les MSC de la MO. Il aurait été bien entendu utile de réaliser notre étude sur plusieurs pressions en oxygène en parallèle, en descendant jusqu'à 1% voire 0,1% [Guitart, 2011]. Pour des raisons pratiques de coût et de temps, et vu la rareté de sources de MO, nous n'avons pas pu mener ce travail. Une pO_2 de 5% est censé être physiologique pour des cellules souches dans la moelle osseuse [Mostafa, 2000]. Nous avons observé une croissance modérée à une pression en O_2 de 5% jusqu'à 5 semaines de culture (P1), et un gain progressif de la croissance après la cinquième semaine. Ces résultats sont cohérents avec des études précédentes qui montrent une inhibition précoce de la croissance en condition d'hypoxie [Grayson, 2006], bien que les données de différents laboratoires soient difficiles à comparer en raison des variations dans les conditions d'oxygène (0,1 à 5%), et dans la durée de la culture (de quelques heures jusqu'à deux mois). L'inhibition transitoire de croissance que nous avons

observé en hypoxie correspond à la « lag phase » décrite par Grayson et elle est suivie d'un gain de croissance à long terme en hypoxie. Ceci pourrait être en contradiction avec le caractère présumé hors cycle des MSC *in vivo*. Comme signalé dans la discussion de notre article, elle pourrait signifier simplement une capacité plus grande à répondre aux facteurs de croissance présents dans le sérum [Basciano, 2011]. En faveur de l'hypothèse que des récepteurs de cytokines et/ou de facteurs de croissance stimulent la prolifération, nous pouvons mentionner le récepteur CXCR4, qui a été induit dans des MSC cultivées en hypoxie (dans Additional file, [Basciano, 2011]). L'engagement du récepteur CXCR4 a, entre autres, la capacité de stimuler la croissance des cellules et dans certaines cas, conduire à une métastase dans des modèles de cancers [Kochetkova, 2009; Kortesidis, 2005]. De plus, en ce qui concerne la migration, CXCR4 a des implications dans la migration des cellules souches, à travers son ligand SDF-1 [Peled, 1999; Wright, 2002]. Les cellules sont recrutées dans la niche de la moelle osseuse depuis la circulation, un processus connu comme « homing ». L'axe SDF-1/CXCR4 induit aussi la "mobilisation" des cellules de la moelle vers la circulation, aux fins immunes et de réparation tissulaire [Lapidot, 2002; Lapidot, 2005].

Signalons enfin que de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme de l'ADN et le cycle cellulaire sont inhibés lors du premier passage en hypoxie. Ceci est peut être en accord avec le caractère quiescent des MSC *in vivo*.

2) Effet de l'hypoxie sur le Métabolisme et le phénotype des MSC. La culture des cellules à 21% pO_2 a des conséquences majeures en particulier celui d'induire un stress oxydatif. A l'inverse, la culture en anaérobiose relative inhibe le métabolisme mitochondrial et favorise la production de lactates, comme nous le décrivons dans notre revue [Némos, 2011; Grayson, 2006]. Il a été suggéré que l'hypoxie des cellules souches au sein de la niche les protège contre le stress oxydatif et limite ainsi la senescence de ces cellules. La baisse du nombre de mitochondries que nous avons observé en hypoxie est une conséquence directe de cette dernière. Morphologiquement, les MSC cultivées en hypoxie contiennent moins de mitochondries et montrent des caractéristiques de cellules indifférenciées. L'inhibition de la biosynthèse mitochondriale pourrait protéger la cellule de l'apoptose, en utilisant une voie selon laquelle l'HIF-α est stabilisé. L'HIF-α induit l'expression des gènes de l'angiogènese et du transporteur de la glucose-6-phosphate. Ce dernier permet de synthétiser du glucose, qui sera utilisé comme source d'ATP pour la cellule [Das, 2010]. Cette capacité de s'adapter et de survivre à un environnement hypoxique est une des caractéristiques qui permettra l'utilisation des MSC pour la régénération des tissus infarcis.

Curieusement, malgré les modifications métaboliques, morphologiques et surtout génétiques décrites plus bas, nous n'avons pas observé de modifications phénotypiques des marqueurs de surface des MSC sous hypoxie [Holzwarth, 2010]. Néanmoins, le marqueur de surface STRO-1 n'a été exprimé que transitoirement dans des MSC hypoxiques, mais pas dans les cellules normoxiques. Ce n'est pas tout à fait surprenant puisque l'expression de STRO-1 est peu à peu perdue lors de l'expansion des cellules en culture [Simmons, 1991; Gronthos, 2003]. Même si STRO-1 sert à isoler des MSC natives à partir de différents tissus, il n'est pas exprimé sur tous les MSC [Kolf, 2007]. Fait intéressant, les MSC positives pour STRO-1 montrent un potentiel d'expansion et de différenciation renforcée [Bensidhoum, 2004; Psaltis, 2010]. Ainsi, l'expression de STRO-1 sur des MSC hypoxiques ne peut pas être fortuite, et serait plutôt un reflet de l'état pluripotent des ces cellules.

D'une certaine manière, ceci démontre l'unicité de ces cellules, mais une analyse fine des intensités de fluorescence montre de discrètes modifications (Figure 12). Notons en effet que l'expression de CD29/VLA-β, impliquée dans l'adhérence à la matrice extracellulaire, augmente en hypoxie à P0, de même pour CD44/Pgp-1 et CD106/VCAM-1. Il n'est pas anodin aussi que l'expression de CD90/Thy-1, un gène impliqué dans la mémoire neuronale [Nosten-Bertrand, 1996] ni que celle de CD105/Endoglin, un régulateur de la différenciation et de la migration cellulaire [McAllister, 1994; Lastres, 1996] soient augmentés en hypoxie. Signalons que les transcrits des marqueurs sus-cités n'ont pas été stimulés en hypoxie du moins de façon significative, c'est pourquoi ils n'apparaissent pas dans le Tableau 5. Leur expression va néanmoins de pair avec l'induction de transcrits de gènes impliqués dans l'adhérence à la matrice extracellulaire. Il aurait été intéressant de valider ESAM (protéine d'adhésion cellulaire endothéliale) ou CD93 par exemple, au niveau protéique.

3) Effet de l'hypoxie sur le transcriptome. Comme décrit plus haut, l'effet le plus spectaculaire et potentiellement intéressant de la culture des MSC en hypoxie, se situe au niveau de l'expression génique. Les molécules impliquées dans le métabolisme de l'ADN, ainsi que dans la progression dans le cycle cellulaire et inhibées lors du premier passage en hypoxie, confortent le fait que l'hypoxie favorise le caractère quiescent des MSC. L'analyse GO des gènes exprimés à P0 a associé les gènes diminués en condition de faible pression en O_2 à des gènes du métabolisme et de la réparation de l'ADN (POLQ, RRM2, XRCC2, FANCD2), à des gènes de la progression du cycle cellulaire (E2F8, MKI67), et à des gènes de l'organisation chromosomique (CENP-B, AURKB, KLF4) (Tableau 5). Ces résultats sont en accord avec les donnés précédentes sur la prolifération et la taille des colonies à P0. L'induction tardive de « gènes de plasticité » selon GO

est plus intrigante. Le terme de plasticité lui-même peut prêter à confusion en effet dans notre esprit, il signifie la capacité des MSC à se différencier ou se dé-différencier à condition qu'elles ne soient pas trop avancées dans leur différenciation. Cette hypothèse formulée notamment par Zipori implique que les cellules expriment un grand nombre de gènes à bas bruit, d'où leur potentiel multipotent [Zipori, 2005]. Cette propriété est à mettre en parallèle avec celle des HSC qui progressent de manière hiérarchique, avec perte et acquisition définitive de certaines potentialités. Le « GO term » plasticity réfère à la fois à une capacité multipotente et à l'adaptation aux conditions de culture. Ainsi OXCT-2 (3-oxoacid/succinyl CoA transferase-2) est une enzyme d'expression mitochondriale impliqué dans le métabolisme des corps cétoniques produits en anaérobiose. En dehors du fait qu'il s'agit d'une adaptation métabolique, OXCT-2 est exprimé dans des cellules germinales du testicule [Tanaka, 2003]. Deux transcrits très fortement amplifiés en hypoxie (58 et 13 fois respectivement) sont SMOC2 et PLEKHA6 (Tableau 6). Ils jouent un rôle dans l'assemblage de la matrice extracellulaire et dans l'adhésion à la matrice. SMOC2 (SPARC related modular calcium binding 2) joue un rôle dans l'angiogenèse et dans l'assemblage de la matrice extracellulaire [Rocnik, 2006]. Un article récent a démontré qu'une protéine apparentée à SMOC2 augmente la durée de vie et la fécondité chez la Drosophile [Lee, 2008]. De plus, des études de développement dans de souris suggèrent un potentiel rôle de SMOC2 dans la différenciation de gonades fœtales et de l'appareil reproducteur [Pazin, 2009]. Autre gène stimulé par l'hypoxie est le DMKN (dermokine) qui a été identifié comme un gène qui s'exprime dans la couche suprabasale de l'épiderme [Matsui, 2004]. Elle est exprimée au cours de la différenciation épidermique [Toulza, 2007].

Le gène Kit (v-kit Hardy–Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog), qui code pour un récepteur tyrosine kinase, a donc été induit en corrélation avec la prolifération [Ohnishi, 2007].

Des autres gènes induits sont LAMA1 (laminine), SNTG2 (syntrophin gamma-2) et GPR56 (G protein-coupled receptor 56). Les protéines LAMA1 et SNTG2 sont toutes les deux impliquées dans le développement de la rétine et de l'œil [Edwards, 2010; Nagai, 2010]. La laminine est aussi essentiel pour le développement musculaire précoce. Elle est requise pour l'élongation de cellules précurseurs du muscle chez la souris [Bajanca, 2006]. La GPR56, une protéine transmembranaire de sept domaines, est impliquée dans le « brain cortical patterning » [Koirala, 2009].

Le gène NOG (noggin) a été décrit dans le développement précoce du système nerveux central [Lamb, 1993; Smith, 1993]. Des études récentes indiquant que NOG est aussi exprimé dans les neurones, les astrocytes et les cellules épendymaires adultes [Mikawa, 2011].

Les gènes potentiellement impliqués dans le contrôle de la différenciation vers les adipocytes, les ostéocytes et les chondrocytes décrits par l'équipe de Tuan n'ont pas été modifiés par l'hypoxie [Baksh, 2004]. Les résultats que nous avons obtenu à partir de la culture des MSC en condition de faible pression en oxygène, montrent que il y à une surexpression des gènes impliqués dans la différenciation neuronale, myocytaire, épithéliale et rétinienne.

Au total, nous avons observé que l'hypoxie stimule plusieurs gènes qui convergent pour maintenir les cellules dans un état indifférencié, et qui facilitent la migration transendothéliale des MSC. En parallèle, l'hypoxie inhibe l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Tableau 5). Ce profil de transcription montre que probablement le programme génétique intrinsèque des MSC *in vivo* est « au repos », et doué de capacités de migration et de différenciation multilignage. Fait important, certains gènes de différenciation cités plus haut (DMKN, LAMA1, SNTG2, GPR56, NOG) impliquent des lignages neurectodermiques. Ceci conforte la notion que les MSC ne sont pas seulement doués de capacité de différenciation dans des lignages du mésoderme mais aussi dans des lignages issus d'autres feuillets primitifs [Pacary, 2007; Tondreau, 2008].

Par ailleurs, certains gènes d'adhésion jouent également un rôle dans la différenciation. Les gènes induits précocement en hypoxie ne sont pas assignés à la multipotence, mais ils sont plutôt des molécules d'adhérence telles que la molécule d'adhésion cellulaire endothéliale von Willebrand (VWF) et la protocadherine. Toutefois, plusieurs gènes peuvent participer au maintien de l'état « souche » des cellules. Par exemple, la molécule CD93 régule l'élimination des cellules apoptotiques, une fonction essentielle du développement, du maintien de l'homéostasie et de la réparation tissulaire [Greenlee, 2008].

L'expression des molécules d'adhésion pourrait être physiologiquement pertinente et en corrélation avec le plus large potentiel de différenciation des MSC hypoxiques. En effet, le facteur VWF est un marqueur d'engagement endothélial [Bruno, 2009] et PLVAP, signalé dans Basciano *et al* pour la première fois sur les MSC, est une molécule de trafique leucocytaire [Keuschnigg, 2009], qui peut aider à la migration transendothéliale des MSC de la moelle osseuse [Basciano, 2011]. La stimulation de la leptine est également significative dans le sens où des travaux récents ont montré qu'elle contribue à maintenir les cellules souches progénitrices à l'état indifférencié [Scheller, 2010]. Ce résultat montre aussi l'impact de l'hypoxie sur le métabolisme des MSC, en accord avec une étude sur les MSC de rat [Ohnishi, 2007]. Cependant, dans cette étude la durée de l'hypoxie a été de 24 heures seulement. Pourtant, plusieurs gènes impliqués dans l'adhésion et la matrice extracellulaire ont été stimulées. Le facteur de

transcription TCF1 liée à WNT peut réguler les MSC et renforcer leur différenciation ostéogénique [Wang, 2007]. En conclusion, cet ensemble de gènes semble concourir au maintient des MSC hypoxiques dans un état pluripotent.

4) Conséquences médicales potentielles. La question posée est de savoir si une telle culture est susceptible d'améliorer les MSC dans une optique de médecine régénératrice [Charbord, 2010], ou de traitement des maladies inflammatoires et autoimmunes [Pistoia, 2010].

   4.1) Concernant le premier type d'application, la réponse n'est pas claire. Le but de la médecine régénératrice est de reconstituer un tissu lésé, mais seule la pose d'un tissu différencié (du type monocouche d'épiderme, ou maillage artificiel rempli de chondrocytes) est actuellement envisageable. La culture de MSC en hypoxie dans des conditions de différenciation spécifiques pourrait permettre d'obtenir plus de cellules (chondrocytes, par exemple). Cependant l'avantage quantitatif que nous avons obtenu semble modéré. De même en ce qui concerne l'ensemencement d'une trame tissulaire avec des MSC autologues. L'implantation d'une bronche, déplétée au préalable de ces cellules en eau distillée, et ensemencée avec des MSC autologues de MO a permis de traiter une atélectasie post tuberculeuse chez une patiente [Macchiarini, 2008]. Dans ce cas, des fibroblastes sont suffisants pour reconstituer un tuyau rigide. Il reste possible que la culture en hypoxie permette la différenciation neuronale des MSC.

   4.2) Concernant le second type d'applications, les MSC injectées par voie intraveineuse au patients s'accumulent dans le parenchyme pulmonaire. Bien que ce fût suffisant pour traiter le choc septique expérimental [Németh, 2009], la diffusion des MSC dans d'autres organes peut être nécessaire pour traiter des maladies systémiques. À ce propos, l'induction de molécules impliquées dans la migration transendothéliale par les conditions de culture, peut être utile. Une étude dans un modèle animal montre que la migration des MSC en réponse à une fracture est déterminée par CXCR4 [Granero-Moltó, 2009]. Cependant, l'hypoxie peut être préjudiciable à d'autres fins. Les MSC inhibent les cellules T-CD4 d'une façon CCL2-dépendante par transformation de cette chimiokine en un antagoniste dérivé [Rafei, 2009]. Comme nous l'avons observé il y a une diminution de la transcription de CCL2 dans les cellules cultivées sous hypoxie. Ces MSC pourraient devenir alors inefficaces pour le traitement de l'encéphalomyélite allergique expérimentale (modèle animal de la sclérose en plaques). Signalons enfin, que les MSC ont la capacité d'agir comme cellules présentatrices d'antigènes et peuvent ainsi

induire une réponse immunitaire adaptative spécifique à un antigène donné [Stagg, 2006], mais l'effet éventuel de l'hypoxie sur cette propriété reste inconnu.

Une application spectaculaire des MSC est le traitement de la GVHD aiguë corticorésistante dans les greffes de MO allogéniques [Le Blanc, 2008] et résulte des propriétés immunosuppressives de ces cellules.

Par ailleurs, l'une des fonctions essentielles des MSC de la MO est leur contribution au soutien de l'hématopoïèse, en créant un tissu conjonctif, mais surtout en synthétisant une vaste palette de cytokines et de facteurs de croissance impliqués dans la différenciation et la maturation des différentes populations de cellules sanguines. Actuellement, la transplantation de cellules souches hématopoïétiques est couramment employée en clinique, notamment dans le cadre du traitement des hémopathies malignes. Le greffon contient essentiellement des cellules sanguines qui reconstituent l'hématopoïèse d'où un chimérisme. Le greffon contient aussi des MSC en très petit nombre. À ce jour, un microchimérisme impliquant les MSC du donneur n'a pas été démontré. La raison est peut être, que les MSC restent bloquées puis sont éliminées dans le parenchyme pulmonaire. Actuellement, il n'est pas non plus démontré que le stroma de soutien soit endommagé par le conditionnement qui prépare à la greffe de HSC. L'intérêt d'injecter des MSC en grand nombre en association avec le greffon de HSC reste donc à démontrer. Si l'utilité est prouvée, l'injection de MSC dont la capacité de migration serait selon nos résultats améliorée par l'hypoxie.

En conclusion, l'effet thérapeutique éventuel des MSC cultivées en hypoxie devra être évalué au cas par cas au moyen d'études *in vitro* et de modèles *in vivo*.

Chapitre 6. Conclusion

Notre travail a démontré que des MSC cultivées à long terme en faible pression en oxygène:

- présentent des caractères phénotypiques très proches à des MSC cultivées en air ambiant. Nous avons en effet vérifié que les MSC maintiennent l'expression de marqueurs de surface tout au long de la culture. Un ensemble de marqueurs sert à identifier les MSC de la moelle osseuse (Tableau 1), étant donné qu'il n'existe pas une seule protéine de surface exclusive pour reconnaître ces cellules. Plusieurs de ces marqueurs sont présents dans les MSC en culture comme dans les cellules natives, en appuyant l'idée que les MSC gardent, au moins pour la plupart, leurs caractéristiques *in vivo* pendant la culture.
- leur capacité d'expansion en hypoxie est supérieure à celle obtenue en normoxie. La richesse du potentiel clinique des MSC doit être accompagnée d'un travail de recherche fondamental ainsi que clinique pour mieux caractériser ces cellules. L'ensemble des données exposées ci-dessus montre l'intérêt d'amplifier les MSC en grand nombre étant donné que le nombre des cellules présentes initialement dans les prélèvements ne permet pas d'envisager une utilisation clinique directe. Il faut alors passer par une étape d'expansion *ex vivo*. À cet effet, les conditions de culture des cellules doivent être définies. Plusieurs paramètres sont importants : la densité d'ensemencement, le nombre de passages, le milieu de culture et les facteurs de croissance ainsi que la condition de pression en O_2 dans laquelle elles sont cultivées. Les conditions de culture peuvent avoir un impact significatif sur le comportement ultérieur des cellules. Par exemple, dans des études préliminaires avec des MSC pour une future application en thérapie cellulaire, il a été montré que la culture jusqu'à confluence avant d'être perfusées peut affecter leur potentiel de migration [De Becker, 2007].
- les MSC « hypoxiques » expriment davantage de transcrits impliquant des molécules d'assemblage et d'adhérence à la matrice extracellulaire et en même temps plusieurs gènes de différenciation dans des lignages non mésodermiques. Au total ce travail démontre que les MSC « hypoxiques » ont un potentiel multipotent supérieur aux MSC « normoxiques ». En particulier les MSC hypoxiques ont exprimé des gènes de différenciation vers les lignages ostéocytaires et adipocytaires. De même, ces MSC cultivées avec du milieu induisant la différenciation pendant trois semaines ont montré que le pourcentage de différenciation était supérieur pour les cellules cultivées en hypoxie que pour les cellules cultivées en normoxie.
- seraient proches des conditions physiologiques qui prévalent au sein de la niche osseuse, comme est suggère mais pas démontre par ce travail. Les MSC dans leur niche sont censés être au repos et multipotentes, ces propriétés sont apparemment dissociées dans notre modèle

in vitro. Jusqu'à ce que nous comprenions la signature *in vivo* des MSC, nous ne pouvons pas conclure et prétendre que la culture *in vitro* en hypoxie imite la niche. Comme les MSC-nestin positives et les HSC forment une niche unique dans la moelle osseuse [Méndez-Ferrer, 2010], l'hypoxie est sans aucun doute un milieu physiologique pour les MSC. À cet égard, il convient de mentionner que la nestin a été induite par l'hypoxie dans nos expériences (dans Additional file, [Basciano, 2011]).

L'ensemble de nos données montre que la culture en hypoxie favorise un « programme d'indifférenciation » dans les MSC, mais il reste à évaluer l'impact de l'hypoxie sur certaines fonctions souhaitées de ces cellules dans le cas d'applications médicales.

Il existe un intérêt croissant à utiliser des cellules spécifiques des tissus provenant de MSC en médecine régénératrice et en traitement des maladies inflammatoires et autoimmunes. La culture des MSC en hypoxie pendant un minimum de six semaines peut être bénéfique, dans la mesure où elle favorise le nombre de cellules parallèlement à leur capacité de différenciation. En ce qui concerne la différenciation, l'hypoxie pourrait servir comme stratégie pour engager les MSC vers les lignages neural, myocytaire ou épithelial *in vitro*.

Chapitre 7. Perspectives

Notre travail devra être validé sous plusieurs aspects :

1) A court terme, il serait bien entendu souhaitable de valider notre travail au niveau des protéines exprimées. À cet effet, il faudra faire des extractions des protéines en condition de normoxie comme d'hypoxie pour pouvoir les analyser en Western Blot. Il est à signaler que les gènes induits par l'hypoxie concernent plus des gènes de développement neuronal et myocytaire. Or notre modèle a porté sur la différenciation des MSC en adipocytes et ostéocytes. Par conséquent il sera intéressant de travailler sur des systèmes de différenciation des MSC en cellules nerveuses pour valider directement l'effet de l'hypoxie et vérifier si elle est efficace pour générer des neurones *in vitro*. L'implantation de MSC chez l'animal et le devenir de ces cellules cultivées en pO_2 atmosphérique ou bien à 5% pO_2 devraient être analysés.
2) Le caryotype et les télomères des MSC cultivées devraient être étudiés vu l'implication majeure de ces paramètres sur la senescence d'une part et le potentiel de transformation d'autre part.
3) L'effet immunomodulateur des MSC cultivées devra être étudié. En effet, en dehors même de son action thérapeutique potentielle, l'action immunosupressive des MSC pourrait favoriser l'émergence de cancers. L'effet des MSC sur les fonctions immunologiques en particulier des lymphocytes T et NK est faisable *in vitro* dans des délais raisonnables.
4) Enfin sur le plan fondamental, la comparaison de MSC cultivées en hypoxie avec les MSC triées à partir de MO, ou microdisséquées *in situ*, pourrait permettre de répondre à la question de l'identité entre ces cellules, et donc de la relevance physiologique de la culture des MSC en basse pO_2. À cette fin, nous pourrions soit analyser un petit nombre de transcrits par RT-PCR/PCR multiplex ou bien amplifier les transcrits au préalable avant une hybridation sur « biopuces ». Une cartographie moléculaire des MSC reste en effet nécessaire pour positionner ces cellules dans l'ontogénie par rapport aux autres lignages.

