

ÉCOLE DOCTORALE

(SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT)

LABORATOIRE EA 4708 / I3MTO

THÈSE présentée par :

Gaith Larguech

Soutenue le : 29 juin 2017

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité: **Biologie - Santé**

**Effets de la Laminarine sur les cellules souches
mésenchymateuses: impact sur la différenciation
chondrogénique**

THÈSE dirigée par : **Eric Lespessailles, Professeur associé, Université d'Orléans et
Richard Daniellou, Professeur, Université d'Orléans.**

RAPPORTEURS :

**Vincent Ferrières : Professeur, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de
Rennes**

Xavier Houard : MCU, Université – Paris 6

JURY:

Vincent Ferrières : Professeur, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes : Rapporteur

Xavier Houard : MCU, Université – Paris 6 : Rapporteur

Raphael Coursier : Docteur en Médecine Hôpital Saint Vincent - Saint Antoine, Lille : Examinateur

Hechmi Toumi : Professeur, Université d'Orléans : Président de jury

Richard Daniellou : Professeur, Université d'Orléans : Co-directeur de thèse

Eric Lespessailles : Professeur associé, Université d'Orléans : Directeur de thèse

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'Unité de recherche EA 4708 – I3MTO (Imagerie Multimodale Multiéchelle et Modélisation du Tissu Osseux et articulaire) dans le Collegium Sciences et Techniques de l'Université d'Orléans en liaison avec l'Institut de Chimie Organique et Analytique de l'Université d'Orléans.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance à mes directeurs de thèse, Monsieur le Docteur Eric Lespessailles et Monsieur le Professeur Richard Daniellou qui m'ont encadré et orienté tout au long de ces années de travail. Je leur remercie pour leurs conseils éclairés, leurs disponibilités et leurs confiances.

Je remercie profondément Monsieur le Professeur Hechmi Toumi pour la confiance qu'il m'a témoignée, ses remarques et son soutien scientifique et surtout morale.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Vincent Ferrières et à Monsieur le Professeur Xavier Houard 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 Monsieur le Docteur Raphael Coursier d'avoir bien voulu évaluer cette thèse en participant au jury en tant qu'examineur.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Madame Annabelle Cesaro pour son aide précieuse, sa disponibilité et ses conseils.

Je souhaiterais aussi remercier Monsieur le Professeur Stéphane Petoud pour m'avoir permis de réaliser une partie de mes expériences dans son laboratoire.

A tout le personnel de laboratoire ainsi à mes collègues et en particulier Masnsen, Marija, Thomas, Fouad et Mohamed pour m'avoir encouragés et supportés durant ces années.

Enfin, je remercie mes amis d'ici, de là-bas et de toujours. Je remercie de tout mon cœur ma famille et ma fiancée pour son soutien scientifique et morale, toujours merci !

Résumé

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) de la moelle osseuse ont été intensivement étudiées pour leur capacité de régénération et leurs propriétés immunomodulatrices. Beaucoup d'études ont montré que la thérapie qui utilise les CSM améliore les fonctions de tissu ostéo-articulaire particulièrement le cartilage en vue de leur capacité de différenciation en chondrocytes. Les CSM présentent un certain nombre d'avantages pour la médecine régénérative, ces cellules peuvent être facilement isolées et multipliées en culture pour obtenir un nombre approprié pour la thérapie cellulaire de plus, elles ont une faible immunogénicité, ce que les rend aptes à la transplantation allogénique. Depuis les années 1960, de nombreuses études ont souligné les propriétés médicinales des polysaccharides notamment les β -glucanes qui ont une place particulière du fait de leurs effets immunostimulants. L'objectif de notre travail était de mettre en évidence les capacités d'un β -glucane particulier, la laminarine, sur la prolifération et la différenciation des CSM dans la perspective d'applications dans l'arthrose. Les CSM ont été cultivés dans les milieux de croissance et de différenciation chondrocytaire. La viabilité et l'apoptose des cellules ont été explorées par le comptage, les tests MTT et la coloration à l'annexine V. En outre, l'analyse des protéines spécifiques de la prolifération a été effectuée par le western blott. De plus, l'expression des marqueurs spécifiques des CSM et des chondrocytes a été étudiée à l'aide de la RT-qPCR et de l'immunofluorescence. Nos résultats ont démontré que la stimulation des CSM à la laminarine avec la dose de 1 mg/ml soit en condition de culture de croissance basique ou en chondrogenèse a inhibé la prolifération des cellules sans induire leur apoptose. En outre, dans les conditions de culture chondrogénique, la laminarine à une dose similaire a empêché la différenciation des CSM en chondrocytes.

Mots clefs : Cellules souches mésenchymateuses, prolifération, différenciation chondrocytaire, laminarine.

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) are a population of multipotent cells residing in several readily available adult tissue compartments, thus allowing for their ex vivo expansion. MSCs have a reliable potential for differentiation (plasticity) into cells of the mesodermal lineage (chondrocytes, osteoblasts, adipocytes). Bone marrow-derived MSCs have been a focus of stem cell research in light of their relative ease of isolation and expansion and of their high potential for differentiation. Herein, the aim of the present PhD is to explore the potential of a β -glucan (laminarin) on Mesenchymal stem cell proliferation and differentiation for future benefit for osteoarthritis treatment. MSCs were cultured in MSC growth and chondrogenic differentiation mediums. Cells viability and apoptosis were explored by cell count, MTT assays and Annexin V staining. In addition, Analysis of the specific protein of cell proliferation was performed by western blott. Furthermore, mRNA and protein expression of specific markers for MSCs and chondrocytes were studied using qPCR and immunofluorescence. Our results demonstrated that stimulation of MSC with laminarin at a dose of 1 mg/ml in either basic growth culture or chondrogenesis inhibited cell proliferation without inducing their apoptosis. Furthermore, under chondrogenic culture conditions, laminarin at a similar dose prevented the differentiation of MSC into chondrocytes.

Key words: Mesenchymal stem cells, proliferation, chondrogenic differentiation, laminarin.

Listes des figures

Figure 1 : Hiérarchie des cellules souches en fonction du potentiel de différenciation.....	5
Figure 2 : La multi-potence des CSM.....	11
Figure 3 : Auto-renouvellement et différenciation des cellules souches mésenchymateuses.....	12
Figure 4 : Modèle de plasticité cellulaire.....	14
Figure 5 : Immunomarquage par un fluorochrome.....	18
Figure 6 : La technique de cytométrie en flux.....	19
Figure 7 : Les principales étapes de la chondrogénèse et les principales voies de signalisation impliquées	24
Figure 8 : Classification générale des polysaccharides.....	34
Figure 9 : Les différentes structures des bêta-glucanes en fonction de leurs différentes liaisons glycosidiques.....	35
Figure 10 : Stimulation des CSM avec du laminarine durant 7 jours.....	54
Figure 11 : Différenciation des CSM en chondrocytes durant 7,14 et 21 jours sous traitement en laminarine.....	56
Figure 12 : exemples de profils de qRT-PCR pour la détermination du Cycle threshold (Ct).....	66
Figure 13 : Image de microscopie optique de CSM adhérentes.....	69
Figure 14 : Caractérisation des CSM murines isolées par RT-qPCR.....	71
Figure 15 : Immunomarquage des marqueurs mésenchymateux Nucléostémin et Thy-1 (CD90) dans les CSM au P4.....	72
Figure 16 : CSM après 7 jours de traitement par la laminarine.....	75
Figure 17 : Viabilité et prolifération des CSM.....	77
Figure 18 : Effet de la laminarine sur la voie de signalisation wnt/ β -caténine des CSM.....	79
Figure 19 : les marqueurs des CSM sous le traitement de la laminarine.....	80
Figure 20 : Immunomarquage de la Nucléostémin dans les CSM au J7.....	81
Figure 21 : Dénombrement des CSM après 7 jours de différenciation chondrocytaire sous traitement de laminarin.....	84
Figure 22 : Comptage des CSM après 14 jours de différenciation chondrocytaire sous traitement de laminarin.....	85
Figure 23 : Microscopie des CSM au jour 21.....	86

Figure 24 : Effet de la laminarin sur les marqueurs définissant les CSM lors de la différenciation chondrogénique à j 7.....	87
Figure 25 : Effet de la laminarin sur les marqueurs définissant les CSM lors de la différenciation chondrogénique à j 14.....	88
Figure 26 : Effet de la laminarin sur les marqueurs définissant les CSM lors de la différenciation chondrogénique à j 21.....	89
Figure 27 : Effet de la laminarin sur les marqueurs des chondrocytes lors de la différenciation chondrogénique des CSM à j 7.....	90
Figure 28 : Effet de la laminarin sur les marqueurs des chondrocytes lors de la différenciation chondrogénique des CSM à j 14.....	90
Figure 29 : Effet de la laminarin sur les marqueurs des chondrocytes lors de la différenciation chondrogénique des CSM à j 21.....	91
Figure 30 : Immunomarquage du Nucléostémin et du collagen II des CSM en voie de différenciation chondrocytaire au J 7.....	92
Figure 31 : Immunomarquage du Nucléostémin et du collagen II des CSM en voie de différenciation chondrocytaire au J 14.....	93
Figure 32 : Immunomarquage du Nucléostémin et du collagen II des CSM en voie de différenciation chondrocytaire au J 21.....	94
Figure 33 : Coloration des cellules avec Oil Red O après 21 jours de culture en milieu de différenciation adipocytaire.....	95
Figure 34 : CSM humaines après 7 jours de traitement par la laminarine.....	99
Figure 35 : Viabilité et prolifération des CSM humaines.....	100
Figure 36 : Comptage des CSM durant la différenciation chondrocytaire sous le traitement de la laminarine.....	101
Figure 37 : Effet de la laminarine sur l'expression de l'ARNm de l'endoglin lors de la différenciation chondrogénique des CSM humaines.....	101
Figure 38 : Immunomarquage du Nucléostémin dans les CSM humaines en voie de différenciation chondrocytaire au J 21.....	102
Figure 39 : Effet de la laminarin sur les marqueurs des chondrocytes lors de la différenciation chondrogénique des CSM humaine.....	103

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères minimaux pour définir les CSM.....	8
Tableau 2 : Profil phénotypique des cellules souches mésenchymateuses.....	16
Tableau 3 : listes des anticorps utilisés en immunofluorescence.....	57
Tableau 4 : listes des anticorps utilisés en Western Blot.....	59
Tableau 5 : Tampon RIPA.....	59
Tableau 6 : Composition des gels de séparation.....	60
Tableau 7 : Composition des gels de concentration.....	60
Tableau 8 : Composition du Tampons de charge.....	61
Tableau 9 : Composition du Tampons de migration.....	61
Tableau 10 : Composition du Tampons de transfert.....	62
Tableau 11 : Composition du Tampons de lavage.....	62
Tableau 12 : Composition du Tampons de saturation.....	63
Tableau 13 : Liste des amorces spécifiques des gènes utilisées pour la qPCR.....	65

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN: acide ribonucléique

BMP: Bone morphogenetic protein

CD: Cluster of Differentiation

CD105: Endogline

CFU-F : test d'unité formant des colonies type-fibroblaste

CSE : cellules souches embryonnaires

CSM : cellules souches mésenchymateuses

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

DMSO: dimethyl sulfoxide

EGF: Endothelial Growth Factor

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorter

FGF: Fibroblast Growth Factor

GDF: Growth differentiation factor

GVHD: graft versus host disease

HGF: Hepatocyte Growth Factor

HLA : Human leucocyte Antigen

HLA-DR : Human Leukocyte Antigen - antigen D Related

IFN- γ : Interferon gamma

IL : InterLeukine

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

ITS : insuline-transferrine-acide sélénique

LPS : lipopolysaccharide

MCI : masse cellulaire interne

MMP : métalloprotéinases matricielles

NK : Natural Killer

PBS: Phosphate Buffer Saline

PDGF: Platelet Derived Growth Factor

Poly (I: C): acide polyinosinique-polycytidylique

qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction

SVF: Sérum de Veau Fœtal

TGF-β: Transforming Growth Factor -β

TNF: Tumor Necrosis Factor

Treg: Lymphocytes Trégradeurs

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

α-MEM: α-MEM Eagle

Liste des Publications

- Articles

Larguech G, Cesaro A, Toumi H, Martinić I, Petoud S, Daniellou R and Lespessailles E. Growth Inhibition of Mesenchymal Stem Cells by Laminarin: Impact on Chondrocyte Differentiation.

H. Toumi, **G. Laguech**, M. Cherif, A. Batakis, R. Hambli, R. Jennane, T.M. Best, E. Lespessailles. Implications of the calf musculature and Achilles tendon architectures for understanding the site of injury.

Aveline P, Lespessailles E, Mazor M, **Larguech G**, Cherief M, Best TM, Toumi H. Physical Exercise Programs In A Young Female Rat Model: What Is Most Osteogenic?

Toumi H, Ambli R, Best TM, Cherief M, Mazor M, **Larguech G**, Jenanne R, Lespessailles E. Calf Muscle Contributions To Achilles Tendon Architectures And Injuries Using Finite Element Modeling.

Toumi H, **Larguech G**, Filaire E, Pinti A, Lespessailles E. Regional variations in human patellar trabecular architecture and the structure of the quadriceps enthesis: a cadaveric study.

- Conférence et présentation de posters

Larguech G, Cesaro A, Toumi H, Martinić I, Petoud S, Daniellou R and Lespessailles E. Growth Inhibition of Mesenchymal Stem Cells by Laminarin Treatment. Colloque « American College of Sports Medicine», Denver, USA 2017.

Larguech G, Toumi H, Cherief M, Best TM, Jenanne R, Ambli R Lespessailles E. Association between individual calf muscle volume and Achilles tendon enthesis morphology. Colloque « American College of Sports Medicine», San Diego, USA 2015.

G.Larguech, M.Cherief, H.Toumi, E.Lespessailles and R.Daniellou. Effect of Beta 1.3/1.6 Glucan on chondrogenic differentiation. Colloque « Biotechnocentre », France 2014.

Mazor M.,**Larguech G**. Coursier R., Cherief M., Lespessailles E., Toumi H. A potential breakthrough in the treatment of Osteoarthritis: Alternative method for cartilage repair by mesenchymal stem cells from osteoarthritic area; Colloque « Biotechnocentre », France 2013.

Cherief M., Mazor M., **Larguech G.**, Lespessailles E., Toumi H. Douleur et arthrose : mythe ou réalité ; Colloque « Biotechnocentre », France 2014.

Mazor M., **Larguech G**, Cherief M, Best TM, Lespessailles E, Toumi H. A potential breakthrough in osteoarthritis treatment: Alternative method for cartilage repair by mesenchymal stem cells. Colloque « American College of Sports Medicine», San Diego, USA 2015.

Aveline P, Lespessailles E, Cherief M, Mazor M, **Larguech G**, Best TM, Toumi H. Does exercise has an additive effect to Strontium Ranelate on bone status? Colloque « American College of Sports Medicine», San Diego, USA 2015.

Cherief M, **Larguech G**, Mazor M, Best TM, Lespessailles E, Toumi H. Is Subchondral Bone Plate Innervation And Vascularisation Associated With Knee Oa. Colloque « American College of Sports Medicine», San Diego, USA 2015.

Table des matières

Introduction	1
1 Chapitre 1	3
1.1 Les cellules souches :	3
1.1.1 Potentialité des cellules souches	3
1.1.2 Les catégories des cellules souches	5
1.1.2.1 Les cellules souches embryonnaires	5
1.1.2.2 Les cellules souches fœtales	6
1.1.2.3 Les cellules souches adultes	7
1.2 Les cellules souches mésenchymateuses	7
1.2.1 Principales sources des CSM	9
1.2.2 Caractéristiques et propriétés des CSM	10
1.2.2.1 Multi-potence	10
1.2.2.2 L'auto-renouvellement	11
1.2.2.3 Plasticité	13
1.2.3 Phénotype et sélection	15
1.2.3.1 Phénotype	15
1.2.3.2 Sélection (<i>in vitro</i>)	16
1.2.4 Rôle des cellules souches mésenchymateuses dans l'homéostasie	20
1.2.4.1 Remodelage tissulaire	21
1.2.4.2 Interaction des cellules souches mésenchymateuses avec le système immunitaire	22
1.2.5 Chondrogenèse	23
1.2.6 Les mécanismes moléculaires associés aux effets thérapeutiques des CSM dans l'arthrose :	25
1.2.7 Applications cliniques	27
1.2.7.1 Avantages	27
1.2.7.2 Effets secondaires	31
2 Chapitre 2	33
2.1 Les polysaccharides	33
2.2 Les bêta-glucanes	34
2.3 Histoire des bêta-glucanes	35
2.3.1 Production des bêta-glucanes de différentes sources	35
2.3.1.1 Les céréales	36
2.3.1.2 Les champignons	36
2.3.1.3 Les levures	37
2.3.1.4 Les bactéries	37

2.3.1.5	Les algues.....	38
2.3.2	Mécanisme d'action des bêta-glucanes	39
2.3.2.1	Dectine 1.....	40
2.3.2.2	Les TLRs	41
2.3.2.3	CR3.....	41
2.3.2.4	Les scavengers	42
2.3.2.5	LacCer	42
2.3.3	Les bêta-glucanes et le système immunitaire	42
2.3.4	Applications Cliniques	44
	Matériels et méthodes	53
1.	La culture des CSM humaines	54
2.	La culture des CSM murines	54
2.1.	Réactif.....	54
2.1.1.	Composition des milieux de cultures	54
2.2.	Protocoles.....	55
2.2.1.	Isolement et mise en culture des CSM.....	56
2.2.2.	Passages en sous-culture et amplification	56
2.2.3.	Caractérisation des CSM.....	57
2.2.4.	Préparation de solution de traitement de laminarine :	57
2.2.5.	Traitement des CSM avec de la laminarine durant 7 jours de culture	57
3.	Le test MTT	58
4.	Microscopie épifluorescente des CSM	59
5.	Différentiation des CSM en chondrocytes sous stimulation de la laminarine pendant 7, 14 et 21 jours.....	59
6.	Marquage des CSM par immunofluorescence	60
6.1.	Marquage des molécules étudiées.....	61
6.2.	Protocole	61
7.	Etude de l'expression des protéines par Western blotting.....	62
7.1.	Principe du Western Blotting	62
7.2.	Protocoles expérimentaux du Western Blot	63
7.2.1.	Lyses des cellules.....	63
7.2.2.	Dosages des protéines.....	63
7.2.3.	Electrophorèse (migration)	64
7.2.4.	Transfert	66
7.2.5.	Détection des protéines	66
7.2.6.	Marquage des protéines	66

7.2.7.	Révélation par chimiluminescence.....	67
8.	Etude de l'expression des ARNm par RT q-PCR.....	67
8.1.	Extraction des ARN.....	68
8.2.	Transcription inverse.....	68
8.3.	PCR quantitative.....	69
8.4.	Traitement des résultats de qPCR.....	70
9.	Statistiques.....	71
	Résultats et Discussion	72
1.	Identification des CSM murines	73
1.2.	Caractérisation morphologique.....	73
1.3.	Caractérisation phénotypique.....	74
1.3.1.	L'expression des ARNm	74
1.3.2.	L'immunofluorescence	76
1.4.	Stimulation des CSM avec la laminarine	77
1.4.1.	Dénombrement des CSM	77
1.4.2.	Prolifération et Viabilité	80
1.4.3.	Implication de la voie du signal wnt / b-catenin dans l'inhibition de la croissance des CSM par la laminarine	82
1.4.4.	L'expression des marqueurs des CSM sous la stimulation de la laminarine.....	84
1.5.	Différentiation des CSM sous la stimulation de laminarine.....	87
1.5.1.	7, 14 et 21 jours.....	87
1.6.	Différentiation des CSM en adipocytes sous la stimulation de laminarine	99
2.	Les cellules humaines :	102
2.1.	Stimulation des CSM humaine avec la laminarine	102
2.1.1.	Dénombrement des CSM humaine	102
2.2.	Prolifération et viabilité.....	104
2.3.	Différentiation des CSM sous la stimulation de laminarine.....	104
2.3.1.	Dénombrement des cellules :.....	104
2.3.2.	Expression des marqueurs définissant les CSM humaines :	105
2.3.3.	Expression de l'ARNm des marqueurs définissant les chondrocytes humaines :	107
	Conclusion et perspectives	109
	Références Bibliographiques	112

Introduction

Les approches thérapeutiques pour prévenir l'initiation et la progression des lésions des tissus musculosquelettiques sont à l'heure actuelle décevante et limitées en particulier dans des pathologies comme les ostéonécroses aseptiques, les discopathies et l'arthrose.

Ainsi dans l'arthrose, du fait sans doute de son caractère multifactoriel, de la complexité des voies de signalisation impliquées et des multiples phénotypes de cette pathologie, aucune option thérapeutique susceptible de limiter la dégradation du tissu cartilagineux n'est disponible.

La thérapie cellulaire suscite depuis quelques années un intérêt croissant dans la communauté scientifique du fait de sa capacité à reconstituer des pertes de substance de tissu cartilagineux ou osseux par des biomatériaux et des cellules mésenchymateuses indifférenciées.

Les cellules souches ou stromales mésenchymateuses sont au cœur du développement de ces thérapies cellulaires de par leur capacité trophique, immunosuppressive et de différenciation. Depuis les années 1960, de nombreuses études ont souligné les propriétés médicinales des polysaccharides issus de source végétale comme les champignons ou les algues.

Parmi ces polysaccharides, les glucanes ont une place particulière du fait de leurs effets immunostimulants.

L'objectif de notre travail consiste à mettre en évidence les capacités d'un β -glucane particulier, la laminarine, sur la prolifération et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) dans la perspective d'applications dans l'arthrose.

Le mémoire de thèse comporte une première partie consacrée aux CSM, une deuxième partie dédiée aux polysaccharides et en particulier aux β -glucanes et à leurs propriétés dans le champ de leurs applications cliniques.

Une troisième partie s'intéresse spécifiquement aux applications des β -glucanes dans le contexte des maladies ostéo-articulaires.

La quatrième partie aborde les matériels et méthodes utilisées dans le cadre de ce travail, la cinquième partie relate les résultats obtenus et la discussion. Enfin pour terminer ce rapport de thèse, un chapitre de conclusions et perspectives clôturera ce travail.

1 Chapitre 1

1.1 Les cellules souches :

Les cellules souches sont un groupe de cellules capables de se renouveler et de se différencier en plusieurs lignées pour former des cellules somatiques spécialisées [1-3]. 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). Les cellules souches sont capables d'accomplir ces tâches, en subissant une division cellulaire symétrique et / ou asymétrique. La division symétrique donne deux cellules souches filles qui sont indifférenciées ayant les mêmes propriétés phénotypiques et la capacité de se différencier en d'autres lignées. En cas de besoin des cellules somatiques différenciées, la cellule souche subit une division asymétrique pour donner une cellule progénitrice et une copie non différenciée d'elle-même pour maintenir les réserves de cellules souches du corps [4].

Les cellules souches peuvent être classées en fonction de leur temps d'apparition. Les cellules souches embryonnaires sont présentes dans la partie très précoce du développement embryonnaire, alors que les cellules de la lignée germinale et les cellules souches adultes deviennent actives plus tard dans le développement post-natal. Une meilleure catégorisation des cellules souches peut être faite en fonction de leur potentialité. Les cellules souches embryonnaires sont pluripotentes et peuvent former tous les types de cellules de l'organisme alors que les cellules souches adultes sont multipotentes et capables de produire plusieurs lignées[5].

1.1.1 Potentialité des cellules souches

Le terme « potentialité » d'une cellule est couramment utilisé pour décrire la capacité de développement de cellules souches (CS) : à savoir leur potentiel de se différencier en plusieurs types de cellules spécialisées et d'être en mesure de donner lieu à tout type de cellules matures (Figure 1).

- Les cellules souches totipotentes sont les seules cellules à pouvoir conduire au développement d'un organisme entier, car elles sont capables de participer à la formation de tous les tissus d'un individu adulte, ainsi qu'aux cellules du placenta. Elles sont issues des premières divisions de l'œuf fécondé jusqu'au stade de la morula

(4ème jour suivant la fécondation chez la femme) où l'embryon est constitué de 8 à 16 cellules [6]. Cependant, l'utilisation de ces cellules en expérimentation clinique pose plusieurs problèmes [7] premièrement d'ordre éthique en vue de l'utilisation d'embryons humains dans la recherche expérimentale [8] et deuxièmement à cause de leur fort pouvoir mitogène et tumorigène ce qui en limite aujourd'hui l'utilisation clinique [9]. Les cellules souches totipotentes donnent lieu à des cellules souches progénitrices des lignées somatiques et des cellules souches de lignée germinale primitive [2].

- Les cellules souches pluripotentes sont les descendants des cellules totipotentes. Elles peuvent conduire, par différenciation, à l'ensemble des tissus issus des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) mais ne peuvent pas reproduire un être humain entier [10]. Elles sont présentes au niveau de la masse interne du blastocyste à partir du 5ème jour et jusqu'au 7ème après la fécondation. Pour ces raisons, ces cellules souches sont souvent appelées cellules souches embryonnaires [11]. Ces cellules pluripotentes sont caractérisées par leur auto-renouvellement et par leur potentiel de différenciation pour tous les types de cellules de l'organisme [12].
- Les cellules souches multipotentes sont présentes chez l'embryon ainsi que chez l'adulte. Elles ont un potentiel de différenciation plus réduit que les cellules souches pluripotentes mais gardent la capacité de s'auto-renouveler. Leur plasticité est donc plus limitée que celle des cellules souches embryonnaires. Elles sont capables de conduire à plusieurs types cellulaires tels que les chondrocytes, les ostéocytes et les adipocytes [13] comme le cas des cellules souches mésenchymateuses. Les cellules souches multipotentes peuvent être aussi engagées dans un autre programme de différenciation cellulaire, c'est le cas des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse qui peuvent générer toutes les cellules de la lignée sanguine (globules rouges, polynucléaires, lymphocytes T ou B, macrophages) [6].
- Les cellules souches unipotentes sont situées dans les tissus adultes et ont le plus faible potentiel de différenciation. Une cellule unipotente a la capacité de donner un seul type cellulaire. Elles proviennent de cellules multipotentes en train de se différencier dans un lignage spécifique pour donner des cellules progénitrices, comme les pré-adipocytes.

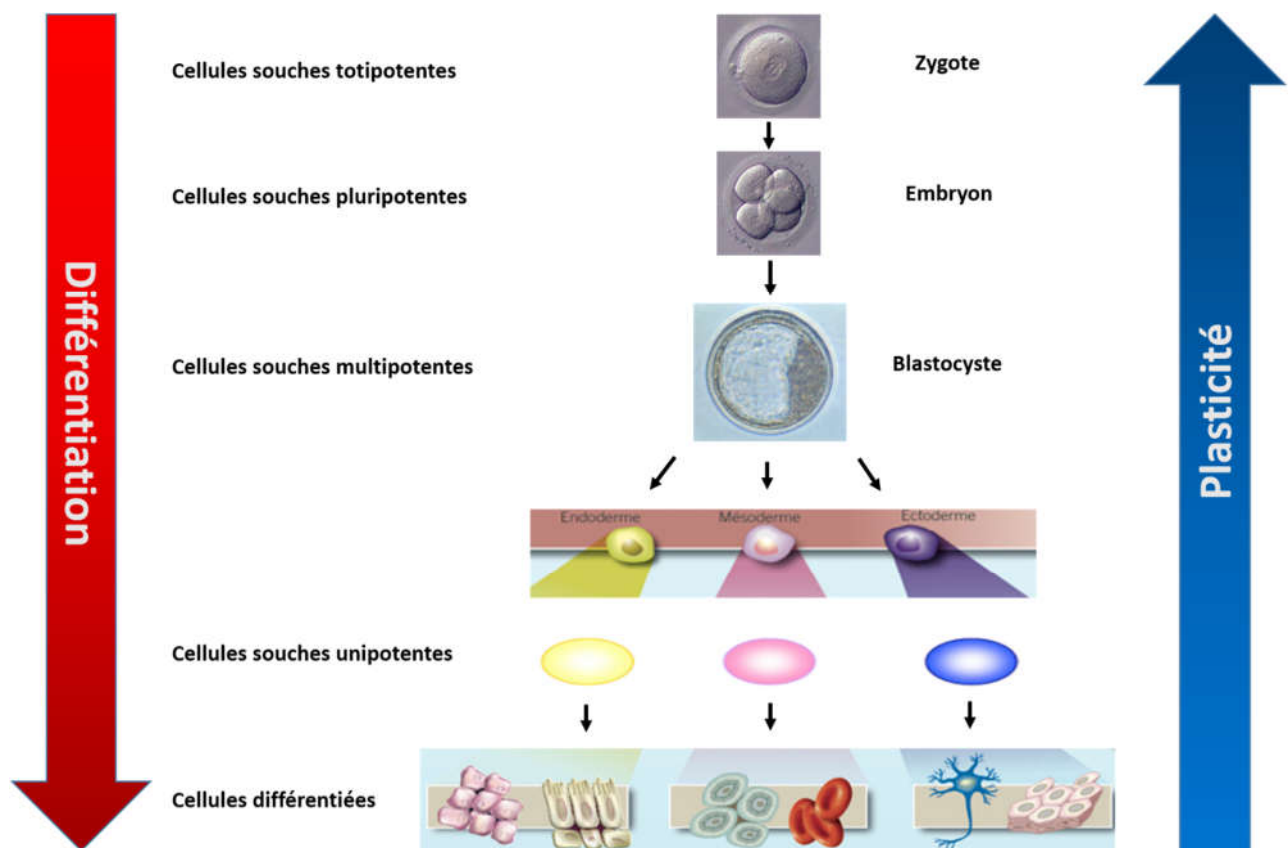


Figure 1 : Hiérarchie des cellules souches en fonction du potentiel de différenciation

1.1.2 Les catégories des cellules souches

1.1.2.1 Les cellules souches embryonnaires

Après la fécondation, le zygote subit des divisions en série au cours du développement embryonnaire. Au stade de la blastula, des amas de cellules forment la masse cellulaire interne (MCI) où sont obtenues les cellules souches embryonnaires [14-16]. Les cellules souches embryonnaires (CSE) sont pluripotentes et peuvent se différencier dans l'une des cellules appartenant aux trois couches germinales (endoderme, mésoderme et ectoderme). Le procédé qui consiste à isoler les cellules souches embryonnaires à partir de la MCI afin d'établir une lignée cellulaire stable est appelé dérivation. Ce processus a été décrit simultanément pour la première fois chez la souris en 1981 par deux équipes indépendantes, l'une britannique [17] à l'Université de Cambridge et l'autre américaine [16] à l'Université de Californie à San Francisco. Après environ 15 années de recherche, une première étude faisait état de la possibilité d'isoler les cellules de la MCI de blastocystes humains et de les maintenir en culture [18]. C'est en 1995 que le groupe de James A. Thomson du « Genome Center of Wisconsin », à Madison aux Etats Unis, a réussi la culture de la première lignée des cellules

souches embryonnaires de primate (la lignée R278.5) à partir d'un blastocyste mâle de singe Macaque rhésus [19]. Les auteurs de cette découverte ont constaté que les CSE de primates diffèrent significativement des CSE de souris mais ressemblent aux cellules souches de carcinomes embryonnaires humaines, ce qui permet de penser qu'il serait possible de maintenir en culture des cellules souches embryonnaires humaines. Trois ans après, le même groupe a réussi la culture de la première lignée des cellules souches embryonnaires humaines [15]. Parmi les cellules embryonnaires, il y a d'autres types de cellules : les cellules souches embryonnaires germinales, qui sont isolées à partir de cellules germinales primordiales de la crête gonadique du fœtus de 5-9 semaines après un avortement. Le succès de l'isolement et la caractérisation de lignées cellulaires germinales embryonnaires a été rapporté par Shamblo et collègues [20, 21]. Ces cellules sont pluripotentes et sont capables de former les trois couches germinales primordiales. La création de lignées de CSE humaines est maintenant effectuée dans de nombreux laboratoires dans le monde entier. En tant que cellules dérivées de la MCI du blastocyste après fécondation *in vitro*, elles peuvent maintenir un caryotype normal avec la conservation de leur pluri-potence après plus de 300 passages [22, 23] et leur capacité à se différencier en plusieurs types de cellules [22, 24]. Les cellules souches embryonnaires sont donc d'un grand intérêt pour la médecine régénérative notamment dans le traitement des maladies du cœur [25], du cerveau, le foie, le sang et le diabète de type I, mais l'utilisation de ces cellules présente plusieurs problèmes tels que l'éthique liée à l'utilisation d'embryons humains pour la recherche expérimentale [8] et clinique, leur fort potentiel tumorigène et mitogénique qui limite leur efficacité aujourd'hui [9].

1.1.2.2 Les cellules souches fœtales

Les cellules souches fœtales peuvent être isolées à partir du sang du fœtus et de la moelle osseuse, ainsi que d'autres tissus fœtaux, y compris le foie et les reins. Le sang du fœtus est une riche source de cellules souches hématopoïétiques qui prolifèrent plus rapidement que celles du sang de cordon ombilical ou de la moelle osseuse adulte. Le sang du fœtus lors des trois premiers mois de grossesse contient également une population de cellules souches mésenchymateuses non hématopoïétiques qui prennent en charge l'hématopoïèse et peuvent se différencier en de multiples lignées. En termes d'éventuelles applications, les cellules souches fœtales hématopoïétiques et mésenchymateuses ont des avantages sur leurs homologues adultes pour leur grande multi-potence et leur faible immunogénicité. Les

cellules souches fœtales sont moins éthiquement controversées que les cellules souches embryonnaires et leur potentiel de différenciation apparaît plus grand que les cellules souches adultes. C'est pour cela qu'elles représentent des outils puissants pour explorer de nombreux aspects de la biologie cellulaire et demeurent très prometteuses comme outils thérapeutiques pour la transplantation de cellules et la thérapie génique *ex vivo* [26].