Références Bibliographiques

Abdallah, B.M.; Haack-Sørensen, M.; Burns, J.S.; Elsnab, B.; Jakob, F.; Hokland, P.; Kassem, M. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite extensive proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 326, 527-38 (2005).

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the cell.* Fifth Edition (2007).

Alison, M.R.; Poulsom, R.; Forbes, S.; Wright, N.A. An introduction to stem cells. *J Pathol* 197, 419-23 (2002).

Alvarez-Dolado, M.; Pardal, R.; Garcia-Verdugo, J.M.; Fike, J.R.; Lee, H.O.; Pfeffer, K.; Lois, C.; Morrison, S.J.; Alvarez-Buylla, A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425, 968-73 (2003).

Andrews, P.W. From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357, 405-17 (2002).

Ashburner, M.; Ball, C.A.; Blake, J.A.; Botstein, D.; Butler, H.; Cherry, J.M.; Davis, A.P.; Dolinski, K.; Dwight, S.S.; Eppig, J.T.; Harris, M.A.; Hill, D.P. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* 25, 25-9 (2000).

Bajanca, F.; Luz, M.; Raymond, K.; Martins, G.G.; Sonnenberg, A.; Tajbakhsh, S.; Buckingham, M.; Thorsteinsdóttir, S. Integrin alpha6beta1-laminin interactions regulate early myotome formation in the mouse embryo. *Development* 133, 1635-44 (2006).

Baksh, D.; Song, L.; Tuan, R.S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 8, 301-16 (2004).

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

Basciano, L.; Némos, C.; Foliguet, B.; de Isla, N.; de Carvalho, M.; Tran, N.; Dalloul, A. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol* 12, 12 (2011).

Beattie, G.M.; Otonkoski, T.; Lopez, A.D.; Hayek, A. Functional beta-cell mass after transplantation of human fetal pancreatic cells: differentiation or proliferation? *Diabetes* 46, 244-8 (1997).

Bell, E.L.; Klimova, T.A.; Eisenbart, J.; Moraes, C.T.; Murphy, M.P.; Budinger, G.R.S.; Chandel, N.S. The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *J. Cell Biol.* 177, 1029-36 (2007).

Bensidhoum, M.; Chapel, A.; Francois, S.; Demarquay, C.; Mazurier, C.; Fouillard, L.; Bouchet, S.; Bertho, J.M.; Gourmelon, P.; Aigueperse, J.; Charbord, P.; Gorin, N.C.; Thierry, D.; Lopez, M. Homing of *in vitro* expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood* 103, 3313-9 (2004).

Bianchi, G.; Banfi, A.; Mastrogiacomo, M.; Notaro, R.; Luzzatto, L.; Cancedda, R.; Quarto, R. *Ex vivo* enrichment of mesenchymal cell progen*itors by fibro*blast growth factor 2. Exp Cell Res 287, 98-105 (2003).

Bianco, P.; Riminucci, M. The bone marrow stroma *in vivo*: Ontogeny, structure, cellular composition and changes in disease. *Handbooks in Practical Animal Cell Biology* (1998).

Bianco, P.; Robey, P.G.; Simmons, P.J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2, 313-9 (2008).

Bjornson, C.R.; Rietze, R.L.; Reynolds, B.A.; Magli, M.C.; Vescovi, A.L. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science* 283, 534-7 (1999).

Bongso, A. Celebrating 10 years of hESC lines: an interview with Ariff Bongso. *Stem Cells* 27, 275-7 (2009).

Bongso, A.; Lee, E.H. Stem cells : from bench to bedside. *Forewords by Sydney Brenner & Philip Yeo World Scientific Publishing, Singapore* (2005).

Bouffi, C.; Djouad, F.; Mathieu, M.; Noël, D.; Jorgensen, C. Multipotent mesenchymal stromal cells and rheumatoid arthritis: risk or benefit? *Rheumatology (Oxford)* 48, 1185-9 (2009).

Brahimi-Horn, M.C.; Pouysségur, J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett.* 581, 3582-91 (2007).

Brooke, G.; Tong, H.; Levesque, J.; Atkinson, K. Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta. *Stem Cells Dev.* 17, 929-40 (2008).

Bruder, S.P.; Jaiswal, N.; Haynesworth, S.E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64, 278-94 (1997).

Bruder, S.P.; Kurth, A.A.; Shea, M.; Hayes, W.C.; Jaiswal, N.; Kadiyala, S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 16, 155-62 (1998).

Bruno, S.; Bussolati, B.; Grange, C.; Collino, F.; di Cantogno, L.V.; Herrera, M.B.; Biancone, L.; Tetta, C.; Segoloni, G.; Camussi, G. Isolation and characterization of resident mesenchymal stem cells in human glomeruli. *Stem Cells Dev* 18, 867-80 (2009).

Campagnoli, C.; Roberts, I.A.; Kumar, S.; Bennett, P.R.; Bellantuono, I.; Fisk, N.M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98, 2396-402 (2001).

Canque, B.; Camus, S.; Dalloul, A.; Kahn, E.; Yagello, M.; Dezutter-Dambuyant, C.; Schmitt, D.; Schmitt, C.; Gluckman, J.C. Characterization of dendritic cell differentiation pathways from cord blood CD34(+) CD7(+) CD45RA(+) hematopoietic progenitor cells. *Blood* 96, 3748-56 (2000).

Caplan, A.I. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 21, 429-35 (1994).

Carmeliet, P.; Dor, Y.; Herbert, J.M.; Fukumura, D.; Brusselmans, K.; Dewerchin, M.; Neeman, M.; Bono, F.; Abramovitch, R.; Maxwell, P.; Koch, C.J.; Ratcliffe, P. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394, 485-90 (1998).

Carrancio, S.; López-Holgado, N.; Sánchez-Guijo, F.M.; Villarón, E.; Barbado, V.; Tabera, S.; Díez-Campelo, M.; Blanco, J.; San Miguel, J.F.; Del Cañizo, M.C. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol* 36, 1014-21 (2008).

Castro-Malaspina, H.; Gay, R.E.; Resnick, G.; Kapoor, N.; Meyers, P.; Chiarieri, D.; McKenzie, S.; Broxmeyer, H.E.; Moore, M.A. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 56, 289-301 (1980).

Chandel, N.S.; McClintock, D.S.; Feliciano, C.E.; Wood, T.M.; Melendez, J.A.; Rodriguez, A.M.; Schumacker, P.T. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O_2 sensing. J. Biol. Chem. 275, 25130-8 (2000).

Chapel, A.; Bertho, J.M.; Bensidhoum, M.; Fouillard, L.; Young, R.G.; Frick, J.; Demarquay, C.; Cuvelier, F.; Mathieu, E.; Trompier, F.; Dudoignon, N.; Germain, C. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med* 5, 1028-38 (2003).

Charbord, P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther* 21, 1045-56 (2010).

Charbord, P.; Casteilla, L. Human mesenchymal stem cell biology. *Med Sci (Paris)* 27, 261-267 (2011).

Chavakis, E.; Urbich, C.; Dimmeler, S. Homing and engraftment of progenitor cells: a prerequisite for cell therapy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 45, 514-22 (2008).

Chen, J.; Baydoun, A.R.; Xu, R.; Deng, L.; Liu, X.; Zhu, W.; Shi, L.; Cong, X.; Hu, S.; Chen, X. Lysophosphatidic acid protects mesenchymal stem cells against hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis. *Stem Cells* 26, 135-45 (2008).

Chow, D.C.; Wenning, L.A.; Miller, W.M.; Papoutsakis, E.T. Modeling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys. J.* 81, 685-96 (2001).

Cipolleschi, M.G.; Dello Sbarba, P.; Olivotto, M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* 82, 2031-7 (1993).

Clarke, D.L.; Johansson, C.B.; Wilbertz, J.; Veress, B.; Nilsson, E.; Karlström, H.; Lendahl, U.; Frisén, J. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288, 1660-3 (2000).

Colter, D.C.; Class, R.; DiGirolamo, C.M.; Prockop, D.J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3213-8 (2000).

Colter, D.C.; Sekiya, I.; Prockop, D.J. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7841-5 (2001).

Corn, P.G.; Ricci, M.S.; Scata, K.A.; Arsham, A.M.; Simon, M.C.; Dicker, D.T.; El-Deiry, W.S. Mxi1 is induced by hypoxia in a HIF-1-dependent manner and protects cells from c-Myc-induced apoptosis. *Cancer Biol. Ther.* 4, 1285-94 (2005).

Csete, M. Oxygen in the cultivation of stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1049, 1-8 (2005).

Dalloul, A.H.; Patry, C.; Salamero, J.; Canque, B.; Grassi, F.; Schmitt, C. Functional and phenotypic analysis of thymic CD34+CD1a- progenitor-derived dendritic cells: predominance of CD1a+ differentiation pathway. *J. Immunol.* 162, 5821-8 (1999).

Das, R.; Jahr, H.; van Osch, G.J.V.M.; Farrell, E. The role of hypoxia in bone marrow-derived mesenchymal stem cells: considerations for regenerative medicine approaches. *Tissue Eng Part B Rev* 16, 159-68 (2010).

De Bari, C.; Dell'Accio, F.; Luyten, F.P. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum.* 44, 85-95 (2001a).

De Bari, C.; Dell'Accio, F.; Tylzanowski, P.; Luyten, F.P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 44, 1928-42 (2001b).

De Bari, C.; Dell'Accio, F.; Vandenabeele, F.; Vermeesch, J.R.; Raymackers, J.; Luyten, F.P. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J. Cell Biol.* 160, 909-18 (2003).

De Bari, C.; Dell'Accio, F.; Vanlauwe, J.; Eyckmans, J.; Khan, I.M.; Archer, C.W.; Jones, E.A.; McGonagle, D.; Mitsiadis, T.A.; Pitzalis, C.; Luyten, F.P. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum.* 54, 1209-21 (2006).

De Becker, A.; Van Hummelen, P.; Bakkus, M.; Vande Broek, I.; De Wever, J.; De Waele, M.; Van Riet, I. Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica* 92, 440-9 (2007).

Dello Sbarba, P.; Cipolleschi, M.G.; Olivotto, M. Hemopoietic progenitor cells are sensitive to the cytostatic effect of pyruvate. *Exp. Hematol.* 15, 137-42 (1987).

Delorme, B.; Chateauvieux, S.; Charbord, P. The concept of mesenchymal stem cells. *Regen Med* 1, 497-509 (2006).

Delorme, B.; Ringe, J.; Gallay, N.; Le Vern, Y.; Kerboeuf, D.; Jorgensen, C.; Rosset, P.; Sensebé, L.; Layrolle, P.; Häupl, T.; Charbord, P. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood* 111, 2631-5 (2008).

Delorme, B.; Ringe, J.; Pontikoglou, C.; Gaillard, J.; Langonné, A.; Sensebé, L.; Noël, D.; Jorgensen, C.; Häupl, T.; Charbord, P. Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity. *Stem Cells* 27, 1142-51 (2009).

Dennis, J.E.; Charbord, P. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells* 20, 205-14 (2002).

Dennis, J.E.; Merriam,A.; Awadallah,A.; Yoo,J.U.; Johnstone,B.; Caplan, A.I. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res* 14, 700-9 (1999).

Dexter, T.M.; Wright, E.G.; Krizsa, F.; Lajtha, L.G. Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures. *Biomedicine* 27, 344-9 (1977).

Dezawa, M.; Ishikawa, H.; Itokazu, Y.; Yoshihara, T.; Hoshino, M.; Takeda, S.; Ide, C.; Nabeshima, Y. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science* 309, 314-7 (2005).

Dos Santos, F.; Andrade, P.Z.; Boura, J.S.; Abecasis, M.M.; da Silva, C.L.; Cabral, J.M.S. *Ex vivo* expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J. Cell. Physiol.* 223, 27-35 (2010).

Dowthwaite, G.P.; Bishop, J.C.; Redman, S.N.; Khan, I.M.; Rooney, P.; Evans, D.J.R.; Haughton, L.; Bayram, Z.; Boyer, S.; Thomson, B.; Wolfe, M.S.; Archer, C.W. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J. Cell. Sci.* 117, 889-97 (2004).

Edwards, M.M.; Mammadova-Bach, E.; Alpy, F.; Klein, A.; Hicks, W.L.; Roux, M.; Simon-Assmann, P.; Smith, R.S.; Orend, G.; Wu, J.; Peachey, N.S.; Naggert, J.K.; Lefebvre, O.; Nishina, P.M. Mutations in Lama1 disrupt retinal vascular development and inner limiting membrane formation. *J Biol Chem* 285, 7697-711 (2010).

Eliasson, P.; Jönsson, J. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J. Cell. Physiol.* 222, 17-22 (2010).

Erecińska, M.; Silver, I.A. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol* 128, 263-76 (2001).

Erices, A.; Conget, P.; Minguell, J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.* 109, 235-42 (2000).

Ezashi, T.; Das, P.; Roberts, R.M. Low O_2 tensions and the prevention of differentiation of hES cells. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 4783-8 (2005).

Ezquer, F.E.; Ezquer, M.E.; Parrau, D.B.; Carpio, D.; Yañez, A.J.; Conget, P.A. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 14, 631-40 (2008).

Friedenstein, A.J.; Chailakhjan, R.K.; Lalykina, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3, 393-403 (1970).

Gardner, R.L. Stem cells: potency, plasticity and public perception. *J Anat* 200, 277-82 (2002).

Genbacev, O.; Zhou, Y.; Ludlow, J.W.; Fisher, S.J. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 277, 1669-72 (1997).

Gindraux, F.; Selmani, Z.; Obert, L.; Davani, S.; Tiberghien, P.; Hervé, P.; Deschaseaux, F. Human and rodent bone marrow mesenchymal stem cells that express primitive stem cell markers can be directly enriched by using the CD49a molecule. *Cell Tissue Res.* 327, 471-83 (2007).

Granero-Moltó, F.; Weis, J.A.; Miga, M.I.; Landis, B.; Myers, T.J.; O'Rear, L.; Longobardi, L.; Jansen, E.D.; Mortlock, D.P.; Spagnoli, A. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells* 27, 1887-98 (2009).

Grant, W.C.; Root, W.S. The relation of O_2 in bone marrow blood to post-hemorrhagic erythropoiesis. Am. J. Physiol. 150, 618-27 (1947).

Grayson, W.L.; Zhao, F.; Izadpanah, R.; Bunnell, B.; Ma, T. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol* 207, 331-9 (2006).

Greenlee, M.C.; Sullivan, S.A.; Bohlson, S.S. CD93 and related family members: their role in innate immunity. *Curr Drug Targets* 9, 130-8 (2008).

Gronthos, S.; Chen, S.; Wang, C.; Robey, P.G.; Shi, S. Telomerase accelerates osteogenesis of bone marrow stromal stem cells by upregulation of CBFA1, osterix, and osteocalcin. *J Bone Miner Res* 18, 716-22 (2003).

Gronthos, S.; Zannettino, A.C.; Graves, S.E.; Ohta, S.; Hay, S.J.; Simmons, P.J. Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J Bone Miner Res* 14, 47-56 (1999).

Guitart, A.V.; Debeissat, C.; Hermitte, F.; Villacreces, A.; Ivanovic, Z.; Boeuf, H.; Praloran, V. Very low oxygen concentration (0.1%) reveals two FDCP-Mix cell subpopulations that differ by their cell cycling, differentiation and p27KIP1 expression. *Cell Death Differ.* 18, 174-82 (2011).

Guitart, A.V.; Hammoud, M.; Dello Sbarba, P.; Ivanovic, Z.; Praloran, V. Slow-cycling/quiescence balance of hematopoietic stem cells is related to physiological gradient of oxygen. *Exp. Hematol.* 38, 847-51 (2010).

Guo, Z.; Li, H.; Li, X.; Yu, X.; Wang, H.; Tang, P.; Mao, N. *In vitro* characteristics and *in vivo* immunosuppressive activity of compact bone-derived murine mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells* 24, 992-1000 (2006).

Harrison, J.S.; Rameshwar, P.; Chang, V.; Bandari, P. Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood* 99, 394 (2002).

Haynesworth, S.E.; Goshima, J.; Goldberg, V.M.; Caplan, A.I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13, 81-8 (1992).

Herzberg, N.H.; Zwart, R.; Wolterman, R.A.; Ruiter, J.P.; Wanders, R.J.; Bolhuis, P.A.; van den Bogert, C. Differentiation and proliferation of respiration-deficient human myoblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1181, 63-7 (1993).

Hoffmann, A.; Pelled, G.; Turgeman, G.; Eberle, P.; Zilberman, Y.; Shinar, H.; Keinan-Adamsky, K.; Winkel, A.; Shahab, S.; Navon, G.; Gross, G.; Gazit, D. Neotendon formation induced by manipulation of the Smad8 signalling pathway in mesenchymal stem cells. *J. Clin. Invest.* 116, 940-52 (2006).

Holzwarth, C.; Vaegler, M.; Gieseke, F.; Pfister, S.M.; Handgretinger, R.; Kerst, G.; Müller, I. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol* 11, 11 (2010).

Horwitz, E.M. Marrow mesenchymal cell transplantation for genetic disorders of bone. *Cytotherapy* 3, 399-401 (2001).

Horwitz, E.M.; Gordon, P.L.; Koo, W.K.K.; Marx, J.C.; Neel, M.D.; McNall, R.Y.; Muul, L.; Hofmann, T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8932-7 (2002).

Imanishi, Y.; Saito, A.; Komoda, H.; Kitagawa-Sakakida, S.; Miyagawa, S.; Kondoh, H.; Ichikawa, H.; Sawa, Y. Allogenic mesenchymal stem cell transplantation has a therapeutic effect in acute myocardial infarction in rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 44, 662-71 (2008).

In 't Anker, P.S.; Scherjon, S.A.; Kleijburg-van der Keur, C.; Noort, W.A.; Claas, F.H.J.; Willemze, R.; Fibbe, W.E.; Kanhai, H.H.H. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 102, 1548-9 (2003).

Ishida, T.; Inaba, M.; Hisha, H.; Sugiura, K.; Adachi, Y.; Nagata, N.; Ogawa, R.; Good, R.A.; Ikehara, S. Requirement of donor-derived stromal cells in the bone marrow for successful allogeneic bone marrow transplantation. Complete prevention of recurrence of autoimmune diseases in MRL/MP-Ipr/Ipr mice by transplantation of bone marrow plus bones (stromal cells) from the same donor. *J. Immunol.* 152, 3119-27 (1994).

Jackson, K.A.; Mi, T.; Goodell, M.A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14482-6 (1999).

Javazon, E.H.; Beggs, K.J.; Flake, A.W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol* 32, 414-25 (2004).

Jezek, P.; Plecitá-Hlavatá, L.; Smolková, K.; Rossignol, R. Distinctions and similarities of cell bioenergetics and the role of mitochondria in hypoxia, cancer, and embryonic development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 604-22 (2010).

Jiang, Y.; Jahagirdar, B.N.; Reinhardt, R.L.; Schwartz, R.E.; Keene, C.D.; Ortiz-Gonzalez, X.R.; Reyes, M.; Lenvik, T.; Lund, T.; Blackstad, M.; Du, J.; Aldrich, S.; Lisberg, A.; Low, W.C.; Largaespada, D.A.; Verfaillie, C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-9 (2002).

Jones, D.L.; Wagers, A.J. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 11-21 (2008a).

Jones, E.; McGonagle, D. Human bone marrow mesenchymal stem cells *in vivo*. *Rheumatology (Oxford)* 47, 126-31 (2008b).

Jones, E.A.; English, A.; Henshaw, K.; Kinsey, S.E.; Markham, A.F.; Emery, P.; McGonagle, D. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum.* 50, 817-27 (2004).

Jones, E.A.; Kinsey, S.E.; English, A.; Jones, R.A.; Straszynski, L.; Meredith, D.M.; Markham, A.F.; Jack, A.; Emery, P.; McGonagle, D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum.* 46, 3349-60 (2002).

Kadiyala, S.; Young, R.G.; Thiede, M.A.; Bruder, S.P. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro*. *Cell Transplant* 6, 125-34 (1997).

Kaelin, W.G.J.; Thompson, C.B. Q&A: Cancer: clues from cell metabolism. *Nature* 465, 562-4 (2010).

Kaneko, T.; Watanabe, T.; Oishi, M. Effect of mitochondrial protein synthesis inhibitors on erythroid differentiation of mouse erythroleukemia (Friend) cells. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3311-5 (1988).

Kanichai, M.; Ferguson, D.; Prendergast, P.J.; Campbell, V.A. Hypoxia promotes chondrogenesis in rat mesenchymal stem cells: a role for AKT and hypoxia-inducible factor (HIF)-1α. *J Cell Physiol* 216, 708-15 (2008).

Kashiwakura, Y.; Katoh, Y.; Tamayose, K.; Konishi, H.; Takaya, N.; Yuhara, S.; Yamada, M.; Sugimoto, K.; Daida, H. Isolation of bone marrow stromal cell-derived smooth muscle cells by a human SM22alpha promoter: *in vitro* differentiation of putative smooth muscle progenitor cells of bone marrow. *Circulation* 107, 2078-81 (2003).

Keuschnigg, J.; Henttinen, T.; Auvinen, K.; Karikoski, M.; Salmi, M.; Jalkanen, S. The prototype endothelial marker PAL-E is a leukocyte trafficking molecule. *Blood* 114, 478-84 (2009).

Kim, J.; Gao, P.; Liu, Y.; Semenza, G.L.; Dang, C.V. Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7381-93 (2007).

Kinnaird, T.; Stabile, E.; Burnett, M.S.; Epstein, S.E. Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences. *Circ. Res.* 95, 354-63 (2004).

Kobayashi, N.; Yasu, T.; Ueba, H.; Sata, M.; Hashimoto, S.; Kuroki, M.; Saito, M.; Kawakami, M. Mechanical stress promotes the expression of smooth muscle-like properties in marrow stromal cells. *Exp. Hematol.* 32, 1238-45 (2004).

Kochetkova, M.; Kumar, S.; McColl, S.R. Chemokine receptors CXCR4 and CCR7 promote metastasis by preventing anoikis in cancer cells. *Cell Death Differ.* 16, 664-73 (2009).

Koirala, S.; Jin, Z.; Piao, X.; Corfas, G. GPR56-regulated granule cell adhesion is essential for rostral cerebellar development. *J Neurosci* 29, 7439-49 (2009).

Kolf, C.M.; Cho, E.; Tuan, R.S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res. Ther.* 9, 204 (2007).