1.1.2.3 Les cellules souches adultes

Les cellules souches adultes, également appelées cellules souches somatiques, se trouvent dans plusieurs organes et tissus chez l'enfant et l'adulte et maintiennent l'homéostasie de l'organisme. Par rapport aux cellules souches embryonnaires et fœtales, elles sont plus différenciées et leur potentiel est plus limité (multipotentes *versus* pluripotentes) [6]. La première découverte des cellules souches adultes remonte à 1950 lorsque des études d'irradiation ont été effectuées pour trouver un remède après le bombardement atomique de Hiroshima et Nagasaki. Les scientifiques ont découvert que, lorsque les souris sont gravement irradiées, elles ont tendance à épuiser leurs cellules de moelle osseuse, ce qui présentait aussi les mêmes symptômes avec les personnes qui ont survécu après la bombe atomique. Dès lors, l'injection de ces souris à nouveau avec de la moelle osseuse d'autres souris va régénérer l'ensemble de leur système sanguin [27-29]. Ces premières études ont conduit ultérieurement à la découverte et à la caractérisation des cellules souches hématopoïétiques [30, 31], puis à la découverte des cellules souches mésenchymateuses [32, 33]. Les cellules souches adultes ont une durée de vie limitée par rapport aux cellules souches embryonnaires et leur capacité de régénération décroît avec l'âge du fait de la diminution du nombre de cellules souches disponibles dans le tissu avec le temps [34]. Ce nombre dépend également du site de prélèvement [35] et de l'état de santé du donneur [36]. *In vitro*, elles peuvent tout de même proliférer jusqu'à 40 passages sans se différencier [37].

1.2 Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont une population de cellules adultes souches pluripotentes, non-hématopoïétiques, présentes dans tous les tissus conjonctifs. Elles ont été initialement identifiées dans la moelle osseuse, où elles fournissent le microenvironnement correct pour soutenir l'hématopoïèse. Ces cellules constituent une source pour les différentes lignées cellulaires qui sont présentes dans l'os, les tendons, le

cartilage et le stroma [38]. Elles donnent également naissance à des cellules musculaires striées squelettiques et cardiaques, et même à des cellules non mésodermiques, tels que les hépatocytes ou les cellules nerveuses. Ces cellules nichent principalement dans la moelle osseuse [39] mais peuvent également être trouvées en faibles quantités dans le tissu adipeux [40], le tissu osseux, synoviale[41], le sang placentaire , le liquide amniotique et le cordon ombilical [42]. Il a été démontré que les cellules souches mésenchymateuses peuvent circuler dans le sang périphérique, leur nombre augmentant après une fracture de l'os suggérant que la moelle osseuse sert de réservoir pour les CSM qui seraient susceptibles d'être mobilisées et transportées par la circulation sanguine dans les zones touchées afin de participer à la réparation des tissus [43]. Morphologiquement, les CSM sont d'apparence fibroblastique avec des grands noyaux et des corps longs et minces. Le comité « Mesenchymal Stem Cell and Tissue" de l'ISCT (International Society for Cellular Therapy) a fourni des critères minimaux pour définir les CSM. Premièrement, les CSM doivent adhérer à la surface plastique lorsqu'elles sont maintenues dans un milieu standard de culture cellulaire. Deuxièmement, les CSM doivent exprimer les antigènes CD105, le CD73 et CD90 et pas les antigènes CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a et CD19 ou HLA-DR. Troisièmement, les CSM doivent se différencier en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes *in vitro*.

Tableau 1: Critères minimaux pour définir les CSM d'après Dominici (Cytotherapy, 2006) [44].

1. Adhésion au plastique		
2. Phénotype	Positive (≥ 95% +)	Négative (≤ 2% +)
	CD105	CD45
	CD73	CD34
	CD90	CD14 or CD11b
		CD79a or CD19
		HLA-DR
3. Différentiation <i>in vitro</i> en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes		

1.2.1 Principales sources des CSM

C'est en 1976 que, pour la première fois, des cellules souches mésenchymateuses ont été isolées à partir de la moelle osseuse [45]. Les CSM sont présentes dans divers tissus de l'organisme adulte [46]. Elles sont présentes dans de nombreux tissus autres que la moelle osseuse, tels que le sang périphérique [47], le liquide amniotique, l'os [42, 48], le périoste [49], la membrane synoviale [50], le liquide synovial [51], les muscles [52] et le cartilage articulaire [53]. Il a été également mis en évidence que le tissu fœtal [54], le placenta, le sang du cordon [55], la gelée de Wharton [56, 57] et la veine ombilicale [58] contiennent des CSM. Les cellules provenant de différents tissus montrent des similitudes dans leur capacité de se différencier en lignées mésenchymateuses et dans l'expression de leurs marqueurs de surface [59].

Les CSM sont généralement collectées lors d'une ponction de moelle osseuse extraite de la crête iliaque supérieure du bassin chez l'homme [60]. Les CSM peuvent également être collectées dans les compartiments de moelle tibiale et fémorale [61], ainsi que dans la colonne lombaire et thoracique [62]. Du fait de leur faible quantité 0,001 à 0,01 % de la population totale des cellules nucléées de la moelle osseuse soit 10 fois moins que les cellules souches hématopoïétiques [63], il est nécessaire de les purifier avant leur utilisation. Par leur forte capacité d'adhérence au support plastique de la culture *in vitro*, ces CSM peuvent se multiplier pour une durée de vie assez limitée [64]. Cette courte durée de vie semble être due soit à un engagement précoce dans les lignages de cellules différenciées soit à une sénescence progressive par manque d'activité télomérase [10].

Les cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux sont équivalentes à des CSM qui se trouvent dans la moelle osseuse. Le tissu adipeux pourrait servir d'excellente source de CSM, où elles sont 100 à 1000 fois plus abondantes que dans la moelle, du fait de la quantité présente dans l'organisme humain et de la disponibilité de déchets opératoires liés à la chirurgie [40, 61]. Ces cellules possèdent un taux de prolifération élevé lors de l'expansion *in vitro* avec une capacité de différenciation multiple. Elles sont facilement prélevées chez un patient par une méthode simple et peu invasive, sans préoccupation d'ordre éthique ou des problèmes de rejet d'autogreffe [65-67]. Elles sont aussi très facilement cultivables et leur isolement se fait par adhérence au plastique en culture *in vivo* [68]. Les CSM du tissu adipeux n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques, leucocytaires et endothéliaux tels que CD31, CD34, CD45 ainsi que le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (HLA-

DR), alors qu'elles ont été de façon homogène positives pour les marqueurs de surface cellulaire CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD59, CD90 et HLA-ABC [69]. Ces cellules possèdent des caractéristiques typiques des cellules souches mésenchymateuses. En effet, elles n'ont montré aucune différence significative entre les différents passages, ce qui prouve leur stabilité en culture *in vitro* pour plusieurs passages [70], ainsi qu'elles peuvent se différencier en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes [71, 72].

Le cordon ombilical humain est une source prometteuse de cellules souches mésenchymateuses (CSM). Contrairement aux cellules souches de la moelle osseuse, les cellules souches mésenchymateuses du cordon ombilical ont une procédure de collecte indolore et leur capacité d'auto-renouvellement est plus rapide. Elles ont démontré le potentiel de se différencier en trois couches germinales et la capacité de migration dans les régions d'inflammation ou dans les tissus endommagés, pour favoriser la réparation tissulaires et pour moduler l'immunité [73]. Les différents protocoles d'isolement peuvent fournir des différentes quantités et populations de cellules souches provenant d'autres compartiments du cordon ombilical, tels que le revêtement du cordon, le tissu péri-vasculaire, et la gelée de Wharton [74]. C'est en 1991, que pour la première fois, McElreavey a rapporté l'isolement de cellules de type fibroblaste provenant de la gelée de Wharton du cordon ombilical humain. Ces cellules ont un phénotype de surface, une adhérence au plastique et une multi-potence similaire à celles des cellules souches mésenchymateuses dérivées d'autres sources [75].

1.2.2 Caractéristiques et propriétés des CSM

1.2.2.1 Multi-potence

La multipotence est l'une des principales caractéristiques des CSM. En fait, ces cellules ont la capacité de devenir, dans des conditions de culture adéquates, non seulement des chondrocytes, des ostéocytes et des adipocytes mais aussi se différencient en cellules musculaires vasculaires lisses [76]. Bien que cette évidence de différenciation des CSM soit établie depuis longtemps, Pittenger a proposé un modèle de hiérarchie sur la base d'études de clones des CSM. Dans ses études, certains clones ont donné des populations de cellules capables de se différencier dans les trois lignées (chondrocytes, ostéocytes et adipocytes), tandis que d'autres populations clonales n'ont été capables de se différencier que seulement dans une ou deux lignées. Notamment, tous les clones ont pu donner des ostéocytes [77].

D'ailleurs, des nombreuses populations des CSM humaines étaient capables de donner des adipocytes, des ostéocytes, et des chondrocytes, mais elles perdent séquentiellement leur potentiel à se différencier tout en gardant leur voie de différenciation ostéoblastique qui apparait comme la voie par défaut confirmant l'existence d'un modèle de hiérarchie pendant le processus de la différenciation des CSM [78]. Plusieurs autres études rapportent un potentiel de différenciation plus large, comme la différenciation en tenocytes [79], en cellules musculaires squelettiques et cardiaques [80], en cellules endothéliales [81], en hépatocytes [82], en cellules neurales [83] et en cellules épithéliales [84].

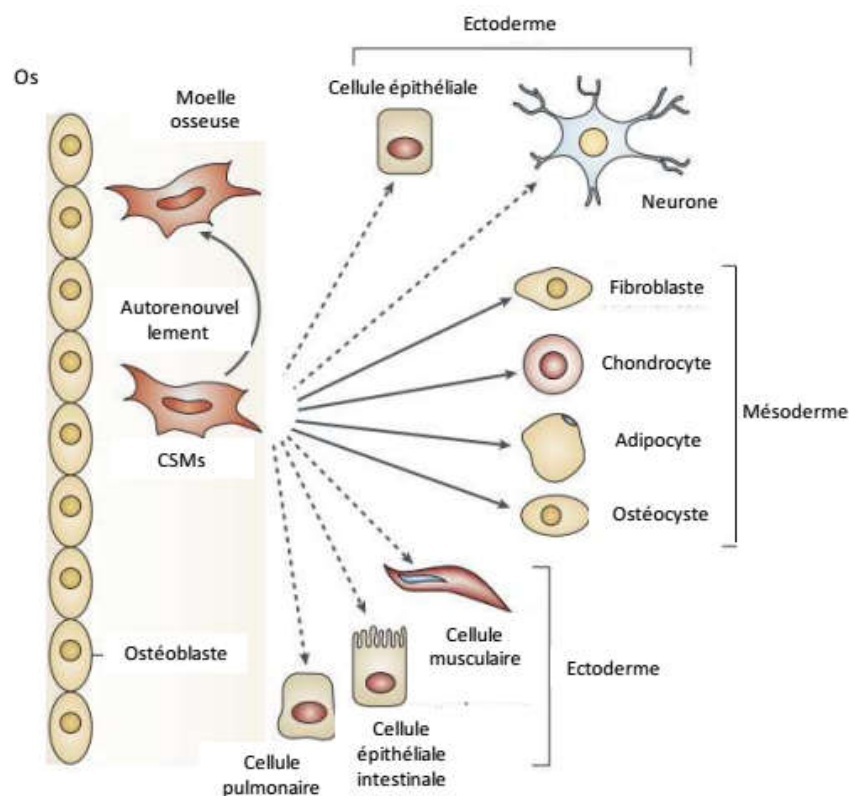


Figure 2 : La multi-potence des CSM d'après Uccelli (Nature Reviews Immunology, 2008) [85]

1.2.2.2 L'auto-renouvellement

Parmi les principales caractéristiques qui définissent une cellule souche, l'auto-renouvellement est défini comme étant la capacité de générer au moins une cellule fille qui conserve les propriétés des cellules souches et le potentiel de différenciation. C'est à dire l'aptitude à donner naissance à un ensemble défini de progénitures différenciées et matures. Lorsque les CSM ont été caractérisées par Friedenstein pour la première fois, elles ont été

classées comme multipotentes, pour leur capacité à se différencier en différentes lignées mésenchymateuses, d'où ce principal critère qui prouve leur appellation, même si largement utilisé, l'auto-renouvellement, critère principal aussi, reste encore controversé. 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* [86]. L'auto-renouvellement se réfère aux voies et mécanismes biologiques qui préservent l'état souches indifférenciées. Les matrices génomiques ont été utilisées pour identifier les signatures moléculaires présumées qui maintiennent l'état de cellules souches, y compris celui des CSM [87]. L'étude de l'implication des gènes spécifiques nous permet de bien comprendre comment les CSM parviennent à s'auto-renouveler (Fig 3).

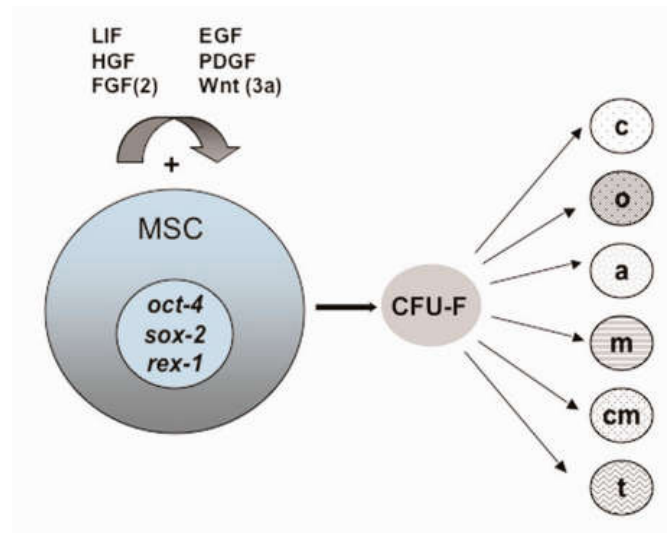


Figure 3 : Auto-renouvellement et différenciation des cellules souches mésenchymateuses d'après Kolf (Arthritis Research & Therapy, 2007)[88].

Des facteurs de signalisation extracellulaires, y compris des facteurs de croissance et des cytokines, sont impliqués pour promouvoir et / ou maintenir l'auto-renouvellement des CSM *in vitro*. Les CSM provenant d'une variété d'espèces de mammifères expriment également les gènes marqueurs des cellules souches embryonnaires *Oct-4*, *sox-2* et *rex-1*[89]. Des tests d'immunoprécipitation de chromatine suggèrent que certaines protéines du complexe de la famille des « polycomb-group proteins » qui sont associées à la chromatine sont impliquées d'une manière globale dans le maintien de la répression des gènes de différenciation. Ainsi, les protéines Polycomb peuvent indirectement maintenir l'activation d'*oct-4*, *sox-2*, et *rex-1* dans les CSM [90]. Le « leukemia inhibitory factor » (LIF) [91], les facteurs de croissance des

fibroblastes (FGF) [92] et la glycoprotéine Wnt [93] ont été impliqués dans la maintenance du caractère souche (en anglais, « Stemness ») des CSM parmi d'autres facteurs de croissance et des cytokines. Ces facteurs ont attiré une attention particulière en raison de leur rôle démontré dans l'auto-renouvellement des autres types de cellules souches et dans le maintien du tissu mésenchymateux embryonnaire indifférencié. Le « leukemia inhibitory factor » (LIF) est une cytokine qui maintient l'état souche des CSM et d'autres cellules souches [91]. Le « fibroblast growth factor 2 » (FGF2) maintient l'état souche des CSM à partir d'une variété d'espèces en prolongeant leur viabilité en culture [94]. Des travaux antérieurs suggèrent que les Wnts signaling pathways peuvent également régler le maintien du caractère souche des CSM [95], comme ils le font dans l'auto-reouvellement des cellules souches hématopoïétiques, neurales, intestinales, et les cellules souches de la peau [93]. La stimulation des CSM par des Wnt 3a inhibe leur différenciation ostéogénique en supprimant l'expression des gènes ostéoblastiques et en diminuant la minéralisation de la matrice, cet effet est accompagné par une augmentation de la prolifération et une diminution de l'apoptose lors de l'expansion des CSM non différenciées [95].

1.2.2.3 Plasticité

La plasticité des CSM se définit comme étant leur capacité de dé-différenciation et re-différenciation dans une autre lignée ou aussi leur aptitude de trans-différenciation, l'existence de cette propriété est très controversée [96]. Cette flexibilité des CSM correspond à la capacité de ces cellules à modifier leur vitesse de prolifération à l'extérieur et au cours de leur cycle cellulaire ainsi qu'à leur capacité d'auto-renouvellement après la perte ou la ré-acquisition de potentiel d'engagement en lignées cellulaires induites [97]. La différenciation des cellules souches mésenchymateuses ne semble pas être un processus irréversible. Des CSM qui semblent être à la phase finale de leur processus de différenciation peuvent changer de parcours si certaines conditions de culture *in vitro* sont relativement modifiées. Des clones des CSM différenciées peuvent donner d'autres cellules de la lignée mésenchymateuse, ceci a été démontré par des travaux antérieurs lorsque des clones d'ostéoblastes ont donné des chondrocytes et des adipocytes, ainsi que des clones de cellules vasculaires de muscle lisse ont également donné des chondrocytes, des ostéocytes et des adipocytes [76, 98]. 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 différenciées sont capables d'acquérir à nouveau un phénotype différencié, c'est à dire, qu'elles suivent un processus de re-différenciation [99] (Figure 4).

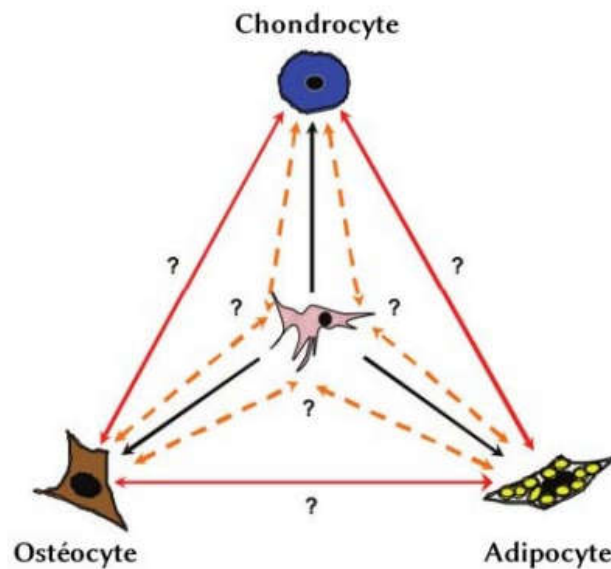


Figure 4 : Modèle de plasticité cellulaire d'après Baksh (Journal of cellular and molecular medicine, 2004). Les MSC peuvent suivre une voie de transdifférenciation ou de dé-différenciation en fonction des conditions de culture [102].

Certains chercheurs ont proposé que l'hétérogénéité cellulaire au sein d'une population clonale résulte du « bruit génique ». Dans ce modèle, le degré de multi-potence dépend des profils d'expression des gènes, des concentrations de protéines et de facteurs épi-génétiques. 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 des CSM [100]. Le « lineage priming » selon Delorme représente un autre modèle qui peut expliquer la plasticité du système mésenchymateux, Les MSC expriment certains gènes spécifiques de lignage tel que « Runt-related transcription factor 2 » (RUNX2) et « transcription factor » SOX avant toute induction de différenciation. Et au moment de la différenciation, le gène correspondant à la voie ciblée est augmenté tandis que les autres facteurs diminuent [76].

1.2.3 Phénotype et sélection

1.2.3.1 Phénotype

La caractérisation des propriétés phénotypiques des cellules souches mésenchymateuses est un aspect très controversé qui représente un obstacle difficile pour l'identification d'anticorps spécifiques. La plupart des informations à propos du phénotype des cellules souches mésenchymateuses proviennent des cellules cultivées *ex vivo*. Des résultats qui découlent des expériences de cytométrie en flux ont indiqué que ces cellules expriment une variété de marqueurs non spécifiques de surface cellulaire, car ils sont également exprimés par des cultures de cellules fibroblastiques provenant de divers tissus et qui ont été largement modulés lors de la culture *in vitro* (Tableau 2). Peu de choses sont encore connues sur les caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses *in vivo* et sur l'expression possible de marqueur différentiel entre les différentes classes de CSM. La majorité des informations recueillies jusqu'à présent est basée sur l'analyse des CSM cultivées. En dépit de la confusion au sujet de leur phénotype et l'hypothèse erronée que tout marqueur exprimé sur culture des CSM *in vitro* était également susceptible d'être présente *in vivo*, il y a un accord général sur le fait que les CSM ne possèdent pas les antigènes typiques de la lignée hématopoïétique (CD11b, CD14, CD 31, CD34, CD45 et CD117) [44, 88, 97] mais elles ont d'autres antigènes de surface tels que CD44, CD73, CD90, CD105, CD106 et CD166 [97, 101] ou CD13, CD28, CD33 et la classe HLA [102]. L'anticorps anti Stro-1 est également utilisé pour sélectionner les cellules souches mésenchymateuses dans la moelle osseuse [103, 104]. Cependant, le marqueur Stro-1 est progressivement perdu au cours de la culture cellulaire et permet donc d'identifier les CSM seulement dans les premiers passages [88]. Le travail effectué par Delorme a permis de décrire les protéines de la membrane plasmique des cellules en culture par la sélection des molécules appartenant aux cellules non hématopoïétiques. Certaines de ces protéines seraient utiles pour trier les MSC natives à partir de cellules mononucléaires. Tel est le cas de la protéine CD200, qui semble être l'un des marqueurs les plus efficaces pour la purification des MSC natives, capables de se différencier en adipocytes, ostéocytes et chondrocytes [105]. D'autres marqueurs de surface ont été utilisés pour purifier les cellules souches mésenchymateuses à partir de la moelle osseuse, comme CD146 [106] ou CD271 [107].

Tableau 2 : Profil phénotypique des cellules souches mésenchymateuses d'après Pountos (Injury, 2007) [108].

	Detection		Detection
Haematopoietic receptors		Growth factors and Cytokines	
CD1a (T6)	Neg	CD25 (Interleukin-2R)	Neg
CD14 (Lipopolysaccharide receptor)	Neg	CD71 (Transferrin receptor)	Pos
CD34	Neg	CD114 (Granulocyte-colony stimulating factor receptor)	Neg
CD45 (Leukocyte common antigen)	Neg	CD117 (Stem cell factor receptor)	Neg
CD133 (AC133)	Neg	CDw119 (Interferon γ R)	Pos
Adhesion molecules		CD120 a & b (Tumor Necrosis factor-a 1&2 R)	Pos
CD31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1)	Neg	CD121 a & b (Interleukin-1R a&b chain)	Pos
CD44 (Hyaluronate receptor)	Pos	CD123 (Interleukin-3R)	Pos
CD50 (Intercellular adhesion molecule 3)	Pos	CD124 (Interleukin-4R)	Pos
CD54 (Intercellular adhesion molecule 1)	Pos	CD126 (Interleukin-6R)	Pos
CD56 (Neural cell adhesion molecule)	Pos	CD127 (Interleukin-7R)	Pos
CD58 (Lymphocyte function-associated antigen 3)	Pos	CD140a (Platelet derived growth factor receptor)	Pos
CD62E (E-selectin)	Neg	FGFR (Fibroblast growth factor receptor)	Pos
CD62L (L-selectin)	Pos	CD271 (Low affinity nerve growth factor receptor)	Pos
CD62P (P-selectin)	Neg	Other Markers	
CD102 (intercellular adhesion molecule 2)	Pos	CD3 (CD3 complex)	Neg
CD106 (Vascular cell adhesion molecule-1)	Pos	CD9 (Tetraspannin)	Pos
CD144 (Calherin 5)	Neg	CD13 (Aminopeptidase N)	Pos
CD166 (Activated leukocyte cell adhesion molecule)	Pos	CD19 (B-lymphocyte Surface Antigen B4)	Neg
Integrins		CD73 (Ecto-5'-nucleotidase)	Pos
CD11a (Lymphocyte function-associated antigen-1 α)	Neg	CD80 (B7-1)	Neg
CD11b (Macrophage-1 antigen)	Neg	CD83 (HB15a)	Neg
CD11c (Complement receptor type 4 a chain)	Neg	CD86 (B7-2)	Neg
CD18 (Lymphocyte function-associated antigen-1 β)	Neg	CD90 (Thy-1 glycoprotein)	Pos
CD29 (Very late antigen β)	Pos	CD105 (Endoglin)	Pos
CD49a (Very late antigen a1)	Pos	CD146 (MUC18, Mel-CAM, S-endo)	Pos
CD49b (Very late antigen a2)	Pos	CD157 (BP-3 or Bone Marrow Stromal cell antigen-1)	Pos
CD49c (Very late antigen a3)	Pos	SH3 (Src homology 3)	Pos
CD49d (Very late antigen a4)	Neg	D7-FIB	Pos
CD49e (Very late antigen a5)	Pos	STRO-1	Pos
CD49f (Very late antigen a6)	Pos	HLA-A,B,C	Pos
CD51 (Vitronectin R a chain)	Neg	SSEA-3,4	Pos
CD61 (Vitronectin R β chain)	Pos		
CD104 (β_4 integrin)	Pos		

1.2.3.2 Sélection (*in vitro*)

Les cellules souches adultes sont prélevées plus facilement et de façon plus éthique que les cellules embryonnaires. Les critères permettant de choisir la source adéquate de CSM sont disponibles ainsi que les cellules sont facilement caractérisables à travers des protocoles bien établis [109]. Les CSM peuvent être obtenues à partir de plusieurs sources telles que la moelle osseuse, le placenta, le tissu adipeux, la peau et le sang de cordon ombilical [110]. Elles sont

ensuite isolées suivant leur adhérence sur les surfaces en plastique contrairement aux cellules souches hématopoïétiques. Comme étant des cellules issues de cultures primaires, ce processus d'isolement est maintenu pendant 2 à 3 passages pendant lesquels, la fraction hématopoïétique non-adhérente de cellules est épuisée, ce qui va conduire à une population plus homogène [77]. Morphologiquement, Mets et Verdonk ont décrit la présence de deux types de cellules différentes dans les cultures cellulaires, 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)[111]. L'utilisation de marqueurs pour vérifier l'identité des MSC sert comme une étape de contrôle importante qui peut économiser beaucoup de temps et réduire le nombre de manipulations expérimentales. Dans ce but, plusieurs laboratoires ont essayé d'augmenter la pureté des cellules souches mésenchymateuses isolées par sélection positive et négative. La réussite de la sélection positive et négative varie en fonction de la spécificité du marqueur, de la population de cellules de départ, ainsi que de la stratégie d'isolement. Bien que la sélection négative et positive de MSCs soit bien décrite dans le domaine, il subsiste des inquiétudes sur l'utilisation d'une telle stratégie d'isolement [112]. Les CSM peuvent être sélectionnés négativement à l'aide d'un cocktail d'anticorps dirigés contre des protéines exprimées par des cellules hématopoïétiques. Pour les cellules stromales de moelle osseuse humaine, les cibles communes de sélection négative comprennent CD2, CD3, CD11b / intégrine alpha M, CD14, CD15 / Lewis X, CD16 / Fc gamma RIII, CD19, CD38, CD56 / NCAM-1, CD66b / CEACAM- 8, CD123 / IL-3 R alpha, et CD235a / Glycophorin, tandis que CD45 et TER-119 sont des cibles communes pour la sélection négative des cellules souches mésenchymateuses murines. Afin d'améliorer la pureté des cellules souches mésenchymateuses humaines sélectionnées négativement, Modder et al. ont établi la sélection négative des cellules souches mésenchymateuses (utilisant des anticorps contre CD2, CD3, CD11b / intégrine alpha M, CD14, CD15 / Lewis X, CD16 / Fc gamma RIII, CD19, CD56 / NCAM-1, CD123 / IL-3 R alpha, et CD235a / Glycophorin A) par cytométrie en flux (FACS) pour isoler les cellules qui expriment CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56, CD34, CD31, CD45 et PECAM-1 [113]. Les CSM peuvent être aussi sélectionnées positivement à l'aide de certains anticorps destinés à cibler des protéines mésenchymateuses spécifiques telles que CD271/NGF R qui est fortement exprimée chez les

CSM [114], ainsi que l'endogline/CD105 une glycoprotéine localisée sur la membrane cellulaire et faisant partie du complexe protéique, récepteur du Transforming growth factor beta $TGF\beta$ [115] et la STRO-1 qui est une protéine de surface cellulaire exprimée par des cellules stromales de la moelle osseuse [104]. La sélection positive peut conduire à la réticulation des antigènes de surface, qui peuvent activer les voies de signalisation et modifier le phénotype cellulaire. D'autre part, tout type de sélection augmente le risque d'isolement d'une population cellulaire distincte qui peut se différencier de manière préférentielle vers une lignée spécifique. Malgré ces limites, les cellules isolées par sélection positive ont été décrites pour avoir augmenté leur capacité de différenciation par rapport aux cellules isolées sur la base de l'adhésion aux surfaces plastiques [104, 107, 114, 115]. Parmi les techniques qui permettent la sélection des CSM *in vitro*, les chercheurs utilisent l'immunomarquage. Le principe de cette technique est de mettre les cellules prélevées chez un animal en contact avec un premier anticorps dit anticorps primaire, spécifique de l'antigène de la cellule d'intérêt ; puis de révéler cet anticorps en utilisant un anticorps dit secondaire, issu d'un animal d'une autre espèce. L'anticorps secondaire, qui est l'anticorps marqué, reconnaît spécifiquement l'anticorps primaire comme étranger et se fixe donc sur lui (Figure 5).

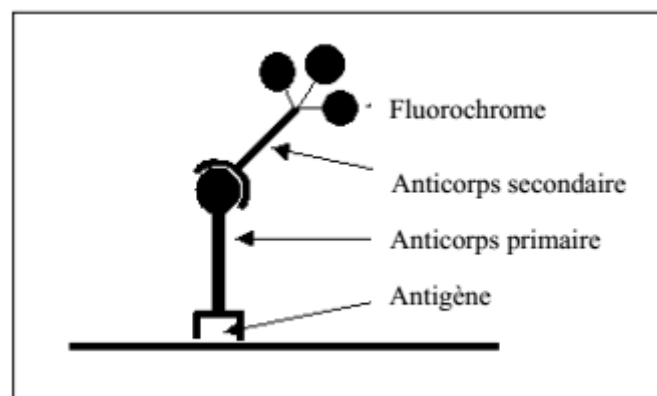


Figure 5 : Immunomarquage par un fluorochrome.

<http://webiologie.free.fr/techniques/marquage/anticorps.html> (Mars 2017)

Le marqueur porté par l'anticorps doit ensuite être révélé : les chercheurs utilisent soit la fluorescence : on parle de la technique de cytométrie en flux ou d'isolement cellulaire par fluorescence active (fluorescence activated cell sorting ou FACS) (Figure 6), soit des technologies de séparation magnétique.

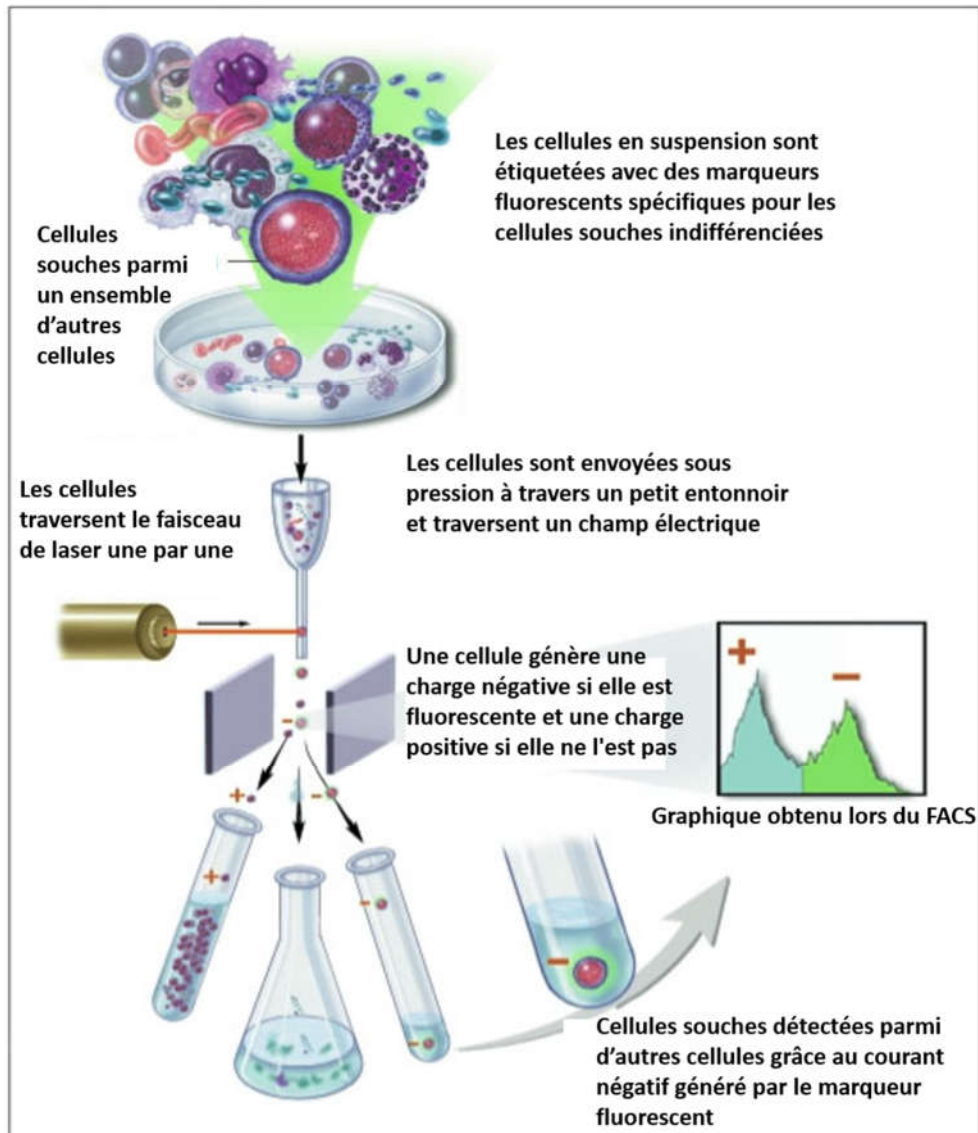


Figure 6 : La technique de cytométrie en flux d'après Terese Winslow, Lydia Kibiuk et Caitlin Duckwall (2001). <https://stemcells.nih.gov/info/2001report/appendixE.htm> (Mars 2017).