Komarova, S.V.; Ataullakhanov, F.I.; Globus, R.K. Bioenergetics and mitochondrial transmembrane potential during differentiation of cultured osteoblasts. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 279, C1220-9 (2000).

Kortesidis, A.; Zannettino, A.; Isenmann, S.; Shi, S.; Lapidot, T.; Gronthos, S. Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. *Blood* 105, 3793-801 (2005).

Krampera, M.; Sartoris, S.; Liotta, F.; Pasini, A.; Angeli, R.; Cosmi, L.; Andreini, A.; Mosna, F.; Bonetti, B.; Rebellato, E.; Testi, M.G.; Frosali, F. Immune regulation by mesenchymal stem cells derived from adult spleen and thymus. *Stem Cells Dev.* 16, 797-810 (2007).

Krause, D.S.; Theise, N.D.; Collector, M.I.; Henegariu, O.; Hwang, S.; Gardner, R.; Neutzel, S.; Sharkis, S.J. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105, 369-77 (2001).

Kurpinski, K.; Lam, H.; Chu, J.; Wang, A.; Kim, A.; Tsay, E.; Agrawal, S.; Schaffer, D.V.; Li, S. Transforming growth factor-beta and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Stem Cells* 28, 734-42 (2010).

Lamb, T.M.; Knecht, A.K.; Smith, W.C.; Stachel, S.E.; Economides, A.N.; Stahl, N.; Yancopolous, G.D.; Harland, R.M. Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science* 262, 713-8 (1993).

Lapidot, T. Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 938, 83-95 (2001).

Lapidot, T.; Dar, A.; Kollet, O. How do stem cells find their way home?. *Blood* 106, 1901-10 (2005).

Lastres, P.; Letamendía, A.; Zhang, H.; Rius, C.; Almendro, N.; Raab, U.; López, L.A.; Langa, C.; Fabra, A.; Letarte, M.; Bernabéu, C. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J. Cell Biol.* 133, 1109-21 (1996).

Le Blanc, K.; Frassoni, F.; Ball, L.; Locatelli, F.; Roelofs, H.; Lewis, I.; Lanino, E.; Sundberg, B.; Bernardo, M.E.; Remberger, M.; Dini, G.; Egeler, R.M. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371, 1579-86 (2008).

Le Blanc, K.; Rasmusson, I.; Sundberg, B.; Götherström, C.; Hassan, M.; Uzunel, M.; Ringdén, O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363, 1439-41 (2004).

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.* 31, 890-6 (2003).

Lee, K.P.; Simpson, S.J.; Clissold, F.J.; Brooks, R.; Ballard, J.W.O.; Taylor, P.W.; Soran, N.; Raubenheimer, D. Lifespan and reproduction in Drosophila: New insights from nutritional geometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 2498-503 (2008).

Li, F.; Wang, Y.; Zeller, K.I.; Potter, J.J.; Wonsey, D.R.; O'Donnell, K.A.; Kim, J.; Yustein, J.T.; Lee, L.A.; Dang, C.V. Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6225-34 (2005).

Li, N.; Lu, X.; Zhao,X.; Xiang,F.; Xenocostas, A.; Karmazyn, M.; Feng, Q. Endothelial nitric oxide synthase promotes bone marrow stromal cell migration to the ischemic myocardium via upregulation of stromal cell-derived factor-1α. *Stem Cells* 27, 961-70 (2009).

Li, W.; Ma, N.; Ong, L.; Nesselmann, C.; Klopsch, C.; Ladilov, Y.; Furlani, D.; Piechaczek, C.; Moebius, J.M.; Lützow, K.; Lendlein, A.; Stamm, C.; Li, R.; Steinhoff, G. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells* 25, 2118-27 (2007).

Liechty, K.W.; MacKenzie, T.C.; Shaaban, A.F.; Radu, A.; Moseley, A.M.; Deans, R.; Marshak, D.R.; Flake, A.W. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat. Med.* 6, 1282-6 (2000).

Liu, K.; Chi, L.; Guo, L.; Liu, X.; Luo, C.; Zhang, S.; He, G. The interactions between brain microvascular endothelial cells and mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. *Microvasc. Res.* 75, 59-67 (2008).

Loeffler, M.; Bratke, T.; Paulus, U.; Li, Y.Q.; Potten, C.S. Clonality and life cycles of intestinal crypts explained by a state dependent stochastic model of epithelial stem cell organization. *J. Theor. Biol.* 186, 41-54 (1997).

Loeffler, M.; Roeder, I. Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models-a conceptual approach. *Cells Tissues Organs*171, 8-26 (2002).

Loor, G.; Schumacker, P.T. Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia-reperfusion. *Cell Death Differ.* 15, 686-90 (2008).

Lord-Dufour, S.; Copland, I.B.; Levros, L.J.; Post, M.; Das, A.; Khosla, C.; Galipeau, J.; Rassart, E.; Annabi, B. Evidence for transcriptional regulation of the glucose-6-phosphate transporter by HIF-1α: Targeting G6PT with mumbaistatin analogs in hypoxic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 27, 489-97 (2009).

Luskin, M.B.; Parnavelas, J.G.; Barfield, J.A. Neurons, astrocytes, and oligodendrocytes of the rat cerebral cortex originate from separate progenitor cells: an ultrastructural analysis of clonally related cells. *J Neurosci* 13, 1730-50 (1993).

Macchiarini, P.; Jungebluth, P.; Go, T.; Asnaghi, M.A.; Rees, L.E.; Cogan, T.A.; Dodson, A.; Martorell, J.; Bellini, S.; Parnigotto, P.P.; Dickinson, S.C.; Hollander, A.P.; Mantero, S.; Conconi, M.T.; Birchall, M.A. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 372, 2023-30 (2008).

Martin-Rendon, E.; Hale, S.J.M.; Ryan, D.; Baban, D.; Forde, S.P.; Roubelakis, M.; Sweeney, D.; Moukayed, M.; Harris, A.L.; Davies, K.; Watt, S.M. Transcriptional profiling of human cord blood CD133+ and cultured bone marrow mesenchymal stem cells in response to hypoxia. *Stem Cells* 25, 1003-12 (2007).

Matsui, T.; Hayashi-Kisumi, F.; Kinoshita, Y.; Katahira, S.; Morita, K.; Miyachi, Y.; Ono, Y.; Imai, T.; Tanigawa, Y.; Komiya, T.; Tsukita, S. Identification of novel keratinocyte-secreted peptides dermokine-alpha/-beta and a new stratified epithelium-secreted protein gene complex on human chromosome 19q13.1. *Genomics* 84, 384-97 (2004).

Mazumdar, J.; O'Brien, W.T.; Johnson, R.S.; LaManna, J.C.; Chavez, J.C.; Klein, P.S.; Simon, M.C. O_2 regulates stem cells through Wnt/β-catenin signalling. Nat. Cell Biol. 12, 1007-13 (2010).

McAllister, K.A.; Grogg, K.M.; Johnson, D.W.; Gallione, C.J.; Baldwin, M.A.; Jackson, C.E.; Helmbold, E.A.; Markel, D.S.; McKinnon, W.C.; Murrell, J.; *et al.* Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat. Genet.* 8, 345-51 (1994).

Méndez-Ferrer, S.; Michurina, T.V.; Ferraro, F.; Mazloom, A.R.; Macarthur, B.D.; Lira, S.A.; Scadden, D.T.; Ma'ayan, A.; Enikolopov, G.N.; Frenette, P.S. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829-34 (2010).

Mets, T.; Verdonk, G. Variations in the stromal cell population of human bone marrow during aging. *Mech Ageing Dev* 15, 41-9 (1981).

Miao, Z.; Jin, J.; Chen, L.; Zhu, J.; Huang, W.; Zhao, J.; Qian, H.; Zhang, X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol. Int.* 30, 681-7 (2006).

Mikawa, S.; Sato, K. Noggin expression in the adult rat brain. *Neuroscience* 184, 38-53 (2011).

Mitchell, K.E.; Weiss, M.L.; Mitchell, B.M.; Martin, P.; Davis, D.; Morales, L.; Helwig, B.; Beerenstrauch, M.; Abou-Easa, K.; Hildreth, T.; Troyer, D.; Medicetty, S. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 21, 50-60 (2003).

Mohyeldin, A.; Garzón-Muvdi, T.; Quiñones-Hinojosa, A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 7, 150-61 (2010).

Moore, K.A.; Lemischka, I.R. Stem cells and their niches. *Science* 311, 1880-5 (2006).

Morrison, S.J.; Csete, M.; Groves, A.K.; Melega, W.; Wold, B.; Anderson, D.J. Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells. *J. Neurosci.* 20, 7370-6 (2000).

Mostafa, S.S.; Miller, W.M.; Papoutsakis, E.T. Oxygen tension influences the differentiation, maturation and apoptosis of human megakaryocytes. *Br J Haematol* 111, 879-89 (2000).

Moyes, C.D.; Mathieu-Costello, O.A.; Tsuchiya, N.; Filburn, C.; Hansford, R.G. Mitochondrial biogenesis during cellular differentiation. *Am. J. Physiol.* 272, C1345-51 (1997).

Muraglia, A.; Cancedda, R.; Quarto, R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113 (Pt 7), 1161-6 (2000).

Mylotte, L.A.; Duffy, A.M.; Murphy, M.; O'Brien, T.; Samali, A.; Barry, F.; Szegezdi, E. Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment. *Stem Cells* 26, 1325-36 (2008).

Nagai, R.; Hashimoto, R.; Tanaka, Y.; Taguchi, O.; Sato, M.; Matsukage, A.; Yamaguchi, M. Syntrophin-2 is required for eye development in Drosophila. *Exp Cell Res* 316, 272-85 (2010).

Nakahara, H.; Dennis, J.E.; Bruder, S.P.; Haynesworth, S.E.; Lennon, D.P.; Caplan, A.I. *In vitro* differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp. Cell Res.* 195, 492-503 (1991).

National Research Council (U. S.). *Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine. National Academy Press, Washington, D.C.* (2002).

Nauta, A.J.; Fibbe, W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110, 3499-506 (2007).

Németh, K.; Leelahavanichkul, A.; Yuen, P.S.T.; Mayer, B.; Parmelee, A.; Doi, K.; Robey, P.G.; Leelahavanichkul, K.; Koller, B.H.; Brown, J.M.; Hu, X.; Jelinek, I.; Star, R.A.; Mezey, E. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 15, 42-9 (2009).

Némos, C.; Basciano, L.; Dalloul, A. Effet et applications potentielles de la culture des cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse en condition d'hypoxie. *Pathologie Biologie* Sous presse (2011).

Nosten-Bertrand, M.; Errington, M.L.; Murphy, K.P.; Tokugawa, Y.; Barboni, E.; Kozlova, E.; Michalovich, D.; Morris, R.G.; Silver, J.; Stewart, C.L.; Bliss, T.V.; Morris, R.J. Normal spatial learning despite regional inhibition of LTP in mice lacking Thy-1. *Nature* 379, 826-9 (1996).

Nuttall, M.E.; Patton, A.J.; Olivera, D.L.; Nadeau, D.P.; Gowen, M. Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *J Bone Miner Res* 13, 371-82 (1998).

Ohnishi, S.; Yasuda, T.; Kitamura, S.; Nagaya, N. Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells. *Stem Cells* 25, 1166-77 (2007).

Okuyama, H.; Krishnamachary, B.; Zhou, Y.F.; Nagasawa, H.; Bosch-Marce, M.; Semenza, G.L. Expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in bone marrow-derived mesenchymal cells is dependent on hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 281, 15554-63 (2006).

Oswald, J.; Boxberger, S.; Jørgensen, B.; Feldmann, S.; Ehninger, G.; Bornhäuser, M.; Werner, C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro*. *Stem Cells* 22, 377-84 (2004).

Pacary, E.; Tixier, E.; Coulet, F.; Roussel, S.; Petit, E.; Bernaudin, M. Crosstalk between HIF-1 and ROCK pathways in neuronal differentiation of mesenchymal stem cells, neurospheres and in PC12 neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 35, 409-23 (2007).

Pazin, D.E.; Albrecht, K.H. Developmental expression of Smoc1 and Smoc2 suggests potential roles in fetal gonad and reproductive tract differentiation. *Dev. Dyn.* 238, 2877-90 (2009).

Peled, A.; Petit, I.; Kollet, O.; Magid, M.; Ponomaryov, T.; Byk, T.; Nagler, A.; Ben-Hur, H.; Many, A.; Shultz, L.; Lider, O.; Alon, R. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 283, 845-8 (1999).

Pereira, R.F.; O'Hara, M.D.; Laptev, A.V.; Halford, K.W.; Pollard, M.D.; Class, R.; Simon, D.; Livezey, K.; Prockop, D.J. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1142-7 (1998).

Pevsner-Fischer, M.; Levin, S.; Zipori, D. The Origins of Mesenchymal Stromal Cell Heterogeneity. *Stem Cell Rev* at <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s12015-011-9229-7> (2011).

Pistoia, V.; Raffaghello, L. Potential of mesenchymal stem cells for the therapy of autoimmune diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 6, 211-8 (2010).

Pittenger, M.F.; Mackay, A.M.; Beck, S.C.; Jaiswal, R.K.; Douglas, R.; Mosca, J.D.; Moorman, M.A.; Simonetti, D.W.; Craig, S.; Marshak, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-7 (1999).

Pontikoglou, C.; Deschaseaux, F.; Sensebé, L.; Papadaki, H.A. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties and Their Role in Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Stem Cell Rev* (2011).

Psaltis, P.J.; Zannettino, A.C.W.; Worthley, S.G.; Gronthos, S. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. *Stem Cells* 26, 2201-10 (2008).

Quevedo, H.C.; Hatzistergos, K.E.; Oskouei, B.N.; Feigenbaum, G.S.; Rodriguez, J.E.; Valdes, D.; Pattany, P.M.; Zambrano, J.P.; Hu, Q.; McNiece, I.; Heldman, A.W.; Hare, J.M. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 14022-7 (2009).

Quirici, N.; Soligo, D.; Bossolasco, P.; Servida, F.; Lumini, C.; Deliliers, G.L. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp. Hematol.* 30, 783-91 (2002).

Rafei, M.; Campeau, P.M.; Aguilar-Mahecha, A.; Buchanan, M.; Williams, P.; Birman, E.; Yuan, S.; Young, Y.K.; Boivin, M.; Forner, K.; Basik, M.; Galipeau, J. Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner. *J Immunol* 182, 5994-6002 (2009).

Reynolds, B.A.; Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-10 (1992).

Risbud, M.V.; Shapiro, I.M.; Vaccaro, A.R.; Albert, T.J. Stem cell regeneration of the nucleus pulposus. *Spine J* 4, 348S-353S (2004).

Rocnik, E.F.; Liu, P.; Sato, K.; Walsh, K.; Vaziri, C. The novel SPARC family member SMOC-2 potentiates angiogenic growth factor activity. *J Biol Chem* 281, 22855-64 (2006).

Rodesch, F.; Simon, P.; Donner, C.; Jauniaux, E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 80, 283-5 (1992).

Sacchetti, B.; Funari, A.; Michienzi, S.; Di Cesare, S.; Piersanti, S.; Saggio, I.; Tagliafico, E.; Ferrari, S.; Robey, P.G.; Riminucci, M.; Bianco, P. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 131, 324-36 (2007).

Sadat, S.; Gehmert,S.; Song, Y.; Yen, Y.; Bai, X.; Gaiser, S.; Klein, H.; Alt, E. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* 363, 674-9 (2007).

Sarugaser, R.; Lickorish, D.; Baksh, D.; Hosseini, M.M.; Davies, J.E. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 23, 220-9 (2005).

Scheller, E.L.; Song, J.; Dishowitz, M.I.; Soki, F.N.; Hankenson, K.D.; Krebsbach, P.H. Leptin functions peripherally to regulate differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells* 28, 1071-80 (2010).

Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7-25 (1978).

Schumacker, P.T. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Crit. Care Med.* 33, S423-5 (2005).

Semenza, G.L. Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 8, 863-84 (1994).

Serafini, M.; Dylla, S.J.; Oki, M.; Heremans, Y.; Tolar, J.; Jiang, Y.; Buckley, S.M.; Pelacho, B.; Burns, T.C.; Frommer, S.; Rossi, D.J.; Bryder, D. Hematopoietic reconstitution by multipotent adult progenitor cells: precursors to long-term hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 204, 129-39 (2007).

Serakinci, N.; Guldberg, P.; Burns, J.S.; Abdallah, B.; Schrødder, H.; Jensen, T.; Kassem, M. Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* 23, 5095-8 (2004).

Serakinci, N.; Hoare, S.F.; Kassem, M.; Atkinson, S.P.; Keith, W.N. Telomerase promoter reprogramming and interaction with general transcription factors in the human mesenchymal stem cell. *Regen Med* 1, 125-31 (2006).

Shamblott, M.J.; Axelman, J.; Littlefield, J.W.; Blumenthal, P.D.; Huggins, G.R.; Cui, Y.; Cheng, L.; Gearhart, J.D. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 113-8 (2001).

Shamblott, M.J.; Axelman, J.; Wang, S.; Bugg, E.M.; Littlefield, J.W.; Donovan, P.J.; Blumenthal, P.D.; Huggins, G.R.; Gearhart, J.D. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13726-31 (1998).

Short, B.; Brouard, N.; Occhiodoro-Scott, T.; Ramakrishnan, A.; Simmons, P.J. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res* 34, 565-71 (2003).

Simmons, P.J.; Torok-Storb, B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78, 55-62 (1991).

Simonsen, J.L.; Rosada, C.; Serakinci, N.; Justesen, J.; Stenderup, K.; Rattan, S.I.S.; Jensen, T.G.; Kassem, M. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol* 20, 592-6 (2002).

Smith, A.G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 435-62 (2001).

Smith, W.C.; Knecht, A.K.; Wu, M.; Harland, R.M. Secreted noggin protein mimics the Spemann organizer in dorsalizing Xenopus mesoderm. *Nature* 361, 547-9 (1993).

Snyder, C.M.; Chandel, N.S. Mitochondrial regulation of cell survival and death during low-oxygen conditions. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2673-83 (2009).

Snykers, S.; De Kock, J.; Tamara, V.; Rogiers, V. Hepatic differentiation of mesenchymal stem cells: *in vitro* strategies. *Methods Mol. Biol.* 698, 305-14 (2011).

Sohni, A.; Verfaillie, C.M. Multipotent adult progenitor cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 24, 3-11 (2011).

Song, L.; Tuan, R.S. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J* 18, 980-2 (2004).

Spees, J.L.; Olson, S.D.; Ylostalo, J.; Lynch, P.J.; Smith, J.; Perry, A.; Peister, A.; Wang, M.Y.; Prockop, D.J. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during *ex vivo* repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 2397-402 (2003).

Spradling, A.; Drummond-Barbosa, D.; Kai, T. Stem cells find their niche. *Nature* 414, 98-104 (2001).

Stagg, J.; Pommey, S.; Eliopoulos, N.; Galipeau, J. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood* 107, 2570-7 (2006).

Stenderup, K.; Justesen, J.; Clausen, C.; Kassem, M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 33, 919-26 (2003).

Sung, J.H.; Yang, H.; Park, J.B.; Choi, G.; Joh, J.; Kwon, C.H.; Chun, J.M.; Lee, S.; Kim, S. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. *Transplant. Proc.* 40, 2649-54 (2008).

Sutherland, H.J.; Eaves, C.J.; Eaves, A.C.; Dragowska, W.; Lansdorp, P.M. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis *in vitro*. *Blood* 74, 1563-70 (1989).

Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-76 (2006).

Tanaka, H.; Iguchi, N.; Miyagawa, Y.; Koga, M.; Kohroki, J.; Nishimune, Y. Differential expression of succinyl CoA transferase (SCOT) genes in somatic and germline cells of the mouse testis. *Int. J. Androl.* 26, 52-6 (2003).

Tang, J.; Wang, J.; Yang, J.; Kong, X.; Zheng, F.; Guo, L.; Zhang, L.; Huang, Y. Mesenchymal stem cells over-expressing SDF-1 promote angiogenesis and improve heart function in experimental myocardial infarction in rats. *Eur J Cardiothorac Surg* 36, 644-50 (2009).

Tarte, K.; Gaillard, J.; Lataillade, J.; Fouillard, L.; Becker, M.; Mossafa, H.; Tchirkov, A.; Rouard, H.; Henry, C.; Splingard, M.; Dulong, J.; Monnier, D. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood* 115, 1549-53 (2010).

Tondreau, T.; Dejeneffe, M.; Meuleman, N.; Stamatopoulos, B.; Delforge, A.; Martiat, P.; Bron, D.; Lagneaux, L. Gene expression pattern of functional neuronal cells derived from human bone marrow mesenchymal stromal cells. *BMC Genomics* 9, 166 (2008).

Toulza, E.; Mattiuzzo, N.R.; Galliano, M.; Jonca, N.; Dossat, C.; Jacob, D.; de Daruvar, A.; Wincker, P.; Serre, G.; Guerrin, M. Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function. *Genome Biol.* 8, R107 (2007).

Trentin, J. Hematopoietic microenvironments: Historical perspectives, status and projections. *In: Tavassoli, M. ed. Handbook of the Hemopoietic Microenvironment (Clifton, NJ:Humana Press)*, 1–87 (1989).

Tropepe, V.; Coles, B.L.; Chiasson, B.J.; Horsford, D.J.; Elia, A.J.; McInnes, R.R.; van der Kooy, D. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 287, 2032-6 (2000).

Tsai, C.; Chen, Y.; Yew, T.; Chen, L.; Wang, J.; Chiu, C.; Hung, S. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood* 117, 459-69 (2011).

Valorani, M.G.; Germani, A.; Otto, W.R.; Harper, L.; Biddle, A.; Khoo, C.P.; Lin, W.R.; Hawa, M.I.; Tropel, P.; Patrizi, M.P.; Pozzilli, P.; Alison, M.R. Hypoxia increases Sca-1/CD44 co-expression in murine mesenchymal stem cells and enhances their adipogenic differentiation potential. *Cell Tissue Res.* 341, 111-20 (2010).

van der Kooy, D.; Weiss, S. Why stem cells? *Science* 287, 1439-41 (2000).

Vayssière, J.L.; Cordeau-Lossouarn, L.; Larcher, J.C.; Basseville, M.; Gros, F.; Croizat, B. Participation of the mitochondrial genome in the differentiation of neuroblastoma cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28A, 763-72 (1992).

Wakitani, S.; Saito, T.; Caplan, A.I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18, 1417-26 (1995).

Wang, G.; Bunnell, B.A.; Painter, R.G.; Quiniones, B.C.; Tom, S.; Lanson, N.A.J.; Spees, J.L.; Bertucci, D.; Peister, A.; Weiss, D.J.; Valentine, V.G.; Prockop, D.J. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 186-91 (2005).