Cette méthode est facile à mettre en place quand les cellules souches sont en suspension. Lorsque les cellules proviennent d'un tissu, il faut d'abord les en extraire, en utilisant par exemple un traitement à la protéase : les cellules souches sont alors isolées des cellules voisines et de la matrice extracellulaire [116].

1.2.4 Rôle des cellules souches mésenchymateuses dans l'homéostasie

La prolifération, la migration et la différenciation sont les principaux processus cellulaires qui permettent le maintien de l'homéostasie tissulaire dans l'organisme adulte. La prolifération cellulaire est impliquée dans la production et l'augmentation du nombre de cellules, la différenciation permet de maintenir le renouvellement de la plupart des lignées et la migration des cellules est le mouvement des cellules réparatrices vers les tissus lésés afin d'assurer leur régénération. Ces trois processus cellulaires permettent le maintien physiologique d'un organe ou d'un tissu en remplaçant les cellules mortes, soit naturellement, soit après une blessure, assurant ainsi la durabilité du fonctionnement d'un organe au cours de la vie [117, 118]. Dans cela, les CSM jouent un rôle important dans la protection des tissus essentiellement par l'inhibition de l'apoptose et l'augmentation du « tissue turnover ». D'ailleurs, il a été rapporté que les CSM sont capables d'inhiber l'apoptose dans les reins, le foie et les lésions cérébrales, par l'augmentation des facteurs de survie comme l'expression de la protéine kinase B (Akt) dans les cellules blessées, les facteurs BDNF (Brain-derived neurotrophic factor : Facteur neurotrophique dérivé du cerveau) et de croissance comme « l'insulin-like growth » factor (IGF), le « Vascular endothelial growth factor » (VEGF) et l'expression de « Hepatocyte growth factor » (HGF) qui inhibent l'apoptose et stimulent la prolifération cellulaire [119]. Il est aussi bien connu que les CSM font des véritables médiateurs dans la réparation des tissus par le biais des mécanismes paracrines. Parmi toutes les théories concernant l'action paracrine des CSM, la plus étudiée et discutée par la recherche est l'immunomodulation. Compte tenu de la nature inflammatoire de la plupart des blessures, des études ont indiqué que le rôle prédominant des CSM dans la résolution des lésions tissulaires repose sur l'atténuation de l'inflammation dans des sites endommagés. Outre la médiation directement dans le processus inflammatoire, certaines études ont suggéré que les MSC possèdent également des caractéristiques anti-oxydantes, elles ont été observées pour produire de nombreux médiateurs antioxydants tels que le VEGF, le « Platelet-derived growth factor » (PDGF), le superoxyde dismutase (SOD), le HGF et l'IL-6 [119]. Ensemble, ces caractéristiques dynamiques permettent aux CSM une bénéfique habilité thérapeutique dans la restauration de la physiologie du tissu afin de préserver son homéostasie.

1.2.4.1 Remodelage tissulaire

La restauration des tissus est le processus par lequel plusieurs types de cellules endommagées sont remplacés afin de protéger et d'améliorer la fonction des organes. Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer le phénomène de restauration des tissus chez les mammifères. Ces théories incluent la dé-différenciation des tissus endommagés, la trans-différenciation des cellules progénitrices et l'activation des réserves des cellules précurseurs [117]. A cet égard, la polyvalence de développement des CSM a suscité un intérêt remarquable dans leur application potentielle en thérapie cellulaire. La transplantation de ces cellules stimule la régénération des tissus, y compris les os, les muscles squelettiques, le myocarde, la peau, le foie et les nerfs périphériques. Selon plusieurs données, cela se produit et résulte à la fois de l'intégration des CSM transplantées dans les tissus du receveur et de l'activité sécrétoire de ces cellules. A cet égard, Il a été démontré que les cellules souches mésenchymateuses transplantées intègrent le revêtement endothélial des capillaires en croissance et l'espace péri-endothéliales des vaisseaux sanguins nouvellement formés, en les stabilisant ainsi [120]. Les CSM représentent une source importante de facteurs de croissance et de cytokines, qui participent à la régulation de la régénération des tissus. Ainsi, les CSM produisent des facteurs dans la moelle osseuse qui sont nécessaires pour l'autosubsistance des cellules souches hématopoïétiques, nous pouvons nous référer à des facteurs tels que SDF-1 α (the stromal factor-1 α), SCF (stem cell factor), angiopoïétine -1, et l'interleukine-7 [121]. Les CSM produisent des facteurs de croissance angiogéniques et neurotrophiques, y compris le VEGF, l'angiopoïétine, le bFGF « basic fibroblast growth factor », le HGF, le NGF « nerve growth factor », le BDNF « brain-derived neurotrophic factor », et le GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) [122, 123]. En cela, les facteurs de croissance angiogénique produits par les CSM dans les régions de la transplantation stimulent la division des cellules endothéliales, la migration et la formation des vaisseaux sanguins. En outre, les facteurs produits par les CSM favorisent la mobilisation de progéniteurs endothéliaux de la moelle osseuse, qui participent à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins [122, 124]. En même temps, les facteurs neurotrophiques produits par les CSM stimulent à la fois la croissance et le renouvellement des terminaisons nerveuses. Ainsi, les CSM peuvent médier la régulation coordonnée de la croissance des vaisseaux sanguins et les nerfs au cours de la régénération et le remodelage des tissus [123].

1.2.4.2 Interaction des cellules souches mésenchymateuses avec le système immunitaire

Dans la littérature, les CSM de la moelle osseuse sont souvent étiquetées comme des cellules ayant plusieurs propriétés telles que le support de l'hématopoïèse, la capacité de différenciation (multi-potence), la capacité de l'auto-renouvellement et le potentiel immuno-modulateur [125]. De nombreux modèles précliniques ont démontré que les CSM de la moelle osseuse peuvent migrer vers les sites d'inflammation en entraînant des effets immuno-modulateurs par contact cellulaire direct avec les cellules immunitaires ou par la production de facteurs immunosuppresseurs solubles [126]. Pour cette raison, il existe un certain nombre d'études cliniques qui utilisent les CSM pour traiter des maladies auto-immunes, telles que: la maladie aiguë du greffon contre l'hôte (GVHD) [127], l'anémie aplasique [128], la maladie de Crohn [129], la sclérose en plaques [130] et l'insuffisance cardiaque ischémique [131]. Après avoir établi leur potentiel immuno-modulateur *in vitro*, les CSM ont été introduites dans les milieux cliniques, dans lesquels ces cellules présentent leurs effets thérapeutiques dans le traitement des maladies auto-immunes du rejet du greffe après une transplantation de moelle osseuse [127]. Il est important de mentionner le manque de protocoles d'optimisation permettant l'isolement, l'expansion des CSM et en particulier le maintien de leur potentiel immuno-modulateur [132] étant donné que ces efforts sont essentiels pour promouvoir la thérapie cellulaire. Récemment, de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'interaction entre les CSM et divers participants dans le processus d'inflammation ont été mis en évidence. En fonction de leur type et de l'intensité des stimuli inflammatoires qui les affectent, les CSM modulent leur capacité à supprimer la réponse immunitaire dans certains cas ou à l'augmenter dans des autres [133]. En effet, les CSM se comportent comme des cellules surveillantes de l'immunité innée, pouvant détecter la présence d'agents pathogènes dans l'organisme et participant à la résolution de l'infection [134, 135]. À la suite d'une infection ou d'une atteinte tissulaire, l'inflammation créée ne stimule pas uniquement les cellules de l'immunité innée mais également les cellules stromales et notamment les CSM résidentes[136]. Ainsi, le recrutement des CSM est la conséquence de l'expression à la surface des CSMs des « Toll Like Receptors » (TLR). En effet, elles expriment les ARNm des TLR 1,2, 3, 4, 5 et 6 et moins clairement des TLR 7 à 10 [137]. Suite à l'activation des TLR, les CSM acquièrent un phénotype différent en fonction du niveau de l'inflammation, leur conférant une activité pro ou anti-inflammatoire. Les CSM ont la capacité de modifier et

d'influencer presque toutes les cellules du système immunitaire inné et adaptatif, d'induire un phénotype anti-inflammatoire et de moduler la réponse immunitaire médiée par leurs facteurs solubles tels que l'interleukine 6 (IL-6), « macrophage colony-stimulating factor » (M-CSF), l'IL-10, le TGF- β , HGF, l'enzyme l'indoleamine 2,3- dioxygénase (IDO) [138], le « TNF- α -stimulated gene/protein » 6 (TSG-6) [139] et la Prostaglandine E2 PGE2 [140-142]. Ces facteurs ont été identifiés comme ayant un rôle majeur sur l'inhibition des lymphocytes T, la maturation des cellules dendritiques (CD), la prolifération des cellules « natural killer » (NK) ou encore en induisant l'expression d'IL-10 par les lymphocytes T régulateurs. Krampera et ses collègues ont observé que, dans un système *in vitro* de co-culture, les CSM inhibent bien la prolifération des lymphocytes T mais que cet effet n'apparaît qu'après trois jours de culture seulement. Cette observation suggère qu'il existe une communication réciproque entre les deux types cellulaires à l'origine de l'effet inhibiteur des CSM [143]. Il a été rapporté aussi que les CSM régulent positivement des cytokines anti-inflammatoires, y compris l'IL-3, -5, -10, et -13, alors qu'elles régulent négativement des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 α et β , IFN- γ et TNF- α [144].

1.2.5 Chondrogenèse

La chondrogenèse débute avec la sélection, la migration, la prolifération et la condensation des CSM. Ces différentes étapes sont régulées par des interactions entre les CSM et les cellules épithéliales [145]. Le facteur de croissance « Transforming Growth Factor β » (TGF- β) est un des premiers stimulus des voies de signalisation pour initier la transformation des chondro-progéniteurs en chondrocytes matures [146]. Cette différenciation se caractérise par la formation d'une matrice contenant différents types de collagène tels que les collagènes de type II, IX et XI mais aussi des agrécannes [147]. Le facteur de transcription Sox9 est un des premiers facteurs permettant aux cellules de commencer l'étape de condensation, ultérieurement Sox9 permet l'expression du collagène de type II (col2a1) [148]. La Co-expression de L-Sox5 et Sox6 qui sont deux autres membres de la famille des facteurs transcriptionnels Sox est aussi indispensable pour permettre la différenciation des chondro-progéniteurs en chondrocytes [149]. L'expression de ces protéines Sox dépend de la signalisation des Bone Morphogenic Protein (BMP) et plus particulièrement des protéines BMP-RIA et BMP-RIB [150]. Un autre facteur de transcription intervient dans la phase de différenciation chondrocytaire. Il s'agit de Runx2, ce facteur est également présent dans la

phase de condensation et plusieurs études le décrivent comme étant également nécessaire dans la différenciation osseuse des CSM [151]. Des études antérieures ont montré les rôles des cascades de signalisation intracellulaire activée par des membres de la famille du TGF- β en favorisant l'expression des gènes spécifiques du cartilage, comme les 'mitogen-activated protein kinases' (MAPK), les N-cadherines et les Wnts [152-154]. Les principaux sous-types de MAPK incluent le p38, « extracellular signal-regulated kinase-1 » (ERK-1), et « c-Jun N-terminal kinase » (JNK). Ces derniers sont des régulateurs exclusifs de l'expression du gène du facteur de transcription Sox 9 qui est le principal inducteur du phénotype chondrocytaire [153]. L'expression des marqueurs associés à la chondrogenèse a été caractérisée de façon positive dans les chondrocytes différenciées à partir des CSM, y compris les facteurs de transcription (sox-9, scleraxis), la matrice extracellulaire (ECM) et certains gènes (collagène de type II et IX, de l'aggrécane, biglycane, décorine) [99, 155]. Cependant, les voies de signalisation qui induisent l'expression de ces gènes chondrogéniques de référence restent généralement inconnues. Les effets naturels, les mutations humaines et les études de génétique moléculaire ont identifié plusieurs molécules de signalisations instructives, y compris divers transforming growth factor- β (TGF- β) [156], la protéine morphogénétique osseuse (BMP), le facteur de croissance et de différenciation (GDF)[157] et les ligands Wnt [158]. Les protéines recombinantes et / ou le traitement des cellules souches mésenchymateuses avec le TGF- β 1 et TGF- β 3, la BMP-2, BMP-4, BMP-6 [159], BMP-12 [160], BMP-13 [161] et GDF-5 ont été démontrés pour induire rapidement la chondrogenèse des CSM à partir d'une variété de sources mésodermiques [155].

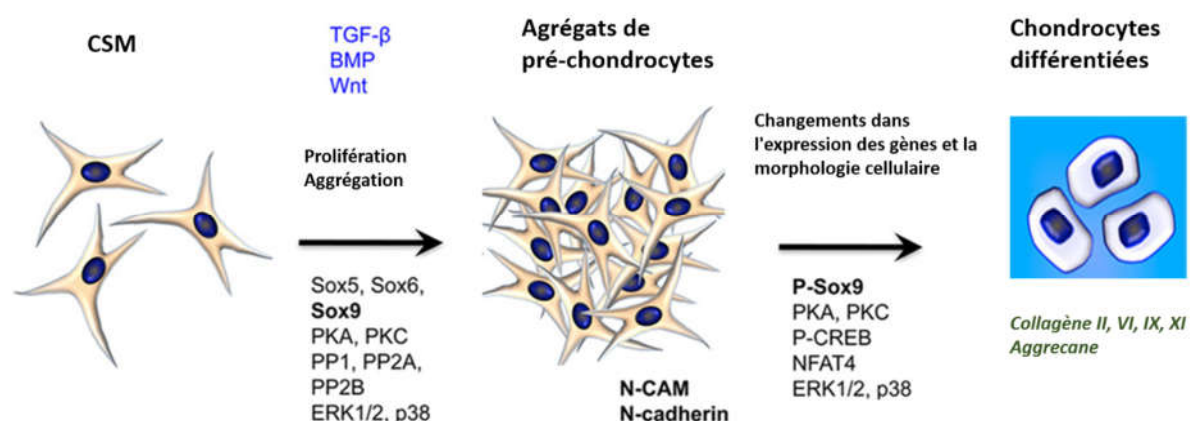


Figure 7 : Les principales étapes de la chondrogénèse et les principales voies de signalisation impliquées d'après Roza Zakany. (Bioscience, 2013). <http://www.bioscience.org> (Avril 2017).

1.2.6 Les mécanismes moléculaires associés aux effets thérapeutiques des CSM dans l'arthrose :

Le potentiel de la réparation des tissus fonctionnels avec la MSC a également été utilisé pour la régénération du cartilage [176]. Ces cellules ont une capacité d'auto-renouvellement et de prolifération rapide ainsi qu'un potentiel de différenciation permettant leur spécialisation en chondrocytes d'où leur application actuelle comme un acteur encourageant dans le traitement des lésions du cartilage. Les CSM produisent une grande quantité de facteurs sécrétés, tels que les cytokines, les chimiokines ou les facteurs de croissance, qui servent de base à diverses fonctions par une diaphonie entre différents types de cellules. Dans la moelle osseuse les CSM et les ostéoblastes constituent la fraction stromale dans un réseau complexe formé par des cellules souches hématopoïétiques, des cellules souches endothéliales et leur descendance. Dans cet égard, les CSM contrôlent la survie, la prolifération et la différenciation des cellules souches. Elles jouent également un rôle dans la régénération tissulaire localement ou sur de grandes distances grâce à la sécrétion de facteurs trophiques. Ces médiateurs solubles peuvent agir directement, en déclenchant des mécanismes intracellulaires des cellules blessées, ou indirectement, en induisant la sécrétion de médiateurs fonctionnellement actifs par des cellules voisines. En effet, en cas de blessure, les MSC atténuent les dommages aux tissus, inhibent le remodelage fibrotique et l'apoptose, favorisent l'angiogenèse, stimulent le recrutement et la prolifération des cellules souches endogènes et réduisent les réponses immunitaires [162]. Pour ces multiples raisons, l'intérêt de l'utilisation des CSM en thérapie cellulaire pour la régénération du cartilage dans les maladies ostéoarticulaires a été largement discuté. Les CSM ont été utilisés dans les approches d'ingénierie tissulaire où elles peuvent être associés à un échafaud et implanté dans le cartilage lésé. La preuve clinique soutient l'idée que les CSM peuvent être un traitement efficace pour une lésion traumatique du cartilage, mais peu d'études rapportent l'intérêt des approches d'ingénierie tissulaire basées sur les CSM dans l'arthrose [163]. D'ailleurs quelle que soit la source des CSM (moelle osseuse, tissu adipeux ou synoviale), les facteurs sécrétés par les CSM augmentent la production de matrice du cartilage par les chondrocytes [164]. Cependant, ni le mécanisme d'action exact lorsque les CSM ne sont pas en contact direct avec les chondrocytes, ni l'identification des médiateurs possibles, ont été étudiés. La prolifération des chondrocytes s'est révélée stimulée par la co-culture avec des CSM dérivés de la moelle osseuse ou la synoviale [165, 166]. Dans cet égard, Un effet paracrine a été démontré, en

effet, les protéines sécrétées par les CSM notamment le HGF protégeaient les chondrocytes arthrosiques contre l'apoptose et la dégénérescence vers des phénotypes hypertrophiques ou fibrotiques [167]. Bien que l'arthrose ne soit pas considérée comme une maladie inflammatoire, les médiateurs pro-inflammatoires, tels que les cytokines à savoir l'IL-1 β et TNF- α , les métalloprotéinases (MMP) et les espèces réactives d'oxygène (ROS), sont sécrétées par des chondrocytes ou des synoviocytes, et participent aux altérations du tissu articulaire. Plusieurs cytokines pro-inflammatoires sont négativement réduites dans les chondrocytes lorsqu'elles sont cultivées avec des CSM suggérant que les CSM peuvent également être protecteurs grâce à la régulation négative des médiateurs inflammatoires tels qu'IL6, IL8, de la protéine chimio-attractante de monocytes (MCP) 1 et de la protéine inflammatoire des macrophages (MIP) 1 α des chondrocytes et des synoviocytes [168-170].

En plus de leur potentiel anti-inflammatoire et de leur capacité à stimuler la régénération du cartilage endogène, les CSM peuvent se différencier *in vivo* et remplacer le cartilage lésé [171]. Le potentiel de régénération des CSM a été confirmé *in vivo* en utilisant des modèles expérimentaux d'arthrose induite par la collagénase lors de l'injection intra-articulaire des CSM murine où les lésions histologiques de la dégradation du cartilage ont été significativement réduites [172]. Dans ce modèle d'arthrose induite par la collagénase, il a été démontré que les taux des biomarqueurs de l'activité inflammatoire Alarmin S100A8/S100A9 ainsi que l'IL1 β ont diminué significativement quelques heures après l'injection des CSM. En effet, l'efficacité de l'injection des CSM a été observée dans ce modèle avec une activation élevée de la membrane synoviale et donc corrélée avec leur propriété anti-inflammatoire [172]. Dans un modèle de lapin, Desando et al. ont démontré que l'injection intra-articulaire des CSM avait un avantage structurel. Le traitement des CSM a inhibé la progression de l'arthrose et a notamment été associé à une diminution significative (Laverty's scoring system) à 16 semaines par rapport au groupe contrôle [173]. Dans une étude chez l'humain, Orozco et al. ont utilisé des CSM dérivées de la moelle osseuse pour traiter des patients atteints de l'arthrose de genou et qui ne répondaient pas aux traitements conservateurs. Les CSM ont été injectés intra-articulairement et leurs résultats ont indiqué une forte efficacité clinique, notamment une amélioration de la qualité du cartilage chez 11 des 12 patients ainsi qu'un soulagement de la douleur sans le recours à l'hospitalisation ni à la chirurgie [174]. Une autre étude a testé l'efficacité des CSM de la moelle osseuse dans le traitement des patients atteints d'arthrose

du genou, de la hanche ou de la cheville. Chaque patient a reçu une injection autologue des CSM après que les cellules ont été isolées et cultivées pour leur expansion. Tous les patients ont bénéficié d'une distance de marche accrue, d'un score WOMAC amélioré et d'une amélioration de la régénération du cartilage démontrée ensuite sur les IRM [175]. Outre leur effet direct sur le cartilage, les CSM peuvent agir sur les autres tissus articulaires tels que la membrane synoviale, les ligaments, les ménisques et l'os sous-chondral qui sont également altérés dans l'arthrose en inhibant l'activation synoviale et la formation de chondrophyte / ostéophyte dans les ligaments articulaires ainsi que la destruction du cartilage, probablement en supprimant les macrophages synoviaux [172]. Toutes ces données font valoir en faveur d'une action trophique des CSM pour protéger le cartilage endogène non seulement de la dégradation mais aussi contre la fibrose, l'hypertrophie et l'apoptose proposant le HGF comme un médiateur soluble qui participe à cet effet global [167].

1.2.7 Applications cliniques

1.2.7.1 Avantages

Les CSM sont des cellules très intéressantes pour les applications cliniques vu leur grande capacité d'expansion *in vitro*, leur capacité à se différencier en plusieurs types cellulaires et leurs propriétés immuno-modulatrices. En outre, elles peuvent être obtenues directement à partir du patient, éliminant ainsi les complications associées à un rejet immunitaire des tissus allogéniques [176]. Depuis les années 1990, les CSM cultivées *ex vivo* ont été utilisées dans de nombreux essais cliniques comme une alternative pour le traitement des maladies du système immunitaire et en médecine régénérative. L'une des propriétés les plus intéressantes de CSM dans l'utilisation clinique est leur capacité immuno-suppressive. Grâce à ces facteurs qui inhibent les principaux effecteurs de l'immunité, elles ont été utilisées pour traiter des maladies auto-immunes sévères comme le rejet d'organe ou la maladie aiguë du greffon contre l'hôte (graft versus host disease ou GVHD) [127]. GVHD est une réaction inflammatoire provoquée par les lymphocytes T de l'hôte contre la guérison du tissu donneur après la transplantation, qui se traduit par le rejet de la greffe [177]. L'utilisation des CSM à cet égard, s'est révélée être très efficace dans la suppression de la réaction immunitaire lors du rejet de greffe [127]. Ces cellules ont été également utilisées dans le traitement de maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde [178], le lupus érythémateux [179] et le syndrome de Gougerot Sjogren [180]. Xu et al. ont révélé, pour la première fois, que les

fonctions immunorégulatrices et les propriétés biologiques des CSM chez les patients atteints du syndrome de Gougerot Sjogren sont considérablement altérées. Dans cela ils ont constaté que le traitement avec l'infusion ces CSM allogéniques a empêché et supprimé des maladies associé à ce syndrome chez les souris, plus important encore, les CSM ont démontré des effets immunorégulatrices dans la conduite des lymphocytes T en favorisant le développement de la sous population lymphocytes T régulateurs (Treg) ayant la propriété d'inhiber la prolifération d'autres lymphocytes T effecteurs ce qui explique leur action immunosuppressive, leur nécessité au maintien de la tolérance immunitaire et au maintien de l'homéostasie notamment la fonction des glandes salivaires dans ce cas de figure [180]. La transplantation des CSM a aussi exercé un effet protecteur contre le diabète sucré. En travaillant sur un modèle de souris diabétiques de type 1, Ezquer et ses collègues 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 [181]. L'effet bénéfique des CSM a été testé avec succès pour le traitement de la maladie de Crohn. En effet les recherches ont montré que les cellules de la moelle osseuse peuvent repeupler les épithéliums du tractus gastro-intestinal humain. La régénération de l'épithélium gastro-intestinal avec des cellules dérivées du donneur chez l'homme montre une application clinique potentielle de cellules dérivées de la moelle osseuse pour réparer les épithéliums gravement endommagés [182]. Le potentiel de réparation des tissus fonctionnels avec les CSM a été utilisé aussi pour la régénération des os. Comme étant des cellules dérivées de la moelle osseuse et ayant le plus fort potentiel de différenciation ostéocytaire, elles sont qualifiées à être un meilleur choix pour l'ingénierie osseuse que les autres sources des CSM [183]. En 1998, une étude a démontré que l'implantation des MSC dérivées de la moelle osseuse a conduit à la régénération de l'os fracturé [184]. Dans une autre étude, des CSM provenant de la moelle osseuse des souris normales ont été injectées dans des souris transgéniques qui avaient un phénotype des os fragiles ressemblant à l'ostéogenèse imparfaite, car elles ont exprimé un mini gène humain pour le collagène de type I, ceci a conduit à une augmentation importante du collagène et des minéraux dans l'os un mois après la transplantation [185]. De même, l'administration des CSM de la moelle osseuse chez des jeunes patients souffrant d'ostéogenèse imparfaite, a engendré l'augmentation du taux de croissance et de la taille du corps et en même temps, le taux de fracture a été réduit ainsi que la teneur minérale osseuse a été augmentée chez certains patients [186]. Les cellules souches mésenchymateuses de la

moelle osseuse peuvent être utilisées dans le traitement des maladies vasculaires, en vue de leur capacité à se différencier en cellules musculaires lisses qui forment les parois des vaisseaux, artères et veines. En thérapie cardiaque, les CSM ont fourni des avantages fonctionnels contre l'infarctus du myocarde et la cardiomyopathie ischémique [187, 188]. Sur la base de leurs résultats en 1995, Wakitani et al ont publié le premier article sur la génération de cardiomyocytes *in vitro* à partir des CSM provenant de la moelle osseuse de rat [189]. Plus tard, plusieurs études ont démontré le succès de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en cardiomyocytes [190-192]. Des études *in vivo* sur des différents modèles animaux ont été effectuées pour révéler l'effet des CSM dans les maladies cardiovasculaires. En 2002, Shake et ses collègues ont démontré la différenciation des CSM dérivées de la moelle osseuse du porc en cardiomyocytes fonctionnels lorsqu'elles ont été injectées dans le myocarde atteint d'infarctus [193]. Dans un modèle canin, il a été observé que les CSM injectées dans le cœur ont été différenciées en cellules musculaires lisses et cellules endothéliales plutôt que des cardiomyocytes tout en observant une meilleure fonctionnalité dans la zone atteinte d'infarctus [194]. Dans un modèle d'infarctus du myocarde, il a été démontré que lorsque les rats ont été traités avec des CSM, la zone atteinte devient beaucoup plus petite 4 semaines après le traitement et les cellules souches mésenchymateuses qui ont été étiquetées avant le traitement ont exprimé des marqueurs cardiaques tels que la troponine cardiaque et l'actine de muscle lisse [195]. En outre, il y a des études qui accordent l'effet régénératoire des CSM à leurs effets paracrines. Dans des modèles d'infarctus du myocarde d'animal, des recherches ont montré que lorsque des CSM qui ont été génétiquement modifiées pour la surexpression de la protéine kinase Akt, elles ont exercé un meilleur effet guérisseur sur les ventricules gauches [196, 197]. Encore, selon une autre étude, la sécrétion de facteur de croissance des hépatocytes HGF à partir de CSM a déclenché la migration des cellules souches cardiaques sur le site de régénération du myocarde atteint d'infarctus chez des souris [198]. Outre les modèles animaux, la transplantation des CSM a été réalisée chez les patients présentant un infarctus du myocarde, les résultats ont montré une amélioration de l'activité du myocarde après la greffe [199, 200]. De plus il a également été rapporté que les CSM de moelle osseuse présentent des effets protecteurs contre les maladies cardio-vasculaires cérébrales en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires [201, 202]. Les CSM disposent également d'une attention particulière depuis leur différenciation en hépatocytes [203, 204]. Depuis que l'isolement et la culture des hépatocytes en quantités

suffisantes n'est pas possible *in vitro* [205, 206], les thérapies cellulaires impliquant des cellules souches ont un rôle important dans le traitement des maladies du foie. La différenciation des cellules souches mésenchymateuses en hépatocytes a été signalée à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ces hépatocytes différenciés étaient positives pour les marqueurs d'hépatocytes originales et jugées fonctionnelles en évidence de leur sécrétion d'albumine et de leur capacité de stockage de glycogène [203, 207]. Les effets immuno-modulateurs des CSM se sont également avérés être importants lors de la régénération du foie. Il a été montré que la prise de greffe des CSM dans le foie stimule les propriétés de prolifération et régénération du foie [208-210]. Sans traitement efficace, l'évolution pathologique des reins peut évoluer vers des défaillances rénales aiguës suivies par des défaillances rénales chroniques conduisant les patients à l'hémodialyse ou à la transplantation rénale qui semble enfin évidente. C'est pour cette raison que les CSM ont également été signalées être comme un bon candidat pour la guérison des maladies rénales quant à leur effet immuno-modulateur et leur capacité à se différencier en cellules tubulaires et glomérulaires après leur injection intra-artérielle [211]. Dans des études antérieures, les chercheurs ont induit une insuffisance rénale aiguë chez des rats dont le but est de tester si les CSM pourraient améliorer l'inflammation, la vascularisation et les manifestations apoptotiques ou nécrotiques des lésions ischémiques rénales. Il a été démontré que les effets bénéfiques du MSC sont principalement médiés *via* des actions paracrines représentées par la réduction significative de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 β et TNF- α d'une part et par la régulation à la hausse des cytokines anti-inflammatoires telles que IL-10 et TGF- α , d'une autre part, dans les reins traités [212, 213]. Similairement chez l'humain, les recherches ont montré que les CSM dérivées du cordon ombilical ont pu améliorer l'insuffisance rénale par des effets immuno-modulateurs [214, 215]. Les cellules souches mésenchymateuses représentent une plateforme prometteuse non seulement pour la thérapie cellulaire en tant que greffe pour régénérer les organes et les tissus mais aussi en thérapie génique dans le traitement du cancer [216, 217]. Les CSM ont la capacité de migrer et de proliférer spécifiquement au niveau des sites inflammatoires, des tumeurs et des métastases à travers le corps. Ce comportement des CSM a été exploité pour une stratégie de ciblage tumoral dans le cadre de thérapies cellulaires anti-cancéreuses [218, 219]. En effet, la greffe de CSM, modifiées ou non, pour transporter des molécules d'intérêt, permettrait de délivrer des substances cytotoxiques, d'inhiber la croissance tumorale, tout en évitant de léser, voire même en protégeant, le tissu sain

avoisinant [220-222]. C'est ainsi que nombreuses études rapportent l'utilisation des CSM modifiées génétiquement pour délivrer des cytokines thérapeutiques directement dans le microenvironnement tumoral et ainsi obtenir des concentrations suffisantes en protéines d'intérêt au niveau des sites tumoraux afin de réduire la croissance tumorale [223]. Les effets anti-tumoraux des CSM humaines modifiées génétiquement et administrées par voie intraveineuse ont été montrés dans les poumons, le cerveau et les tumeurs sous-cutanées [223]. Les progrès récents dans la biologie des cellules souches sont très encourageants et permettent d'envisager un avenir prometteur. Pourtant, il y a encore plusieurs questions à définir, comme la source de tissu optimale à utiliser, les méthodes d'expansion cellulaire, les dosages et la durée du traitement. Les réponses viendront probablement des études fondamentales qui permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués.

1.2.7.2 Effets secondaires

Tout de suite ou après quelques jours, il est possible que des effets secondaires se produisent lors de la greffe des CSM. Suite à une administration systémique, il existe un risque d'infection lié à la contamination des CSM lors des manipulations *ex vivo*. Ce risque existe également lors d'implantation de cellules allogéniques [224] ou xénogéniques [225] si les cellules sont issues d'un individu malade. Grâce à leurs propriétés immuno-modulatrices, les CSM peuvent induire une immuno-suppression systémique favorisant la croissance des tumeurs [226]. Dans ce sens, les CSM peuvent inhiber ou restreindre la réponse inflammatoire participant ainsi à la formation d'un microenvironnement tumoral immunodéprimé qui favoriserait la croissance tumorale et le développement de métastases [227]. De par leur activité paracrine, la sécrétion des facteurs pro-angiogéniques, notamment l'angiopoïétine-1, le VEGF et des facteurs de croissance tels que le PDGF, les FGF-2 et FGF-7, mais également des cytokines IL-6 et TNF- α ainsi que l'activateur du plasminogène, les CSM agissent de manière synergique sur les cellules endothéliales pour promouvoir la vasculogénèse et l'angiogénèse favorisant ainsi le développement tumoral [227]. D'autres études suggèrent aussi que les CSM contribueraient à la maintenance et à la progression des cancers [227, 228]. Ce potentiel pro-tumoral serait attribué à plusieurs phénomènes. En effet, la capacité de différenciation des CSM en cellules endothéliales leur permet de participer au processus néoplasique. De même, les propriétés immuno-suppressives des CSM *in vivo*, peuvent indirectement protéger les cellules tumorales du système immunitaire [229]. Les changements génétiques, dus à des

instabilités chromosomiques, peuvent engendrer des transformations malignes sur les CSM. De tels changements tels que l'échappement à l'apoptose, les remaniements chromosomiques et la disparition de l'inhibition de contact [230] s'ils apparaissent *in vivo* pourraient conduire à l'établissement d'une lignée cellulaire souche maligne [110].

2 Chapitre 2

2.1 Les polysaccharides

Les glucides ou saccharides, composés seulement de trois éléments chimiques : le carbone (C), l'hydrogène (H) et l'oxygène (O), représentent des biomolécules essentielles et une source primaire d'énergie dans les organismes vivants [231]. Ces biomolécules peuvent être divisées respectivement en trois groupes principaux: les monosaccharides, les disaccharides et les polysaccharides (figure 8). Les trois monosaccharides les plus courants sont le glucose, le fructose et le galactose tandis que les disaccharides comprennent le saccharose, le lactose et le maltose (qui contiennent au moins une molécule de glucose). De plus, une classe de macromolécules biologiques, de glucides polymères ou de polysaccharides est constituée par le nombre d'unités monomères, les monosaccharides, liés ensemble par des liaisons glycosidiques covalentes conduisant à des molécules de sucre complexes [232], qui jouent un rôle clé dans de nombreuses applications dans la médecine et la pharmacologie [233].

Le mot "polysaccharide" a une origine grecque et son dérivé du sacchar = sucre et poly = beaucoup. Cette classe diversifiée de biopolymères, appelés généralement polysaccharides ou glycanes, est représentée par la formule générale suivante: $(C_6H_{10}O_5)_n$ [234] . Ils peuvent être divisés en deux groupes principaux: homopolysaccharides ou homoglycanes et hétéropolysaccharides ou hétéroglycanes [235]. Ainsi, les homoglycanes représentent les polysaccharides constitués d'un seul type de monosaccharide (glycogène, amidon, dextrane, beta-glucane, cellulose) [236], galactane (polyoside composé exclusivement de monomères de galactose) [237] et des fructanes (homopolymères de fructose liés au résidu fructosyle ou glucosyle d'une molécule de saccharose) [238]. Par ailleurs, deux ou plusieurs unités monomères différentes représentent des hétéroglycanes qui peuvent être divisés en sucres neutres (c'est-à-dire en hémicellulose, en gommes, en mucilages ou en substances pectiques), en sucres conjugués (glycoprotéines ou glycolipides) ou en mucopolysaccharides (acide hyaluronique ou héparine). Les polysaccharides peuvent être classés selon différents paramètres : origine, structure, types de monomères et de la charge correspondante. Ainsi, selon la stéréochimie de la liaison glycosidique, α ou β , les polysaccharides possèdent des caractéristiques et des propriétés différentes.

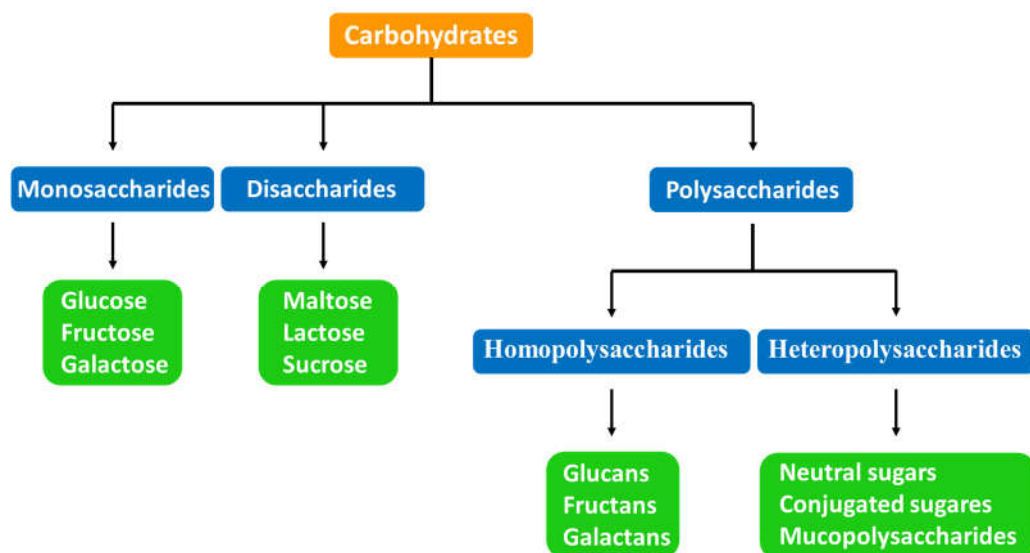


Figure 8 : Classification générale des polysaccharides.

2.2 Les bêta-glucanes

Les glucanes sont des polysaccharides constitués d'unités de glucose. Deux groupes de glucanes sont présents dans les champignons, les α -glucanes et les β -glucanes. Ces derniers représentent une vaste famille de polysaccharides composés par des monomères de D-glucose en configuration β et assemblés par différents types de liaisons glycosidiques. Le type de ces liaisons (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4, 1 $\rightarrow$ 6) et leur répartition affectent fortement la conformation des chaînes de β -glucanes et les propriétés d'association et de solubilité qui en découlent. Les paramètres de caractérisation naturels des (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucanes incluent: la structure primaire, la solubilité, le degré de ramification et le poids moléculaire, ainsi que la charge polymère et / ou la conformation en solution (triple hélice, simple hélice ou conformation de bobine aléatoire). Tous ces facteurs jouent un rôle dans l'activité biologique associée au β -glucanes. Cette classe de sucres attire l'attention croissante de l'industrie en raison de ses effets positifs sur la santé humaine et animale. Des exemples comprennent des propriétés bioactives et médicinales, telles que les effets anti-inflammatoires, antimicrobiens et anti-tumoraux, ou la stimulation immunitaire [239].

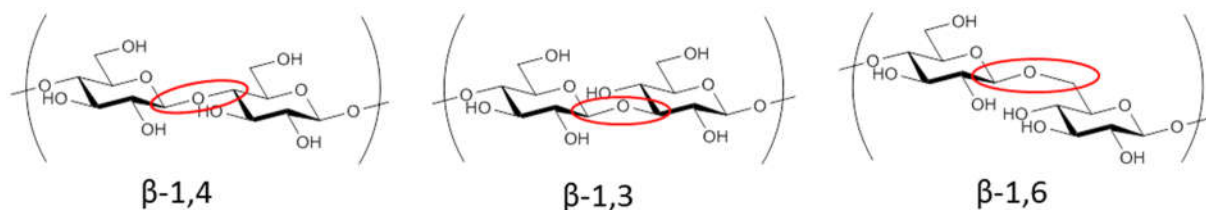


Figure 9 : Les différentes structures des bêta-glucanes en fonction de leurs différentes liaisons glycosidiques. <https://www.megazyme.com/technical-support/dietary-fiber/what-is-dietary-fiber> (Avril, 2017)

2.3 Histoire des bêta-glucanes

Les produits naturels, utiles dans la prévention et le traitement de diverses maladies, sont recherchés depuis des siècles. L'étude des β -glucanes a débuté au cours des années 1960 et 1970. Deux histoires convergentes peuvent être tracées concernant les β -glucanes. La première a eu lieu principalement en Europe et aux États-Unis et la seconde au Japon. La recherche sur les β -glucanes dans le milieu euro-américain reposait sur la connaissance des effets immunomodulateurs du zymosan qui est un mélange de polysaccharides isolés des parois cellulaires de *Saccharomyces cerevisiae*. A l'époque, le zymosan était utilisé comme un médicament à travers toute l'Europe, ce médicament avait malheureusement des effets secondaires nuisibles chez les patients [240]. Louis Pillemer et son équipe ont réalisé les premières études sur le zymosan dans les années 1940. Ils ont découvert qu'il était capable de stimuler l'immunité non spécifique. Il activait la réponse immunitaire quel que soit le type d'envahisseur ou de substance pathogène, incluant virus, bactéries, champignons, parasites ou tumeurs. Depuis lors, il a été utilisé dans de nombreuses études et son rôle comme étant un stimulant puissant, en particulier des macrophages, a été démontré. Pendant de nombreuses années, il n'était pas clair de savoir quelle partie de cette composition brute était responsable de ses activités. Lorsque le zymosane a été examiné en détail, la réponse est arrivée une vingtaine d'années plus tard, dans les années 1960, par Nicholas DuLuzio à l'université de Tulane, à La Nouvelle-Orléans [241]. Le β -glucane a été identifié ainsi comme le composant qui a eu l'effet primaire. Le glucane a ensuite été isolé et ses effets immunologiques ont été étudiés plus en détail.

2.3.1 Production des bêta-glucanes de différentes sources

Les β -glucanes forment un composant naturel des parois cellulaires des bactéries, champignons, levures et céréales comme l'avoine et l'orge. Chaque type de bêta-glucane

comprend un squelette moléculaire différent, un niveau de ramification et un poids moléculaire qui influe sur sa solubilité et son impact physiologique. Une des sources les plus courantes des β -glucanes est dérivée de la paroi cellulaire de la levure de boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*). Les β (1,3) D-glucanes de la levure sont souvent insolubles. Cependant, les β (1,3) (1,4) -glucanes sont également extraits du son de certains grains, tels que l'avoine et l'orge, et à un degré beaucoup plus faible dans le seigle et le blé. D'autres sources incluent certains types d'algues marines qui contiennent de grandes quantités de polysaccharides [242], ainsi que diverses espèces de champignons, comme le *Ganoderma lucidum* et le *Ganoderma applanatum* [243].

2.3.1.1 Les céréales

Les β -glucanes de céréales provenant de l'avoine, de l'orge, du blé et du seigle induisent une variété d'effets physiologiques qui ont une incidence positive sur la santé. Les β -glucanes d'orge et d'avoine ont été étudiés pour leurs effets sur la régulation de la glycémie chez les sujets testés atteints d'hypercholestérolémie [244]. L'avoine et l'orge diffèrent dans le rapport des liaisons 1 $\rightarrow$ 3 et 1 $\rightarrow$ 4. L'orge a plus de liaison 1 $\rightarrow$ 4 avec un degré de polymérisation supérieur à 4. Cependant, la majorité des blocs d'orge restent des oligotriosides et des tétraosides. Dans l'avoine, le β -glucane se trouve principalement dans l'endosperme du grain d'avoine, en particulier dans les couches externes de cet endosperme [245].

2.3.1.2 Les champignons

Les champignons jouent un rôle important en tant que décomposeurs dans la nature, ils assimilent les éléments et les transforment en substances plus simples, permettant ainsi le recyclage des déchets organiques. Ils peuvent développer d'importantes relations symbiotiques avec d'autres êtres vivants tout en offrant divers produits d'intérêt économique tel que les enzymes, les polysaccharides, les acides organiques, les vitamines, les antibiotiques, l'alcool et les acides aminés [246]. La paroi cellulaire fongique se compose d'un réseau complexe de fibres qui fournissent la structure, la protection, et la rigidité à la cellule. Selon le groupe taxonomique, les champignons peuvent différer dans la composition de la paroi cellulaire, qui est généralement constituée de glucanes (β -(1 $\rightarrow$ 3), β -(1 $\rightarrow$ 3/1 $\rightarrow$ 4), β -(1 $\rightarrow$ 6) et α -(1 $\rightarrow$ 3)), la chitine, les mannoprotéines, le galactomannane, la cellulose et l'acide glucuronique, ainsi que des protéines et des glycoprotéines [247, 248]. Les β -glucanes de

champignons ont été proposés pour agir en tant que «modificateurs de réponse biologique» en fonction de leurs effets sur le système immunitaire [249]. Il a été suggéré que les récepteurs à la surface des cellules immunitaires innées tels que le dectin-1 et le récepteur du complément 3 (CR3) sont responsables de la liaison aux β -glucanes, permettant aux cellules immunitaires de les reconnaître comme "non-soi" [250, 251]. Cette régulation de la réponse immunitaire affecte également les propriétés anti-tumorales [252].

2.3.1.3 Les levures

Les β -glucanes trouvés dans les parois cellulaires de la levure sont principalement des β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucan ramifiés avec des chaînes latérales β -(1 $\rightarrow$ 6) –glucane. Une série d'essais cliniques chez l'homme dans les années 1990 a évalué l'impact du betafectine, un β -(1 $\rightarrow$ 6) ramifié β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucane, purifié à partir des parois cellulaires de *Saccharomyces cerevisiae*, sur des patients ayant des infections post chirurgicales à haut risque. Dans ces études, ce β -glucane a considérablement réduit les complications [253]. Il a été rapporté aussi que les β -glucanes dérivés des levures administrées par voie orale diminuait les taux de cytokines IL-4 et IL-5 responsables de la manifestation clinique de la rhinite allergique [254].

2.3.1.4 Les bactéries

Les organismes procaryotes tels que les bactéries produisent une variété de polysaccharides qui comprennent les β -(1 $\rightarrow$ 3) -glucanes, β -(1 $\rightarrow$ 2) -glucanes et la cellulose. Les occurrences connues de β -(1 $\rightarrow$ 3) -glucanes de la fermentation sont limitées à des espèces de bactéries du sol appartenant aux genres Alcaligènes (*Achromobacteriaceae*), Agrobacterium, et Rhizobium (*Rhizobacteriaceae*). Parmi ces polysaccharides, Le curdlane (un β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucane) est un polysaccharide (polymère constitué d'oses) formé de 400 à 500 résidus de D-glucose unis par des liaisons osidiques β -(1 $\rightarrow$ 3). Il s'agit d'un polymère linéaire, non ramifié. Ce polysaccharide est produit par des bactéries du genre Alcaligenes comme *Alcaligenes faecalis var. myxogenes* (aujourd'hui identifié comme *Agrobacterium biovar 1*) ; il a été découvert en 1966 par T. Harada qui lui a donné le nom de curdlane à cause de sa capacité à se gélifier (curdle en anglais) [255]. Ce β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucane a été approuvé en tant qu'additif alimentaire par la « Food and Drug Administration » des Etats-Unis (FDA) en 1996 [256]. En raison de ses propriétés uniques, il a fait l'objet d'une recherche considérable montrant sa propriété inhabituelle de former un gel élastique lorsque la suspension aqueuse est chauffée. Les gels

sont très stables sur une large plage de pH et dans des conditions de traitement sévères. Ces propriétés uniques de gélification thermique et de liaison à l'eau du curdlane sont d'un grand intérêt pour les industries alimentaires et pharmaceutiques [239].

2.3.1.5 Les algues

La valeur nutritive des algues marines a longtemps été reconnue en orient, mais aussi dans le monde occidental. L'utilisation d'algues pour la consommation humaine est limitée, elles existent comme additifs et ce qu'on appelle les aliments bons pour la santé. En revanche, plus d'algues que jamais ont été consommées au Japon, en Chine et en Corée. Les algues sont faibles en graisses, et contiennent des vitamines et des minéraux [257]. Les algues contiennent également une grande quantité de polysaccharides tels que la gélose, l'alginate, le sulfate de rhamnan, le fucoïdan et la laminarine. Ces polysaccharides diffèrent de ceux des végétaux terrestres et fournissent des fibres alimentaires que le corps humain ne digère pas. Ces polysaccharides sont utilisés dans les industries alimentaires et pharmaceutiques et ont récemment été démontrés avoir des activités biologiques uniques [258].

2.3.1.5.1 La laminarine

La laminarine est un β -glucane ayant une masse moléculaire qui varie entre 3,5 et 5,3 kDa. La Laminarine a d'abord été décrite par Schmiedeberg en 1885, qui l'a isolée de la *Laminariaceae* [259]. C'est le principal polysaccharide de stockage dans les algues brunes. Ses activités biologiques connues comprennent la stimulation du système immunitaire et les effets cytotoxiques sur les cellules tumorales [258]. La laminarine est un polymère β -(1 $\rightarrow$ 3)-lié principalement de D-glucose avec un lien β -(1 $\rightarrow$ 6). Ces liaisons β -1,6 'sont présentes dans une chaîne linéaire de résidus de glucose liés en β -(1 $\rightarrow$ 3) et principalement sous forme de liaisons interchaînes qui conduisent à une ramification de la molécule. La structure détaillée des laminaires varie d'une espèce à l'autre et sa solubilité dépend de la quantité de liaison β -(1 $\rightarrow$ 6). En effet, Le facteur de ramification détermine la solubilité dans l'eau. Plus la teneur en ramification est élevée, plus la solubilité dans l'eau froide est élevée. Par conséquent, la laminarine a été trouvée dans des formes hydrosolubles et insolubles dans l'eau dans différentes espèces de Laminarine (*Laminaria digitata* et *Laminaria hyperborea*). Le degré de polymérisation de la laminarine hydrosoluble est d'environ 20 à 25 unités de glucose. En outre, ce polysaccharide est poly-dispersé, constitué d'une série G mineure avec des polymères

contenant uniquement des résidus de glucose et une série M plus abondante avec des glucanes terminés d'un résidu à une liaison de D-mannitol qui varie de 2,4 à 3,7% dans la laminarine soluble et insoluble. Par conséquent, la variation chimique de cette molécule de stockage est basée sur le nombre de liaisons β -1,6, le degré de ramification et la présence ou l'absence de résidus terminaux de mannitol. Cependant, la voie biosynthétique de la laminarine lui-même ainsi que celle qui relie le mannitol et la laminarine est encore inconnue [259]. Récemment, les extraits d'algues notamment la laminarine ont été explorés comme une source nouvelle de composés bioactifs présentant des propriétés immunomodulatrices et antimicrobiennes [260]. Particulièrement, sur le système digestif où la laminarine semble être un modulateur du métabolisme intestinal par ses effets sur la composition du mucus, le pH intestinal et la production d'acides gras à chaîne courte [261]. Ainsi, la laminarine contribue à l'apport en fibres alimentaires et joue un rôle dans la prévention du cancer. La laminarine a été proposée pour induire l'apoptose des cellules métastatiques du côlon via la caspase-3 et la caspase-9. La laminarine et ses produits d'hydrolyse enzymatique ont un potentiel antitumoral car ils inhibent la formation de colonies de lymphome SK-MEL-28 humain et les cellules DLD-1 du cancer de côlon. Il a été démontré aussi que la laminarine de la *Laminaria digitata* inhibe la prolifération cellulaire dans les cellules de cancer du côlon HT-29 par arrêt du cycle cellulaire à la transition G2 / M et induit l'apoptose en déclenchant la voie de signalisation du récepteur du facteur de croissance épidermique / ErbB / Jnk (c-Jun N-terminal kinase). La même équipe a précédemment signalé que les facteurs de croissance insulineux et les voies de MAP kinase étaient également impliqués dans l'apoptose HT-29 induite par la laminarine. Outre, Le sulfate de laminarine semble inhiber l'activité de l'héparanase dans des cellules de mélanome de souris B16-BL6 et des cellules 13762 MAT d'adénocarcinome mammaire [262].

2.3.2 Mécanisme d'action des bêta-glucanes

Le β -glucane pris par voie orale diffère d'autres substances alimentaires. Ce type de glucane est résistant aux acides de sorte qu'il passe à travers l'estomac pratiquement inchangé. Les macrophages dans le revêtement muqueux de la paroi intestinale ramassent les particules de β -glucane à travers des récepteurs spécifiques. Par la suite, ces cellules s'activent immédiatement et seront plus tard capables de se déplacer vers les ganglions lymphatiques locaux dans le cadre de leur fonction de présentation antigénique naturelle, de libérer des cytokines et d'induire une activation immunitaire systématique. Les β -glucanes peuvent

abaisser le taux de cholestérol sanguin en empêchant l'absorption du cholestérol des aliments dans l'estomac et les intestins, lorsqu'il est pris par la bouche. Lorsqu'ils sont administrés par injection, les β -glucanes peuvent stimuler le système immunitaire en augmentant les produits chimiques, ce qui empêche les infections. Les β -glucanes peuvent agir sur une variété de récepteurs membranaires présents sur les cellules immunitaires. Ils peuvent agir seuls ou en combinaison avec d'autres ligands à travers l'activation de différentes voies de signalisation [263]. En effet, les organismes multicellulaires possèdent des récepteurs appelés (pattern recognition receptors) «récepteurs de reconnaissance de formes» (PRRS), pour détecter d'une manière innée les structures reconnues comme du non-soi (y compris des modèles moléculaires associés aux pathogènes, ou PAMPs) [264]. Ainsi, les β -glucanes agissent probablement comme des PAMPs et sont reconnus par des récepteurs de surface cellulaire appropriés, déclenchant des réponses immunitaires. Chez l'homme, un certain nombre de tels récepteurs ont été identifiés. Ce sont le dectine-1, le récepteur du complément 3 (CR3), les scavengers, le lactosylcéramide (LacCer) et les Toll like receptors (TLR) [264].

2.3.2.1 Dectine 1

Le Dectine-1 est une lectine composée de quatre composants : un domaine extracellulaire de reconnaissance des glucides (CRD), une tige, une région transmembranaire et une queue cytoplasmique intracellulaire [250]. Le Dectine-1 est communément exprimé dans les macrophages, les lignées de neutrophiles, les cellules dendritiques et certaines cellules T, mais pas dans les cellules naturelles tueuses NK [265, 266]. Il fonctionne comme un récepteur de reconnaissance de motif pour une variété de β -(1 $\rightarrow$ 3)-lié et β -(1 $\rightarrow$ 6)-glucanes liés de champignons et de plantes, et joue ainsi un rôle dans la réponse immunitaire innée. La fonction du dectine-1 dans la liaison au zymosane est obtenue par le CRD, qui se lie également aux cellules fongiques intactes et aux autres β -(1 $\rightarrow$ 3) et / ou β -(1 $\rightarrow$ 6) -glucanes fongiques solubles. L'étude a montré que le dectin-1 se lie spécifiquement aux β -(1 $\rightarrow$ 3) -glucanes, mais seulement à ceux constitués d'au moins 10 oligosaccharides [267]. La liaison du dectine-1 avec le ligand active plusieurs voies de signalisation pour favoriser les réponses immunitaires innées par activation de la phagocytose, la production des ROS et l'induction des cytokines inflammatoires [268]. Le domaine cytoplasmique de dectin-1 a un motif d'activation à base de tyrosine immunoréceptrice (ITAM) pour activer une tyrosine kinase, qui à son tour stimule la production de ROS, L'activation de cette tyrosine kinase induit également la synthèse de

TNF- α , et IL-2, IL-10, IL-12 [269, 270]. Plusieurs voies ont maintenant été identifiées comme étant impliquées dans la signalisation du dectine-1 mais certains éléments suggèrent qu'il pourrait agir en synergie avec les TLR pour produire de fortes réponses inflammatoires en stimulant des cytokines comme le TNF- α , l'IL-2 et l'IL-12 [271].

2.3.2.2 Les TLRs

Les récepteurs Toll-like (TLR) sont une classe de protéines qui jouent un rôle clé dans le système immunitaire inné. Ils sont des récepteurs non catalytiques simples, capables de recouvrir la membrane, généralement exprimés dans des cellules sentinelles telles que des macrophages et des cellules dendritiques, qui reconnaissent des molécules dérivées de microbes. Une fois que ces microbes ont franchi des barrières physiques telles que la peau ou la muqueuse du tractus intestinal, ils sont reconnus par les TLR, qui activent les réponses des cellules immunitaires. Au moins 11 membres de cette famille existent chez l'homme [272]. Les cellules fongiques et le zymosan se lient aux TLR 2 et 4 et activent toutes les deux des réponses immunitaires innées [273]. Ainsi le TLR2 augmente l'expression de la NF- κ B et provoque la production de cytokines, y compris TNF- α et IL-12 [274].

2.3.2.3 CR3

C'est un récepteur de surface cellulaire humain constitué de domaines CD11b et CD18, trouvé sur les leucocytes polymorphonucléaires (principalement des neutrophiles), des cellules NK et des phagocytes mononucléaires comme les macrophages. CR3 est un récepteur de reconnaissance de formes, capable de reconnaître et de se lier à de nombreuses molécules trouvées sur les surfaces des bactéries envahissantes. CR3 reconnaît également iC3b lorsqu'il est lié à la surface de cellules étrangères. La liaison au récepteur provoque la phagocytose et la destruction de la cellule étrangère [275]. Deux sites de liaison existent dans CD11b. L'un est pour les β -glucanes et est situé à l'intérieur de l'extrémité C, tandis que l'autre pour iC3b (cleaved component 3 fragment of serum complement system) est situé à l'intérieur de l'extrémité N. La liaison des β -glucanes au CR3 augmente l'adhérence aux cellules microbiennes et active la voie iC3b provoquant une cytotoxicité tumorale [276]. D'autres études ont montré que le Zymosan a également augmenté la destruction des cellules tumorales par les cellules NK via l'activation de CR3 [277, 278].

2.3.2.4 Les scavengers

Les récepteurs scavenger sont situés dans les cellules myéloïdes et endothéliales. Ils comprennent un groupe hétérogène de protéines avec deux domaines transmembranaires, deux domaines intracellulaires et un domaine extracellulaire [279]. Les scavengers reconnaissent une gamme de cellules étrangères, de lipoprotéines de basse densité (LDL), de lipoprotéines de haute densité (HDL) et de ligands polyanioniques [280]. Bien que le lentinan (Polysaccharide isolé du corps de fruit de shiitake) puisse se lier à ces récepteurs, aucun récepteur scavenger spécifique de β -glucane n'a encore été identifié [279]. Mais une étude a démontré que le β -glucane du champignon *Coriolus versicolor* augmente l'expression de scavenger SR-B1 via la signalisation de la Dectin-1 [281].

2.3.2.5 LacCer

Le LacCer situé dans les neutrophiles et les cellules endothéliales, est un glycolipide contenant un lipide de céramide hydrophobe et un fragment de sucre hydrophile. Il reconnaît à la fois les cellules microbiennes et les β - (1 $\rightarrow$ 3) -glucanes fongiques. A travers le LacCer dans les cellules épithéliales alvéolaires, le β - (1 $\rightarrow$ 3) -glucane augmente la synthèse de NF- κ B, MIP-2 et TNF- α par une voie de signalisation de la protéine kinase C, tandis que dans les cellules neutrophiles, LacCer a augmenté la production de ROS pour tuer les microbes par activation de PI-3K, MAPK et la protéine kinase C médiée par la famille kinase de Src Lyn [282].

2.3.3 Les bêta-glucanes et le système immunitaire

Les β -glucanes sont des immunomodulateurs puissants ayant des effets sur l'immunité innée et l'immunité adaptative. La capacité du système immunitaire inné à reconnaître et à réagir rapidement à un pathogène envahissant est essentielle pour contrôler l'infection. Le Dectine-1, qui est un récepteur de la protéine transmembranaire de type II et qui se lie aux β -(1 $\rightarrow$ 3) et β -(1 $\rightarrow$ 6) glucanes, peut initier et réguler la réponse immunitaire innée [263]. Mise à part le Dectine-1 appartenant à la famille de lectine de type C, l'effet immunomodulateur des polysaccharides extraits des champignons a été attribué à la reconnaissance de ces substances par d'autres récepteurs spécifiques tels que les Toll-like Receptor (TLR), complement receptor 3 (CR3), NOD-like (NLR), RIG-I-like (RLR), appartenant à la famille de lectine de type C [283, 284]. Ces récepteurs initient la réponse immunitaire pendant une infection en induisant des

macrophages, des cellules naturelles tueuses (NK), des cellules dendritiques, des neutrophiles et des monocytes pour produire des cytokines[284]. Les fonctions immunomodulatrices induites par les β -glucanes impliquent à la fois des réponses immunitaires innées et adaptées. Les β -glucanes améliorent également la phagocytose opsonique et non opsonique et déclenchent une cascade de libération de cytokines, comme le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) et divers types d'interleukines (IL) [263]. Un modèle d'activation immunitaire impliquant un β -glucane insoluble extrait de *Saccharomyces cerevisiae* (Zymosan) a été proposé par Gardner et al en 2003 [285]. En fait, les récepteurs Toll-like (TLR) reconnaissant les particules de β -glucane induisant le facteur de transcription nucléaire κ B (NF- κ B) pour produire des cytokines inflammatoires comme l'interleukine 12 (IL-12) et le facteur de nécrose tumorale (TNF- α). En collaboration avec les TLR, le Dectin-1 a stimulé la phagocytose chez les macrophages, augmentant ainsi la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) qui contribuent à la mort des micro-organismes envahissants. Dans une autre étude, des macrophages de souris ont été stimulés *in vitro* avec 100 ng / ml de lipopolysaccharide (LPS) en combinaison ou non avec 100 μ g / ml de chaque β -glucane extrait de *Saccharomyces cerevisiae*, *Laminaria digitata* et *Pleurotus ostreatus*. L'expression de gènes liés à la production de cytokines (TNF- α et IL-6) a été détectée par (RT-PCR). L'administration séparée de glucanes et de LPS, ainsi que l'association des deux composants, ont augmenté l'expression de TNF- α . L'expression de l'IL-6 n'a pas été induite par le β -glucane et une légère expression a été observée pour le LPS. Cependant, lorsqu'ils sont co-administrés avec du LPS, le β -glucane de *Pleurotus ostreatus* produit un fort effet synergique. Les résultats suggèrent ainsi un mécanisme d'immunomodulation par les glucanes administrés par voie orale, qui peut effectuer l'activation des macrophages résidents dans l'intestin avec le LPS de la flore bactérienne [286]. En outre, le β -glucane a été largement utilisé comme protection contre l'infection. En utilisant plusieurs modèles expérimentaux, on a montré que le β -glucane protège contre les infections bactériennes et protozoaires et améliore l'efficacité antibiotique dans les infections avec des bactéries résistantes aux antibiotiques. L'effet protecteur des β -glucanes a été démontré dans les infections expérimentales avec *Leishmania major*, *L. donovani*, *C. albicans*, *Toxoplasma gondii*, *Streptococcus suis*, *Plasmodium berghei*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mesocostoides corti*, *Trypanosoma cruzi*, *Eimeria vermiformis* et *Bacillus anthracis* [240].

2.3.4 Applications Cliniques

Les effets les plus importants des β -glucanes sur la santé sont dus aux fonctions spéciales de ses propriétés immunomodulatrices. Des études *in vitro* et *in vivo* montrent que les glucanes ont un effet stimulant sur le système immunitaire inné contre les infections bactériennes, virales, fongiques et parasitaires[287]. Diverses études ont examiné les effets potentiels sur la santé du β -glucane, mise à part de leurs propriétés immunomodulatrices, les β -glucanes sont en outre utilisés dans diverses recherches cliniques contre plusieurs maladies telles que le diabète, l'hypertension, le cholestérol, le cancer ou aussi contre les effets nuisibles des radiations et pour la cicatrisation des plaies.

Cancer

Depuis que leur activité anti-tumorale a été démontrée il y a près de 50 ans, de nombreuses expériences sur des animaux ont démontré les effets remarquables de certains β -glucanes fongiques sur une gamme de tumeurs [277]. Les expériences sur l'homme avec les glucanes commencent dans les années 1970. En 1975, les effets bénéfiques du β -glucane dans le traitement du cancer ont été soulignés par Peter W. Mansell. Les chercheurs ont injecté du bêta-(1→3)-glucane dans les nodules sous-cutanés de cancer malin de la peau de neuf patients. En cinq jours, la taille des lésions cancéreuses a été considérablement réduite et celles de taille réduite ont été complètement guéries [288]. Les β -glucanes, comme le lentinan (dérivé du champignon Shiitake) et le polysaccharide-K, ont été utilisés comme thérapie immunoadjuvante pour le cancer depuis 1980, principalement au Japon. Il existe une importante collection de recherches qui démontre que les β -glucanes possèdent des activités antitumorales et anti-cancéreuses. Dans une étude d'un modèle murin, le bêta (1→3)-glucane associé à l'interféron gamma a inhibé les tumeurs et les métastases hépatiques [263]. Dans certaines études, les β -(1→3)-glucanes ont amélioré les effets de la chimiothérapie. En outre, chez des souris cancéreuses, l'administration de cyclophosphamide en conjonction avec des bêta-(1→3)-glucanes dérivés de la levure a abouti à une réduction de la mortalité, de même chez les patients atteints d'un cancer gastrique ou colorectal avancé, l'administration de bêta-(1→3)-glucanes dérivés de champignons shiitake en association avec la chimiothérapie a entraîné un temps de survie prolongé [263]. Des études précliniques ont montré qu'un β -glucane de levure, lorsqu'il est utilisé en combinaison avec certains anticorps monoclonaux

ou des vaccins contre le cancer, offre des améliorations significatives de la survie à long terme par rapport aux anticorps monoclonaux seuls. L'activité anti-tumorale est provoquée par un mécanisme de destruction unique qui implique des neutrophiles qui sont amorcés par le β -glucane et qui ne sont pas normalement impliqués dans la lutte contre le cancer. En cela Hong et al. démontrent que ce mécanisme d'action est efficace contre un large éventail de cancers lorsqu'ils sont utilisés en combinaison avec des anticorps monoclonaux spécifiques qui se lient à la tumeur [289]. Le cancer est une prolifération cellulaire incontrôlée induite par de nombreux facteurs, y compris les produits chimiques environnementaux, les virus, les bactéries, les hormones et l'inflammation chronique. En cela, trois étapes de développement sont reconnues. La première est l'initiation, dans laquelle un mutagène se lie à l'ADN cellulaire et provoque des lésions, ce qui en soi est habituellement insuffisant pour induire la production de tumeurs. La deuxième étape est l'activation d'un promoteur tumoral qui conduit à la formation de petites tumeurs bénignes. Enfin, dans la troisième étape, la progression, le contrôle strict normal sur le cycle cellulaire est perdu, ce qui entraîne une prolifération cellulaire incontrôlée [290]. Cependant, certains β -glucanes fongiques semblent avoir une influence bénéfique sur la promotion et la progression du cancer [291] et un tel traitement dans des modèles du cancer murin a conduit à la formation de tumeurs beaucoup plus petites que celles observées dans les groupes contrôles [277].