Wang, M.; Zhang, W.; Crisostomo, P.; Markel, T.; Meldrum, K.K.; Fu, X.Y.; Meldrum, D.R. STAT3 mediates bone marrow mesenchymal stem cell VEGF production. *J Mol Cell Cardiol* 42, 1009-15 (2007).

Weissman, I.L.; Anderson, D.J.; Gage, F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 387-403 (2001).

Williams, R.S. Mitochondrial gene expression in mammalian striated muscle. Evidence that variation in gene dosage is the major regulatory event. *J. Biol. Chem.* 261, 12390-4 (1986).

Wilson, A.; Trumpp, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 6, 93-106 (2006).

Woodbury, D.; Schwarz, E.J.; Prockop, D.J.; Black, I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61, 364-70 (2000).

Wright, N.; Hidalgo, A.; Rodríguez-Frade, J.M.; Soriano, S.F.; Mellado, M.; Parmo-Cabañas, M.; Briskin, M.J.; Teixidó, J. The chemokine stromal cell-derived factor-1 alpha modulates alpha 4 beta 7 integrin-mediated lymphocyte adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1 and fibronectin. *J. Immunol.* 168, 5268-77 (2002).

Wright, N.A. Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. *Int J Exp Pathol* 81, 117-43 (2000).

Xie, X.; Wang, J.; Cao, J.; Zhang, X. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells induced by myocardial medium under hypoxic conditions. *Acta Pharmacol Sin* 27, 1153-8 (2006).

Yu, D.; Cringle, S.J. Retinal degeneration and local oxygen metabolism. *Exp. Eye Res.* 80, 745-51 (2005).

Zhang, H.; Zeng, X.; Sun, L. Allogenic bone-marrow-derived mesenchymal stem cells transplantation as a novel therapy for systemic lupus erythematosus. *Expert Opin Biol Ther* 10, 701-9 (2010).

Zhang, M.; Mal, N.; Kiedrowski, M.; Chacko, M.; Askari, A.T.; Popovic, Z.B.; Koc, O.N.; Penn, M.S. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB J* 21, 3197-207 (2007).

Zhu, J.; Liu, M.; Kennedy, R.H.; Liu, S.J. TNF-alpha-induced impairment of mitochondrial integrity and apoptosis mediated by caspase-8 in adult ventricular myocytes. *Cytokine* 34, 96-105 (2006).

Zipori, D. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells* 23, 719-26 (2005).

Zou, D.; Han, W.; You, S.; Ye, D.; Wang, L.; Wang, S.; Zhao, J.; Zhang, W.; Jiang, X.; Zhang, X.; Huang, Y. *In vitro* study of enhanced osteogenesis induced by HIF-1α-transduced bone marrow stem cells. *Cell Prolif.* 44, 234-43 (2011).

Zuk, P.A.; Zhu, M.; Ashjian, P.; De Ugarte, D.A.; Huang, J.I.; Mizuno, H.; Alfonso, Z.C.; Fraser, J.K.; Benhaim, P.; Hedrick, M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279-95 (2002).

Zulewski, H.; Abraham, E.J.; Gerlach, M.J.; Daniel, P.B.; Moritz, W.; Müller, B.; Vallejo, M.; Thomas, M.K.; Habener, J.F. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate *ex vivo* into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 50, 521-33 (2001).

Zvaifler, N.J.; Marinova-Mutafchieva, L.; Adams, G.; Edwards, C.J.; Moss, J.; Burger, J.A.; Maini, R.N. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2, 477-88 (2000).

Publication

Basciano et al. BMC Cell Biology 2011, 12:12
http://www.biomedcentral.com/1471-2121/12/12

BMC Cell Biology

RESEARCH ARTICLE Open Access

Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status

Leticia Basciano, Christophe Nemos, Bernard Foliguet, Natalia de Isla, Marcelo de Carvalho, Nguyen Tran and Ali Dalloul*

Abstract

Background: In the bone marrow, hematopietic and mesenchymal stem cells form a unique niche in which the oxygen tension is low. Hypoxia may have a role in maintaining stem cell fate, self renewal and multipotency. However, whereas most studies addressed the effect of transient *in vitro* exposure of MSC to hypoxia, permanent culture under hypoxia should reflect the better physiological conditions.

Results: Morphologic studies, differentiation and transcriptional profiling experiments were performed on MSC cultured in normoxia (21% O_2) versus hypoxia (5% O_2) for up to passage 2. Cells at passage 0 and at passage 2 were compared, and those at passage 0 in hypoxia generated fewer and smaller colonies than in normoxia. In parallel, MSC displayed (>4 fold) inhibition of genes involved in DNA metabolism, cell cycle progression and chromosome cohesion whereas transcripts involved in adhesion and metabolism (CD93, ESAM, VWF, PLVAP, ANGPT2, LEP, TCF1) were stimulated. Compared to normoxic cells, hypoxic cells were morphologically undifferentiated and contained less mitochondrias. After this lag phase, cells at passage 2 in hypoxia outgrew the cells cultured in normoxia and displayed an enhanced expression of genes (4-60 fold) involved in extracellular matrix assembly (SMOC2), neural and muscle development (NOG, GPR56, SNTG2, LAMA) and epithelial development (DMKN). This group described herein for the first time was assigned by the Gene Ontology program to "plasticity".

Conclusion: The duration of hypoxemia is a critical parameter in the differentiation capacity of MSC. Even in growth promoting conditions, hypoxia enhanced a genetic program that maintained the cells undifferentiated and multipotent. This condition may better reflect the *in vivo* gene signature of MSC, with potential implications in regenerative medicine.

Background

Adult bone marrow is a widely used source of mesenchymal stem cells (MSC) that can be isolated and expanded in culture while keeping the ability to form adipocytes, chondrocytes and osteoblasts [1,2] and possibly other cell types including cardiomyocytes [3]. Within the bone marrow, MSC may interact with hemopoietic stem cells (HSC), which reside in a specific microenvironment formed by various stromal precursor cells and osteoblasts, called the niche [4-6]. Whether MSC reside in the same niche amidst HSC or whether they dwell in a specific niche is presently unknown. Different types of niches for hemopoietic progenitors may exist depending on their more or less primitive state [7] located near bone surfaces away from blood vessels and therefore submitted to a low O_2 tension. It is thus inferred that stem cells are equipped to survive in a hypoxic environment and that this condition plays a role in the maintenance of multipotency [8] and extension of survival [9]. This may hold true for murine and human MSC as their proliferation, differentiation and survival [10-12] are affected by culture in low O_2 tension. However the degree and duration of hypoxia described in the literature vary greatly and may result in opposite effects on

* Correspondence: ali.dalloul@medecine.uhp-nancy.fr
Nancy University Medical School (EA 4369) and School of Surgery (NT), 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

BioMed Central

© 2011 Basciano et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

the proliferation and differentiation capacities of MSC [13-15]. So far one study described the long term (one month) effect of human MSC culture under low O_2 tension (2% O_2) and showed improved survival and increase in adipocytic and osteogenic differentiation capacity [16]. In the present study we cultured human MSC in normoxia (21% O_2) versus hypoxia (5% O_2) for up to passage 3 (P3) and compared their morphology differentiation potential and mRNA expression at early and late passages. We observed that cells cultured under low O_2 tension were more undifferentiated than cells cultured in normoxia. Further, hypoxia inhibited the expression of genes involved in DNA replication and cell division at P0. At P2, however, Gene Ontology (GO) analysis revealed that only one significant functional group of genes was stimulated and related to "plasticity". We conclude that culture in hypoxia maintains MSC in a multipotent, undifferentiated state.

Results

The effect of hypoxia on MSC expansion and phenotype

Bone marrow mononuclear cells (MNC) were cultured and passaged until P3. As shown in Figure 1, both the CFU-F numbers and the mean colony size were significantly smaller at P0 in 5% O_2 (hypoxia) versus 21% O_2 (normoxia). This diminution was however less significant at P1 ($0.05<p<0.1$), and at P2 the numbers of CFU-F were enhanced by hypoxia. In other experiments, cells were trypsined and counted, total cell numbers were diminished in hypoxia versus normoxia at P0 whereas they were enhanced at P1; the overall cell doubling/day was diminished by hypoxia until P1 and augmented afterwards (data not shown).

In parallel, immunostaining and flow cytometry were performed at various time points. MSC were negative for CD45 and CD34 and positive albeit variably for several other markers (Figure 2). In brief, cultured cells displayed a typical MSC profile with stable phenotype overtime and no significant phenotypic differences between hypoxic and normoxic conditions in agreement with others [17]. Only STRO-1 was transiently expressed on 50% of the cells at P0 under hypoxia and diminished thereafter as expected from previous observations [18]. In brief, after a lag phase during which the hypoxic cells grew slower than normoxic cells, the former expanded faster in late passages. In contrast, with the exception of STRO-1 which is dicussed in the relevant section, the phenotype of MSC was not modified during culture expansion irrespective of the oxygen tension. We next looked for qualitative effects of hypoxia and investigated the morphology of MSC by light and electron microscopy and evaluated the numbers of mitochondria in hypoxic versus normoxic cells.

Culture of MSC in hypoxia inhibited cell differentiation and mitochondrial biogenesis

The number of mitochondria was evaluated by flow cytometry, by Mitotracker staining and by transmission electron microscopy TEM at P2, under hypoxia and normoxia in 3 independent experiments. Cells were

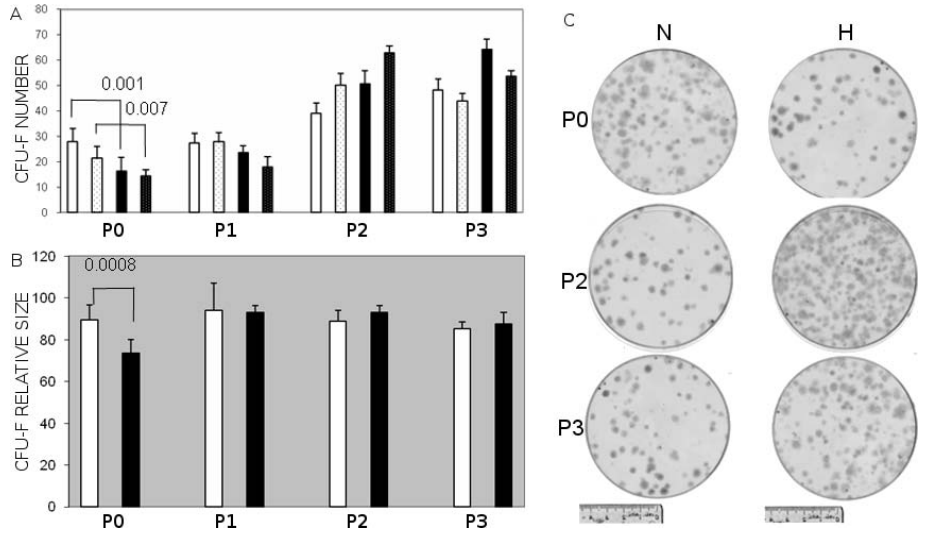

Figure 1 The effect of oxygen tension on CFU-F size and numbers. Cells were plated at 1000 (plain histograms) and 10000 MNC/60 cm^2 (dotted histograms) from total BM for P0. For the next passages, 100 (plain histograms) and 1000 cells/cm^2 (dotted histograms) were seeded. Cells were incubated under hypoxic (5% O_2, black histograms) or normoxic conditions (21% O_2, white histograms) respectively and colonies were counted and their size evaluated (A & B). Mean +/- of 3 to 5 independent experiments. Numbers above the histograms (A & B) represent the significance calculated using bilateral paired Student's t test. A representative aspect of colonies at various passages is shown (C).

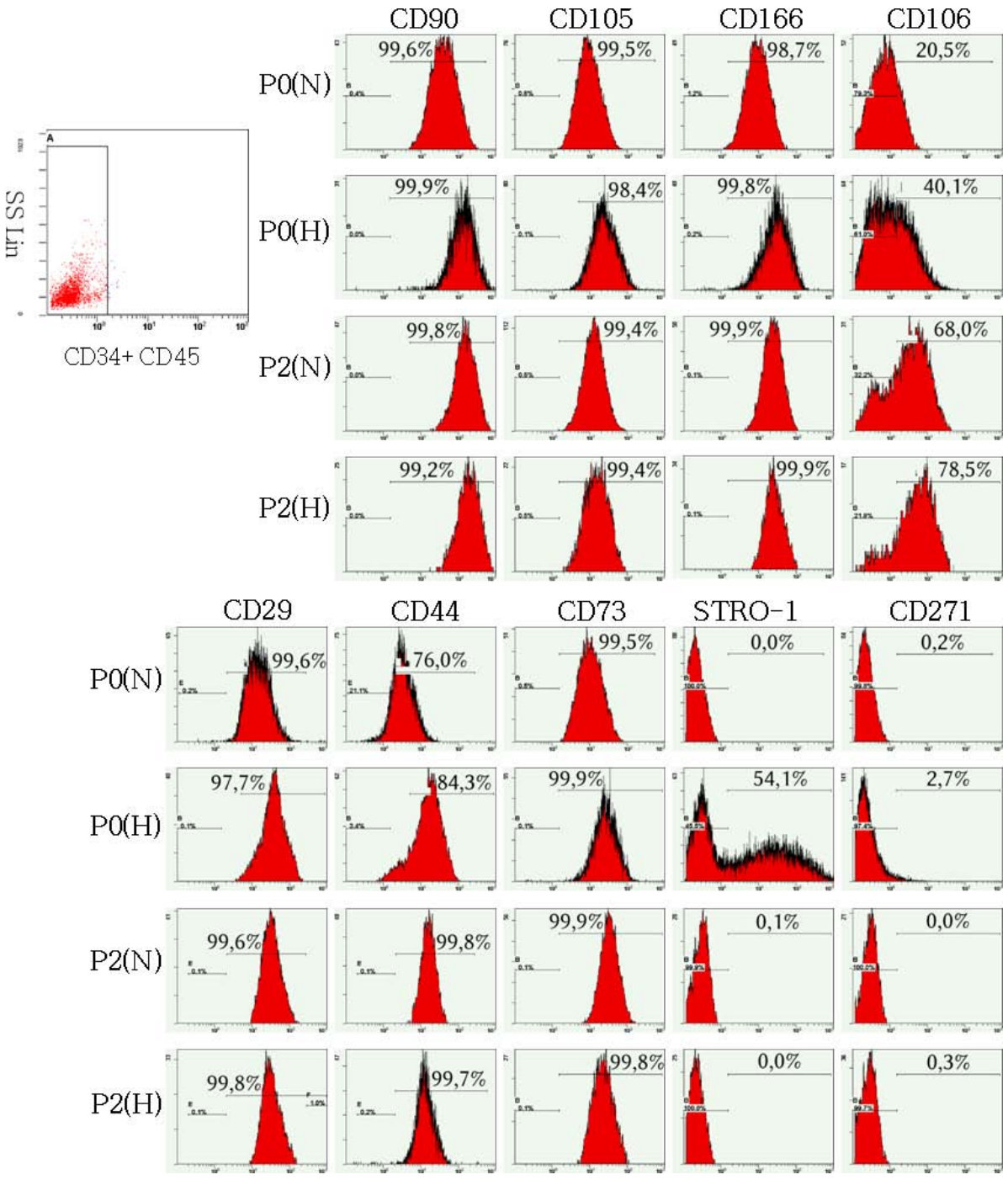

Figure 2 Stability of MSC phenotype in culture. Flow cytometry analysis of surface markers at P0 and P2 in hypoxia and normoxia. Histograms show the intensity of several markers within the CD34-CD45- (dot plot), MSC-enriched population from the bone marrow. A representative experiment out of 3 from distinct donors is shown.

analyzed by flow cytometry. The mean fluorescence intensity of hypoxic cells compared to normoxic cells was 47.7 versus 117 on histograms (Figure 3A). Thus hypoxia did inhibit the biosynthesis of mitochondria. The same cells were also permeabilized and stained with Mitotracker and analysed on fluorescence microscopy. As shown in Figure 3B, normoxic cells looked brighter than the hypoxic ones. We observed a 50 to 75% inhibition of mitochondrial biogenesis by counting the mitochondria on TEM sections. Strikingly, hypoxic cells

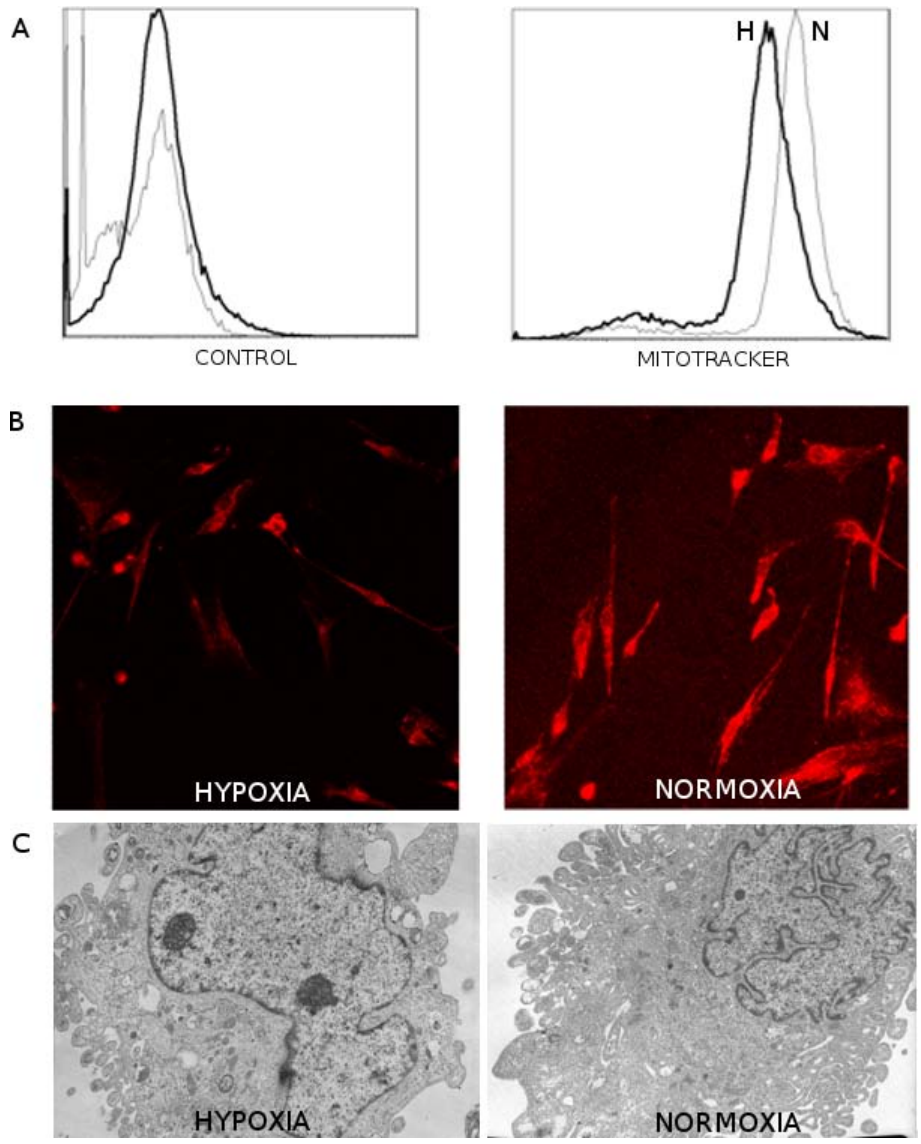

Figure 3 Morphological aspect of MSC. The amount of mitochondria was evaluated by flow cytometry (A) and optical microscopy (B) on MSC stained with Mitotracker Orange. TEM was performed on MSC at P2 culture in normoxic or hypoxic conditions (C). (N = 3).

looked less differentiated than normoxic ones. They displayed larger and less convoluted nuclei and more abundant nucleoli, and a higher nuclei/cytoplasm index, although the size of cells was very similar under both conditions (Figure 3C).

Long term hypoxia stimulated the differentiation of MSC in adipocytes and osteocytes

MSC were grown from the start in normoxia versus hypoxia until P2, then washed and cultured in osteogenic or adipogenic lineage-specific media. The cells were kept in normoxia and hypoxia during the differentiation process. Differentiated cells were characterized by conventional histology staining (Figure 4A) and by RT-PCR for the amplification of lineage-specific transcripts for adipocytes (LPL, PPARγ) and osteocytes (ALPL, Runx2), respectively. The later transcripts were investigated in MSC at P2 before they were cultured in differentiating conditions. As shown from 2 independent experiments in Figure 4B, the expression of ALPL was stronger in hypoxic MSC than in normoxic cells. Further, while Runx2 transcription was undetectable in normoxic MSC, it was induced in hypoxic cells. This suggested that hypoxic cells were more prone to osteogenic differentiation than normoxic cells. We indeed observed that hypoxic MSC generated more (50% to 100% increase) osteogenic and adipogenic colonies, than normoxic MSC (Figure 4C).