Diabète

Plusieurs β -glucanes fongiques peuvent réduire les concentrations de glucose dans le sang après avoir mangé, éventuellement en retardant la vidange de l'estomac afin que le glucose alimentaire soit absorbé plus progressivement [292]. En outre, un polysaccharide acide (TAP) a été isolé à partir d'un extrait d'eau chaude des corps fructifères de *Tremella aurantia* qui a réduit la concentration de glucose sanguin chez des rats avec diabète induite [293]. Les β -glucanes d'avoine et de champignons réduisent les concentrations de glucose dans le sang après l'administration orale, comme cela a été observé dans les expériences sur les animaux et les essais cliniques. Des études montrent que le β -glucane d'avoine réduit la glycémie postprandiale. Il a également été démontré que la farine de son d'avoine est plus efficace que le son d'avoine croustillant, expliqué par la teneur trois fois plus élevée en β -glucane dans la farine de son d'avoine [263]. Une autre étude suggère l'effet antidiabétique de la cytokine IL-1 qui augmente la production d'insuline, avec pour résultat une diminution des niveaux de

glucose sanguin. Les macrophages sont la principale source d'IL-1 de l'organisme, sa production peut être stimulée par une supplémentation en bêta-(1→3/1→6)-glucane [294].

Hypertension

Certains β -glucanes fongiques peuvent également contrôler la pression artérielle. Chez les rats génétiquement modélisés pour développer une hypertension spontanée (SHR), un régime contenant 5% de Shiitake (*Lentinus edodes*) ou maitake (*Grifola frondosa*) provoque une diminution de la pression sanguine systémique moyenne. De plus, la consommation de basidiocarpes entiers, de maitake et de l'extrait hydrosoluble, a également entraîné une diminution de la pression sanguine chez des rats Zucker diabétiques [295].

Cholestérol

Les maladies cardiovasculaires liées à un taux élevé de cholestérol dans le sang sont encore la cause la plus fréquente de décès chez les humains dans les pays occidentaux. Le cholestérol contient des lipoprotéines de basse densité LDL et des lipoprotéines de haute densité HDL [296]. Les β -glucanes de levure semblent être efficaces pour abaisser les concentrations de cholestérol dans le sang [297]. L'avoine aussi avait un effet abaissant le cholestérol et le composant actif était identifié comme étant des β -glucanes. L'avoine a réduit à la fois le cholestérol total du sérum et le cholestérol LDL par rapport au témoin. Chez 20 patients atteints d'hypercholestérolémie, le son d'avoine était meilleur que le son de blé pour diminuer le cholestérol. On a également observé que l'orge avait un effet similaire [298].

Cicatrisation

Les activités de macrophage stimulées par les β -glucanes de *Saccharomyces cerevisiae* peuvent également favoriser la guérison des plaies et réduire les taux de tissu cicatriciel après une intervention chirurgicale ou un traumatisme, comme le révèlent les études tant animales qu'humaines [299]. Dans les fibroblastes cutanés humains normaux, cette préparation de β -glucane stimulait l'ARNm de procollagène et la biosynthèse de collagène [300]. Dans les deux études animales et humaines, la thérapie avec β -glucane a fourni des améliorations telles que moins d'infections, une mortalité réduite et une résistance à la traction plus forte du tissu cicatriciel [263].

Radiation

L'action protectrice du bêta-(1→3)-glucane sur les effets nuisibles des radiations a été montrée en 1985 lorsque l'Institut de recherches radiobiologiques des forces armées américaines a annoncé les résultats d'expérimentations récentes. Myra D. Patchen et son équipe ont exposé des souris à des doses létales de radiations. Lorsque l'on donne aux animaux une dose orale de bêta-1,3-glucane extrait de levure après les avoir exposés à des radiations, 70 % d'entre eux sont totalement protégés de leurs effets nuisibles [301].

Les maladies ostéo-articulaires

Les maladies ostéo-articulaires recouvrent diverses pathologies telles que l'arthrose, l'arthrite et l'ostéoporose, qui ont toutes comme point commun d'associer handicap locomoteur et douleurs. Elles touchent à la fois l'os et l'articulation, induisant des troubles musculo-squelettiques. Ayant des origines diverses, traumatiques, de dégénérescence, génétiques, inflammatoire (rhumatisme inflammatoire) et de surpoids. Ces maladies concernent toutes les tranches d'âge y compris les enfants, et tous les profils, du sportif au sédentaire, hommes et femmes. Leur impact en terme de santé publique est majeur, en France, 6 millions de personnes touchées par l'arthrose, 40 % des femmes de plus de 65 ans feront une fracture ostéoporotique, 1 000 000 de personnes souffrent de rhumatisme inflammatoire chronique, dont 20 000 sont des enfants. Le traitement de ces maladies repose sur les anti-inflammatoires, la rééducation par un kinésithérapeute, les cures thermales. La prise en charge chirurgicale donne d'excellents résultats grâce à la pose de prothèses comme dans le cas de la hanche. Mais la recherche ne cesse d'évoluer pour trouver des traitements purement naturels qui seront plus efficaces d'une part et ne présentant pas d'effets secondaires nuisibles d'autre part. D'où la piste des β -glucanes qui semblent être un remède pour ces pathologies dégénératives. Les premières études qui ont évoqué les β -glucanes comme traitement ont été menées en Corée du Sud au milieu des années 2000 contre l'ostéoporose [302, 303]. Pour cela les chercheurs ont étudié les effets anti-ostéoporotiques du Polycan, un β -glucane d'*Aureobasidium pullulans*, chez des souris ovariectomisées à des doses administrées par voie orale une fois par jour pendant 28 jours de 31,25, 62,5 et 125 mg / kg. En effet, le Polycan a considérablement supprimé de façon dose-dépendante la diminution du poids osseux, de la teneur en minéraux osseux, de la charge de rupture, de la densité minérale osseuse et des taux sériques de calcium et de phosphore et de l'augmentation des taux sériques d'ostéocalcine. En outre, le Polycan a considérablement supprimé les diminutions

des paramètres histo-morphométriques tels que le volume, la longueur et l'épaisseur de l'os trabéculaire et l'épaisseur de l'os cortical et l'augmentation des ostéoclastes dans le fémur et le tibia. Une autre étude similaire a expérimenté les effets protecteurs de ce β -glucane contre l'ostéoporose, montrant ainsi que le Polycan était capable de préserver la masse osseuse, et d'augmenter le taux de formation osseuse chez les rats ovariectomisés, suggérant ainsi que celui-ci peut être considéré comme un agent anti-ostéoporotique potentiel [304]. Les résultats de ces derniers travaux ont conduit les chercheurs à étudier l'effet de ce β -glucane sur l'arthrose. En cela, le but était d'évaluer l'efficacité du Polycan sur un modèle d'arthrose murine, induite par ménisectomie et par section du ligament croisé antérieur. Ensuite, une semaine après la chirurgie, trois doses différentes de Polycan (85, 42,5 et 21,25 mg / kg) ont été administrées aux rats par voie orale une fois par jour pendant 84 jours. Après l'euthanasie, il a été montré que le traitement par le β -glucane a induit une diminution de la sévérité de l'arthrose (diminution de la raideur, de l'engourdissement et de la douleur) associée à une augmentation de la prolifération des chondrocytes [305]. Un effet similaire a été aussi observé dans un modèle canin, considérant que l'administration de β -(1 $\rightarrow$ 3 / 1 $\rightarrow$ 6)-glucanes a significativement amélioré l'activité vitale et réduit significativement la raideur, la boiterie et la douleur chez les chiens [306]. Malgré le faible nombre des travaux qui ont étudié les effets bénéfiques des β -glucanes sur l'arthrose, ce dernier est l'objet d'une invention en ingénierie tissulaire du cartilage dont le but est d'obtenir un gel de cartilage implantable pour la réparation tissulaire du cartilage hyalin comprenant des cellules aptes à former du cartilage hyalin et des particules d'hydrogel de chitosane, un polysaccharide contenant des β -glucanes [307].

Résumé

En résumé, les β -glucanes semblent être bénéfiques pour les humains avec des systèmes immunitaires affaiblis et ceux qui souffrent de maladies infectieuses et du cancer, ainsi que pour aider la guérison des patients de la chimiothérapie et la radiothérapie. Ils sont également particulièrement bénéfiques pour les personnes d'âge moyen, les personnes ayant un mode de vie actif et stressant. Les mécanismes d'action de ces β -glucanes fongiques semblent dépendre de leurs capacités à se lier aux récepteurs cellulaires, qui sont connus pour inclure les récepteurs de la dectine-1, CR3, LacCer, les scavengers et les TLRs. Cette liaison conduit ensuite à l'activation de voies de signalisations multiples qui à leur tour favorisent des

réponses immunitaires dans les cellules affectées. Les données suggèrent que différents β -glucanes ont une efficacité différente probablement à travers leur affinité de liaison différente pour chaque récepteur, bien que la pureté chimique des glucanes utilisés dans ces études ne soit pas toujours connue.

Objectif

L'arthrose est une maladie dégénérative chronique qui se manifeste par des douleurs persistantes causées par l'usure anormale du cartilage et de l'ensemble de l'articulation notamment l'os sous-chondral et la membrane synoviale. La gonarthrose (arthrose du genou) est l'une des causes principales d'incapacité fonctionnelles dans les pays développés. Ainsi en France, environs 10 millions sont concernées dont 80% sont limitées dans leurs quotidiens. Pour prendre en charge cette pathologie, il existe plusieurs approches tel que le traitement par les antalgiques locaux, les anti-inflammatoires ou les anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente comme le chondroïtine et le glucosamine sulfate. Mais à l'heure actuelle, aucune option thérapeutique de ces dernières n'est susceptible de limiter la dégradation du cartilage. D'où le recours dans les cas extrêmes aux méthodes invasives notamment les infiltrations des corticoïdes et l'implantation des prothèses. Cependant, ces dernières années la thérapie à bases des cellules souches suscite un intérêt croissant dans la communauté scientifique du fait de leurs capacités à restaurer la fonction d'un tissu ou d'un organe. En particulier, les CSM qui sont des cellules souches adultes provenant de la moelle osseuse, du tissu adipeux ou du sang. Ces cellules sont capables de s'auto-renouveler et de donner naissance à d'autres lignées cellulaires comme les cellules du cartilage. Les CSM prélevées dans la moelle osseuse par ponction de la crête iliaque sont ensuite mise en culture pour les amplifier afin de les réinjecter dans les sites altérés de l'articulation. Leur potentiel de prolifération élevée et leur multipotence va leur permettre de régénérer le cartilage dégradé. Mais malheureusement ces cellules sont programmées pour être soumise à une différenciation terminale qui donne des chondrocytes hypertrophiques qui vont synthétiser du cartilage calcifié n'ayant pas les mêmes propriétés mécaniques du cartilage articulaire. Bien que, la différenciation de ces cellules dépend de leurs capacités de répondre à des facteurs de croissance et de différenciation spécifique comme le TGF- β pour donner des chondrocytes ou le BMP-1 pour l'obtention des ostéocytes, il a été démontré en 2004 que la migration, la prolifération et la différenciation de ces cellules sont activées également par les β -glucannes. Depuis des siècles, les produits naturels sont recherchés dans la médecine traditionnelles en Chine, en Afrique et en Amérique de sud pour prévenir et traiter diverses maladies notamment les β -glucannes qui sont des polysaccharides qu'on les trouve dans le son de céréales, la paroi cellulaire des levures, chez certains champignons et dans les algues marines. Mise à part de leurs rôles bénéfiques dans le traitement de plusieurs maladies comme le cancer, le diabète ou l'hypertension les β -glucannes extrait des algues marine notamment le

polycan ont fait preuve de leur capacités à préserver l'épaisseur du cartilage articulaire et à augmenter la prolifération des chondrocytes chez des rat arthrosique. Bien que le polycan ait induit la prolifération des cellules cartilagineuses, on s'est posé la question si ce traitement pourrait induire également la prolifération et la différenciation des CSM résidentes dans le cartilage. D'où, l'objectif de notre étude qui vise à investiguer les effets de la laminarine sur la prolifération et la différenciation des CSM humaines et murines.

Matériels et méthodes

1. La culture des CSM humaines

Nous avons utilisé des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine (StemPro® BM Mesenchymal Stem Cells) acheté chez GIBCO, les cellules ont été mises en culture dans des boîtes de 75 cm² en milieu MEM (Gibco) complétées par 10% de FBS inactivé (StemPro® MSC SFM Supplement CTS™), 1% de streptomycine de pénicilline (Gibco), 1% de glutamine (Gibco) et 0,1% de Fungizone (Gibco). Par la suite, les cellules ont été mises dans un incubateur à 37 ° C et à 5% de CO₂.

2. La culture des CSM murines

Nous avons utilisé des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse du tibia et de fémur d'un rat Wistar acheté chez JANVIER-LABS (France), puis immédiatement scarifié et la moelle osseuse a été récoltée. Toutes les expériences ont été réalisées conformément aux procédures approuvées par le comité de protection des animaux de l'Université d'Orléans.

2.1. Réactif

2.1.1. Composition des milieux de cultures

Milieu complet pour la culture des CSM (milieu de croissance)

- Minimum Essential Medium (MEM) 1X, Gibco France ; réf : 512000-046.
- Featal Bovine Serum MSC FBS, Gibco France; réf: 12763-025
- Penicillin Streptomycin Pen Strep, Gibco France ; réf : 15140-122.
- Fungizone Amphotericin B, Gibco France ; réf : 15290-018.
- L-Glutamine, Gibco France ; réf : 25030-024.

Milieu de différenciation en Chondrocytes

- Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 Nutrient Mixture (ham) DMEM/F-12(1x), Gibco France; réf: 21041-025.
- Featal Bovine Serum FBS, Gibco France; réf: 26170-043.
- Penicillin Streptomycin Pen Strep, Gibco France ; réf : 15140-122.
- Fungizone Amphotericin B, Gibco France ; réf : 15290-018.
- ITS liquid Media Supplement (100x), Sigma-aldrich France ; réf : 13146-5ML

- Dexamétazone, Sigma-aldrich France; réf: D4902-25MG
- Sodium pyruvate, Sigma-aldrich France ; réf : P5280-25G
- acide ascorbique, Sigma-aldrich France ; réf : A4544-100G
- L-Proline, Sigma-aldrich France ; réf : P5607-25G
- Transforming Growth Factor β TGF β , Sigma-aldrich France ; réf : T7039-50UG

Milieu de différenciation en adipocytes

- Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 Nutrient Mixture (ham) DMEM/F-12(1x), Gibco France; réf: 21041-025.
- Fetal Bovine Serum FBS, Gibco France; réf: 26170-043.
- Hydrocortisone, Sigma-aldrich France; réf: H0888-5G
- Indo Methasone, Sigma-aldrich France; réf: I7378-10G
- IBMX 3-Isobutyl-1-methylxanthine, Sigma-aldrich France; réf: I5879-100MG
- Insuline, Sigma-aldrich France; réf: I0516-5ML
- Penicillin Streptomycin Pen Strep, Gibco France ; réf : 15140-122.
- Fungizone Amphotericin B, Gibco France ; réf : 15290-018.

Autres réactifs

- Phosphate Buffered Saline PBS (10x), Gibco France; réf : 14200-59.
- Trypsine-EDTA, Sigma-aldrich France; réf : T3924
- Distilled Water, Gibco France; réf: 15230-097.
- Laminarin from *Eisenia Bicyclis*, Carbosynth United Kingdom; réf : OL02421

2.2. Protocoles

L'animal est injecté par une solution de Pentobarbital sodique (54.7 mg/ml) avec une seringue de 1 ml attaché à une aiguille 22G. Après avoir vérifié que l'animal est bien endormi et que son activité motrice est arrêtée, il a été placé sur la balance pour le peser avant de passer au prélèvement sanguin. Ensuite, à l'aide d'un ciseau, le rat est ouvert au niveau de la partie inférieure de la cage thoracique, le sternum est maintenu avec une pince clamp et le péricarde est découpé soigneusement afin de prélever le sang directement du cœur à l'aide d'une seringue de 20 ml. En fin, l'animal est réinjectée une deuxième fois d'une solution de 1 ml de Pentobarbital directement dans le cœur pour l'euthanasier.

2.2.1. Isolement et mise en culture des CSM

Après avoir nettoyé les pattes arrière à l'alcool 70 % pour les stériliser, les fémurs et les tibias des membres inférieurs de l'animal sont coupés puis la peau et les muscles sont enlevés. Par la suite les fémurs et les tibias disséqués sont placés dans l'alcool 70% pendant quelques secondes et puis transférés dans du PBS stérile 1X ensuite mettre l'ensemble avec du milieu de culture avec du PS, Fungizone et du SVF dans une boîte de pétrie et aller sous la hotte de culture pour le reste de l'expérience. Chaque os a ensuite été maintenu avec des pinces et les deux extrémités ont été coupées ouvertes avec un ciseau. Avec une aiguille 25G 8/5 attaché à une seringue de 2 ml remplie avec du milieu de culture, la moelle osseuse est rincé 2 à 3 fois dans un tube de 50 ml en insérant l'aiguille sur l'une des extrémités ouverte de l'os. Lorsque toute la moelle osseuse a été récupérée, la solution cellulaire obtenue est passé sur un tamis de 70 μ m pour éliminer les débris osseux et les agrégats sanguins. Par la suite, les cellules sont centrifugées à 1500 rpm à 4 ° C pendant 5 minutes et le surnageant est retiré par aspiration. Le milieu de culture (MEM contenant 10% de FBS, 1% Pen-Strep et 0.01% de fungizone) est ensuite ajouté aux cellules pour les suspendre puis mise en culture dans des flasque 75cm² dans un incubateur à 37 ° C et à 5% de CO₂. Le premier changement de milieu est effectué 24 heures après pour éliminer les cellules non adhères. Le milieu est renouvelé deux à trois fois par semaine.

2.2.2. 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 des flacons stériles en plastique de 75 cm² de surface. Au bout de 2 semaines en culture les cellules sont lavées deux fois avec tampon PBS afin d'éliminer les traces de sérum que inhiberaient l'action de la trypsine et ensuite détachées en les incubant pendant 3-5 minutes avec de la trypsine-EDTA à 37°C. Après, 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 lame de Thoma. Après le comptage, elles sontensemencées

dans des flasques de 75cm² de surface à une densité de 5000 cellules par cm² à 37°C avec 5% CO₂.

2.2.3. Caractérisation des CSM

Le profil antigénique des marqueurs de surface des CSM dérivé de la moelle osseuse a été caractérisé lors des 4 premiers passages qui précèdent la mise en culture des cellules dans le cadre de notre étude par RT-qPCR et par immunomarquage. Cependant les marqueurs qui tracent définitivement les CSM ont été identifiés. Dans notre travail, les molécules de surface CD34, CD45 et CD31 vont servir à caractériser les cellules souches hématopoïétiques tandis que les molécules de surface Nucléostémine (GLN3), Endogline (CD105) et Thy-1(CD90) vont servir à suivre la caractérisation des CSM.

2.2.4. Préparation de solution de traitement de laminarine :

Dans cette étude nous avons utilisé la molécule de laminarine *d'Eisenia Bicyclis* qui est un β -glucane de stockage trouvé dans les algues marines brunes. Cette molécule est achetée sous forme de poudre d'apparence blanche chez Carbosynth (United Kingdom). Pour préparer notre solution stock, 1 gramme de laminarin est dissous dans 100 ml de l'eau stérile puis filtré et stocké en -20 C°.

2.2.5. Traitement des CSM avec de la laminarine durant 7 jours de culture

Après avoir acquiert 80% de confluences sur les flasques de 75 cm² de surface, le milieu de culture est d'abord éliminé par aspiration, les cellules sont ensuite lavé deux fois au PBS et après détachées en les incubant pendant 3-5 minutes avec de la trypsine-EDTA à 37°C. Les cellules sont récupérées sous la forme de culot cellulaire, puis suspendues dans du milieu de culture et comptées. Dans cela, pour établir en triplicata cette manipulation, environ 1 400 000 cellules ont étéensemencées équitablement dans 12 flasques de 25 cm² de surfaces comme suit (Figure 9) :

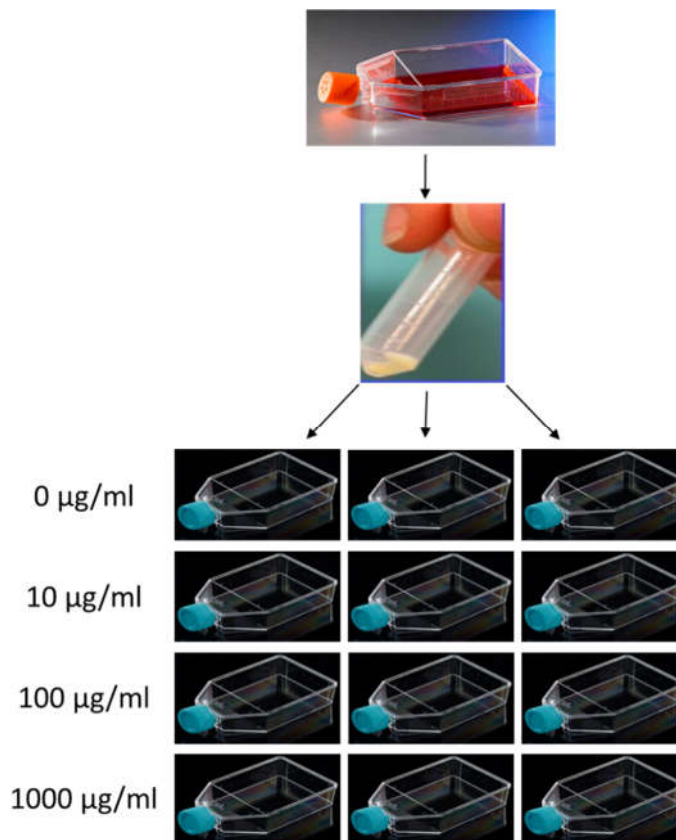


Figure 10 : Stimulation des CSM avec du laminarine durant 7 jours.

Les cellules ont étéensemencées dans du milieu de culture basique (MEM contenant 10% de FBS, 1% Pen-Strep et 0.01% de fungizone) à J-2. Après 48 heures de stabilisation, à J0, le milieu de culture a été changé et les différentes doses de traitement de laminarine (10, 100 et 1000 µg/ml) ont été ajoutées. Pendant 7 jours dans un incubateur à 37 ° C et à 5% de CO₂, Le milieu de culture contenant le traitement de la laminarine a été renouvelé trois fois.

3. Le test MTT

Le test MTT est une méthode rapide de numération des cellules vivantes. Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium). Le test est basé sur la réduction du produit jaune le bromure de tétrazolium en formazan violet par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives. Le nombre de cellules vivantes après incubation en présence (ou en absence, contrôle) de la molécule testée est directement proportionnel à la couleur bleue qui est mesurée par spectrophotométrie. Dans notre étude, les cellules ont étéensemencées avec du milieu de culture de CSM basique dans 3 plaque à 96 puits et incubées pendant 24 heures pour stabilisation à 37°C et 5% CO₂. Ensuite, l'ancien milieu est aspiré pour remettre en incubation de nouveau milieu avec les

différentes concentrations de laminarin 0, 10, 100 et 1000 μ / ml pendant 24, 48 et 72 heures à 37°C et 5% CO₂. Après l'incubation avec la laminarine, le réactif MTT (5mg/ml dans PBS) (Sigma-Aldrich®, St. Quentin Fallavier, France) est ajouté à chaque puits et les cellules ont été encore incubées pendant 4 heures dans les mêmes conditions. Puis après élimination du milieu de culture, les cristaux bleus qui se sont formés ont été dissout dans une solution de 100 μ l SDS-acidic-isopropanol 0.5% SDS ; 80 mM HCl) (0.5% SDS, 80 mM HCl ; Sigma-Aldrich®, St. Quentin Fallavier, France). Enfin l'absorbance dans chaque puits, y compris le Blank a été mesuré à 540 nm dans un lecteur de plaque (Multiscan Go, Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) considérant que La longueur d'onde de référence devrait être supérieure à 620 nm.

4. Microscopie épifluorescente des CSM

Les cellules ont été cultivées dans du milieu α -MEM supplémenté avec 10% de FBS, 1% Pen-Strep et 0.01% de fungizone. Ensuite, les cellules ont étéensemencées dans une lamelle Lab Tek de 8 puits (Nunc, Dutscher S.A., Brumath, France) à une densité de 5 x 10⁴ cellules / puits et cultivées à 37 ° C et à 5% de CO₂. Après 24 heures, les milieux de culture cellulaire ont été éliminés et les cellules ont été incubées avec une solution de 100 μ M d'étoposide et de 0, 10, 100 et 1000 μ g/ml de laminaire pendant les 24h qui suivent. En outre, les cellules ont été lavées avec du PBS et incubées avec une sonde fluorescente d'annexine V-FITC (APOAF, SIGMA) dans du tampon de liaison pendant 15 min, suivies d'un lavage supplémentaire avec le milieu OPTIMEM. Enfin les cellules ont été observées avec un microscope inversé à fluorescence Zeiss Axio Observer Z1 (Zeiss, Le Pecq, France) équipé d'une caméra CCD haute résolution ORCA-R2. La source lumineuse, Zeiss HXP 120, a été combinée avec le cube de filtre FITC.

5. Différentiation des CSM en chondrocytes sous stimulation de la laminarine pendant 7, 14 et 21 jours

Les cellules MSC à P4 ont été différenciées en chondrocytes. Nous avons choisi des CSM qui ont été cultivées jusqu'à P4 en considérant que la culture devient plus homogène avec les sous-passages. Après avoir acquiert 80% de confluences sur les flasques de 75 cm² de surface le milieu de culture est d'abord éliminé par aspiration, les cellules sont ensuite lavé deux fois au PBS et après détachées en les incubant pendant 3-5 minutes avec de la trypsine-EDTA à 37°C. Les cellules sont récupérées sous la forme de culot cellulaire, puis suspendues dans du

milieu de culture et comptées. Pour l'obtention des chondrocytes nous avons ensemencés 10000 cellules dans des puits de 9 cm² pendant 48 heures avec un milieu basique d'amplification de CSM (α -MEM contenant 10% de FBS, 1% Pen-Strep et 0.01% de fungizone). Une fois que les cellules sont stabilisées, le milieu est remplacé par du milieu de différenciation chondrocytaire contenant du DMEM / F-12 supplémenté par FBS 10%, PS1% 1; 10⁻⁷M de dexaméthasone, 1 μ M d'ascorbate-2-phosphate, L-proline (Sigma-Aldrich®, St. Quentin Fallavier, France), 1% de pyruvate de sodium, ITS 1X et 10 ng / ml de TGF- β 1 (Gibco™, Courtaboeuf, France). Les cellules sont cultivées pendant 7, 14 et 21 jours à 37°C et 5% CO₂ avec le milieu de différenciation chondrocytaire contenant les différentes doses de traitement de laminarin (10, 100 et 1000 μ g/ml) qui est renouvelé 2 à 3 fois par semaine. La différenciation en chondrocytes a été faite 3 fois.

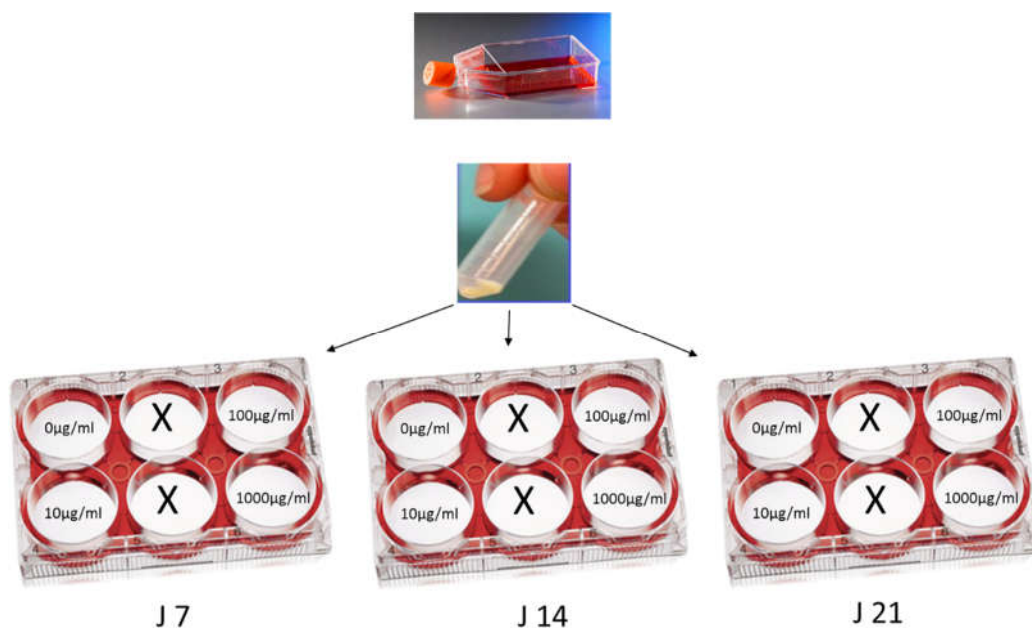


Figure 11 : Différenciation des CSM en chondrocytes durant 7,14 et 21 jours sous traitement de la laminarine.

6. Marquage des CSM par immunofluorescence

L'immunofluorescence permet la détection et la localisation d'une ou plusieurs protéines tissulaires ou cellulaire grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques. Cette technique peut aussi bien être réalisée sur des coupes flottantes ou sur des lames présentant du tissu ou des cellules fixées. La réalisation d'un marquage passe par différentes étapes : (1) prétraitement

du tissu ou cellules, (2) sélection de l'anticorps primaire et détermination de sa dilution, (3) spécificité de l'anticorps secondaire, et (4) la pertinence du choix du fluorochrome. Dans notre étude, on a utilisé le principe de l'immuno-marquage indirect. En effet, les molécules exprimées à la surface ou à l'intérieur des cellules sont spécifiquement reconnues par un anticorps dit : anticorps primaire (AC primaire). Après rinçage, l'excès d'AC primaire est évacué, il ne reste que celui qui s'est fixé. Afin de mettre en évidence la formation du complexe molécule-AC primaire, un deuxième anticorps est utilisé (AC secondaire). Ce dernier est couplé à un fluorochrome et il est spécifiquement dirigé contre l'AC primaire. Lorsqu'il est excité par une source laser, le fluorochrome absorbe de l'énergie à une longueur d'onde donnée, puis retourne à son état fondamental en émettant un signal fluorescent qui permet de visualiser et de quantifier la protéine marquée.

6.1. Marquage des molécules étudiées

Les caractéristiques des anticorps utilisés pour les molécules cibles ainsi que celles des anticorps secondaires sont présentées dans le tableau suivant.

Tableau 3 : listes des anticorps utilisés en immunofluorescence

Anticorps	Source animale	Origine commerciale
Nucléostémine	lapin	Abcam : ab70346
Collagène II	lapin	Abcam : ab185430
CD90/Thy-1	souris	AbD serotec : MCA47GA
Anti-rabbit 549	lapin	Rockland : 605-441-013
Anti-mouse 488	souris	Rockland : 610-441-020
Anti-mouse 549	souris	Rockland : 610-142-121

6.2. Protocole

Après stimulations biochimiques (Laminarine) pendant 7, 14 et 21 jours, les cellules sont lavées une fois avec du PBS puis fixées soit avec 2 mL de formol 4% à température ambiante ou avec 2 ml de méthanol à -20°C pendant 10 mn en fonction de l'anticorps utilisé. Une perméabilisation avec 2 mL de Triton 0,5% pendant 10 min sous agitation, permet de digérer les phospholipides composant la membrane cytoplasmique, créant ainsi des pores qui permettront l'entrée des anticorps. Après cela la solution de perméabilisation est retirée

ensuite remplacé par une solution de saturation PBS-Tween 0.1% BSA 1% pendant une heure à température ambiante pendant 1 heure sous agitation.

L'anticorps primaire est dilué dans du PBS-Tween 0.1% BSA 1% et ajouté aux cellules overnight en chambre humide à 4°C. Trois lavages sous agitation de 10 mn chacun sont effectués avec PBS-Tween 0.1% avant d'incuber les cellules avec l'AC secondaire pendant 1 heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. 5 minutes avant la fin de l'incubation 100µl de solution DAPI est ajoutées aux cellules. Enfin les cellules sont lavées trois fois et sont prêtes à être observées en microscopie. Deux contrôles négatifs (cellules sans anticorps et cellules incubées avec l'AC secondaire uniquement) ont été effectués aux mêmes temps que les échantillons, afin de prendre en considération une éventuelle auto-fluorescence des cellules ou une fixation aspécifique de l'AC secondaire.

7. Etude de l'expression des protéines par Western blotting

7.1. Principe du Western Blotting

Le western blotting permet de doser les protéines spécifiques issues de cellules ou d'un tissu. Cette technique se déroule en cinq étapes :

- Extraction des protéines totales à partir de cellules lysées.
- Séparation des protéines totales grâce à une électrophorèse. La migration des protéines dans un gel de polyacrylamide est proportionnelle à leur masse moléculaire.
- Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose.
- Mise en évidence des protéines recherchées grâce à un immunomarquage indirect.
- Révélation de l'interaction de l'AC avec la protéine recherchée grâce à une technique de chimiluminescence.

7.2. Protocoles expérimentaux du Western Blot

Les caractéristiques des anticorps utilisés pour les protéines cibles ainsi que celles des anticorps secondaires sont présentées dans le tableau suivant.

Tableau 4 : listes des anticorps utilisés en Western Blot

Anticorps	Source animale	Origine commerciale
β -Actin	mouse	Santa Cruz : sc-47778
Cyclin D1	rabbit	Cell Signaling : #2978
β -Catenin	rabbit	Cell Signaling : #8480
Phospho- β -Catenin	rabbit	Cell Signaling : #9561
Anti-rabbit IgG (HRP)	Goat	Abcam : ab6721
Anti-mouse IgG (HRP)	Goat	Abcam : ab6789

7.2.1. Lyses des cellules

- Tampon RIPA (lyse des cellules)

Tableau 5 : Tampon RIPA

Réactifs	Concentrations
Tris	50mM pH 7,5
NaCl	150mM
Nonidet P-40	1%
Déoxycholate	0,5%
Dodécyl sulfate de sodium (SDS)	0,1%
Cocktail de protéases inhibitrices	1% pH 7,5

Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS. Après, 2 ml de tampon de lyse sont ajoutés. Aussitôt les cellules sont décrochées et transférées dans des microtubes puis incubées 10 à 15min à 4°C. Les lysats cellulaires sont centrifugés à 12000 tour/minute pendant 20 min à 4°C. Le surnageant contenant les protéines totales est transféré dans de nouveaux microtubes.

7.2.2. Dosages des protéines

La concentration des protéines est déterminée grâce une réaction colorimétrique qui consiste en premier lieu à préparer une gamme étalon de sérumalbumine bovine dans le tampon de lyse aux concentrations suivantes : 0 / 0,2 / 0,75 / 1 / 1,25 / 2 mg/ml. Un mélange de réactifs S et A dans un rapport 1 / 50 est préparé pour obtenir une solution A', celle-ci est ajoutée aux

échantillons ainsi qu'à la gamme d'albumine dans un rapport de 1/5. Ensuite, la solution B est ajoutée dans un rapport de 1/40. Enfin l'absorbance est mesurée à 562 nm après 30 minutes d'incubation à l'abri de la lumière avec le densitomètre MULTISKAN GO de Thermo Scientifique en utilisant le logiciel SKANIT SOFTWARE 3.2.

7.2.3. Electrophorèse (migration)

- Préparation des gels de séparation d'acrylamide pour 20 ml :

Tableau 6 : Composition des gels de séparation

Solutions	8%	10%	12%	15%
Tris HCl pH 8,8 1,5M (ml)	5	5	5	5
Bis-Acrylamide à 30% (ml)	5.3	6.6	8	10
H ₂ O (ml)	9.7	8.4	7	5
SDS 20 % (μl)	100	100	100	100
Persulfate d'ammonium (APS) 10% (μl)	60	60	60	60
Temed (μl)	10	10	10	10

Le gel encore liquide remplit les $\frac{3}{4}$ de la plaque puis est recouvert d'H₂O afin de le tasser. La polymérisation dure 15 min.

- Préparation des gels de concentration d'acrylamide pour 10 ml :

Tableau 7 : Composition des gels de concentration

Solutions	7%
Tris HCl pH 6,8 0,5M (ml)	2,5
Bis-Acrylamide Bis 30% (ml)	1,7
H ₂ O (ml)	5,8
SDS 20 % (μl)	50
Persulfate d'ammonium (APS) 10% (μl)	83
Temed (μl)	15

Ce gel remplit le dernier $\frac{1}{4}$ de la plaque, un peigne est placé afin de déterminer les puits et la polymérisation dure 15 min.

Tampons :

- Tampons de charge

Tableau 8 : Composition du Tampons de charge

Produits	Concentration finale
Tris HCl pH = 6.8	0.25M
SDS	8%
Glycérol	40%
Bleu de bromophénol	Une petite pincée
H2O	10 ml

Un volume suffisant d'une solution composée de β -mercaptoéthanol (réduit les ponts disulfure lors de la dénaturation des protéines) et de tampon de charge (composé bleu qui permet de suivre la migration sur le gel) est préparé dans un rapport de 1/20. Cette solution est mélangée à volume égal à celle contenant 30 ng des protéines totales, puis portée à ébullition pendant 5 min afin de dénaturer les protéines pour leur permettre de migrer dans les mailles du gel une fois déposées.

- Tampons de migration

Tableau 9 : Composition du Tampons de migration

Produits	Quantité
TRIS en poudre	3.03g
Glycine	14.41g
SDS	0.1%
H2O	1L

Pour la migration, le tampon d'électrophorèse est versé entre les deux plaques jusqu'à remplir le vide, le reste du tampon sert à remplir la cuve à moitié. Les protéines migrent sur les gels à 120 volts.

Pour faire du Tris HCl, il faut diluer du Tris dans l'eau le pH est alors basique, faire descendre le pH avec de l'HCl puis compléter avec de l'eau. Filtrer ensuite la solution sur un filtre 0.22 μ m sous hotte et mettre à 4°C.

7.2.4. Transfert

- Tampon de transfert

Tableau 10 : Composition du Tampons de transfert

Produits	Quantité
TRIS en poudre	2.42g
Glycine	11.25g
Méthanol	200ml
H2O	1L final (soit 800ml)

Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF préalablement humidifiée dans du méthanol pur. Le montage est préparé comme le montre la figure 26. Il consiste à placer le gel et la membrane PVDF entre deux papiers filtres puis le tout entre deux mousses (les papiers filtres et les mousses sont humidifiés avec du tampon de transfert). La cassette est soigneusement fermée et placée dans le bac contenant le tampon de transfert. Enfin, les protéines sont transférées pendant 40 mn à 20 volts.

7.2.5. Détection des protéines

Mettre la membrane dans la solution de rouge ponceau (solution prête à l'emploi) et laisser colorer environ 5 à 10 mn max avec agitation puis enlever la solution et laver à l'eau du robinet plusieurs fois jusqu'à l'apparition des bandes protéiques.

7.2.6. Marquage des protéines

- Tampon de lavage : TBS- Tween 0.1%

Tableau 11 : Composition du Tampons de lavage

Produits	Quantité
NaCl	150mM
Tris HCl	10Mm
Tween	0.1%
H2O	Qsp 1L

- Tampon de saturation : Lait écrémé 5% ou BSA 5%.

Tableau 12 : Composition du Tampons de saturation

Produits	Quantité
Lait écrémé (en poudre)	5%
BSA (en poudre)	5%
TBS –Tween	Volume à définir selon l'expérience

Une fois le transfert terminé et les bandes protéiques sont détectés, la membrane est lavée 2 fois pendant 5 mn au PBS Tween 0.1% puis plongée dans le tampon de saturation et incubée pendant 1h sous légère agitation. À la suite de quoi elle est incubée toute la nuit à 4°C avec l'AC primaire dilués au 1/1000 dans du tampon de saturation sous agitation toute la nuit à 4°C. Un second rinçage TBS-Tween 0.1% (3 fois pendant 10 min), est suivi par l'incubation de la membrane avec l'anticorps secondaire dilués au 1/1000 dans du tampon de saturation pendant 1h sous agitation à température ambiante. Un troisième rinçage au TBS-Tween 0.1% (3 fois pendant 10 min) est réalisé avant de procéder à la révélation. Les protéines sont quantifiées relativement à l'expression de la protéine de l'actine. Cette protéine a été choisie car son expression n'est pas influencée par les conditions de culture.

7.2.7. Révélation par chimiluminescence

Les membranes sont d'abord incubées pendant 5 minutes à l'abri de la lumière dans du Tris 100mM, puis appliquée sur un film alimentaire et séchée avec du papier. Ensuite Les membranes sont incubées pendant 1 minute à l'abri de la lumière avec un mélange des deux réactifs d'ECL (Amersham, réf. RPN2209) en volumes égaux puis assécher de nouveau et placées dans l'enceinte de l'appareil. Plusieurs essais de temps de révélation sont définis (30s ; 60s ; 120s ; 300s ; 9000s...) considérant que le temps nécessaire pour l'apparition des bandes est de 30s.

8. Etude de l'expression des ARNm par RT q-PCR

La quantification de l'expression des ARNm est réalisée par qRT-PCR. Cette technique permet de mesurer l'amplification en temps réel d'un ADNc d'intérêt, issu de la rétro-transcription d'un extrait d'ARN totaux.

8.1. Extraction des ARN

L'extraction des ARN totaux est effectuée à l'aide du kit « RNeasy minikit » (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Cette extraction nécessite un nombre de cellules correspondant à 1 flasque de 25cm² pour les CSM cultivées en milieu d'amplification basique et 1 puits d'une plaque 6 puits pour les CSM en voie de différenciation chondrogénique cultivées pendant 7, 14 et 21 jours, de façon à ce que la quantité d'ARN extraits soit suffisante. 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. 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 10000rpm. 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 10000rpm. 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 10000rpm 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. 30 µL d'eau ultra pure RNase-Free (Invitrogen) sont déposés sur la membrane pour l'élution et les colonnes centrifugées pour 1 min à 10000rpm. Les ARN extraits sont conservés à -80 °C.

Une lecture de l'absorbance à 260 nm au Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) permet de déterminer la quantité des ARN ; 1 DO à 260 nm = 44 ng/µL d'ARN. Le rapport d'absorbance 260/280 nm permet de connaître la pureté des ARN, qui doit être compris entre 1,9 et 2,1, garantissant une absence de contamination par les protéines.

8.2. Transcription inverse

La rétro-transcription des ARN totaux permet de synthétiser les ADNc correspondants. Elle est réalisée à l'aide du kit Quantitec de Qiagen selon les recommandations du fournisseur. A partir de 500 ng d'ARN pour chaque échantillon, 2 µl du tampon (gDNA wipeout) et une quantité d'H₂O variable (selon l'échantillon) est ajouté à chaque tube pour éliminer l'ADN génomique puis centrifugé brièvement et incubé 2 minutes à 42°C. Après cette courte incubation, le mélange réactionnel constitué de 1µl de reverse-transcription master mix, 4µl de quantiscript RT buffer et 1µl du RT primer mix est préparé ensuite ajouté à chaque tube pour avoir à la fin

20µl dans chacun. Le mélange réactionnel est incubé 30 min à 42°C pour réaliser la transcription inverse ensuite La réaction est stoppée par un chauffage de 5 min à 95 °C afin d'inactiver l'enzyme. Cette étape a été réalisée avec un thermocycleur BIORAD.

8.3. PCR quantitative

La PCR quantitative (qPCR) en temps réel permet le suivi de l'amplification spécifique de la matrice d'intérêt. Elle contraste avec la PCR conventionnelle où les amplicons ne sont détectés que dans la phase finale du processus d'amplification. Ces qPCR utilisent du SYBR green, un agent qui devient fluorescent en s'intercalant dans le petit sillon de l'ADN néoformé. La quantité de fluorescence émise est donc proportionnelle à la quantité d'amplicons formés.

Les couples d'amorces spécifiques ont été définies à l'aide du logiciel Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Mars 2015). Les oligonucléotides ont été synthétisés par la société Invitrogen. Ils sont reçus lyophilisés et sont re-suspendus à une concentration stock de 100 µM et conservés à -20 °C. Ils sont ensuite aliquotés et utilisés à une concentration finale de 10 µM.

Les séquences des amorces utilisées sont indiquées dans le tableau suivant :

Tableau 13 : Liste des amorces spécifiques des gènes utilisées pour la qPCR

Primers	Forward	Reverse
Rat		
Eng	CCCTGATTCAGCCAAAGTGT	GGTGCTACTCAGGACAAGGTG
Gnl3	AGCCCTGATGATGAGCAATC	ACTTGAGGACACCTGCAACC
Thy1	AGCTATTGGCACCATGAACC	AGGCTGAACTCATGCTGGAT
CD31	GAAGGTTTCTGAGCCCAGTG	CATCTGCCTTGGCTGTCTTA
CD34	GGGAGACATCAAATGTTTCAGG	GGCCTCAGTCTCCTCCTTTT
CD45	CTTTGCAAGCAATACCACCA	AGCCATTGGAGAGAGTGACG
Col2a1	GTTACGTACACTGCCCTGA	GGCCCTATGTCCACACCAAA
Acan	TCTTTGTGACTCTGCGGGTC	AGTGGTCACAGGATGCATGC
Humain		
Sox 9	GCTCTGGAGACTTCTGAACGA	GGGAGATGTGCGTCTGCT
Acan	GACAGTGAGGTTTCTGAGCC	AGTGGAGAGAGTGCCATACG
Col2A1	CCAAAGTGTCCTGATTCAG	GGTGGACAAGGTGCTACTCAG
Eng	TTCACGTACACTGCCCTGAA	TTCATGACGTACACTGCCC

Après la transcription inverse, les échantillons d'ADNc ont été dilués pour obtenir à la fin 1ng/µl dans chaque puits d'une plaque à 96. Le mélange réactionnel pour chaque puits de

qPCR contient 20µl est constitué de 10 µl de Sybr green, 5µl de l'ADNc, les amorces (quantité variable selon le gène cible) et de l'H₂O (quantité variable selon le gène cible). La qPCR en temps réel a été réalisée sur le système Bio-Rad, CFX96™ Real-time et L'analyse des données a été effectuée par le logiciel Bio-Rad CFX manager.

Pour les expériences de qRT-PCR, un gène de ménage (dont l'expression est en théorie constante quel que soit la lignée ou le traitement effectué) le RPL13 a été choisi.

8.4. Traitement des résultats de qPCR

Un profil type d'amplification par qPCR est présenté figure x. Il se décompose en 3 parties :

- Une première partie dans laquelle le nombre d'amplicons formés ne permet pas d'obtenir une fluorescence détectable par l'appareil (nombre de cycle < 19 et < 25 pour les échantillons A et B, respectivement).
- Une deuxième partie où la fluorescence augmente de manière exponentielle (entre les cycles 19 - 30 et 25 – 35 pour les échantillons A et B, respectivement).
- Une troisième partie de plateau correspondant à une saturation de la réaction d'amplification (nombre de cycles > 25 ou > 35 pour les échantillons A et B, respectivement).

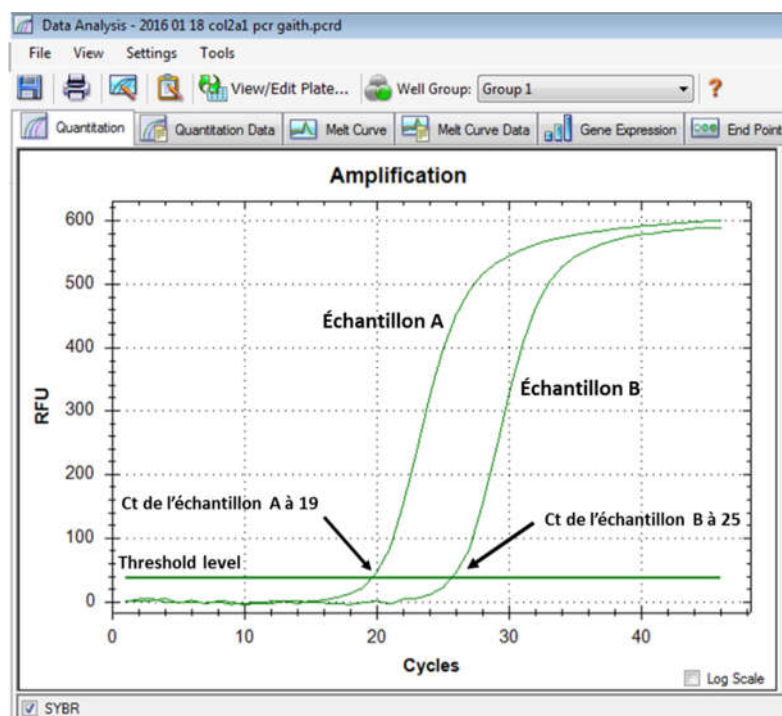


Figure 12 : exemples de profils de qRT-PCR pour la détermination du Cycle threshold (Ct).

Ces courbes permettent de calculer le cycle, à partir duquel, la fluorescence devient détectable (au-dessus du Treshold level). Cette valeur seuil est appelée Ct (pour « Cycle Treshold »). Il est directement proportionnel à la quantité de matrice initiale. Plus il y a de matrice et plus la fluorescence sera détectable précocement. A chaque cycle de phase exponentielle la quantité de produits PCR formés est donc en théorie doublée. Un calcul en 3 étapes permet la quantification relative du niveau d'expression du gène d'intérêt par rapport à celle du gène de ménage.

- Etape 1 : Normalisation par rapport au gène de ménage pour chaque échantillon : $Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{gène de ménage}} = \Delta Ct$
- Etape 2 : Variance entre 2 échantillons : $\Delta Ct_{\text{échantillon 1}} - \Delta Ct_{\text{échantillon 2}} = \Delta \Delta Ct$
- Etape 3 : Détermination de la variation du nombre de copie du gène d'intérêt entre les échantillons comparés = $2^{-\Delta \Delta Ct}$.

Ce calcul permet de connaître la variation du nombre de copie de l'ARNm d'intérêt entre les conditions comparées.

9. Statistiques

Les résultats du test MTT et du comptage des cellules ont été comparés à l'aide du test ANOVA à sens unique, suivi du test de comparaison multiple de Kruskal-Wallis. Les expressions de l'ARNm ont été comparées à l'aide du test ANOVA à sens unique suivie du test de Mann-Whitney (Prism6, GraphPad Software Inc. CA). Une valeur $p < 0,05$ a été considérée statistiquement significative. Les expériences ont été effectuées trois fois pour l'expression de l'ARNm des cellules murines et six fois pour les essais MTT. Seules, les expériences de l'expression de l'ARNm des cellules humaines ont été effectuées une seule fois.

Résultats et Discussion

1. Identification des CSM murines

Une fois extraites de la moelle osseuse, les cellules sont cultivées en monocouche jusqu'au quatrième passage. Il est ensuite essentiel de contrôler le phénotype de ces cellules selon les protocoles en usage dans les différentes études sur les CSM. Ces données sont nécessaires dans la tâche des 'Contrôles Qualités'. Le phénotype des CSM est déterminé d'abord par l'étude des expressions des ARNm des marqueurs spécifiques et par immunofluorescence. Cette détermination repose sur la recherche d'expression de marqueurs de surface caractérisant les CSM (CD90, CD105 et CD73) et par l'absence de marqueurs de surface caractérisant des cellules souches hématopoïétiques (CD34, CD45) et endothéliales (CD31).

1.2. Caractérisation morphologique

La morphologie des CSM a été étudiée en microscopie optique. Les CSM montrent une forme axiale ou une morphologie semblable aux fibroblastes et peuvent être repiquées plusieurs fois. Après 3 jours de culture, les CSM ont adhéré à la surface du plastique, et se présentent sous la forme d'une petite population des cellules isolées. Après quelques jours, les cellules ressemblent à de longues cellules fibroblastiques et commencent à former des colonies.

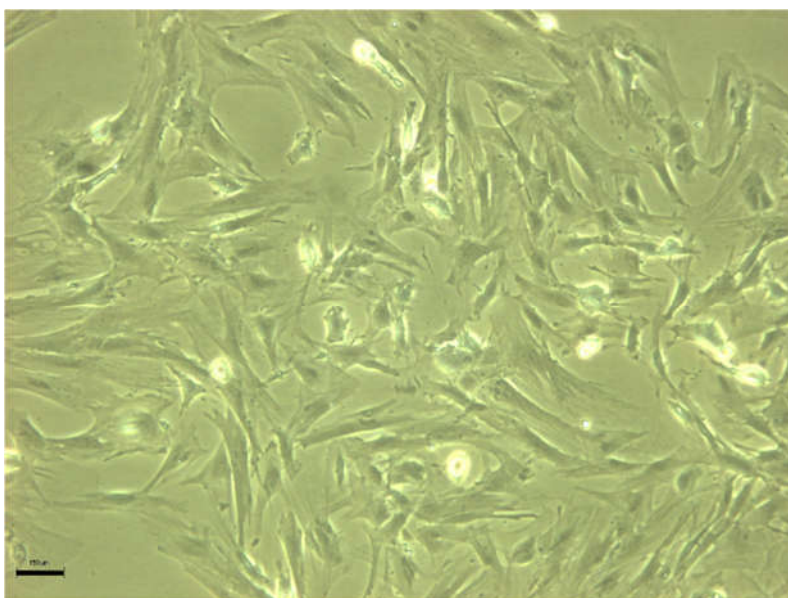


Figure 13 : Image de microscopie optique de CSM adhérentes. X20 (Barre graduée 20 μ m).

Cette propriété d'adhésion au plastique n'est pas suffisante pour identifier de manière certaine une population de CSM purifiées. Nous avons donc eu recours à une méthode qui consiste à analyser le phénotype des cellules à travers les marqueurs de surface propres aux

CSM, par étude de l'expression des ARNm des marqueurs de surface propres aux CSM (Thy-1/CD90, Endoglin/CD105 et Nucléostémine) et d'autres marqueurs propres aux cellules souches hématopoïétiques (CD34, CD45) et endothéliales (CD31). En parallèle, Nous avons étudié par immuno-marquage la fluorescence du Nucléostémine et du Thy-1/CD90.

1.3. Caractérisation phénotypique

1.3.1. L'expression des ARNm

Les MSC ont été purifiées par adhérence au plastique et amplifiées dans du MSCGM « mesenchymal stem cell growth medium ». Les cellules ont été passées tous les 15 jours et leurs proliférations a été maintenue au moins jusqu'au 4ème passage pour l'étude de leur phénotype qui a été analysé par l'expression des ARNm des Nucléostémin, Thy-1/CD90, Endoglin/CD105, CD34, CD45 et CD31 après chaque passage.

D'après la figure 14, Les résultats des analyses de l'expérimentation par RT-qPCR ont montré que l'expression des ARNm des marqueurs des CSM (Nucleostemin (GLN3), Thy1/CD90 et Endoglin/CD105) a été croissante d'un passage à autre par contre l'expression des ARNm des antigènes endothéliaux (CD31) ou hématopoïétiques (CD45 et CD34) a été décroissante. En effet, au 4^{ème} passage les cellules expriment plus fortement les marqueurs mésenchymateux CD90, CD105 et Nucléostémin par rapport au premier passage alors qu'elles n'expriment presque plus les marqueurs endothéliaux (CD31) ou hématopoïétiques (CD45 et CD34). Donc ces cellules qui seront utilisées dans la suite des expériences sont bel et bien des CSM.

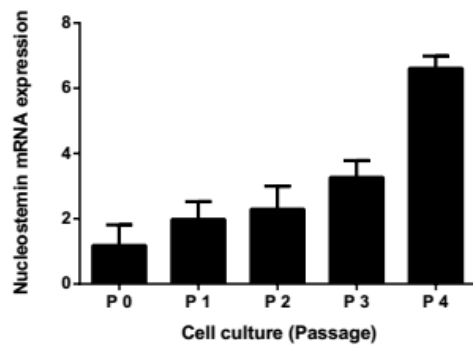
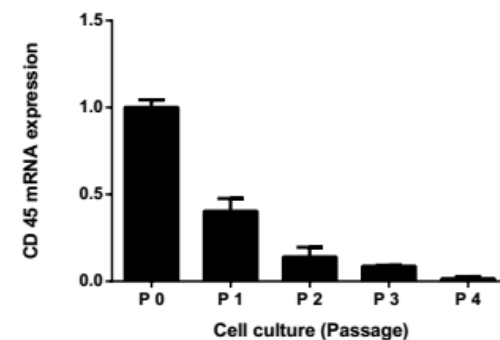
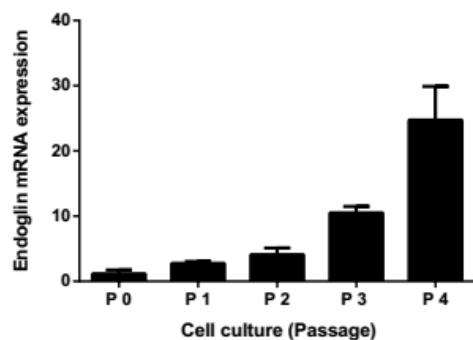
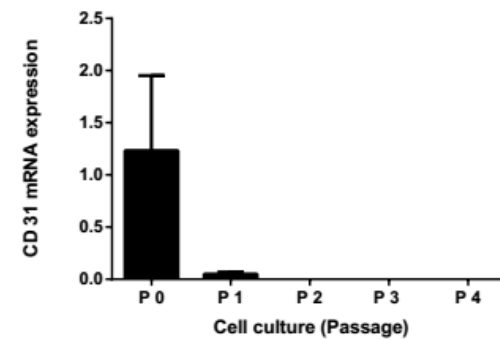
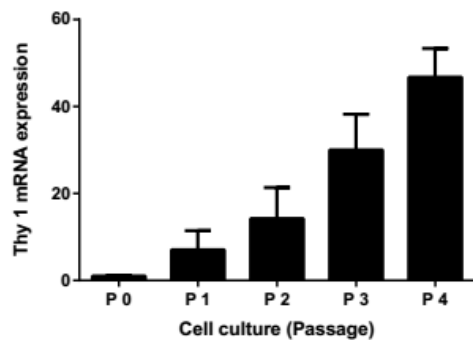
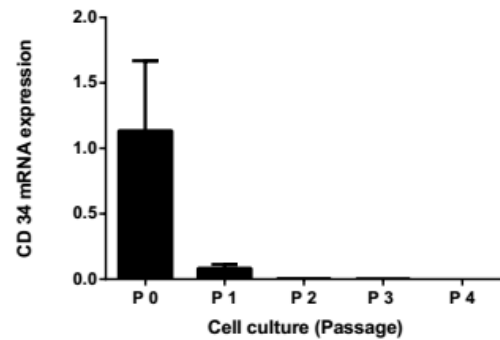
A**B**

Figure 14 : Caractérisation des CSM murines isolées par RT-qPCR. (A) l'expression d'ARNm des marqueurs définissant les CSM (Nucleostemin, Endoglin et Thy1). Les cellules ont été cultivées dans un milieu de non-différenciation jusqu'au quatrième passage. Les données (n = 2 répliques biologiques) sont présentées en moyenne $\pm$ SEM. (B) l'expression de l'ARNm des marqueurs CD31, CD45 et CD34. Les cellules ont été cultivées dans un milieu de non-différenciation au quatrième passage. Les données (n = 2 répliques biologiques) sont présentées en moyenne $\pm$ SEM.

1.3.2. L'immunofluorescence

Les cellules du passage 4 ayant exprimé plus fortement les marqueurs mésenchymateux Nucléostémin, CD90 et CD105 ont été marquées par les anticorps anti-nucléostémin et anti-THY-1. L'immunomarquage de la molécule de nucléostémin, caractéristique des CSM, montre une fluorescence rouge des CSM uniquement dans leurs noyaux marqués en bleu au DAPI. Par ailleurs, l'immunomarquage de la molécule THY-1 montre une fluorescence verte à une distribution cytoplasmique. Le noyau étant marqué en bleu au DAPI.

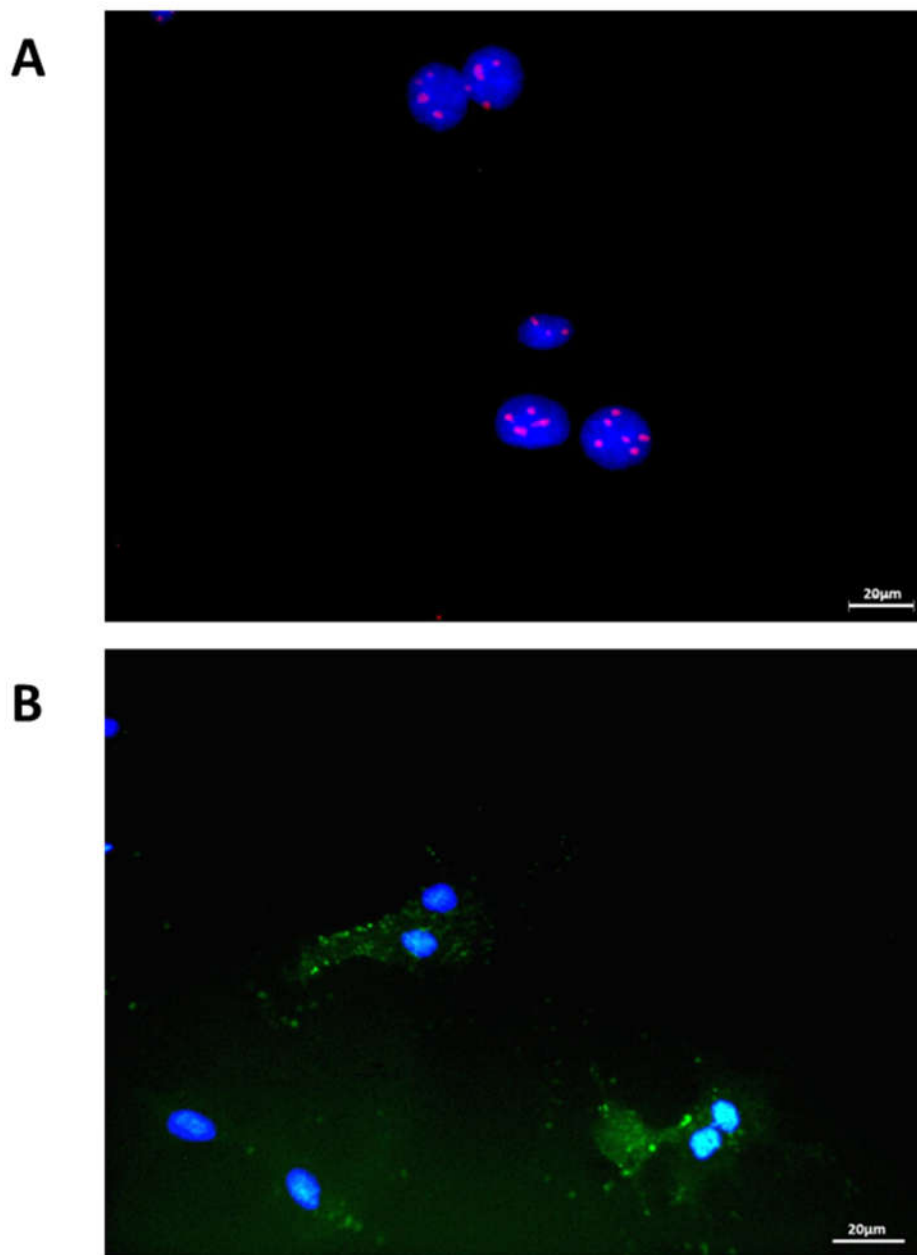


Figure 15 : Immunomarquage des marqueurs mésenchymateux Nucléostémin et Thy-1 (CD90) dans les CSM au P4 : Double immunomarquage des noyaux (bleu), (A) Nucléostémin (rouge). (B) Thy-1 (vert). Les cellules sont observées sous un microscope à épifluorescence x40.

Discussion

Les CSM sont généralement issues de la moelle osseuse par aspiration au niveau de la crête iliaque [60] mais aussi du tibia ou du fémur [61]. Comme les CSM représentent une faible fraction des cellules mononuclées totales de la moelle, il peut être utile de les isoler afin d'enrichir la culture. Plusieurs techniques sont disponibles comme l'utilisation d'un gradient de densité permettant d'obtenir des densités cellulaires de 1.10^4 cellules/cm² à $0,4.10^6$ cellules/cm² [77]. Une autre technique, la plus utilisée, repose sur la mise en culture de l'ensemble des cellules provenant de la moelle osseuse, dans un milieu contenant 10% de sérum [77]. Comme le montre nos résultats, cette technique permet d'obtenir des cellules adhérentes et possédant une morphologie fibroblastique. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Barry FP et al qui montrent que seules les cellules possédant une morphologie fibroblastique et capables d'adhérer au support de culture de surface plastique sont des CSM [44]. La culture primaire étant maintenue 15 jours, la fraction de cellules non adhérentes et hématopoïétiques est éliminée lors du renouvellement de milieu de culture. Cependant, ces propriétés d'adhésion au plastique ne sont pas suffisantes pour caractériser les cellules comme étant des CSM. C'est pourquoi une méthode basée sur l'analyse de marqueurs spécifiques des CSM ou des cellules hématopoïétiques est indispensable. Nos résultats de l'immunofluorescence montrent que les cellules, cultivées en monocouche, expriment dans leurs noyaux le marqueur Nucléotémine. Les cellules expriment fortement aussi les ARNm des antigènes Thy-1, Endoglin et Nucléotémine. Alors que l'expression des ARNm des récepteurs spécifiques des cellules hématopoïétiques (CD45 et CD34) et endothéliales (CD31) est presque nulle au 4^{ème} passage. Tout en sachant que Thy-1 (CD90), Endoglin (CD105) et Nucléotémine (GLN3) une fois exprimés conjointement, permettent d'identifier des CSM [44].

1.4. Stimulation des CSM avec la laminarine

1.4.1. Dénombrement des CSM

Afin d'explorer la réaction des CSM sous stimulation de la laminarine *in vitro*, les cellules ont étéensemencées au nombre de 10^5 dans des flacons de 25 cm² puis traitées avec 0, 10, 100 ou 1000 µg/ml de laminarine pendant 7 jours. D'après la figure 16 A, nos résultats ont montré que, après le 7 jours de traitement par laminarine, le nombre de cellules a diminué significativement par rapport aux cellules non traitées. Les taux de cellules traitées avec 1000 µg/ml de laminarin ont diminué significativement environ 4 fois par rapport aux cellules non

traitées et environ 2 fois pour les cellules traitées avec 100 µg/ml de laminarine comparativement à celles non traitées. En outre, nous avons également observé une légère diminution pour les cellules traitées avec 10 µg/ml de laminarine comparativement aux cellules non traitées.