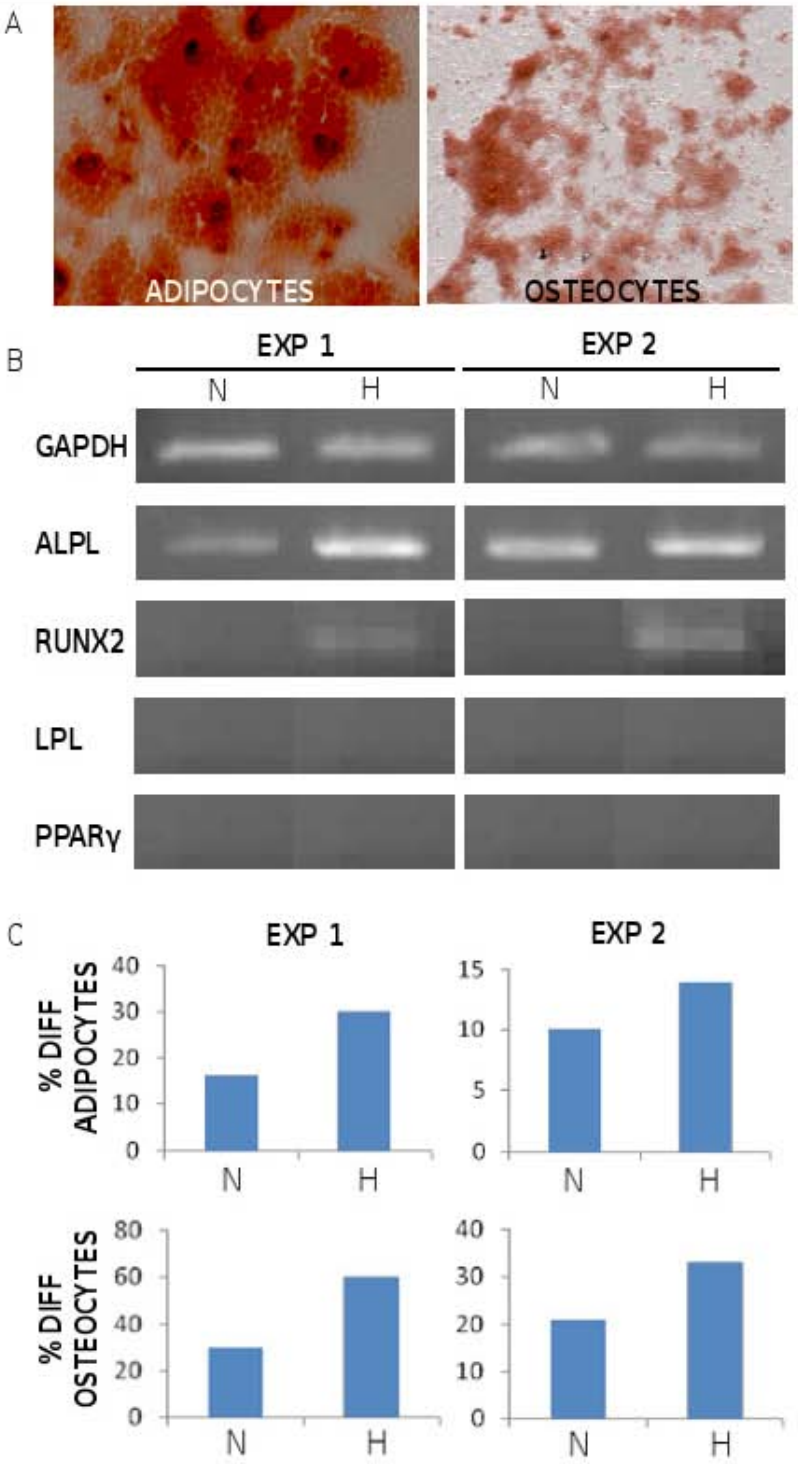

Figure 4 Culture in hypoxia enhanced the potential of MSC to differentiate in adipocytes (A) and osteocytes (O). MSC were cultured in hypoxia or normoxia until P2, and shifted to adipocyte- or osteocyte-specific differentiation conditions respectively for 2-4 more weeks. The aspect of differentiated colonies under hypoxia is shown (A). In 2 independent experiments (B), MSC were harvested at P2, RNA from normoxic (N) or hypoxic (H) cells was extracted, reverse-transcribed and amplified by PCR with primers specific for control GAPDH and the indicated genes, representative of adipocytic (LPL, PPARγ) and osteocytic (ALPL, Runx2) lineages. The same cells were grown in osteocytic and adipocytic-specific medias and colonies were counted and compared to the numbers of CFU-F generated in MSC-specific medium (C).

MSC from 3 distinct donors were cultured in normoxic and in hypoxic conditions. The cells from each donor/condition were harvested at P0 and P2. RNAs were extracted thereafter, processed and hybridization with microarrays was performed in 6 independent experiments. Comparative analysis of transcriptome from MSC cultured at P0 in hypoxia versus normoxia revealed 386 dysregulated genes (1% out of 41,000 genes), of which 174 were up regulated (45%) and 212 were down regulated (55%). GO analysis performed on the 386 dysregulated genes revealed an over-representation of genes (122 genes, $p < 0.1$) involved in DNA metabolism (cell cycle, replication, M-phase, spindle organization and biogenesis) and/or coding for nuclear proteins (chromosome, spindle, nucleus). Among these 122 genes, 118 (98%) had a 2-6 fold decreased expression with the range [2-5.94] corresponding to *NAV2* and *RRM2* genes respectively. Figure 5 and Table 1 summarize the analysis and showed the ten first down regulated genes after short culture in hypoxia. Contrary to down regulated genes, we showed no significant GO over-representation for up regulated genes. Nevertheless, we could observe a strong trend of over representation for genes coding for membrane receptors (CD93, ZP1, ESAM, protocadherin 17) and paracrine factors (Leptin, angiopoietin 2, VWF) with a range of over expression [2-6.96] corresponding to *ALDOC* and *TCF1* genes respectively. Table 1 depicts the ten up regulated genes at P0 in hypoxia.

Comparative analysis of transcriptome from MSC cultured at P2 in hypoxia versus normoxia revealed 519 dysregulated genes, of which 264 were up regulated (50.9%) and 255 were down regulated (49.1%). Gene ontology analysis performed on the 519 deregulated genes revealed an over-representation of genes involved in cell plasticity (48 genes, $p < 0.1$) and adhesion (37 genes, $p < 0.1$). When we increased the stringency of analysis by selecting genes that were 4-fold differentially expressed on 4 arrays, we eliminated genes for cell adhesion GO term but not for plasticity. All these 48 genes characterizing plasticity GO term were up regulated with a range between 4.2 and 58.3. Table 2 shows the ten first up regulated genes after long term culture (P2) in hypoxia. Several transcripts were validated by quantitative, real time PCR (qPCR) (Figure 5B). The results matched that of the gene arrays with enhanced expression of HOXA11, KIT, WNT4, OXCT2 and inhibited expression of CCL2, CX3CL1 under hypoxia.

Discussion

Hematopoietic and Stromal Stem Cells adapt themselves to hypoxia in culture which probably reflects their native hypoxic microenvironment [1-3]. Accordingly, several teams cultured HSC and MSC in hypoxic conditions in

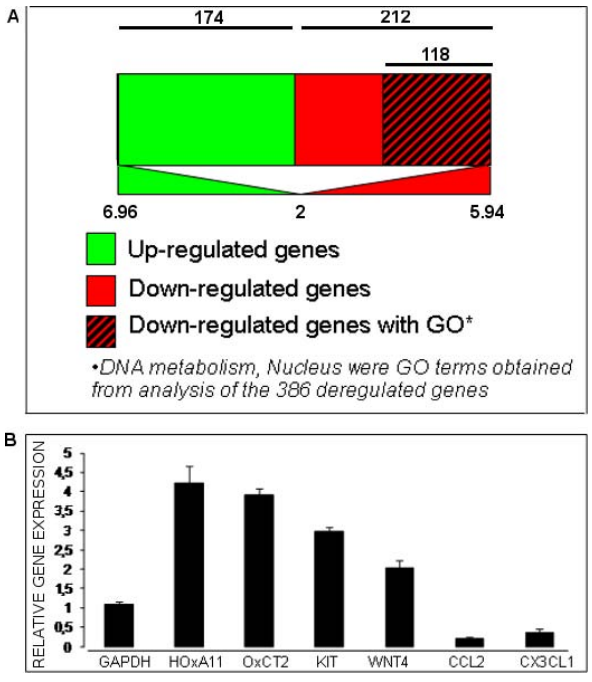

Figure 5 Genetic reprogramming of MSC under hypoxia. MSC from 3 donors were cultured until P0 and P2. RNA was extracted from each culture, processed and hybridized on Agilent DNA microarrays. Diagram A shows the GO analysis of differentially expressed transcripts at P0. Six transcripts were chosen and amplified by qPCR in order to validate gene array results obtained after long term hypoxia using the same extracts. Mean +/- SD from 3 experiments.

Table 1 Ten first down and upregulated genes at P0 in hypoxia

Gene	Fold expression H/N	Genbank Accession	Putative Function
Down Regulated			
RRM2	5.94	NM_001034	Ribonucleotide Reductase
XRCC2	5.80	CR749256	X Ray damage DNA Repair
KIF24	5.16	AK001795	Kinesin: chromatid assembly
POLQ	4.99	AF090919	DNA polymerase theta
E2F8	4.95	NM_024680	Cell cycle progression
FANCD2	4.93	NM_001018115	DNA Repair
ESCO2	4.86	NM_001017420	Sister chromatid cohesion
AURKB	4.74	NM_004217	Chromosome segregation
CENPN	4.48	AK023669	Binding to Centromeres
MKI67	4.46	NM_002417	Cell proliferation
Up Regulated			
TCF1	6.96	NM_000545	Hepatic Transcription Factor
LEP	6.39	NM_000230	Metabolism, apoptosis, angiogenesis
ANGPT2	5.69	NM_001147	Antagonise vascular remodelling
ZP1	5.47	NM_207341	Sperm binding to zona pellucida
VWF	5.41	NM_000552	Platelet binding to endothelium
GIMAP4	5.37	NM_018326	T-cell development, Tumor suppressor ?
CD93	4.56	NM_012072	Intercellular adhesion, clearance apoptotic cells
PLVAP	4.25	NM_031310	Adhesion of Vascular Endothelial cells ?
ESAM	4.24	NM_138961	Adhesion of Endothelial cells
PCDH17	4.14	NM_001040429	Cell-cell connexions in the brain

Comparative analysis of transcriptome from MSC at P0 in hypoxia versus normoxia. Mean from 3 distinct samples.

order to study their differentiation capacity [8-16,19]. Another goal of these experiments is the hope of expanding these cells while maintaining their "stemness" properties. Although data from various laboratories are difficult to compare due to wide variations in oxygen tension, ranging from 0.1 to 5%, and the duration of culture, ranging from a few hours to 2 months, a few studies evidenced an early growth inhibition under hypoxia [16]. Hypoxia induces cell cycle arrest in mammalian cells, however stem cells are more resistant to hypoxia than their progenies again reflecting their natural environment and their intrinsic quiescent state. We performed MSC cultures in 5% O_2 which may be physiological for bone marrow stem cells [20]. As MSC and HSC form a single bone marrow niche [21], 5% O_2 tension is likely to be physiological for MSC as well. We observed that MSC grew slower under 5% O_2 than under 21% O_2 until P1, and gained a progressive growth advantage in the next passages, which matched previously published results [16]. Meanwhile, hypoxic MSC expressed more adhesion and extracellular matrix molecules in early and late cultures, contained less mitochondria and displayed undifferentiated morphological features. In brief, early growth inhibition was somewhat expected and strikingly, GO analysis assigned down regulated genes to DNA metabolism and repair (POLQ, RRM2, XRCC2, FANCD2), cell cycle progression (E2F8, MKI67) and chromosomal organization (CENP-B, AURKB, KLF4) in agreement with our data on proliferation and colony size. Such inhibition likely contributes to the maintenance of MSC in a quiescent state, inasmuch as the inhibition of mitochondria may protect

Table 2 Ten first deregulated genes at P2 in hypoxia

Gene	Fold expression H/N	Genbank Accession	Putative Function
SMOC2	58.32	NM_022138	Promotion of Matrix assembly
PLEKHA6	13.59	NM_014935	Adhesion
DMKN	10.79	NM_033317	Epithelial cell differentiation
KIT	8.62	NM_000222	Stem cell Proliferation
LAMA1	8.49	NM_005559	Development Retina and Myocytes
SNTG2	7.52	NM_018968	Eye development
GPR56	6.01	NM_201525	Neural development
OXCT2	5.81	NM_022120	Ketone body utilisation
NOG	5.13	NM_005450	Neural tube fusion, joint formation
HOXA11	4.80	NM_005523	Uterine development

Stimulation of plasticity genes under hypoxia according to GO analysis.

MSC from apoptosis. How could we reconcile these data with our observation that hypoxic MSC gained a growth advantage over normoxic MSC at late passages? The contradiction may be apparent. One possibility is that these cells became more sensitive to growth factors present in the serum. Whether growth advantage is due to a stimulation of proliferation pathways or to the expression of receptors for cytokines and growth factors or both, is worth investigating. Note in this respect that CXCR4 was induced by hypoxia.

As MSC in their niche are supposed to be quiescent and multipotent, these properties are apparently dissociated in our *in vitro* model, with quiescence being observed at early passages, whereas multipotency is augmented at late passages. Until we understand the *in vivo* signature of MSC, we cannot draw conclusions and pretend that *in vitro* culture in hypoxia mimics the niche.

Although expected from previous studies and suggested by our morphological observations, maintenance of stem cell characteristics at early passages under hypoxia was not inferred from GO analysis. Early induced genes were not assigned to multipotency but instead belonged mostly to adhesion molecules such as Von Willebrand Endothelial Cell Adhesion molecule and Protocadherin (Table 1). However, several genes may clearly affect stemness. CD93 regulates the clearance of apoptotic cells, a function critical to development, maintenance of homeostasis and tissue repair [22]. The WNT-related transcription factor TCF1 may regulate MSC and enhance their osteogenic differentiation [23]. At variance with the above genes, 8 genes potentially involved in the control of differentiation towards adipocytes, osteocytes and chondrocytes [1] were not modified by hypoxia [Additional file 1]. Strong expression of adhesion molecules may be physiologically relevant and correlate with broader differentiation potential of hypoxic MSC. Indeed VWF is a marker of endothelial commitment [24] and PLVAP, reported here for the first time in MSC is a leukocyte trafficking molecule [25] which may help transendothelial migration of MSC from the bone marrow. Stimulation of Leptin is also meaningful as a recent work demonstrated that it helps maintain mesenchymal progenitor cells undifferentiated [26]. This result also shows that hypoxia impacts the metabolism of MSC in agreement with a study on rat MSC [27]. In this study however, the duration of hypoxia was 24 hours only. Yet, several genes involved in adhesion and extracellular matrix were stimulated.

Hypoxia generates "plasticity". At P2 in hypoxia, only one group of genes was stimulated and was assigned to plasticity. SMOC2 is the first induced gene (Table 2) and plays a role in angiogenesis and extracellular matrix assembly [28], yet a recent article demonstrated that a related protein increases life span and fecundity in Drosophila [29]. Kit gene was induced thus correlating with proliferation [30]. LAMA1/laminin [31] and SNTG2/syntrophin gamma-2 [32,33] are both involved in retinal and eye development whereas GPR56, a seven-transmembrane domain protein, is involved in brain cortical patterning [34].

We have observed that hypoxia stimulated several genes which converge to maintain the cells in an undifferentiated state, and facilitate transendothelial migration of MSC (Table 1 and 2). In parallel, hypoxia inhibited the expression of genes involved in cell proliferation (Table 1). This transcription profile probably reflects the intrinsic genetic program of MSC *in vivo* as these cells are quiescent, and endowed with migration and multilineage differentiation capacities. With respect to migration, note that CXCR4 was induced by hypoxia [Additional file 1 and reference 3] with potential implications in the egress of MSC from the bone marrow. This is in contrast with the cell surface phenotype of MSC which was almost unaffected in our experiments and in others [17]. Note however that STRO-1 was expressed only transiently in cultured hypoxic but not in normoxic cells. This is not totally surprising since STRO-1 expression is gradually lost during culture expansion [18,35]. Even though STRO-1 is useful to isolate MSC from various tissues, it is not positive on all MSC [36]. Interestingly, STRO-1+ cells displayed enhanced expansion and multilineage differentiation potentialities [37,38]. Thus, the expression of STRO-1 on hypoxic MSC may not be fortuitous and reflects multipotential status.

Our results may have physiological & medical applications. Oxygen tension is a critical parameter, possibly the most important one, in the culture of stem cells. As nestin-positive MSC and HSC form a unique bone marrow niche [21], hypoxia is undoubtedly a physiological milieu for MSC. In this respect it is worth mentioning that nestin was induced by hypoxia in our experiments [Additional file 1]. Given the ever growing therapeutic applications of MSC in regenerative medicine [39] and in autoimmune diseases [40], the impact of O_2 on the functions of MSC should be carefully evaluated. For instance, intravenous injection of MSC results in their accumulation in the pulmonary parenchyma. Although this was sufficient to treat experimental septic shock [41], dissemination of MSC into other organs may be necessary to treat systemic diseases; induction of molecules involved in transendothelial migration as observed in our experiments may be helpful in this setting. Conversely however, hypoxia may be detrimental to other purposes. MSC inhibit TH17 cells in a CCL2-dependent manner by processing this chemokine to an antagonistic derivative, and may be helpful in the treatment of Experimental Allergic Enkephalitis (EAE) [42]. Note in this respect that the

transcription of CCL2 in MSC was inhibited under hypoxia in our experiments. Altogether our data demonstrate that hypoxia favoured the "undifferentiation program" of MSC, it remains to evaluate the impact of hypoxia on each desired function of these cells in the event of medical applications.

As the Holy Grail is to use tissue-specific cells derived from MSC in regenerative medicine, culture of MSC in hypoxia at least until P2 in order to induce the expression of a broad range of tissue-specific genes, may be beneficial, inasmuch as it also enhanced the cell numbers in parallel to their differentiating capacity. In this respect differentiation experiments should be carried to evaluate the potential of MSC to generate endothelial cells, myocytes and neurons. Finally, the most relevant result here is the demonstration of induction of plasticity, a major property of MSC, at variance with HSC [43].

Conclusions

The duration of hypoxemia is a critical parameter for the differentiation capacity of MSC. Hypoxia maintains the cells undifferentiated and in parallel enhances the expression of genes involved in the development of various, mesodermal and non mesodermal, cell lineages. In this respect hypoxia may increase both the multipotency and the transdifferentiation potential of MSC.

Methods

Isolation and culture of human MSC

MSC were obtained from bone marrow samples from 6 adult donors with their informed consent following the bylaws of the ethical committee of the Nancy University. MNC were counted and plated at 50×10^3 cells/cm^2 and cultured in Minimal Eagle Medium (α-MEM; Cambrex) supplemented with 10% fetal bovine serum, glutamine 2 mM and penicilin. They were incubated at 37°C under an atmosphere of 5% CO_2 in either 21% O_2 (herein referred to as normoxia) or 5% O_2 (hypoxia). Hypoxia was maintained in a dedicated incubator (Sanyo) connected to CO_2 and N_2 injectors, in which relative N_2 was increased to reach the desired O_2 concentration. Medium was changed twice weekly. MSC were isolated by adherence to plastic. In primoculture, cells were harvested after 21 days (passage 0 or P0) and counted by trypan blue (Sigma-Aldrich). For the next passages (P1, P2 or P3), cells were subcultured at different seeding densities (100 or 1000 cells/cm^2) for 14 days, trypsinized and counted.

For colony-forming unit fibroblast (CFU-F) assays, 1000 and 10000 MNC from total BM were seeded in 60 cm^2 dishes in duplicate. They were cultured for 14 days in normoxic and hypoxic conditions. After that, cells were washed 3 times with PBS and stained with Cristal Violet solution (Sigma-Aldrich). Plates were scanned and CFU-F of more than 30 cells, were scored. The size of the colonies was determinates thereafter using the "Image J" software. CFU-Fs were counted at P0, P1, P2 and P3.

To determine the population doubling (PD), cells in P1 and P2 were seeded at 100 or 1000 cells/cm^2 in T75 flasks and trypsinized after 14 days. Cells were counted and population doubling calculated as: PD = log (N_f/N_i)/log 2, N_f = Final cell number; N_i = Initial cell number.

Microscopy

For electron microscopy, cells were either trypsinized and pelleted before processing or processed as cell monolayers in 12 well plates. Briefly, cells were fixed for 2 h at 4°C in 2.5% glutaraldehyde containing 0.1 M Na cacodylate, then rinsed for 3 h in cacodylate buffer and incubated for 30 min at RT in 1% osmium tetroxyde in cacodylate buffer, rinsed and dehydrated in increasing concentrations (30, 50, 70, 80, 90%) of ethanol, for 5 min each, then in 100% ethanol for 3 × 20 min. Finally the cells were embedded in a 50/50 volume mixture of resin and propylene oxide. A volume of 30 ml of resin EMS (Euromedex, France) is made by mixing 18.2 ml of EMBED (spi-pon 812), 12.4 ml DDSA, 9.4 ml NMA, and 0.7 ml DMP30 for 20 min RT on a stirring magnet. Cell monolayers on plastic wells were treated twice with 100% xylene and semi thin (1.5 mm) or ultra thin sections (70-90 nm) were performed using an ultra microtome (Reichert-Yung). Sections were observed on a Phillips CM12 electron microscope and photographed.

For optical microscopy and mitochondrial staining, cells were incubated with 100 nM Mitotracker orange CMTMRos (Invitrogen), for 45 min at 37°C, washed in 1× PBS, and photographed on an Olympus DP-70 microscope.

Flow Cytometry

For mitochondrial staining, cells were incubated as above, enzymatically detached and resuspended in phenol-red free medium before flow cytometry analysis.

For surface antigen expression on culture-expanded MSC, cells were detached, washed, pelleted and resuspended in DMEM medium without phenol red and incubated for 20 minutes at room temperature with antibodies in a final volume of 100 μl and eventually resuspended in 4% paraformaldehyde until analysis on FC500 Beckman Coulter flow cytometer. We used monoclonal antibodies listed in Table 3. Antibodies were conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), allophycocyanin (APC) or phycoerythrin (PE). Each sample was stained with either CD34 or CD45 (negatively)

Table 3 List of monoclonal antibodies

Antibody	Conjugated	Isotype	Reference
Anti-CD34	FITC	IgG1 Mouse	IM1870, BC
Anti-CD45	FITC	IgG1 Mouse	A07782, BC
Anti-CD90	PE	IgG1 Mouse	IM3600U, BC
Anti-CD105	PE	IgG3,k Mouse	A07414, BC
Anti-CD271	PE	IgG1, k Mouse	557196, BD
Anti-CD106	PE	IgG1, k Mouse	555647, BD
Anti- CD166	PE	IgG1, k Mouse	559263, BD
Anti-CD73	PE	IgG1, k Mouse	550257, BD
Anti-CD29	APC	IgG1, k Mouse	559883, BD
Anti-CD44	APC	IgG2b, k Mouse	559942, BD
Anti-STRO-1	PE	IgM Mouse	sc-47733, SC
Isotype control	APC	IgG2b, k Mouse	555745, BD
Isotype control	PE	IgG1, k Mouse	555749, BD
Isotype control	PE	IgM Mouse	sc-2870, SC
Isotype control	APC	IgG1, k Mouse	555751, BD
Isotype control	FITC	IgG1, Mouse	A07795, BC
Isotype control	PE	IgG1, Mouse	A07796, BC

and with one of the other MAbs from Becton Dickinson (BD, USA), Beckman Coulter (BC, Canada) or Santa Cruz (SC, USA).

MSC Differentiation Assays

The potential of MSC to differentiate into the adipogenic and osteogenic lineages was verified. MSC were enzymatically detached from the culture flasks at nearly confluence and replated in 60 cm^2 dishes at different densities and with specialized culture mediums according to the desired differentiation:

Adipogenic differentiation

MSC cells were seeded at 500 cells/cm^2 and cultured for 14 days with standard culture medium. After that we induced differentiation by supplementing standard culture medium with dexamethasone 1 μM, indomethacin 60 μM and insulin 5 μg/ml for 21 days. Cells were then washed with PBS, fixed in 10% formaldehyde, washed with 60% isopropanol and stained with Oil red O Solution (Sigma-Aldrich) to detect lipid droplets within the cells.

Osteogenic differentiation

MSC cells were seeded at 100 cells/cm^2 and cultured for 14 days with standard culture medium. After that we induced differentiation by supplementing standard culture medium with ascorbic acid 60 μM, β-glycerol phosphate 10 mM and dexamethasone 0.1 μM for 21 days. Cells were washed with PBS and fixed in ice-cold 70% ethanol and stained with Alizarin Red S (pH: 4.1; Sigma-Aldrich) to detect Ca^{2+} deposits.

Differentiation was further assessed by PCR amplification of lineage-specific transcripts and GAPDH as control using primers listed in Table 4.

Lineage specific transcript analyses

Microarrays

Total RNA was extracted and purified from MSC treated in normoxic or hypoxic conditions (P0-P2) according to the RNeasy Mini Kit protocol (Qiagen, Valencia, CA, USA). To perform whole Human Genome Oligo (60-mer) array gene expression analysis, total RNA was extracted from MSC treated on normoxic or hypoxic condition (n = 4) each, including technological and biological replicates). For each sample, 350 ng of total RNA was reverse transcribed, linear amplified, and labelled with Cy3 (one colour protocol) using Agilent's Low RNA Input Linear Amplification Kit PLUS, according to manufacturer's instructions. After labelling, samples were measured on a Nanodrop microarray module for labelling efficiency and quantification. Samples were then hybridized on Agilent 4 × 44 K whole human genome GE arrays (Agilent Design #014850) at 65°C for 17 h. After washing in GE washing buffers, the slide was scanned with Agilent Microarray Scanner G2565CA. Feature extraction software (Version 9.5.3.1, Agilent technologies Inc., CA, USA) was used to convert the image into gene expression data. Genespring GX10 software (Agilent technologies Inc., CA, USA) was used to compile and analyse data. First normalized data (background substracted) were filtered on expression (lower and upper cut-off 20 and 100 respectively for 100% of signal), then on error (CV < 50% for 100% of signal). Only genes that were 2-fold differentially expressed on 4 arrays were scored as significant and used for analysis. Biological process and cellular component of genes were classified according to Gene Ontology ($p < 0.1$).

Table 4 List of primers for amplification of lineage-specifics transcripts (GAPDH is used as control)

Gene Product	Primers	Product Size (bp)
GAPDH (NM_002046.3)	Fw: 5'-AATCCCATCACCATCTTCCAGG-3' Rv: 5'-AGAGGCAGGGATGATGTTCTGG-3'	417
ALPL (NM_000478)	Fw: 5'-CTGGACCTCGTTGACACCTG-3' Rv: 5'-GCGGTGAACGAGAGAATGTC-3'	546
LPL (NM_000237.2)	Fw: 5'-AAAGCCCTGCTCGTGCTGAC-3' Rv: 5'-ACAGGATGTGGCCCGGTTTA-3'	406
PPARG (NM_005037.5)	Fw: 5'-GGAGAAGCTGTTGGCGGAGA-3' Rv: 5'-CACAATGCTGGCCTCCTTGA-3'	431
RUNX-2 (NM_001015051.2)	Fw: 5'-AACTTCCTGTGCTCGGTGCTG-3' Rv: 5'-GGGGAGGATTTGTGAAGACGG-3'	268

Table 5 List of primers used for qPCR (GAPDH is used as a calibrator)

Gene Product	Primers	Product Size (bp)
HoxA11 (NM_005523.5)	Fw: 5'-TTGAGCATGCGGGACAGTT-3' Rv: 5'-GTACCAGATCCGAGAGCTGGAA-3'	87
OxCT2 (NM_022120.1)	Fw: 5'-GAGTTCAACGGCGACCACTT-3' Rv:5'-GCGCTTCTCCTGAAGACCA-3'	110
V-KIT (NM_000222.2)	Fw: 5'-GGCGACGAGATTAGGCTGTT-3' Rv: 5'-CATTCGTTTCATCCAGGATCTCA-3'	77
CCL2 (NM_002982.3)	Fw: 5'-ACTCTCGCCTCCAGCATGAA-3' Rv: 5'-GGGAATGAAGGTGGCTGCTA-3'	72
CX3CL1 (NM_002996.3)	Fw: 5'-TGACATCAAAGATACCTGTAGC-3' Rv: 5'-CTCGTCTCCAAGATGATTGC-3'	88
WNT4 (NM_030761.4)	Fw: 5'-AGCAACTGGCTGTACCTG-3' Rv: 5'-CTGGATCAGGCCCTTGAG-3'	87
GAPDH (NM_002046.3)	Fw: 5'-CGCTCTCTGCTCCTCCTGTT-3' Rv: 5'-CCATGGTGTCTGAGCGATGT-3'	81

Real time PCR

For quantitative PCR, the cDNA used for DNA chip analysis were amplified using the primers listed in Table 5.

The reactions were carried out in 25 μL volume containing cDNA and Master mix (Power SYBR Green PCR Master Mix kit). Thermocycling conditions were 40 cycles of two steps: 15 sec at 95°C plus 1 min at 60°C. Detection was performed using a Mastercycler® ep *realplex* real-time PCR system (Eppendorf). The relative RNA level and fold change in hypoxia/normoxia condition were calculated using the $2^{-\Delta Ct}$ using GAPDH as a calibrator.

Statistics

All statistics were carried using the bilateral Student's t test on Excel program, in order to compare the data in normoxia versus hypoxia.

Additional material

Additional file 1: HN-fold change 4.

Acknowledgements

We thank Pr JP Frippiat for carefully reading the manuscript and Mrs J Chanel for help in processing MSC for TEM. This work is supported by grants from the "Communauté Urbaine du Grand Nancy" and "Ligue Grand Est contre le Cancer".

Authors' contributions

LB did the cultures and PCRs and participated in Microscopy and FACS analysis, CN did the gene arrays, BF did the microscopy, N de I did the cultures, M de C helped in FACS, NT participated in the experiments and culture, AD designed the experiments, wrote the article and participated in microscopy, gene array and FACS analysis.
All authors read and approved the final manuscript.

Received: 15 December 2010 Accepted: 30 March 2011
Published: 30 March 2011

References

1. Baksh D, Song L, Tuan RS: **Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy.** *J Cell Mol Med* 2004, **8**:301-316.
2. Delorme B, Chateauvieux S, Charbord P: **The concept of mesenchymal stem cells.** *Regen Med* 2006, **1**:497-509.
3. Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, Chacko M, Askari AT, Popovic ZB, Koc ON, Penn MS: **SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction.** *FASEB J* 2007, **21**:3197-3207.
4. McCulloch EA, Siminovitch L, Till JE, Russell ES, Bernstein SE: **The cellular basis of the genetically determined hemopoietic defect in anemic mice of genotype Sl-Sld.** *Blood* 1965, **26**:399-410.
5. Schofield R: **The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell.** *Blood Cells* 1978, **4**:7-25.
6. Taichman RS: **Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche.** *Blood* 2005, **105**:2631-2639.
7. Wilson A, Trumpp A: **Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches.** *Nat Rev Immunol* 2006, **6**:93-106.
8. Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, Olivotto M: **The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells.** *Blood* 1993, **82**:2031-2037.
9. Packer L, Fuehr K: **Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells.** *Nature* 1977, **267**:423-425.
10. Martin-Rendon E, Hale SJM, Ryan D, Baban D, Forde SP, Roubelakis M, Sweeney D, Moukayed M, Harris AL, Davies K, Watt SM: **Transcriptional profiling of human cord blood CD133+ and cultured bone marrow mesenchymal stem cells in response to hypoxia.** *Stem Cells* 2007, **25**:1003-1012.
11. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui J, Prockop DJ: **Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality.** *Stem Cells* 2002, **20**:530-541.
12. Annabi B, Lee Y, Turcotte S, Naud E, Desrosiers RR, Champagne M, Eliopoulos N, Galipeau J, Béliveau R: **Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation.** *Stem Cells* 2003, **21**:337-347.
13. Salim A, Nacamuli RP, Morgan EF, Giaccia AJ, Longaker MT: **Transient changes in oxygen tension inhibit osteogenic differentiation and Runx2 expression in osteoblasts.** *J Biol Chem* 2004, **279**:40007-40016.
14. Lennon DP, Edmison JM, Caplan AI: **Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on *in vitro* and *in vivo* osteochondrogenesis.** *J Cell Physiol* 2001, **187**:345-355.
15. Malladi P, Xu Y, Chiou M, Giaccia AJ, Longaker MT: **Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2006, **290**:C1139-46.
16. Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T: **Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3 D constructs.** *J Cell Physiol* 2006, **207**:331-339.
17. Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister SM, Handgretinger R, Kerst G, Müller I: **Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells.** *BMC Cell Biol* 2010, **11**:11.
18. Simmons PJ, Torok-Storb B: **Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1.** *Blood* 1991, **78**:55-62.
19. Carrancio S, López-Holgado N, Sánchez-Guijo FM, Villarón E, Barbado V, Tabera S, Díez-Campelo M, Blanco J, San Miguel JF, Del Cañizo MC: **Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification.** *Exp Hematol* 2008, **36**:1014-1021.
20. Mostafa SS, Miller WM, Papoutsakis ET: **Oxygen tension influences the differentiation, maturation and apoptosis of human megakaryocytes.** *Br J Haematol* 2000, **111**:879-889.
21. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS: **Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche.** *Nature* 2010, **466**:829-834.
22. Greenlee MC, Sullivan SA, Bohlson SS: **CD93 and related family members: their role in innate immunity.** *Curr Drug Targets* 2008, **9**:130-138.
23. Wang Y, Volloch V, Pindrus MA, Blasioli DJ, Chen J, Kaplan DL: **Murine osteoblasts regulate mesenchymal stem cells via WNT and cadherin**

pathways: mechanism depends on cell-cell contact mode. *J Tissue Eng Regen Med* 2007, **1**:39-50.
24. Bruno S, Bussolati B, Grange C, Collino F, di Cantogno LV, Herrera MB, Biancone L, Tetta C, Segoloni G, Camussi G: **Isolation and characterization of resident mesenchymal stem cells in human glomeruli.** *Stem Cells Dev* 2009, **18**:867-880.
25. Keuschnigg J, Henttinen T, Auvinen K, Karikoski M, Salmi M, Jalkanen S: **The prototype endothelial marker PAL-E is a leukocyte trafficking molecule.** *Blood* 2009, **114**:478-484.
26. Scheller EL, Song J, Dishowitz MI, Soki FN, Hankenson KD, Krebsbach PH: **Leptin functions peripherally to regulate differentiation of mesenchymal progenitor cells.** *Stem Cells* 2010, **28**:1071-1080.
27. Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S, Nagaya N: **Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells.** *Stem Cells* 2007, **25**:1166-1177.
28. Rocnik EF, Liu P, Sato K, Walsh K, Vaziri C: **The novel SPARC family member SMOC-2 potentiates angiogenic growth factor activity.** *J Biol Chem* 2006, **281**:22855-22864.
29. Li Y, Tower J: **Adult-specific over-expression of the Drosophila genes magu and hebe increases life span and modulates late-age female fecundity.** *Mol Genet Genomics* 2009, **281**:147-162.
30. Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S, Nagaya N: **Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions.** *FEBS Lett* 2007, **581**:3961-3966.
31. Edwards MM, Mammadova-Bach E, Alpy F, Klein A, Hicks WL, Roux M, Simon-Assmann P, Smith RS, Orend G, Wu J, Peachey NS, Naggert JK, Lefebvre O, Nishina PM: **Mutations in Lama1 disrupt retinal vascular development and inner limiting membrane formation.** *J Biol Chem* 2010, **285**:7697-7711.
32. Nagai R, Hashimoto R, Tanaka Y, Taguchi O, Sato M, Matsukage A, Yamaguchi M: **Syntrophin-2 is required for eye development in Drosophila.** *Exp Cell Res* 2010, **316**:272-285.
33. Piluso G, Mirabella M, Ricci E, Belsito A, Abbondanza C, Servidei S, Puca AA, Tonali P, Puca GA, Nigro V: **Gamma1- and gamma2-syntrophins, two novel dystrophin-binding proteins localized in neuronal cells.** *J Biol Chem* 2000, **275**:15851-15860.
34. Koirala S, Jin Z, Piao X, Corfas G: **GPR56-regulated granule cell adhesion is essential for rostral cerebellar development.** *J Neurosci* 2009, **29**:7439-7449.
35. Gronthos S, Zanettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortesidis A, Simmons PJ: **Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow.** *J Cell Sci* 2003, **116**:1827-1835.
36. Kolf CM, Cho E, Tuan RS: **Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation.** *Arthritis research & therapy* 2007, **9**:204-213.
37. Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, Demarquay C, MAzurier C, Fouillard L, Bouchet S, Bertho JM, Gourmelon P, Aigueperse J, Charbord P, Gorin NC, Thierry D, Lopez M: **Homing of *in vitro* expanded Stro1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/CSID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment.** *Blood* 2004, **103**:3313-3319.
38. Psaltis PJ, Paton S, See F, Arthur A, Martin S, Itescu S, Worthley SG, Gronthos S, Zannettino AC: **Enrichment for STRO-1 expression enhaces the cardiovascular paracrine activity of human bone marrow-derived mesenchymal cell populations.** *J Cell Physiol* 2010, **223**:530-540.
39. Charbord P: **Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts.** *Hum Gene Ther* 2010, **21**:1045-1056.
40. Pistoia V, Raffaghello L: **Potential of mesenchymal stem cells for the therapy of autoimmune diseases.** *Expert Rev Clin Immunol* 2010, **6**:211-218.
41. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, Star RA, Mezey E: **Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E (2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production.** *Nat Med* 2009, **15**:42-49.
42. Rafei M, Campeau PM, Aguilar-Mahecha A, Buchanan M, Williams P, Birman E, Yuan S, Young YK, Boivin M, Forner K, Basik M, Galipeau J: **Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner.** *J Immunol* 2009, **182**:5994-6002.
43. Zipori D: **The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional.** *Stem Cells* 2005, **23**:719-726.

doi:10.1186/1471-2121-12-12
Cite this article as: Basciano *et al.*: Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biology* 2011 **12**:12.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

Additional file

Notes : Fold change >= 4.0
#Entity List : Hypoxie/Normoxie P2 Fold change >= 2.0
#Interpretation : Hypoxie/Normoxie P2
#Experiment : MSC Hypoxie Normoxie
#Fold-Change cut-off : 4.0
#Pairing option : Pairs of conditions
#Condition pairs :
#[2-H] vs [2-N]
#Minimum number of pairs:1 out of 1 condition pairs.
Technology : Agilent.SingleColor.14850
Owner : gxuser
Created On : Thu Jan 07 12:28:59 CET 2010

US45103022_S	ProbeName	Fold change([2	Regulation([2-	US45103022_S	US45103022_S	US45103022_S
-1.5933914	A_23_P110253	8.624546	up	1.7393937	1.8357139	-1.4281435
1.7328968	A_23_P210001	7.7090383	down	-1.4708214	-1.4059925	1.5858545
1.3006134	A_24_P186030	109.491486	down	-5.3639054	-6.119485	1.2291031
-0.6973715	A_23_P107116	5.407332	up	1.4902306	1.3601036	-1.0977039
1.1071873	A_24_P115762	4.9041934	down	-1.1158199	-1.2093163	1.0344744
-1.3338847	A_23_P431268	13.5899315	up	2.364469	2.3531423	-1.549171
-2.106257	A_24_P37409	4.22707	up	0.07065964	0.09530544	-1.8877072
1.1818295	A_32_P196142	4.542653	down	-1.0228367	-1.0723	0.9860277
-1.5450072	A_23_P341938	5.1304846	up	0.9537649	0.72389984	-1.4237247
1.9422121	A_23_P19894	8.772663	down	-1.0413761	-1.2237692	1.9845352
0.5439205	A_24_P511877	4.152196	down	-1.0881577	-0.87804604	1.3335681
1.397994	A_23_P21092	4.660797	down	-0.83892345	-0.6949649	1.5772314
-1.1736622	A_32_P74752	8.989008	up	1.9036698	1.9112325	-1.1802311
0.6031666	A_23_P37914	4.711648	down	-1.5672235	-1.8265052	0.54841614
-1.8423815	A_23_P42706	4.7972727	up	1.246428	0.9155426	-1.0125561
1.3474655	A_23_P132121	4.33512	down	-0.8838806	-0.963439	1.2025595
-2.0032787	A_32_P134427	7.159993	up	0.72762156	0.70157814	-2.4885588
-0.8614006	A_23_P137896	5.8069043	up	1.9389195	1.8675251	-0.6738982
-1.0397363	A_24_P839075	4.7524204	up	1.082747	0.9771919	-1.5137091
-2.935069	A_23_P72737	8.977221	up	0.22453785	0.10450935	-3.0130625
0.8816099	A_24_P935454	7.0357323	down	-1.7557907	-1.7605948	1.300787
2.5700111	A_23_P89431	6.243607	down	-0.21574593	-0.1454773	2.356473
0.60062075	A_32_P12504	4.164426	down	-1.5095191	-1.5657191	0.34107828
0.8650112	A_23_P21495	4.851198	down	-1.2916951	-1.3937426	0.68689775
-1.512742	A_24_P919150	6.2548122	up	1.2070265	1.2404747	-1.1971102
0.3244915	A_32_P14762	4.5817833	down	-1.8686457	-1.8871331	0.15486002
-2.0135107	A_23_P128744	7.5058227	up	0.94717026	0.8538523	-2.12858
2.4130487	A_23_P372834	9.9632635	down	-0.9618988	-1.0777884	2.1998081
-0.2561965	A_23_P373521	4.011064	up	1.6314573	1.5621862	-0.35972643
-2.0024595	A_24_P293530	4.648415	up	0.63030434	0.78429985	-1.3152671
1.8984823	A_23_P122443	4.6285763	down	-0.3913622	-0.27590275	1.7950287
-0.4087658	A_32_P214011	4.09679	up	1.2757368	1.3030663	-0.9113159
-1.0901704	A_24_P941359	14.323266	up	2.7646189	2.873085	-0.8428235
1.8637171	A_32_P125338	4.8593106	down	-0.40447283	-0.62952423	1.6647139
1.3748674	A_23_P163251	4.3500466	down	-0.804502	-0.7515812	1.082406
1.5157385	A_23_P118571	4.182053	down	-0.94122267	-0.44452286	1.3318582
1.5911884	A_23_P72663	5.8968525	down	-0.70895195	-0.7854438	1.8615885
1.6914878	A_23_P145824	4.9301367	down	-0.61897135	-0.49423742	1.683939
1.4922404	A_23_P41344	4.206911	down	-1.3649249	-0.82769823	0.89134645
-1.1679387	A_32_P199263	15.32209	up	2.9318633	3.083095	-0.9321232

2.2688189	A_32_P47538	11.399029	down	-1.2866731	-1.081635	1.9798427
0.6127634	A_24_P302506	5.1129775	down	-1.8004127	-1.3577371	0.6126337
0.3331046	A_32_P473302	5.402256	down	-2.0283523	-2.2053952	0.2573862
0.8735094	A_23_P207680	4.6416454	down	-1.7269144	-1.3226414	0.847682
1.86236	A_23_P148345	7.1333814	down	-1.2737322	-1.1195798	1.5028496
-1.8606582	A_24_P714618	4.447819	up	0.5314355	0.7846284	-1.1245847
-1.6019802	A_23_P103601	4.3777537	up	0.35046005	0.33209896	-1.85674
0.8017664	A_23_P82088	6.788797	down	-2.238576	-2.2737417	0.45327187
1.7837267	A_23_P201193	4.8893375	down	-0.53644085	-0.6597376	1.7574091
1.7330494	A_23_P67529	5.590458	down	-0.9006109	-0.8671169	1.7480211
0.8718786	A_23_P255653	5.157214	down	-1.8773203	-1.3237453	0.87499094
-2.1474266	A_23_P206280	6.00969	up	0.4664564	0.33220577	-2.1540804
1.3905525	A_24_P213494	8.526834	down	-1.9805408	-1.6123786	1.5701294
2.2233143	A_23_P146134	6.322577	down	-0.69582033	-0.73096275	1.8792152
-2.2381701	A_23_P74299	4.3384175	up	0.3069334	0.178298	-1.7678018
1.023365	A_23_P401675	7.812886	down	-1.9704847	-2.1014242	0.8284693
-0.86729527	A_24_P360206	4.17667	up	0.7957792	0.6353111	-1.5394316
-1.1213737	A_23_P256131	4.005072	up	0.66464806	0.6424589	-1.178369
-1.434629	A_24_P278375	4.0940843	up	0.6432228	0.6299839	-1.5478158
1.8375406	A_24_P366526	4.6127176	down	-0.60163975	-0.51504135	1.5288591
2.4144616	A_32_P160563	8.740147	down	-0.8788538	-0.9619684	2.0758634
0.5687127	A_23_P102391	5.9130254	down	-2.0846043	-1.8665357	0.37280083
-1.7027345	A_32_P313405	8.495321	up	1.5683832	1.3828278	-1.5592628
-2.4511862	A_23_P215009	16.628975	up	1.7533016	1.8820691	-1.8473005
-2.9270205	A_23_P66481	10.090026	up	0.46984196	0.44118977	-2.6984267
1.722518	A_23_P145507	8.16462	down	-1.6817746	-1.8391986	0.9296651
0.6399536	A_23_P127033	7.0768037	down	-2.2688222	-2.2564125	0.4560566
1.9779143	A_24_P140405	5.632524	down	-0.2911849	-0.6360359	2.0812163
1.5392785	A_23_P258151	5.5634923	down	-1.1661754	-0.4260645	1.2572846
-0.44465017	A_24_P353619	4.1919875	up	1.6771326	1.6721878	-0.30904102
-1.4483142	A_23_P214533	4.091783	up	0.67221737	1.1843171	-0.5702548
0.28627443	A_24_P136471	5.6208377	down	-2.580958	-1.8583312	0.25667667
-1.1211181	A_23_P10542	5.014093	up	1.4040194	1.3793907	-0.7089119
0.8595352	A_23_P37727	6.689578	down	-1.7667246	-2.036489	0.67397594
2.749936	A_23_P216429	23.284328	down	-1.5167737	-2.215876	2.621747
1.7072377	A_32_P206541	5.6913276	down	-1.0122313	-1.1369963	1.5198426
-1.6731071	A_32_P38093	4.0249605	up	0.3075266	0.30029678	-1.7994862
3.0392818	A_24_P367543	56.273785	down	-2.6099367	-2.8355088	2.9486809
-1.4580612	A_23_P17130	6.595464	up	1.048099	0.79265547	-1.7094889
0.39034224	A_23_P47034	5.81717	down	-2.6155062	-1.6626592	0.39002037
-1.6696649	A_23_P206284	4.0293503	up	0.23138666	0.0972271	-1.903965
0.78189087	A_23_P137238	60.09466	down	-4.723543	-5.699339	0.5577383
1.8019238	A_23_P28898	9.976227	down	-1.6291742	-1.4978456	2.186305
-1.5914364	A_32_P15829	8.341659	up	1.6251392	1.8918996	-1.2859478
2.095263	A_23_P219161	4.99112	down	-0.23237944	-0.33638144	2.0010562
-0.53866196	A_24_P915376	9.668616	up	2.6472363	2.5501075	-0.49139595
1.4074187	A_23_P138495	9.745773	down	-1.7323146	-1.4930491	1.1304011
0.5275712	A_23_P119006	17.152626	down	-3.4442596	-3.0303884	0.44831753
-1.8948607	A_23_P123060	4.531433	up	0.7510228	0.92381907	-1.0090733
-1.8744702	A_24_P137713	4.597641	up	0.49762726	0.41117668	-2.0020056
-1.1375222	A_24_P251962	4.259238	up	0.9776373	0.9171915	-1.1778235
0.34247398	A_23_P137248	14.757826	down	-3.4300585	-3.4556193	0.38501835
2.6130652	A_23_P35444	13.678806	down	-1.1593451	-0.9885311	2.4173522
-0.8729801	A_23_P56433	5.693272	up	1.3326654	1.2443738	-1.5479703