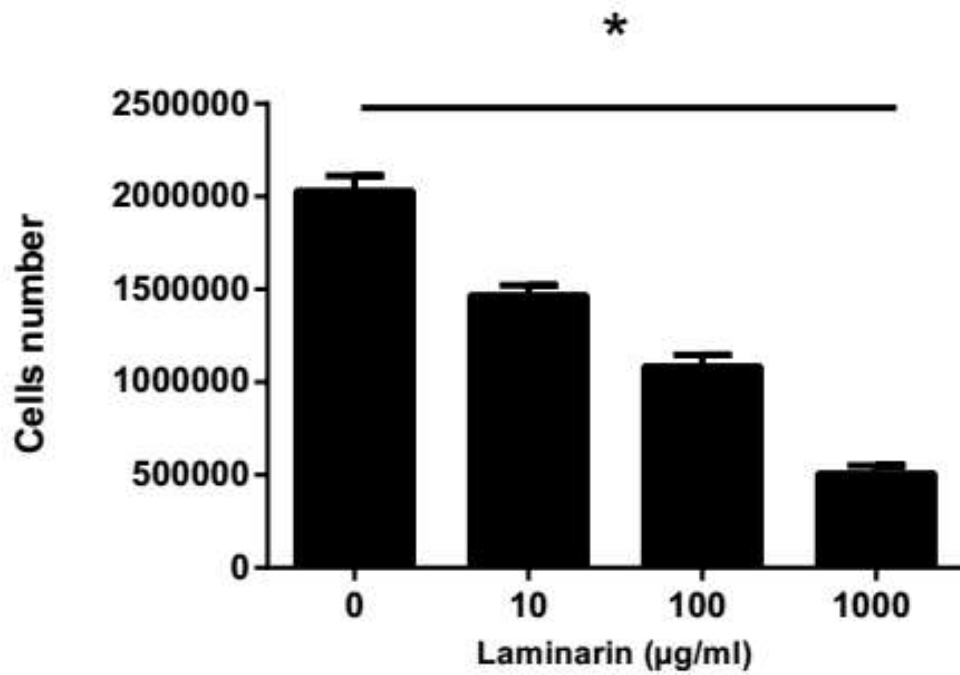
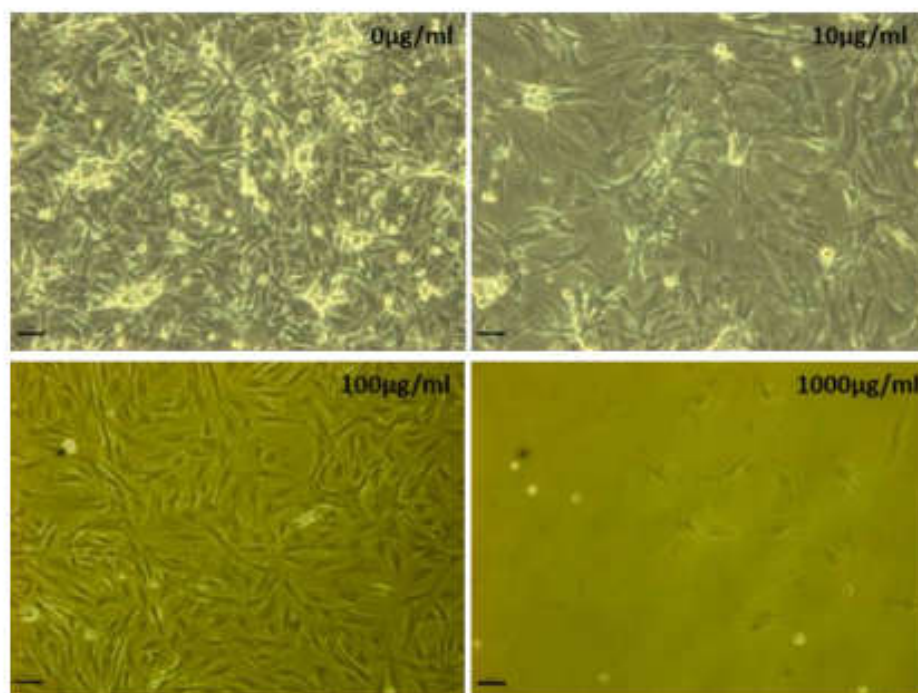
A**B**

Figure 16 : CSM après 7 jours de traitement par la laminarine. (A) Comptage des cellules au jour 7. Les données (n = 3 répliques biologiques) sont présentées en tant que moyenne $\pm$ SEM (* p < 0,05). (B) Microscopie des CSM au jour 7 (X20). Les cellules ont été cultivées dans du milieu de base et traitées avec la laminarine (0, 10, 100 et 1000 µg / ml) pendant 7 jours. (Barre graduée 20 µm).

1.4.2. Prolifération et Viabilité

Afin d'explorer l'effet de la laminarine sur la croissance des CSM, le taux de prolifération a été exploré par le test MTT (figure 17 A). Les résultats ont montré qu'après 24 h, seulement le taux de prolifération des cellules traitées par 1000µg/ml de laminarine a diminué significativement par rapport aux cellules non traité ($44\% \pm 3$). Pourtant, une telle diminution pourrait résulter soit d'une augmentation de l'apoptose, soit d'une diminution du taux de prolifération. Par conséquent, l'apoptose a été explorée en utilisant une sonde fluorescente annexine-FITC avec un control positif testé en utilisant des CSM incubées avec de l'étoposide 100 µM pendant 24 heures (figure 17 B). Les résultats de la microscopie d'épifluorescence n'ont démontré aucune émission d'annexine-FITC confirmant l'absence d'induction d'apoptose pour des cellules souches incubées avec 10, 100 et 1000 µg/ml de laminarine.

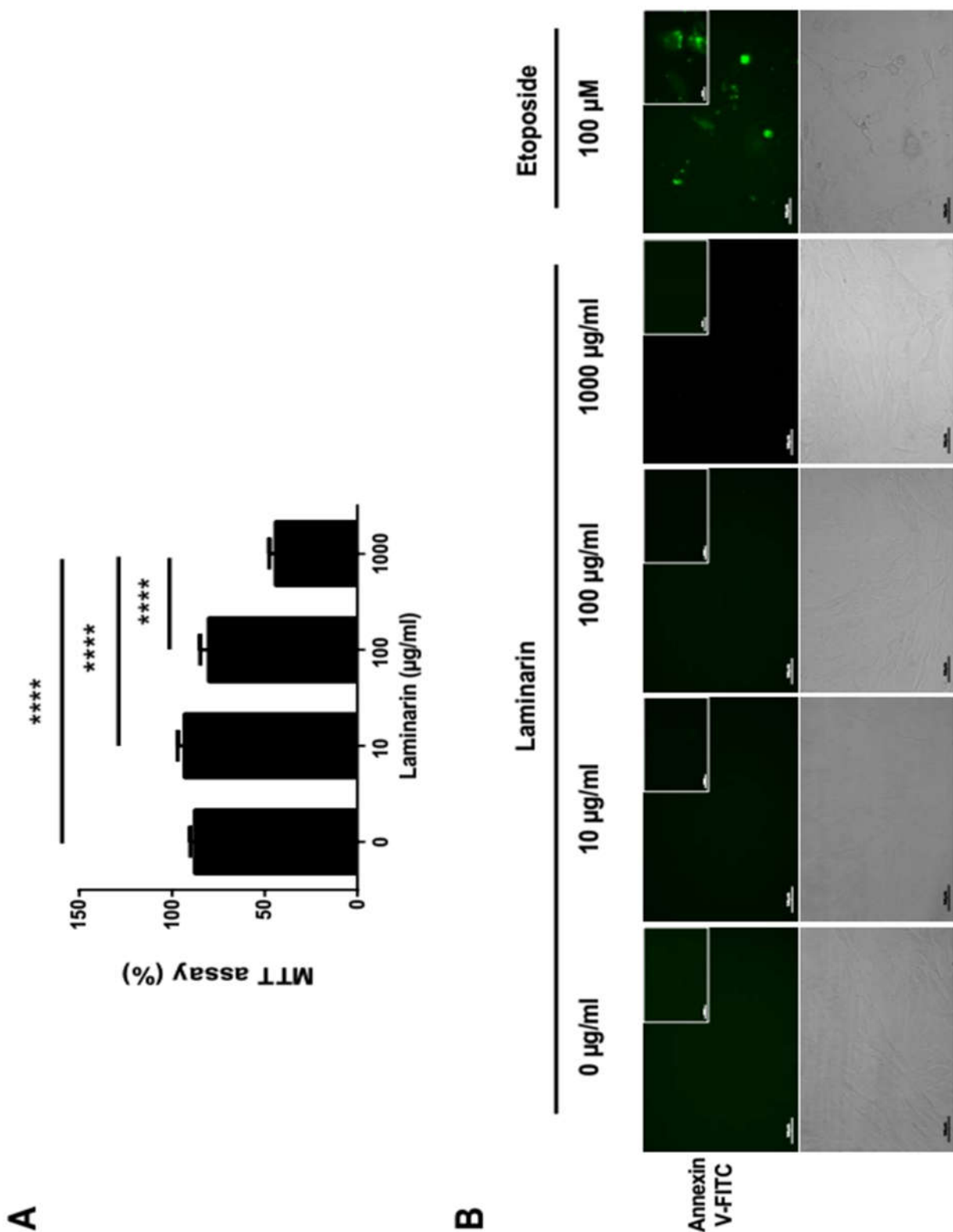


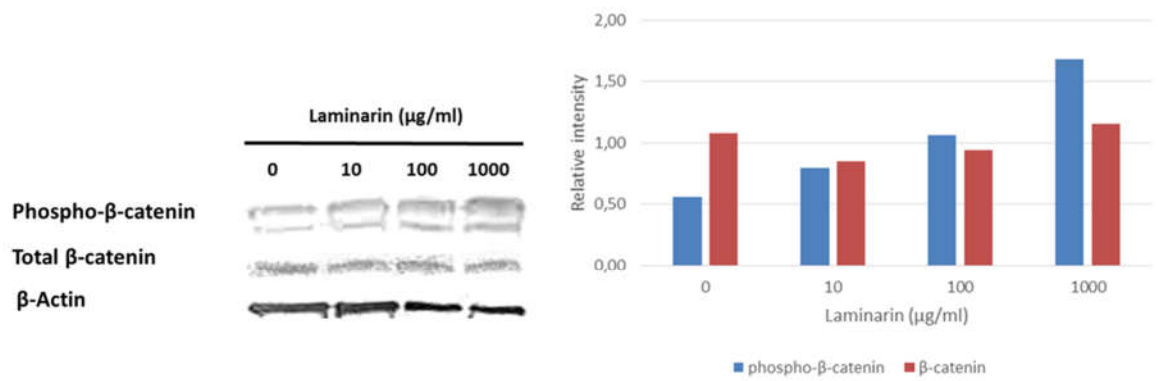
Figure 17 : Viabilité et prolifération des CSM. (A) Effet des différentes doses de laminarine sur la prolifération cellulaire des CSM. Les données (n = 6 répliques biologiques) sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SEM (* p < 0,05). (B) Effet des différentes doses de laminarine sur l'apoptose des CSM. Les cellules ont été cultivées dans du milieu basique puis traitées avec de la laminarine (0, 10, 100 et 1000 µg / ml) et de l'étoposide 100 µM pendant 24 h. (Barre graduée 50 µm pour un grossissement de 20x et 20 µm pour un grossissement de 63x)

1.4.3. Implication de la voie du signal wnt / b-catenin dans l'inhibition de la croissance des CSM par la laminarine

Comme le montre la figure 18 A, l'étude par Western Blot des taux de la protéine β -caténine totale sont demeurés presque stables, alors que les taux de protéines phosphatées de la β -caténine (phospho- β -caténine) ont augmenté pour les cellules traitées par 100 et 1000 $\mu\text{g/ml}$ de laminarine.

La cycline D1 est une protéine cible modulée par la voie wnt / β -catenin. Afin de mieux examiner l'activité de la voie de signalisation wnt / β -catenin, nous avons étudié l'expression de la cycline D1. L'analyse Western Blot a montré que les niveaux de protéines cycline D1 a diminué avec le temps croissant d'incubation avec la laminarine pour les cellules traitées de 100 et de 1000 $\mu\text{g/ml}$, ainsi que pour les cellules traitées par 5 et 10 mM d'aspirine (figure 18 B).

A



B

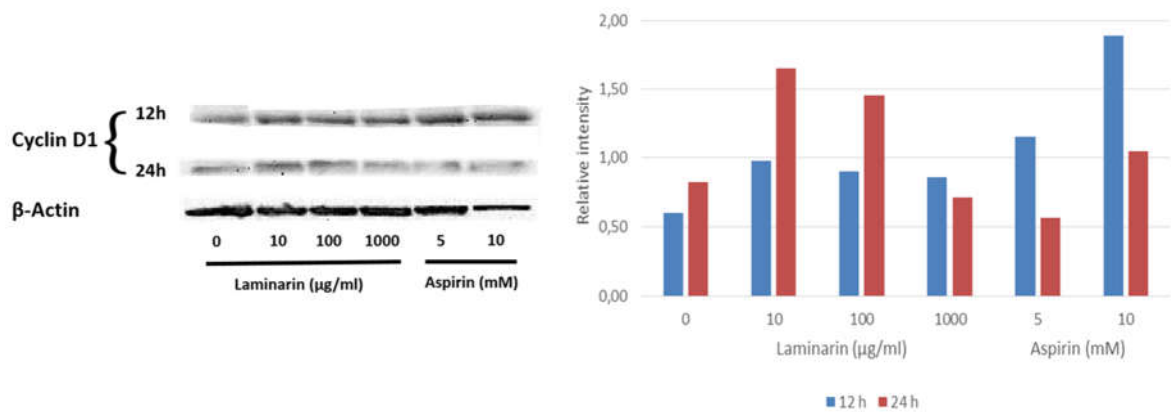


Figure 18 : Effet de la laminarine sur la voie de signalisation wnt/ β-caténine des CSM. (A) La β-caténine et la phospho-β-caténine. les cellules ont été incubées pendant 7 jours dans du milieu de croissance de CSM et traitées avec de la laminarine (0, 10, 100 et 1000 µg/ml) (B) La cycline D1. les cellules ont été incubées pendant 48h heures dans leurs milieu basique ensuite traitées avec de la laminarine (0, 10, 100 et 1000 µg / ml) et de l'aspirine (5 et 10mM).

1.4.4. L'expression des marqueurs des CSM sous la stimulation de la laminarine

ARNm :

Lorsqu'on a étudié l'expression des ARNm du Nucléostémin, Endoglin et Thy1 des CSM après 7 jours de culture sous le traitement des différentes doses de laminarine (0, 10, 100 et 1000 µg/ml), les analyses de ces derniers par RT-qPCR n'ont montré aucune différence significative entre celles des cellules traitées et celles des cellules non traitées à la laminarine comme l'indique la figure 19.

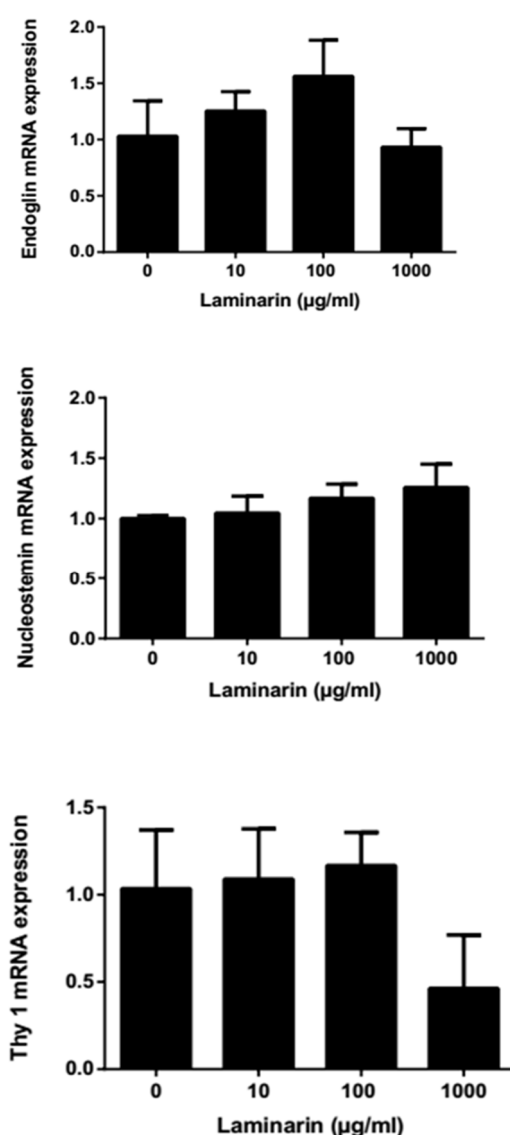


Figure 19 : les marqueurs des CSM sous le traitement de la laminarine. (A) Effet de la laminarin sur les marqueurs définissant les CSM (Nucleostemin, Endoglin et Thy1). Les cellules ont été cultivées dans un milieu de non-différenciation (de base) et traitées avec de la laminarine (0, 10, 100 et 1000 µg/ml) pendant 7 jours. Les données (n = 3 répliques biologiques) sont présentées en moyenne $\pm$ SEM.

Immunomarquage :

Après 7 jours de culture dans le milieu de croissance des CSM avec les différentes doses de laminarine (0, 10, 100 et 1000 $\mu\text{g/ml}$), toutes les cellules de toutes les condition expérimentales expriment le signal fluorecscnt du nucléostémin (en rouge) dans les noyaux des cellules marquées en blue.

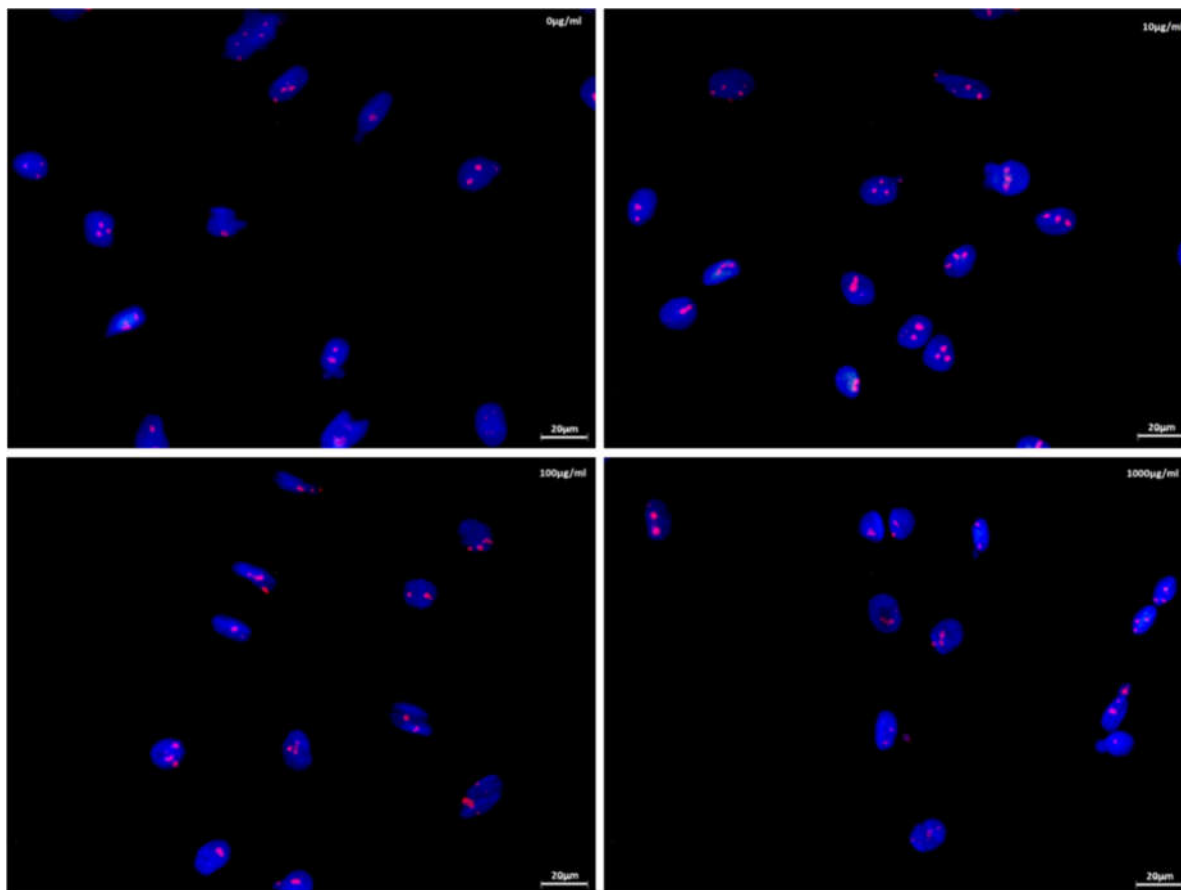


Figure 20 : Immunomarquage de la Nucléostémine dans les CSM au J7 : Double immunomarquage des noyaux (bleu), (A) Nucléostémine (rouge). Les cellules sont observées sous un microscope à épifluorescence x40. Les cellules ont été cultivées dans du milieu de croissance et traitées avec la laminarine (0, 10, 100 et 1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$) pendant 7 jours.

Discussion

Dans cette partie de notre étude, où la culture des CSM est faite dans un milieu de non-différentiation (basique) ne contenant pas des facteurs de croissance spécifiques mais seulement 10% du sérum, nous avons fourni un nouvel aperçu du mécanisme sous-jacent la prolifération des CSM liées au traitement du laminarine. En effet, nous avons montré que cette influence est dose-dépendante et que la dose de 1000 µg/ml de laminarine semble avoir l'impact le plus prononcé sur l'inhibition de la prolifération des CSM. Des études antérieures ont montré que les β -glucanes administrés par voie intraveineuse à des souris ont la capacité de stimuler la prolifération, la différenciation et l'activation des cellules souches via l'activation du complément récepteur CR3 [308]. Une étude récente a montré qu'un β -glucane dérivé de levure induit la maturation de lignées cellulaires de lymphome B humain, par liaison à la Dectine-1, sans affecter leur prolifération et leur viabilité [309]. Pour étudier davantage l'effet de la laminarine sur les CSM, nous avons effectué un test MTT pour comprendre si c'est le taux de prolifération qui diminue, ou si c'est l'apoptose qui serait induite par la laminarine en utilisant le kit de détection d'apoptose de l'annexine V-FITC. Les résultats ont montré que pour toutes les doses, la laminarine n'a pas induit d'apoptose pour les cellules souches mésenchymateuses confirmant son rôle d'inhibition de la prolifération. Nos résultats concordent avec ceux rapportés par Ferrières, Vetvicka, Daniellou et ses collègues qui ont montré que la laminarine supprimait la formation des sphéroïdes et la prolifération des cellules souches cancéreuses du colon tout en évaluant l'impact des β -glucanes sur les activités immunostimulatrices et le développement des cellules souches cancéreuses [310]. Nous avons aussi comparé l'effet de la laminarine à celui de l'aspirine sur la voie de signalisation Wnt/ β -catenin. Dans cela, nous avons démontré une augmentation dans la synthèse de la protéine phosphatée de la β -caténine des CSM traitées par les doses 100 et 1000 µg/ml de laminarine. Toutefois on observe aussi une diminution dans la synthèse de la protéine cyclin D1 au cours du temps pour les CSM traitées par les mêmes doses. Sachant que l'aspirine inhibe la prolifération des CSM et régule négativement la voie de signalisation Wnt/ β -catenin [311]. Nos résultats suggèrent également que les marqueurs des CSM sont restés inchangés après 7 jours de culture avec la présence de laminarine. L'expression de l'ARNm de Nucleostemin, Thy1 et Endoglin n'a montré aucune différence significative entre les cellules traitées et non traitées. Il est bien documenté que l'une des fonctions des MSC est

de servir de gardiens contre les réponses inflammatoires excessives [312] et précédemment, le zymosan, un glucane préparé à partir des parois cellulaires de la levure a été capable de renforcer l'action anti-inflammatoire des CSM [139]. Néanmoins, il a été démontré que la courte stimulation des CSM humaine avec des lipopolysaccharides (LPS) passe à travers les TLR 4 et leurs élabore un profil pro-inflammatoire tandis que l'activation des TLR 3 par les poly(I:C) stimule les CSM vers un profil immunosuppressif [313]. Ces observations ont montré pour la première fois que le traitement par la laminarine diminue la prolifération des CSM sans induire leur apoptose ou modifier leurs phénotypes.

1.5. Différentiation des CSM sous la stimulation de laminarine

1.5.1. 7, 14 et 21 jours

Dénombrement des cellules :

Sous la condition de culture des CSM en voie de différenciation chondrocytaire, les cellules ont étéensemencées au nombre de 10^4 dans des plaques à 6 puits puis traitées avec 0, 10, 100 ou 1000 $\mu\text{g/ml}$ de laminarin. Après 7 jours de chondrogénèse, le nombre de cellules traitées avec de la laminarine 1000 $\mu\text{g/ml}$ a été significativement réduit de 4 fois par rapport à ceux non traités ($p < 0,05$). De façon similaire, lorsque les cellules traitées avec de la laminarine à 100 $\mu\text{g/ml}$ par rapport à celles non traitées, elles ne diminuent que 3 fois mais sans atteindre le niveau de signification (figure 21). Après 14 jours de chondrogenèse, le nombre de cellules traitées avec de la laminarine 1000 $\mu\text{g/ml}$ a été significativement réduit de 8 fois par rapport à ceux non traités ($p < 0,05$). Cependant, le nombre de cellules traitées avec la laminarine 10 ou 100 $\mu\text{g/ml}$ a diminué légèrement par rapport aux cellules non traitées sans montrer une différence significative (figure 22). A 21 jours, les observations visuelles à l'aide de microscope ont suggéré une énorme différence sur le taux de prolifération cellulaire entre les cellules traitées à la laminarine et celles non traitées, en particulier entre 0 et 1000 $\mu\text{g/ml}$ de concentration. Malheureusement, ces observations ne peuvent être confirmées quantitativement en raison du nombre élevé de cellules qui ont formé de multiples couches indissociables. (Figure 23).

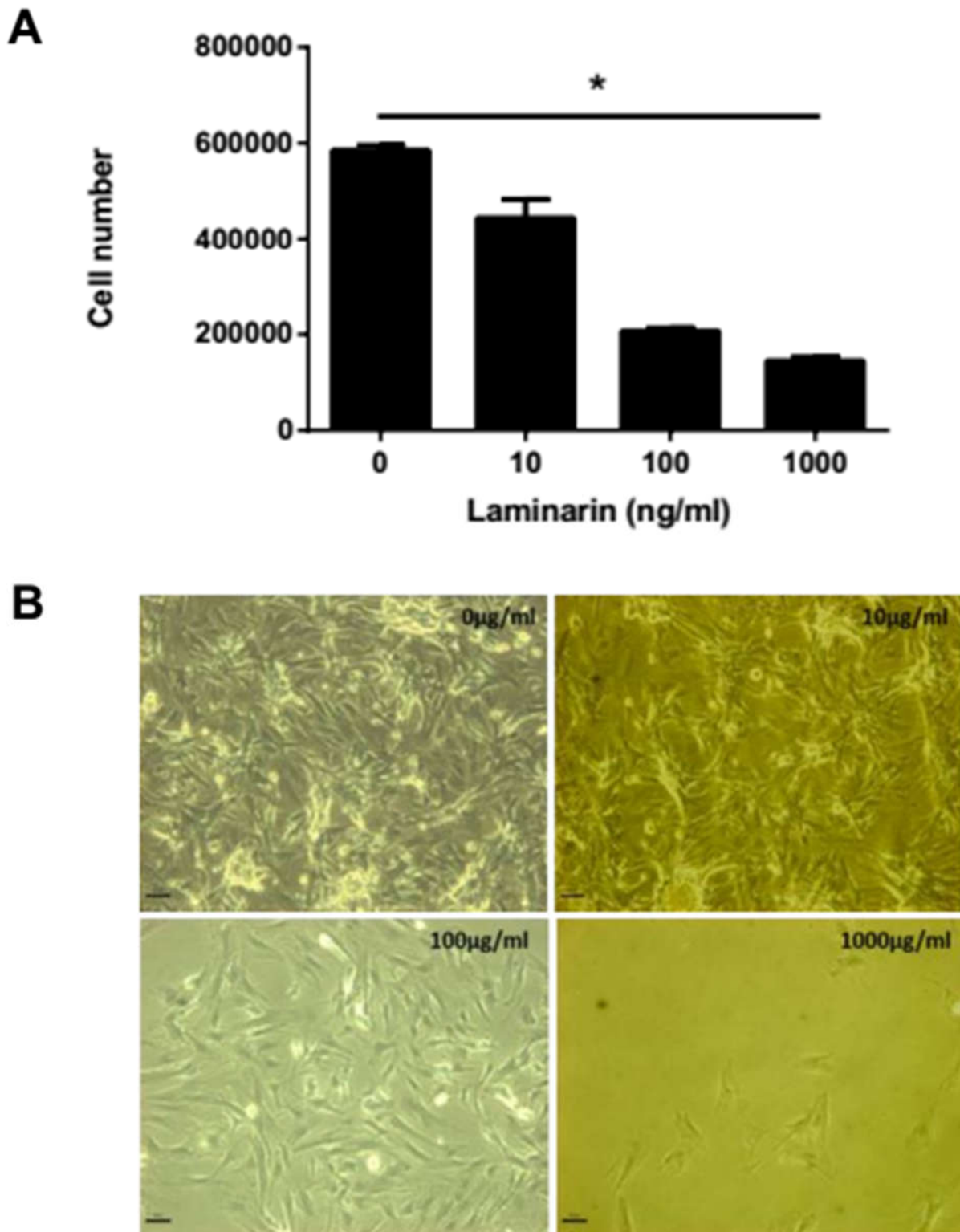


Figure 21 : Dénombrement des CSM après 7 jours de différenciation chondrocytaire sous traitement de la laminarine. (A) Comptage des cellules au jour 7. Les données ($n = 3$ répliques biologiques) sont présentées en tant que moyenne $\pm$ SEM (* $p < 0,05$). (B) Microscopie des CSM au jour 7. Les cellules ont été cultivées dans du milieu de différenciation chondrocytaire et traitées avec la laminarine (0, 10, 100 et 1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$) pendant 7 jours. (Barre graduée 20 μm , grossissement (X20)).

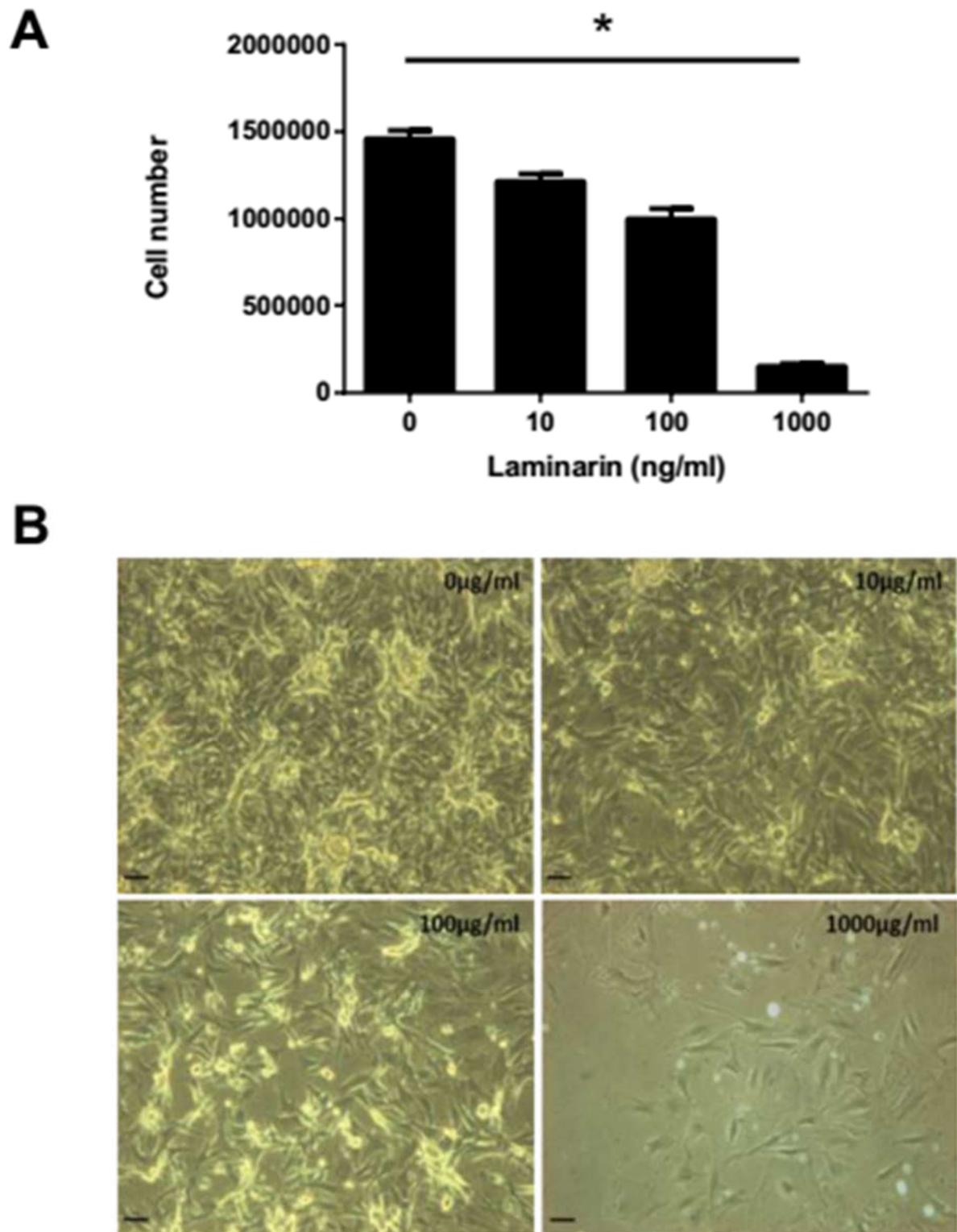


Figure 22 : Comptage des CSM après 14 jours de différenciation chondrocytaire sous traitement de la laminarine. (A) Comptage des cellules au jour 14. Les données ($n = 3$ répliques biologiques) sont présentées en tant que moyenne $\pm$ SEM (* $p < 0,05$). (B) Microscopie des CSM au jour 14. Les cellules ont été cultivées dans du milieu de différenciation chondrocytaire et traitées avec la laminarine (0, 10, 100 et 1000 $\mu\text{g/ml}$) pendant 14 jours. (Barre graduée 20 μm , grossissement (X20)).