0.16371346	A_24_P343621	4.8976483	down	-2.0854645	-1.5396485	0.418046
1.9845495	A_32_P7516	9.150731	down	-1.2380047	-1.0645409	2.1323404
-0.95542145	A_23_P320261	10.785976	up	2.6402931	2.540554	-1.0324907
1.671257	A_23_P168610	12.472382	down	-1.9971299	-1.9383001	1.5999942
1.6004648	A_24_P913056	5.4778795	down	-0.47066736	-0.3825631	2.006834
2.0400934	A_23_P399292	9.840166	down	-1.1847925	-1.2177486	2.1462927
-1.1096764	A_23_P213375	4.683253	up	1.0567884	1.0061188	-1.3029332
0.61200047	A_23_P251232	7.5582247	down	-2.2888727	-2.188178	0.4968338
-1.4837232	A_24_P183128	4.174626	up	0.7594757	0.6419754	-0.9244847
1.2206278	A_23_P67151	4.9478173	down	-0.75237226	-0.98448896	1.408814
1.3752155	A_23_P218358	4.409682	down	-1.1954308	-0.5822606	1.3524985
1.2875443	A_24_P213503	10.653696	down	-2.7855735	-1.8565497	1.5626068
1.3713207	A_23_P81676	17.40935	down	-2.4335465	-2.8851833	1.5596752
0.9974623	A_32_P98227	4.1377807	down	-1.1140366	-1.2574234	0.69558334
0.90394783	A_23_P393620	4.832887	down	-1.3670807	-1.2014322	1.0739326
-1.3585725	A_23_P115805	4.0742407	up	0.6228485	0.7732396	-1.0608892
0.67299175	A_23_P317413	4.0812078	down	-1.4700503	-1.3851047	0.45428133
1.5688963	A_24_P709377	7.5016303	down	-1.1983776	-1.191762	1.7478609
0.7868509	A_32_P310335	4.549914	down	-1.397243	-1.4848785	0.6530161
-1.5960054	A_32_P35947	6.513102	up	1.4394808	1.4841924	-1.4288497
0.98571444	A_23_P144778	7.767911	down	-2.284987	-2.125691	0.8407755
-2.0411758	A_24_P919850	8.234561	up	1.0545244	1.0137129	-2.000599
1.8231277	A_24_P95070	7.7670794	down	-1.1450691	-1.22721	1.7215424
0.09556198	A_23_P331049	6.578847	down	-2.5894337	-2.6345425	0.071783066
0.53060675	A_24_P106363	8.446218	down	-2.404121	-2.4461255	0.90623045
-1.803895	A_23_P10647	43.943466	up	3.7324386	3.8003383	-1.6755514
1.8191719	A_24_P182461	10.121841	down	-1.3923659	-1.4060388	1.9575233
1.8392763	A_23_P19987	7.4360957	down	-1.2569804	-1.0404887	1.7517443
0.76917934	A_23_P80940	6.468674	down	-2.0724912	-2.0503201	0.716856
1.0236931	A_23_P7727	5.854298	down	-1.5856695	-1.6264219	0.8966284
1.5541348	A_24_P563736	4.1254687	down	-0.456697	-0.50128126	1.3349466
-4.585545	A_23_P65388	31.52818	up	0.52882576	0.5349331	-4.68382
-1.5769668	A_23_P130961	4.443834	up	0.4505396	0.47727633	-1.3986616
4.529376	A_23_P75283	30.717075	down	-0.45538425	-0.46500206	4.5125217
-2.0807033	A_23_P2414	6.0336757	up	0.8972473	0.9883499	-1.0880051
-2.4007792	A_24_P925342	6.0034947	up	0.4444995	0.38012505	-2.0274577
-1.472425	A_23_P135742	4.395838	up	0.4445858	0.6962004	-1.2939081
1.1799746	A_23_P207911	7.5008073	down	-1.8630657	-1.795578	0.9251251
-4.9904137	A_23_P70307	58.317238	up	0.6833868	0.7376833	-5.2369266
1.5290833	A_23_P119943	7.217427	down	-1.4328747	-1.4103537	1.3001671
0.22424603	A_23_P214459	5.5383105	down	-2.1479907	-2.0064592	0.32670116
-2.4030151	A_23_P251132	7.51542	up	1.0275254	0.9486785	-1.873754
-0.7298217	A_23_P97046	4.4548407	up	1.2168665	1.3854995	-0.9251418
2.273428	A_32_P208076	6.618513	down	-0.25757647	-0.32870626	2.510809
1.8478985	A_24_P85099	5.007879	down	-0.58156157	-0.51372766	1.6826754
1.4309964	A_23_P91552	6.2092056	down	-0.7875924	-1.483779	1.293272
1.6971064	A_24_P684186	6.7498856	down	-1.3747687	-1.1824622	1.5476475
1.6953583	A_23_P114008	5.8685584	down	-1.027235	-1.0755243	1.3985996

US45103022_S	US45103022_S	US45103022_S	US45103022_S	US45103022_S	US45103022_S	US45103022_S
-1.5933914	0.16961479	-0.0037870407	-0.12166786	0.23053885	0.0	-0.039279938
1.7328968	0.3519411	0.2475195	0.24116707	-0.18473434	0.0	-0.09579754
1.3006134	0.0032396317	0.0	-0.1584959	0.08884144	-0.06559849	0.0033540726
-0.6973715	0.0	-0.02392292	-0.17069435	0.09475517	0.059586525	-0.098270416
1.1071873	-0.007016182	0.0	-0.010210037	0.52678585	0.42153645	0.5310106
-1.3338847	0.0	0.14436054	0.12586927	-1.5299301	-1.3988547	-1.3567863
-2.106257	-0.15918255	0.044917107	-0.124946594	-0.073186874	0.07718468	0.0
1.1818295	0.020460129	-0.21712875	-0.16018295	0.12647915	0.0	0.036107063
-1.5450072	0.05401802	0.17722702	0.0	-0.12337685	-0.16095448	-0.19819641
1.9422121	0.0	-0.13057804	-0.08652973	0.58658886	0.46608353	0.43211174
0.5439205	0.13437271	0.06484699	0.75734377	0.0	-0.22141314	-0.19007254
1.397994	-0.4333868	-0.2571268	0.017861366	0.0	0.7620592	0.74672604
-1.1736622	0.17565489	0.27687836	0.0	-0.4476862	-0.3233323	-0.5670419
0.6031666	0.10834837	-0.18821907	-0.32379055	0.0	0.5730667	0.069685936
-1.8423815	0.0028328896	0.0	-0.09832096	-0.4867115	0.021754265	-0.19448233
1.3474655	0.9020996	0.73525333	0.612483	-0.07666588	0.0	-0.050020218
-2.0032787	0.11070633	-0.22931099	0.10477877	-0.0042071342	-0.13885546	0.0
-0.8614006	0.18281126	0.0	0.06857872	-0.07335377	-0.052983284	-0.2895484
-1.0397363	-0.32922602	0.0	0.35286236	-0.18967867	0.21343088	-0.08797407
-2.935069	0.28672218	0.015034676	0.0	-0.47696018	-0.60992146	-0.5949564
0.8816099	-0.2519455	0.0	0.4061098	-0.0017418861	0.014203072	0.09978342
2.5700111	0.025717735	0.0	-0.10426903	0.17414188	-0.04095745	0.056981087
0.60062075	0.73258877	0.67436504	0.6227665	0.0	-0.48693705	-0.4660678
0.8650112	0.0	0.06533098	0.0115327835	0.03841114	-0.14871454	-0.21344328
-1.512742	-0.6149769	-0.4637556	-0.45294094	0.0	0.5338373	0.33389854
0.3244915	0.45026016	0.4153967	0.39292717	-0.09660578	-0.12202549	0.0
-2.0135107	0.16731071	0.1128521	0.0	-0.30383778	-0.28020287	-0.35813522
2.4130487	-0.05876541	-0.19154358	0.0	0.5767927	0.5334444	0.5528984
-0.2561965	0.22882366	-0.020511627	0.3425579	-0.057561874	0.0	-0.05794859
-2.0024595	0.06249714	0.050047398	0.0	-0.36828423	-0.57045317	-0.40095186
1.8984823	-0.023281097	0.0	-0.27250576	0.016215324	0.16858292	0.20662498
-0.4087658	-0.13593006	-0.061710358	0.0	0.26279068	-0.22403145	0.17698097
-1.0901704	0.0	0.10710192	0.17239523	-0.54592943	-0.83262396	-0.55018854
1.8637171	0.416924	0.42908192	0.27335262	-0.40859842	-0.0038166046	0.0
1.3748674	0.0	-0.2571802	-0.39856815	0.18339252	0.3498497	0.30774546
1.5157385	-0.251791	0.4079528	-0.35785246	0.2648921	0.0	0.2584281
1.5911884	0.0	0.085828304	-0.15828848	0.008379936	0.07653189	-0.15345907
1.6914878	0.71192694	0.41501474	0.29729128	-1.9465184	-0.4156928	0.0
1.4922404	0.0	-0.6793003	-0.14388514	0.7789602	0.4954915	0.36766434
-1.1679387	-0.57705927	-0.5078206	-0.27724648	0.0	0.025842667	0.18575382

2.2688189	0.72939587	0.7085967	0.65309715	0.0	-0.010547638	-0.4645834
0.6127634	-0.054821968	0.0	-0.11537838	0.17380428	0.072583675	0.1389389
0.3331046	0.34886217	-1.1465287	0.23908615	0.043263912	0.0	-0.9915619
0.8735094	0.103162766	0.12102699	0.18393803	-6.313324E-4	-0.0469265	0.0
1.86236	0.14653301	0.0065259933	-0.25958538	0.31651926	-0.1282978	0.0
-1.8606582	0.05715847	0.0	0.23240376	-0.47130108	-0.014708519	-0.03690386
-1.6019802	0.024401665	0.06158161	-0.09791088	0.0	-0.01569271	-0.20602417
0.8017664	0.50939274	0.51532936	0.4566021	0.0	-0.08992481	-0.050174713
1.7837267	0.017201424	-0.14249516	-0.089818	0.0	0.17567635	0.17372322
1.7330494	0.0	-0.13302517	-0.05540657	0.22753239	0.03657627	0.08180523
0.8718786	0.22954607	-0.0040254593	0.4373951	-0.09522295	0.0	0.32167292
-2.1474266	0.05768013	0.05563259	-0.0442276	-0.07149601	-0.058009148	0.0
1.3905525	0.12733555	0.11348152	0.30807114	-0.33704853	-0.3448038	0.0
2.2233143	-0.021543026	-0.18981886	0.0	0.40257692	0.20650434	0.27672672
-2.2381701	-0.1926403	-0.43532228	-0.36420918	0.0	0.38969135	0.44382334
1.023365	0.054329872	0.17164993	-0.00669384	0.015287399	-0.12904167	0.0
-0.86729527	0.18765306	0.22175455	0.0	-0.70683956	-0.47206354	-0.4988804
-1.1213737	0.24011135	0.2160883	0.0	-0.8184805	-0.8712511	-0.90867805
-1.434629	0.111225605	0.10504007	0.0	-0.9357238	-1.2283702	-1.3034563
1.8375406	0.103616714	0.10476017	-0.016803741	0.039427757	-0.08253002	0.0
2.4144616	-0.023921967	0.0	-0.056325436	0.2946329	0.07197428	0.12549257
0.5687127	0.13324928	0.21559525	0.08272076	0.0	-0.069452286	-0.015539169
-1.7027345	-0.36486387	-0.34167767	-0.5914707	0.2382474	0.0	0.1320467
-2.4511862	0.0	0.09454155	0.49517775	-1.3082285	-0.20141888	-0.9206133
-2.9270205	-0.0802536	-0.36540318	-0.027662277	0.24211788	0.0	0.11895561
1.722518	-0.14812803	0.0	-0.77094364	0.5857487	1.1479359	1.9634666
0.6399536	0.0	-0.04143715	-0.16533756	0.440032	0.34990025	0.3743906
1.9779143	0.0	0.27702427	0.1345973	0.028137207	-0.28648615	-0.13596392
1.5392785	0.7366862	0.62288475	0.4457612	0.0	-0.31917715	-0.5374346
-0.44465017	0.0	0.23052979	0.030542374	-0.2925949	-0.08993149	-0.37294483
-1.4483142	0.0	0.19702053	0.076850414	-0.3141055	-0.118049145	-0.047180653
0.28627443	0.60043526	0.34931087	0.4374361	-0.32323408	-0.06724644	0.0
-1.1211181	0.0	0.22407818	0.17302322	-0.1129837	-0.01682663	-0.0936203
0.8595352	0.3998232	0.34841824	0.34714794	-0.008526802	-0.028422356	0.0
2.749936	0.44777584	0.459754	0.11944008	-0.069039345	0.0	-0.029973984
1.7072377	0.106928825	0.18252039	0.0	0.03518009	-0.18425941	-0.25089693
-1.6731071	-0.16905785	-0.393178	-0.36688328	0.20439816	0.072977066	0.0
3.0392818	0.99339485	1.0268717	0.7727084	-0.00613451	0.0	-0.08167601
-1.4580612	0.4678502	0.39349413	0.0	-0.421916	-0.32099056	-0.21645164
0.39034224	-0.34910297	0.031423092	0.1087141	-0.28679228	0.062427044	0.0
-1.6696649	0.04642582	0.023079395	0.0	-0.0978241	-0.28272724	-0.2940669
0.78189087	0.0726881	0.072672844	-0.15780163	-0.054566383	0.055814743	0.0
1.8019238	-0.121611595	0.0	-0.011108398	0.9203491	0.89600945	0.94560623
-1.5914364	0.10888767	0.0	0.32204342	-0.726141	-0.13898993	-0.24313784
2.095263	0.22341537	0.1890502	0.060120583	-0.008188248	-0.040542126	0.0
-0.53866196	0.50388384	0.0	0.4461074	-0.62767124	-0.71139	-0.46347237
1.4074187	0.2969408	0.20790148	0.0	-0.021298409	-0.17116642	0.035579205
0.5275712	0.0898633	0.20341682	0.042596817	-0.08228016	-0.08159447	0.0
-1.8948607	-0.047736168	0.0	0.2629528	-0.18531942	-0.014796734	0.17746592
-1.8744702	0.2786126	0.2808938	0.0	-0.19586515	-0.36005497	-0.19233418
-1.1375222	0.052435875	0.013324738	0.0	-0.3410988	-0.20932388	-0.31099892
0.34247398	0.0	-0.05619812	-0.12059116	0.10820484	0.064315796	0.038059235
2.6130652	0.0	-0.029466152	-0.35029364	1.7337546	1.6823392	1.5821586
-0.8729801	0.16825247	-0.30786943	-0.31987476	0.15150833	-0.05000305	0.0

0.16371346	0.0	-0.032156467	-0.19752169	0.3510852	0.09441328	0.15396547
1.9845495	-0.2284069	-0.05050087	0.0	0.4196968	0.5376644	0.5508766
-0.95542145	0.19479847	0.082855225	0.0	-0.2723837	-0.25689697	-0.26590824
1.671257	0.038091183	-0.12343502	0.0	0.0046391487	-0.040523052	0.16386986
1.6004648	0.09546757	0.21765757	0.3499503	-0.1001482	-0.5423417	0.0
2.0400934	-0.19033718	0.0	-0.00548172	0.42062855	0.61600494	0.5411806
-1.1096764	0.07860279	0.059749603	0.0	-0.20639372	-0.23220825	-0.3984871
0.61200047	0.1411972	0.17063332	0.031103134	0.0	-0.11220837	-0.084739685
-1.4837232	0.027287483	-0.13062668	-0.16403532	-0.053437233	0.0	0.03461218
1.2206278	0.32108593	0.23372793	0.41389704	-0.3666482	0.0	-0.35624123
1.3752155	0.0	-0.65166473	-0.13618279	1.0988054	0.7366514	0.5268245
1.2875443	0.09437704	0.03780794	0.16079998	-0.43186617	-0.42180777	0.0
1.3713207	-0.094986916	-0.14894056	0.0349288	0.0	0.3689804	0.31173706
0.9974623	0.4360447	0.44834614	0.43013573	0.0	-0.3203125	-0.23058796
0.90394783	-0.24054432	-0.10199165	0.0	0.7650757	0.9750786	1.0000229
-1.3585725	0.23685932	0.0	0.06741285	-0.1608634	-0.149014	-0.11555815
0.67299175	0.037365437	-0.036112785	0.07090855	0.10012388	-0.05493164	0.0
1.5688963	0.5112009	0.3619995	0.45127392	0.0	-0.10709	-0.10459328
0.7868509	0.78526115	0.9089813	0.8533201	-0.030809402	0.0	-0.09709549
-1.5960054	0.25719833	0.18319225	0.0	-0.030691624	-0.5244937	-0.40128994
0.98571444	1.3698831	0.9669256	1.008635	-0.11193323	-0.3835106	0.0
-2.0411758	0.26854038	0.20782185	0.0	-0.20871925	-0.16201591	-0.2333374
1.8231277	-0.57869196	0.0	-0.41174126	1.1221533	1.3989782	1.1497235
0.09556198	0.46177483	0.38306713	0.18180275	-0.001540184	-0.12154484	0.0
0.53060675	0.39055967	0.16489506	0.7226138	0.0	-0.34348106	-0.2150402
-1.803895	0.04535961	0.0707674	0.0	-0.5229316	-0.81671715	-0.69341135
1.8191719	0.43732166	0.31240416	0.31913662	-0.25071526	-0.4993844	0.0
1.8392763	-0.26650333	0.0	-0.11935997	0.38760185	0.50981617	0.4176092
0.76917934	-0.23503017	0.0	-0.023788929	0.13092232	0.09771538	0.32778835
1.0236931	0.2609768	0.2300005	0.06976223	-0.08537674	0.0	-0.047758102
1.5541348	-0.14487028	-0.071949005	0.057211876	0.0126104355	0.0	0.2082777
-4.585545	0.038090706	0.0	0.0865736	-1.8876214	-1.7719975	-1.7208629
-1.5769668	0.4166088	0.26243162	0.0	-0.70263433	-0.5535593	-0.81624794
4.529376	0.6246319	0.50632477	0.46556664	0.0	-0.08019161	-0.06777573
-2.0807033	2.5709958	-0.054620266	-0.102451324	0.24703598	-0.16565943	0.0
-2.4007792	-0.16884422	0.780262	0.21783781	-0.4057436	0.0	-0.060320854
-1.472425	0.114373684	0.0	0.07201958	-0.9485922	-1.1581173	-1.1924453
1.1799746	-0.042407036	0.0	-0.08666611	0.22563362	0.072639465	0.1315794
-4.9904137	-0.14717102	-0.13326073	-0.27413273	0.20535469	0.032280922	0.0
1.5290833	0.46595192	0.33502102	0.42929173	-0.009939194	-0.036842346	0.0
0.22424603	0.39550877	0.26430607	0.41259098	-0.16333771	-0.014248848	0.0
-2.4030151	-0.04006052	0.10145712	0.0	0.016232014	-0.18826437	-0.40843534
-0.7298217	-0.004029751	0.01933384	0.0	-0.1594162	0.037614822	-0.16017771
2.273428	0.031772137	0.45306873	0.074291706	-0.2054553	-0.13389587	0.0
1.8478985	0.0	-0.12994385	-0.29442215	1.067379	0.8700714	0.8070936
1.4309964	0.12149477	0.37579536	-0.31994295	0.1331377	-0.27951908	0.0
1.6971064	-0.030068398	0.24141264	0.14806604	0.03135538	-0.036058903	0.0
1.6953583	-0.4128418	0.0	-0.22846031	0.32519054	0.45818043	0.29254484

US45103022_S	US45103022_S	US45103022_S	Common name	GeneSymbol	Description	GenbankAcces
1.7724347	1.7204165	-1.002841	NM_000222	KIT	Homo sapiens v-	NM_000222
-1.3500891	-1.4101973	1.2930765	NM_003466	PAX8	Homo sapiens pa	NM_003466
-5.5900283	-5.1622705	1.1175404	NM_002760	PRKY	Homo sapiens pr	NM_002760
1.5629864	1.3730707	-1.1698823	NM_007148	ZNF179	Homo sapiens zi	NM_007148
-1.2530518	-1.2128572	1.1471024	NM_148170	CTSC	Homo sapiens ca	NM_148170
2.21555	2.2225165	-1.5435848	NM_014935	PLEKHA6	Homo sapiens pl	NM_014935
0.057312965	0.1331482	-1.9776902	NM_004418	DUSP2	Homo sapiens du	NM_004418
-1.1743822	-1.150527	1.0677137	A_32_P196142	A_32_P196142		
0.8759775	0.817646	-1.5800867	NM_005450	NOG	Homo sapiens no	NM_005450
-1.1459713	-1.1631107	2.041627	NM_198098	AQP1	Homo sapiens aq	NM_198098
-0.931911	-0.88824224	1.4443669	AK128714	LOC642123	Homo sapiens cD	AK128714
-0.6979728	-0.5892172	1.5706959	NM_001740	CALB2	Homo sapiens ca	NM_001740
1.8474636	1.7171569	-1.6159506	AK130456	AK130456	Homo sapiens cD	AK130456
-1.687964	-1.4812875	0.6348772	NM_052944	SLC5A11	Homo sapiens so	NM_052944
1.0048761	1.054244	-0.76588774	NM_005523	HOXA11	Homo sapiens ho	NM_005523
-0.9385166	-0.89429474	1.0380926	NM_173354	SNF1LK	Homo sapiens SN	NM_173354
0.5620885	0.6439271	-2.0516262	BC048201	BC048201	Homo sapiens, c	BC048201
1.8132358	1.8812952	-0.45227718	NM_022120	OXCT2	Homo sapiens 3-	NM_022120
1.0182366	1.1662169	-1.0092478	A_24_P839075	A_24_P839075		
0.13723373	0.15579796	-3.084116	NM_003641	IFITM1	Homo sapiens in	NM_003641
-1.5655532	-1.3650169	1.4264884	AY358106	AY358106	Homo sapiens cl	AY358106
-0.24181652	-0.25418472	2.3577366	NM_002982	CCL2	Homo sapiens ch	NM_002982
-1.9212842	-1.5966225	0.28779507	BC024745	BC024745	Homo sapiens cD	BC024745
-1.6370616	-1.6212378	0.8253112	NM_003890	FCGBP	Homo sapiens Fc	NM_003890
1.3282814	1.3669195	-1.368021	L12234	L12234	Human aggrecan	L12234
-1.9767346	-2.0776482	0.25075483	NM_001080507	LOC441161	Homo sapiens hy	NM_001080507
0.81808853	0.8194456	-2.0030222	NM_000710	BDKRB1	Homo sapiens br	NM_000710
-1.0380011	-1.0843925	2.215438	NM_198098	AQP1	Homo sapiens aq	NM_198098
1.6159105	1.696146	-0.516757	NM_021973	HAND2	Homo sapiens ha	NM_021973
0.6431618	0.75927114	-1.2197123	NM_178033	CYP4X1	Homo sapiens cy	NM_178033
-0.3895073	-0.31634808	1.9083538	NM_005319	HIST1H1C	Homo sapiens hi	NM_005319
1.3191319	1.2110653	-0.95164967	AI620901	AI620901	AI620901 tu05d0	AI620901
2.8620987	2.8007622	-1.1124487	AB002384	C6orf32	Homo sapiens m	AB002384
-0.5115981	-0.6709852	1.6513886	NM_207334	FAM43B	Homo sapiens fa	NM_207334
-0.801517	-1.0328751	1.3629622	NM_017705	PAQR5	Homo sapiens pr	NM_017705
-0.6121254	-0.8775344	1.1884832	NM_025237	SOST	Homo sapiens sc	NM_025237
-0.87397575	-0.96134853	1.7297688	NM_001012393	OPCML	Homo sapiens op	NM_001012393
-0.41433907	-0.40892744	2.0770998	NM_017650	PPP1R9A	Homo sapiens pr	NM_017650
-1.0714617	-0.56499624	0.96288633	NM_001432	EREG	Homo sapiens ep	NM_001432
3.0756888	3.042811	-0.6124687	BC073929	BC073929	Homo sapiens cD	BC073929

-1.7781115	-1.1941738	2.2784104	BC037919	BC037919	Homo sapiens cl BC037919
-1.7369618	-1.7676148	0.8400488	ENST000003698	AMIGO1	Amphoterin-induced protein 1 pre
-2.2504125	-2.306015	0.1175642	AF424541	FLJ35024	Homo sapiens ur AF424541
-1.224803	-1.1744471	0.836113	NM_001039083	ARL17	Homo sapiens AI NM_001039083
-1.22049	-1.4164963	1.3658247	NM_194463	RNF128	Homo sapiens rir NM_194463
0.62393475	0.84729576	-1.3835812	BC011779	BC011779	Homo sapiens cl BC011779
0.34508133	0.45085812	-1.822978	NM_020379	MAN1C1	Homo sapiens m NM_020379
-2.2656784	-2.102234	0.3742571	NM_016588	NRN1	Homo sapiens ne NM_016588
-0.6694393	-0.52294445	1.5363598	NM_005725	TSPAN2	Homo sapiens te NM_005725
-0.7287512	-0.71167946	1.5617104	NM_002250	KCNN4	Homo sapiens po NM_002250
-1.4131494	-1.3980908	0.84367657	NM_003844	TNFRSF10A	Homo sapiens tu NM_003844
0.33757114	0.3451395	-2.3493352	NM_201525	GPR56	Homo sapiens G NM_201525
-1.3473644	-1.5251551	1.4662695	NM_006504	PTPRE	Homo sapiens pr NM_006504
-0.6363058	-0.59396124	1.8862209	NM_024025	DUSP26	Homo sapiens du NM_024025
0.26828957	0.20609331	-1.6258245	NM_000674	ADORA1	Homo sapiens ad NM_000674
-2.0572739	-2.1134405	0.86376476	NM_144724	MARVELD2	Homo sapiens M NM_144724
0.93672276	0.583621	-1.5667567	NM_018902	PCDHA11	Homo sapiens pr NM_018902
0.74651146	0.7974386	-1.5674496	NM_005144	HR	Homo sapiens ha NM_005144
0.35951328	0.47124958	-1.5402002	BX114967	BX114967	BX114967 Soare BX114967
-0.5912571	-0.58067036	1.5339947	BC105992	SYNGR2	Homo sapiens sy BC105992
-0.92636347	-0.9874196	2.076693	NM_001012393	OPCML	Homo sapiens op NM_001012393
-2.0929809	-2.398017	0.41857243	NM_014585	SLC40A1	Homo sapiens sc NM_014585
1.3810129	1.4029179	-1.6966524	NM_005559	LAMA1	Homo sapiens la NM_005559
1.7727795	1.7915277	-2.4686365	AB002384	C6orf32	Homo sapiens m AB002384
0.56202793	0.5793781	-2.839798	NM_178568	RTN4RL1	Homo sapiens re NM_178568
-1.2476459	-1.538383	1.7057228	NM_004100	EYA4	Homo sapiens ey NM_004100
-2.378456	-2.265863	0.49611855	NM_024693	ECHDC3	Homo sapiens en NM_024693
-0.29773235	-0.5979724	2.0550199	NM_014243	ADAMTS3	Homo sapiens AI NM_014243
-1.6313705	-1.3648076	1.1900959	THC2678294	THC2678294	FGD5_HUMAN (Q6ZNL6) FYVE, Rh
1.7016449	1.7371311	-0.35813951	NM_000478	ALPL	Homo sapiens al NM_000478
0.6590872	0.5830269	-1.7556334	NM_030899	ZNF323	Homo sapiens zi NM_030899
-2.7566314	-1.7546268	0.2164936	AK074236	SLC14A2	Homo sapiens cl AK074236
1.3419027	1.3904295	-1.0111299	NM_053044	HTRA3	Homo sapiens H NM_053044
-2.2777119	-2.1461654	0.5219164	NM_002996	CX3CL1	Homo sapiens ch NM_002996
-1.6182942	-2.1845732	2.600541	NM_017680	ASPN	Homo sapiens as NM_017680
-0.5771837	-1.2054276	1.3503366	AK128714	LOC642123	Homo sapiens cl AK128714
0.24015045	0.37098312	-1.6401129	THC2632909	THC2632909	Q6E5T4_FUGRU (Q6E5T4) Claudir
-2.9505248	-2.9887838	2.916644	AK024382	AK024382	Homo sapiens cl AK024382
1.051043	0.8741784	-2.17239	NM_032321	MGC13057	Homo sapiens hy NM_032321
-1.7650623	-2.2119246	0.6492262	NM_002729	HHEX	Homo sapiens he NM_002729
0.20646238	0.1428051	-1.9496002	NM_201525	GPR56	Homo sapiens G NM_201525
-5.0685678	-5.7348804	0.46811867	NM_004653	JARID1D	Homo sapiens ju NM_004653
-1.4061041	-1.4677114	1.4666271	NM_000933	PLCB4	Homo sapiens pl NM_000933
1.6568966	1.6133132	-1.2131824	AW389914	AW389914	AW389914 RC4- AW389914
-0.20647097	-0.2526369	2.0908704	NM_006334	OLFM1	Homo sapiens ol NM_006334
2.6837487	2.7671952	-0.8036547	NM_006757	TNNT3	Homo sapiens tr NM_006757
-2.6842184	-2.215271	1.2228703	NM_006504	PTPRE	Homo sapiens pr NM_006504
-4.013977	-3.7438126	0.650856	THC2614203	THC2614203	Q7KZ66_HUMAN (Q7KZ66) NF2 p
0.873672	0.96153975	-1.0034285	NM_002214	ITGB8	Homo sapiens in NM_002214
0.38342285	0.4128642	-1.4473877	NM_030899	ZNF323	Homo sapiens zi NM_030899
0.8817644	0.9063263	-1.1942501	NM_018936	PCDHB2	Homo sapiens pr NM_018936
-3.5294132	-3.5964966	0.41404247	NM_002760	PRKY	Homo sapiens pr NM_002760
-1.51828	-1.5021567	2.4149594	NM_032727	INA	Homo sapiens in NM_032727
1.4924712	1.0428996	-1.2725163	NM_032411	C2orf40	Homo sapiens ch NM_032411

-2.4329443	-2.0176172	0.23775291	NM_024693	ECHDC3	Homo sapiens en	NM_024693
-1.1342983	-0.9956751	2.1403818	BC071773	BC071773	Homo sapiens cI	BC071773
2.4631805	2.5694752	-0.64521503	NM_033317	DMKN	Homo sapiens de	NM_033317
-1.7078457	-2.3866305	1.6283145	NM_014399	TSPAN13	Homo sapiens te	NM_014399
-0.52074766	-0.9716134	1.99436	NM_201384	PLEC1	Homo sapiens pl	NM_201384
-1.1473942	-1.0579796	2.253726	AK027091	AK027091	Homo sapiens cI	AK027091
1.0064449	1.0382309	-1.1892357	NM_018936	PCDHB2	Homo sapiens pr	NM_018936
-2.372119	-2.4934788	0.6383219	NR_001543	TTTY14	Homo sapiens te	NR_001543
0.67843866	0.7712474	-1.6383796	NM_016619	PLAC8	Homo sapiens pl	NM_016619
-0.9852743	-0.91755486	1.5611672	NM_058164	OLFM2	Homo sapiens ol	NM_058164
-0.45552778	-0.6391835	1.5400076	NM_031456	FBXW10	Homo sapiens F-	NM_031456
-1.2328253	-1.9841609	1.4953632	NM_006504	PTPRE	Homo sapiens pr	NM_006504
-2.6391149	-2.6792903	1.4565239	NM_130396	WISP3	Homo sapiens W	NM_130396
-1.2238779	-1.4440632	0.673975	NM_007078	LDB3	Homo sapiens LI	NM_007078
-1.2493458	-1.281723	1.0160894	NM_006528	TFPI2	Homo sapiens ti	NM_006528
0.8212762	0.74639463	-1.4373131	NM_201564	SYCE1	Homo sapiens sy	NM_201564
-1.2235842	-1.6729202	0.6459708	BM955917	BM955917	EST0854 HEV PC	BM955917
-1.1883631	-1.2215929	1.8047838	BC036699	LOC654433	Homo sapiens cI	BC036699
-1.5157757	-1.573039	0.63944817	AK056079	AK056079	Homo sapiens cI	AK056079
1.3137941	1.2924666	-0.93772936	XM_940977	LOC651758	PREDICTED: Hon	XM_940977
-2.0590281	-1.6818638	0.9324131	NM_001825	CKMT2	Homo sapiens cr	NM_001825
0.8428688	0.9168434	-2.2123384	NM_000710	BDKRB1	Homo sapiens br	NM_000710
-1.1868043	-1.2243118	1.7398996	ENST000002225	TFPI2	Tissue factor pathway inhibitor 2	
-2.7303581	-2.641633	0.039183617	NM_006426	DPYSL4	Homo sapiens di	NM_006426
-2.344778	-2.1852221	0.76289415	NM_144724	MARVELD2	Homo sapiens M	NM_144724
3.812097	3.6623693	-1.6378527	NM_018659	CYTL1	Homo sapiens cy	NM_018659
-1.3497534	-1.5072908	1.999918	NM_001542	IGSF3	Homo sapiens in	NM_001542
-1.0979671	-1.2814465	1.5849533	NM_006547	IGF2BP3	Homo sapiens in	NM_006547
-1.8044181	-1.9525657	0.68452835	NM_002703	PPAT	Homo sapiens pl	NM_002703
-1.7225647	-1.6668463	0.7770405	NM_001884	HAPLN1	Homo sapiens hy	NM_001884
-0.53429556	-0.7968879	1.5277209	AK024924	AK024924	Homo sapiens cI	AK024924
0.48840237	0.43020725	-4.1795683	NM_175060	CLEC14A	Homo sapiens C	NM_175060
0.45226955	0.44568634	-2.1104574	NM_001972	ELA2	Homo sapiens el	NM_001972
-0.48995304	-0.41145706	4.4146614	NM_006744	RBP4	Homo sapiens re	NM_006744
1.0849509	0.92825985	-1.6862974	ENST000002569	C12orf39	Uncharacterized protein C12orf39	
0.3449216	0.5407758	-2.0464296	ENST000003743	MAN1C1	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alp	
0.49865913	0.6149025	-1.9513206	AK123855	C1orf170	Homo sapiens cI	AK123855
-1.9404984	-1.8938694	0.99627876	NM_016113	TRPV2	Homo sapiens tr	NM_016113
0.6374321	0.69007206	-5.30878	NM_022138	SMOC2	Homo sapiens SI	NM_022138
-1.4904585	-1.3961916	1.4277945	NM_000597	IGFBP2	Homo sapiens in	NM_000597
-2.1677876	-2.155058	0.4994192	NM_000322	PRPH2	Homo sapiens pe	NM_000322
0.65018654	1.0182424	-1.7193174	NM_018968	SNTG2	Homo sapiens sy	NM_018968
1.2229381	1.4555621	-0.8505082	NM_000478	ALPL	Homo sapiens al	NM_000478
-0.26937008	-0.24515009	2.5696821	NM_002203	ITGA2	Homo sapiens in	NM_002203
-0.53874016	-0.5739832	1.7860155	NM_003483	HMGA2	Homo sapiens hi	NM_003483
-1.7782373	-0.80370426	1.5389729	NM_206965	FTCD	Homo sapiens fo	NM_206965
-0.9595046	-1.1403828	1.5269966	U52054	U52054	Human S6 H-8 m	U52054
-0.91547537	-0.90722895	1.6209631	NM_024795	TM4SF20	Homo sapiens tr	NM_024795

ControlType	Chromosome E	Chromosome N	Chromosome S	Chromosome S	Cytoband	RefSeq
false	55301327	chr4	55301268	+	4q12	NM_000222
false	113691555	chr2	113691496	-	2q13	NM_003466
false	7303901	chrY	7303842	+	Yp11.2	NM_002760
false	19261140	chr17	19261081	+	17p11.2	NM_007148
false	87699045	chr11	87698986	-	11q14.2	NM_148170
false	202454692	chr1	202454633	-	1q32.1	NM_014935
false	96173689	chr2	96173630	-	2q11.2	NM_004418
false	57424354	chr18	57424295	-	18q21.33	
false	52027277	chr17	52027218	+	17q22	NM_005450
false	30931343	chr7	30931284	+	7p15.1	NM_198098
false	121008105	chr1	121008046	+	1p11.2	XR_017692
false	69981169	chr16	69977010	+	16q22.3	NM_001740
false	27838909	chr6	27838850	+	6p22.1	
false	24830378	chr16	24830319	+	16p12.1	NM_052944
false	27188777	chr7	27188718	-	7p15.2	NM_005523
false	43659247	chr21	43659188	-	21q22.3	NM_173354
false	14438456	chr21	14438397	+	21q11.2	
false	40008694	chr1	40008635	-	1p34.2	NM_022120
false						
false	305268	chr11	305209	+	11p15.5	NM_003641
false	27074352	chr11	27074293	-	11p14.2	
false	29608222	chr17	29608163	+	17q12	NM_002982
false	43921760	chr11	43921701	-	11p11.2	
false	45045966	chr19	45045907	-	19q13.2	NM_003890
false	87212564	chr15	87212505	+	15q26.1	
false	74135134	chr6	74135075	-	6q13	NM_001080507
false	95800823	chr14	95800764	+	14q32.2	NM_000710
false	30931640	chr7	30931582	+	7p15.1	NM_198098
false	174684907	chr4	174684848	-	4q34.1	NM_021973
false	47288648	chr1	47288589	+	1p33	NM_178033
false	26164088	chr6	26164029	-	6p22.1	NM_005319
false	55477151	chr3	55477092	+	3p14.3	
false	24912780	chr6	24912721	-	6p22.2	
false	20754086	chr1	20754027	+	1p36.12	NM_207334
false	67483339	chr15	67483280	+	15q23	NM_017705
false	39187553	chr17	39187494	-	17q21.31	NM_025237
false	131793923	chr11	131793864	-	11q25	NM_001012393
false	94758081	chr7	94758022	+	7q21.3	NM_017650
false	75472932	chr4	75472873	+	4q13.3	NM_001432
false	339484	chr7_random	339425	+		

false	669761	chr17_random	669702	+		
false	109848794	chr1	109848735	-	1p13.3	
false	2525721	chr9	2525662	-	9p24.2	
false	41794825	chr17	41791505	-	17q21.31	NM_001039083
false	105926825	chrX	105926766	+	Xq22.3	NM_194463
false	66197500	chr9	66197446	-	9q12	
false	25983481	chr1	25983422	+	1p36.11	NM_020379
false	5943481	chr6	5943422	-	6p25.1	NM_016588
false	115401724	chr1	115397591	-	1p13.2	NM_005725
false	48962835	chr19	48962776	-	19q13.31	NM_002250
false	23105257	chr8	23105198	-	8p21.3	NM_003844
false	56256336	chr16	56256277	+	16q13	NM_201525
false	129744419	chr10	129737904	+	10q26.2	NM_006504
false	33568487	chr8	33568428	-	8p12	NM_024025
false	201402361	chr1	201402302	+	1q32.1	NM_000674
false	68775565	chr5	68775506	+	5q13.2	NM_144724
false	140371139	chr5	140371080	+	5q31.3	NM_018902
false	22028744	chr8	22028685	-	8p21.3	NM_005144
false	115232535	chr10	115232476	-	10q25.3	
false	73680400	chr17	73680342	+	17q25.3	XM_937698
false	131790184	chr11	131790125	-	11q25	NM_001012393
false	190134054	chr2	190133995	-	2q32.2	NM_014585
false	6932035	chr18	6931976	-	18p11.31	NM_005559
false	24914577	chr6	24914518	-	6p22.2	
false	1785277	chr17	1785218	-	17p13.3	NM_178568
false	133892115	chr6	133892056	+	6q23.2	NM_004100
false	11846028	chr10	11845969	+	10p14	NM_024693
false	73365925	chr4	73365866	-	4q13.3	NM_014243
false	14951012	chr3	14950953	+	3p24.3	
false	21776471	chr1	21775671	+	1p36.12	NM_000478
false	28401075	chr6	28401016	-	6p22.1	NM_030899
false	41478371	chr18	41478312	+	18q12.3	
false	8358662	chr4	8358603	+	4p16.1	NM_053044
false	55976425	chr16	55976366	+	16q13	NM_002996
false	94258814	chr9	94258755	-	9q22.31	NM_017680
false	121014960	chr1	121014901	+	1p11.2	
false	85871987	chr2	85871928	+	2p11.2	
false	25488992	chr1	25488933	-	1p36.11	
false	190772799	chr2	190772740	+	2q32.2	NM_032321
false	94444897	chr10	94444838	+	10q23.33	NM_002729
false	56256042	chr16	56255983	+	16q13	NM_201525
false	20327217	chrY	20327158	-	Yq11.222	NM_004653
false	9407906	chr20	9407847	+	20p12.2	NM_000933
false	188277608	chr3	188277549	-	3q27.3	
false	137129506	chr9	137127686	+	9q34.3	NM_006334
false	1910318	chr11	1907619	+	11p15.5	NM_006757
false	129771104	chr10	129767909	+	10q26.2	NM_006504
false	50720393	chr18	50720338	-	18q21.2	
false	20412286	chr7	20412227	+	7p15.3	NM_002214
false	28402003	chr6	28401944	-	6p22.1	NM_030899
false	140456907	chr5	140456848	+	5q31.3	NM_018936
false	7308944	chrY	7308885	+	Yp11.2	NM_002760
false	105040034	chr10	105039975	+	10q24.33	NM_032727
false	106060708	chr2	106056928	+	2q12.2	NM_032411

false	11845272	chr10	11837598	+	10p14	NM_024693
false	551390	chr17_random	551331	-		
false	40680034	chr19	40679975	-	19q13.12	NM_033317
false	16789573	chr7	16785214	+	7p21.1	NM_014399
false	145085565	chr8	145085506	-	8q24.3	NM_201384
false	523483	chr17_random	523424	-		
false	140456998	chr5	140456939	+	5q31.3	NM_018936
false	19698339	chrY	19698280	-	Yq11.222	NR_001543
false	84234866	chr4	84231101	-	4q21.22	NM_016619
false	9825915	chr19	9825856	-	19p13.2	NM_058164
false	18623300	chr17	18623241	+	17p11.2	NM_031456
false	129737792	chr10	129736041	+	10q26.2	NM_006504
false	112496225	chr6	112496166	+	6q21	NM_130396
false	88485804	chr10	88485745	+	10q23.2	NM_007078
false	93354570	chr7	93354511	-	7q21.3	NM_006528
false	135220601	chr10	135220298	-	10q26.3	NM_201564
false	71118998	chr2	71118939	+	2p13.3	
false	113740777	chr2	113740718	+	2q13	
false	26011684	chr21	26011625	+	21q21.3	
false	241581305	chr2	241581246	+	2q37.3	XM_940977
false	80597721	chr5	80595140	+	5q14.1	NM_001825
false	95800848	chr14	95800789	+	14q32.2	NM_000710
false	93352998	chr7	93352939	-	7q21.3	
false	133869180	chr10	133869121	+	10q26.3	NM_006426
false	68756205	chr5	68752077	+	5q13.2	NM_144724
false	5067682	chr4	5067623	-	4p16.2	NM_018659
false	116919214	chr1	116919155	-	1p13.1	NM_001542
false	23317353	chr7	23317294	-	7p15.3	NM_006547
false	56956325	chr4	56956266	-	4q12	NM_002703
false	82973138	chr5	82973079	-	5q14.3	NM_001884
false	73085932	chr8	73085873	+	8q13.3	
false	37793284	chr14	37793225	-	14q21.1	NM_175060
false	806575	chr19	804356	+	19p13.3	NM_001972
false	95341718	chr10	95341659	-	10q23.33	NM_006744
false	21576293	chr12	21576234	+	12p12.1	
false	25985081	chr1	25985022	+	1p36.11	
false	901151	chr1	901092	-	1p36.33	XM_372194
false	16281010	chr17	16280951	+	17p11.2	NM_016113
false	168810488	chr6	168810429	+	6q27	NM_022138
false	217237390	chr2	217237331	+	2q35	NM_000597
false	42772533	chr6	42772474	-	6p21.1	NM_000322
false	1350281	chr2	1350222	+	2p25.3	NM_018968
false	21769414	chr1	21767298	+	1p36.12	NM_000478
false	52424084	chr5	52424025	+	5q11.2	NM_002203
false	64643300	chr12	64518599	+	12q14.3	NM_003483
false	46381618	chr21	46381394	-	21q22.3	NM_206965
false	121014910	chr1	121014851	+	1p11.2	
false	227935877	chr2	227935818	-	2q36.3	NM_024795