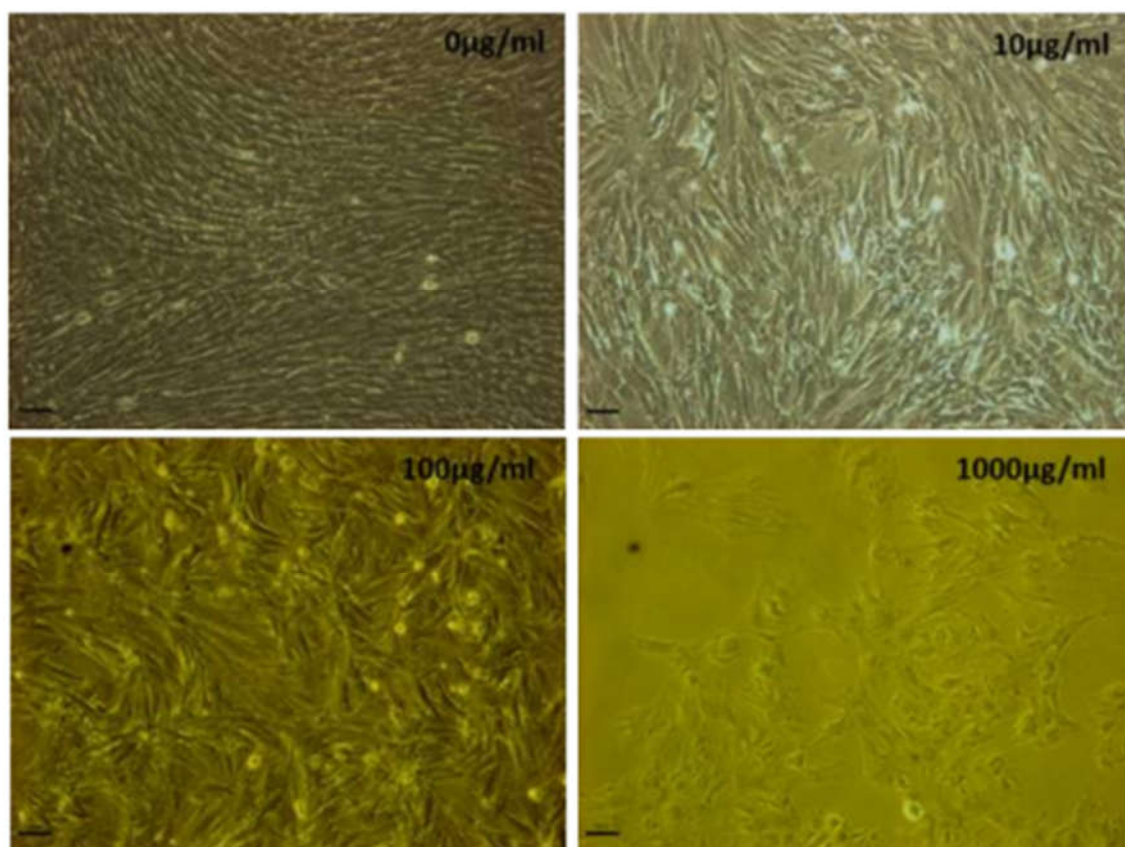


Figure 23 : Microscopie des CSM au jour 21. Les cellules ont été cultivées dans du milieu de différenciation chondrocytaire et traitées avec la laminarine (0, 10, 100 et 1000 µg/ml) pendant 21 jours. (Barre graduée 20 µm, grossissement (X20)).

Expression de l'ARNm des marqueurs définissant les CSM :

Lorsqu'on a étudié l'expression des ARNm de la Nucléostémine, Endogline et Thy1 des CSM après 7 jours (figure 24), 14 jours (figure 25) et 21 jours (figure 26) de culture sous le traitement des différentes doses de laminarine (0, 10, 100 et 1000 $\mu\text{g/ml}$), les analyses de ces derniers par RT-qPCR ont montré une diminution significative du niveau d'ARNm de Thy1 pour toutes les conditions de concentration de laminarine en comparaison aux cellules non traitées. Tandis que l'expression d'ARNm de Nucléostémine et de l'Endogline pour toutes les cellules traitées ne présentait pas de différence significative par rapport aux cellules non traitées.

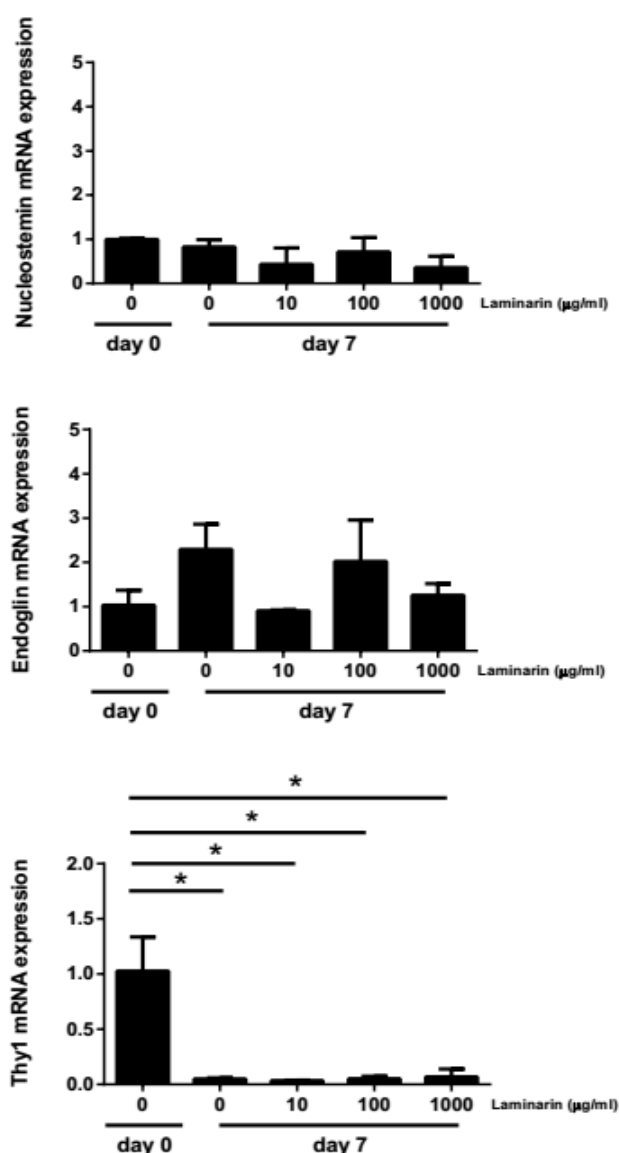


Figure 24 : Effet de la laminarine sur les marqueurs définissant les CSM (Nucléostémine, Endogline et Thy1) lors de la différenciation chondrogénique à J 7. Les cellules ont été cultivées en milieu de chondrogène et traitées avec de la laminarine (0, 10, 100 et 1000 $\mu\text{g/ml}$) pendant 7 jours. Les données ($n = 3$ répliques biologiques) sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SEM (* $p < 0,05$).

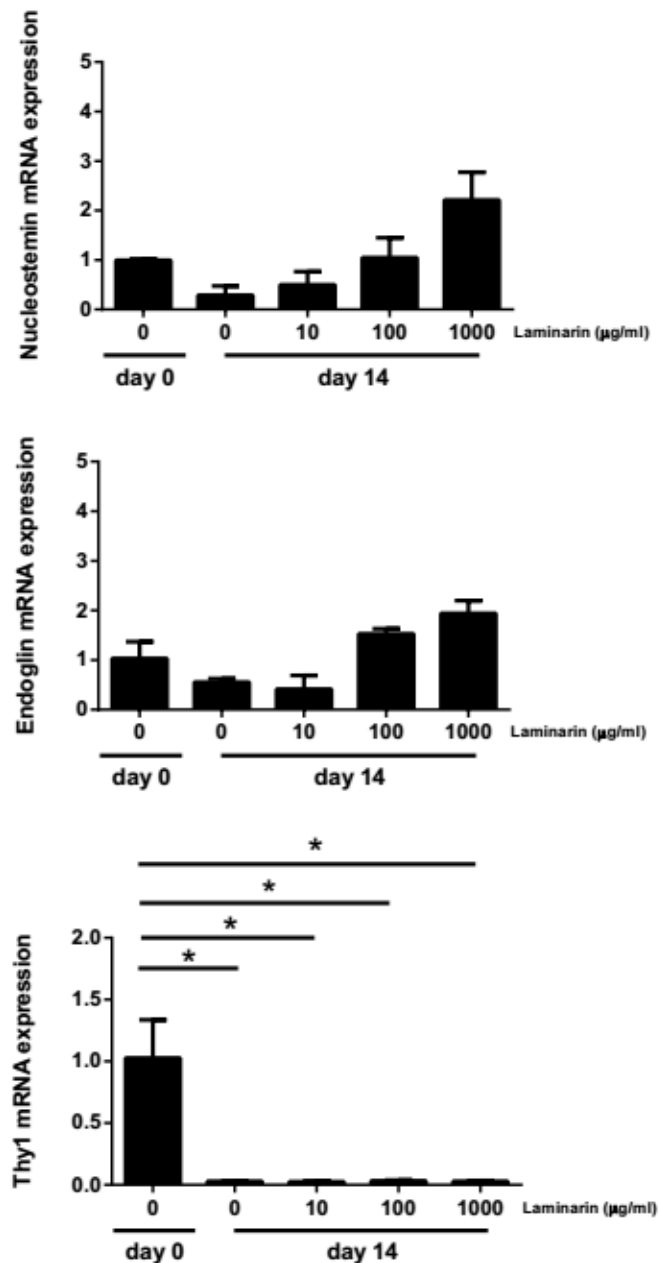


Figure 25 : Effet de la laminarine sur les marqueurs définissant les CSM (Nucléostemine, Endogline et Thy1) lors de la différenciation chondrogénique à j 14. Les cellules ont été cultivées en milieu différenciation chondrocytaire et traitées avec de la laminarine (0, 10, 100 et 1000 ug/ml) pendant 14 jours. Les données (n = 3 répliques biologiques) sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SEM (* p < 0,05).

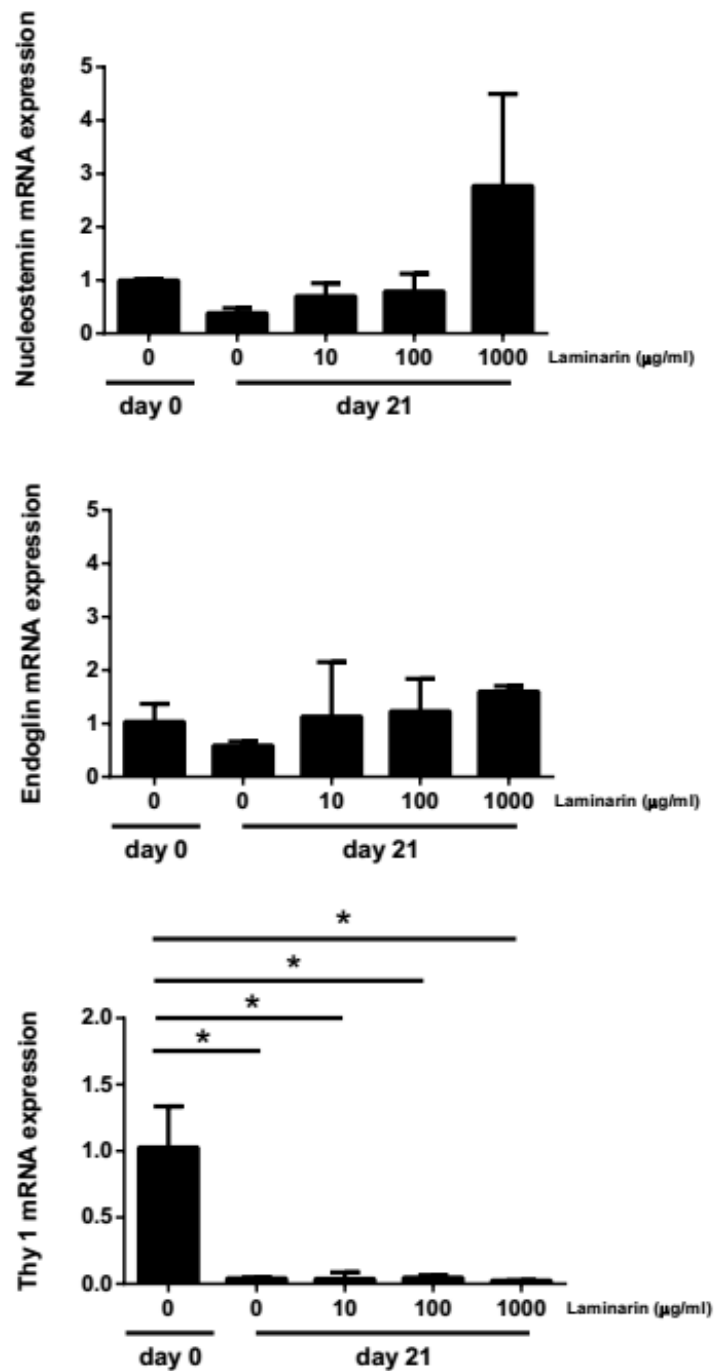


Figure 26 : Effet de la laminarine sur les marqueurs définissant les CSM (Nucléostemine, Endogline et Thy1) lors de la différenciation chondrogénique à j 21. Les cellules ont été cultivées en milieu de différenciation chondrocytaire et traitées avec de la laminarine (0, 10, 100 et 1000 ug/ml) pendant 21 jours. Les données (n = 3 répliques biologiques) sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SEM (* p < 0,05).

Expression de l'ARNm des marqueurs définissant les chondrocytes :

Après 7 jours (figure 27), 14 jours (figure 28) et 21 jours (figure 29) de culture en voie de différenciation chondrocytaire sous le traitement des différentes doses de laminarine (0, 10, 100 et 1000 µg/ml), l'expression des ARNm du collagène II et de l'aggrécane étaient significativement plus élevés pour toutes les cellules traitées en laminarine (10, 100 et 1000 µg/ml) par rapport aux cellules non traitées ($p < 0,05$).

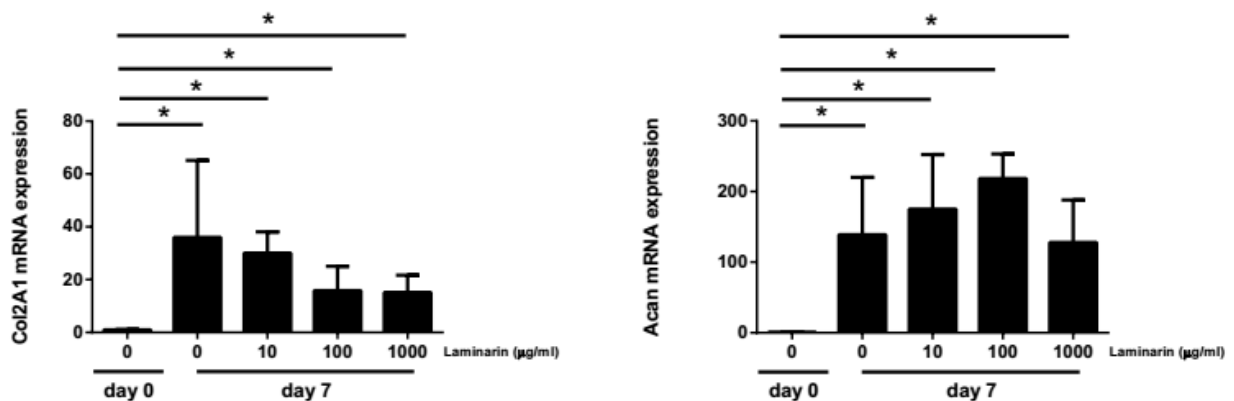


Figure 27 : Effet de la laminarine sur les marqueurs des chondrocytes (Collagène II et Aggrécane) lors de la différenciation chondrogénique des CSM à j 7. Les cellules ont été cultivées en milieu de différenciation chondrocytaire et traitées avec la laminarine (0, 10, 100 et 1000 µg/ml) pendant 7 jours. Les données (n = 3 répliques biologiques) sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SEM (* $p < 0,05$).

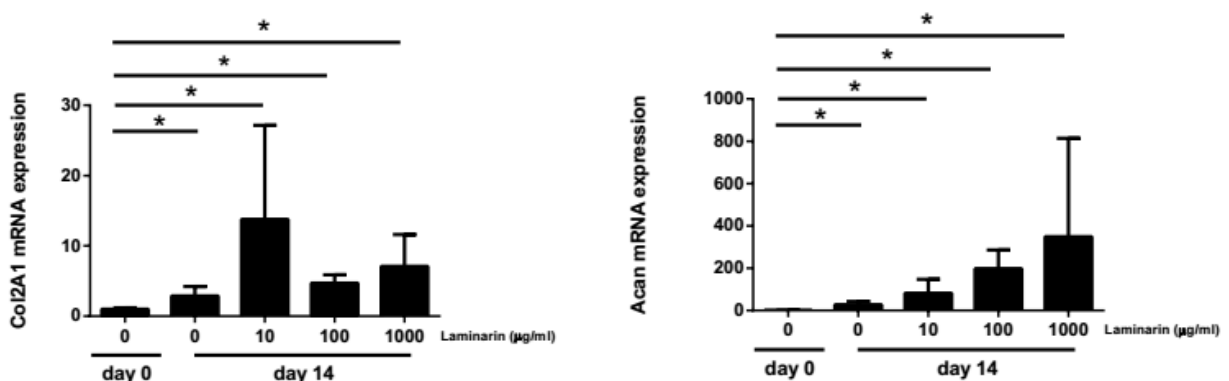


Figure 28 : Effet de la laminarine sur les marqueurs des chondrocytes (Collagène II et Aggrécane) lors de la différenciation chondrogénique des CSM à j 14. Les cellules ont été cultivées en milieu de différenciation chondrocytaire et traitées avec la laminarine (0, 10, 100 et 1000 µg/ml) pendant 14 jours. Les données (n = 3 répliques biologiques) sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SEM (* $p < 0,05$).

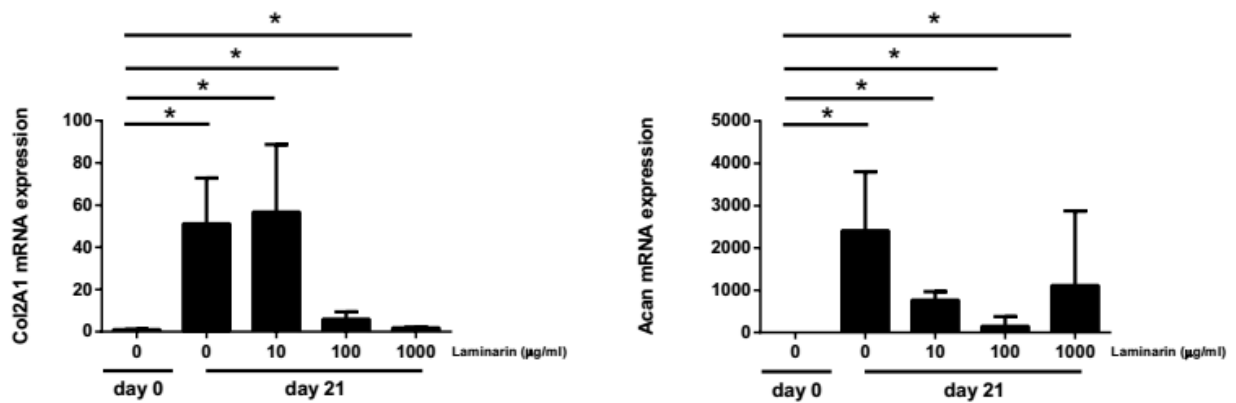


Figure 29 : Effet de la laminarine sur les marqueurs des chondrocytes (Collagène II et Aggrecane) lors de la différenciation chondrogénique des CSM à j 21. Les cellules ont été cultivées en milieu de différenciation chondrocytaire et traitées avec la laminarine (0, 10, 100 et 1000 µg/ml) pendant 21 jours. Les données (n = 3 répliques biologiques) sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SEM (* p < 0,05).

Immunomarquage du nucléostémine et du collagène II

Après 7 jours (figure 30), 14 jours (figure 31) et 21 jours (figure 32) de culture dans le milieu de différenciation chondrocytaire sous le traitement des différentes doses de laminarine (0, 10, 100 et 1000 µg/ml), le signal fluorescent de la nucléostémine (en rouge dans les noyaux marqués en blue) est visiblement plus fort chez les cellules traitées par 100 et 1000 µg/ml de laminarine par rapport aux cellules traitées par 10 µg/ml et aux cellules non traitées. Tandis que le signal fluorescent du collagène II (en vert dans le cytoplasme) est visiblement plus fort chez les cellules non traitées et traitées par 10 µg/ml de laminarine par rapport aux cellules traitées par 100 et 1000 µg/ml.

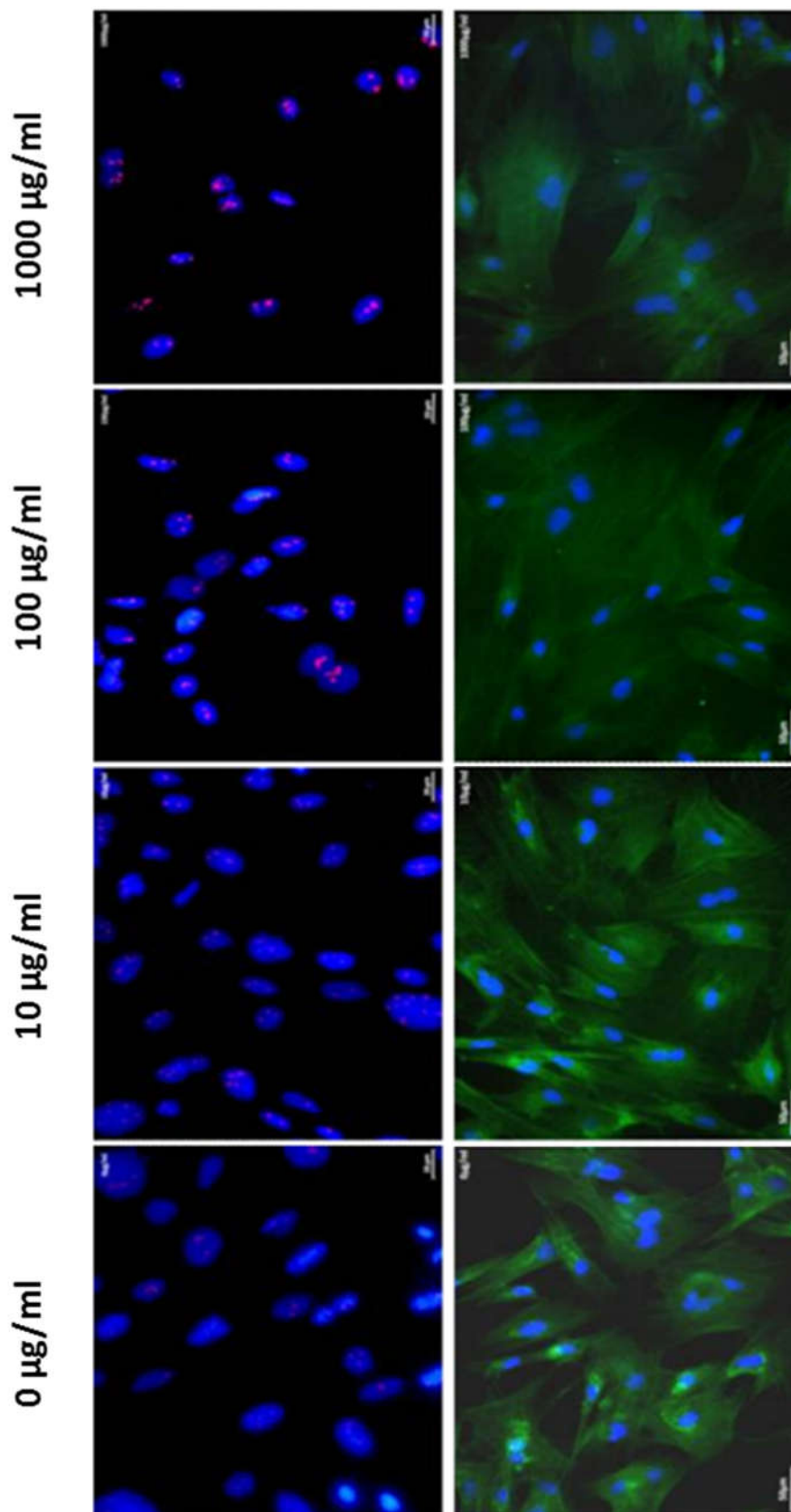


Figure 30 : Immunomarquage du Nucléostémine et du collagène II des CSM en voie de différenciation chondrocytaire au J 7 : Double immunomarquage des noyaux (bleu), Nucléostémine (rouge) et collagène II (vert). Les cellules sont observées sous un microscope à épifluorescence x40. Barre graduée : 30 µm pour le marquage de nucléostémine et 50 µm pour le collagène.

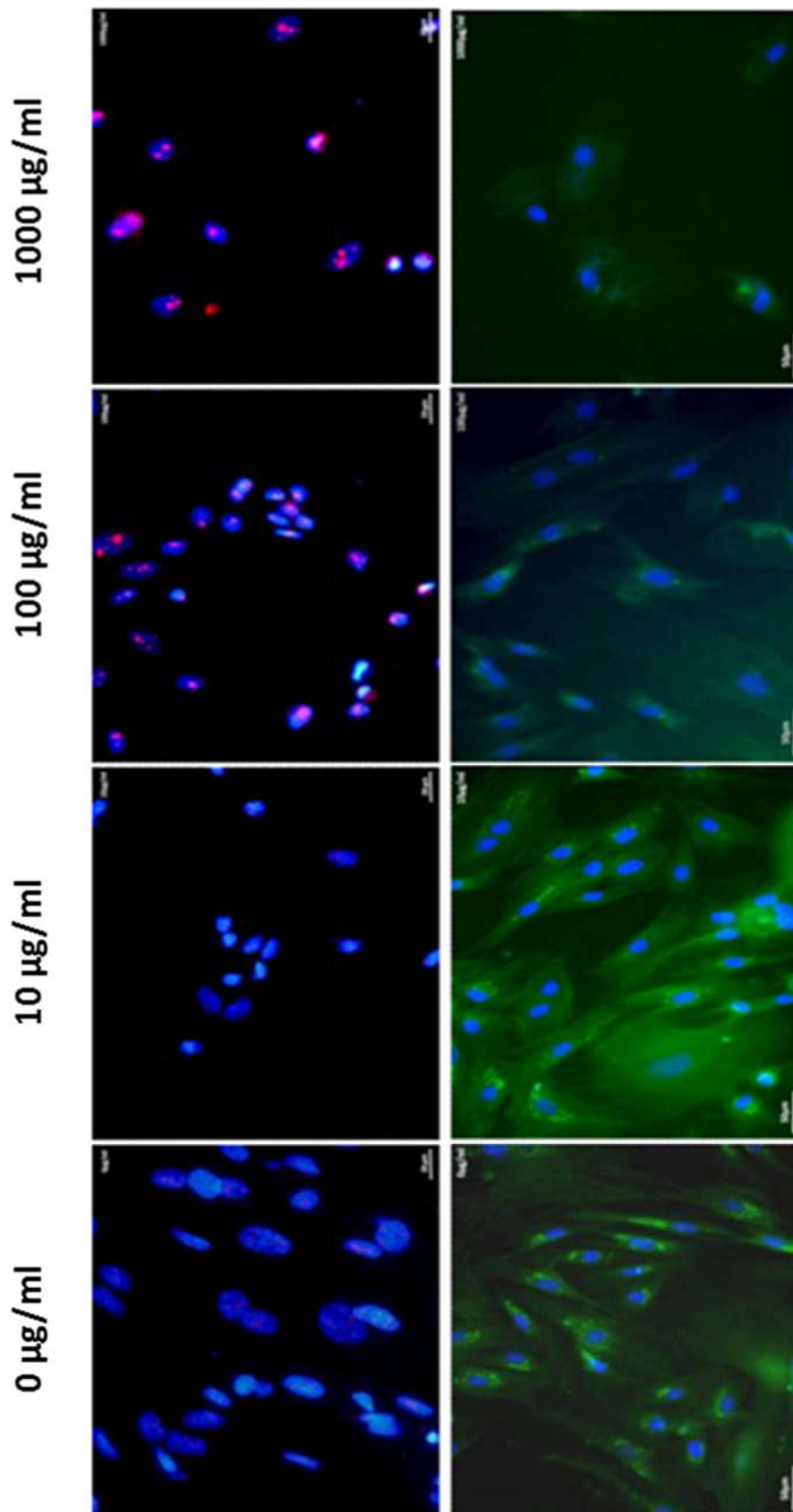


Figure 31 : Etude par immunomarquage du Nucléostémine et du collagène II des CSM en voie de différenciation chondrocytaire au J 14 : Double immunomarquage des noyaux (bleu), Nucléostémine (rouge) et collagène II (vert). Les cellules sont observées sous un microscope à épifluorescence x40. Barre graduée : 30 µm pour le marquage de nucléostémine et 50 µm pour le collagène.

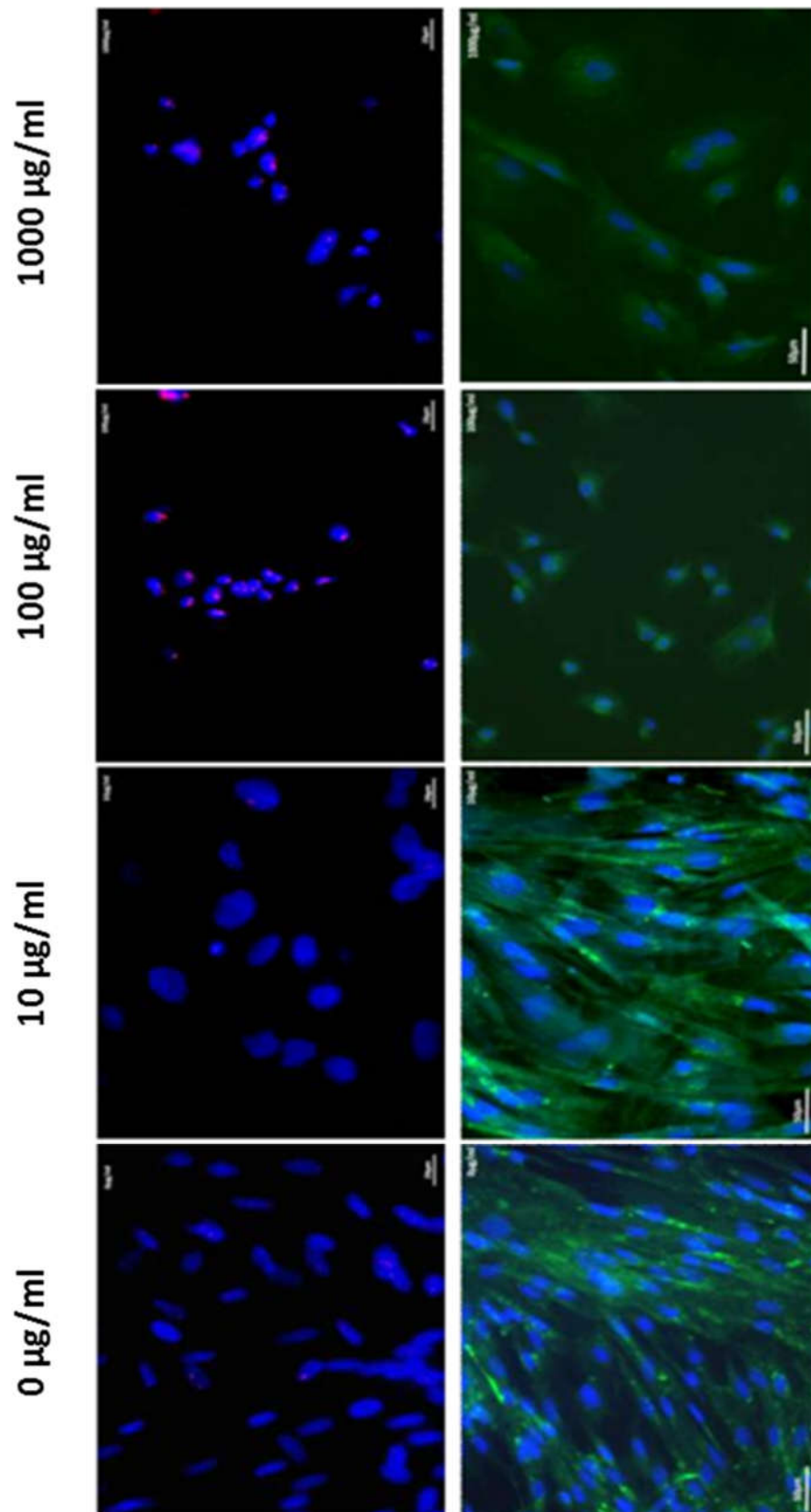


Figure 32 : Etude par immunomarquage du Nucléostémine et du collagène II des CSM en voie de différenciation chondrocytaire au J 14 : Double immunomarquage des noyaux (bleu), Nucléostémine (rouge) et collagène II (vert). Les cellules sont observées sous un microscope à épifluorescence x40. Barre graduée : 30 µm pour le marquage de nucléostémine et 50 µm pour le collagène.

1.6. Différentiation des CSM en adipocytes sous la stimulation de laminarine

Après 21 jours de culture dans le milieu de différenciation adipocytaire sous le traitement des différentes doses de laminarine (0, 10, 100 et 1000 $\mu\text{g/ml}$), les images de coloration par le Oil Red O montrent la présence des lipides marqué en rouge sur toutes les cellules traitées et non traitées par la laminarine.

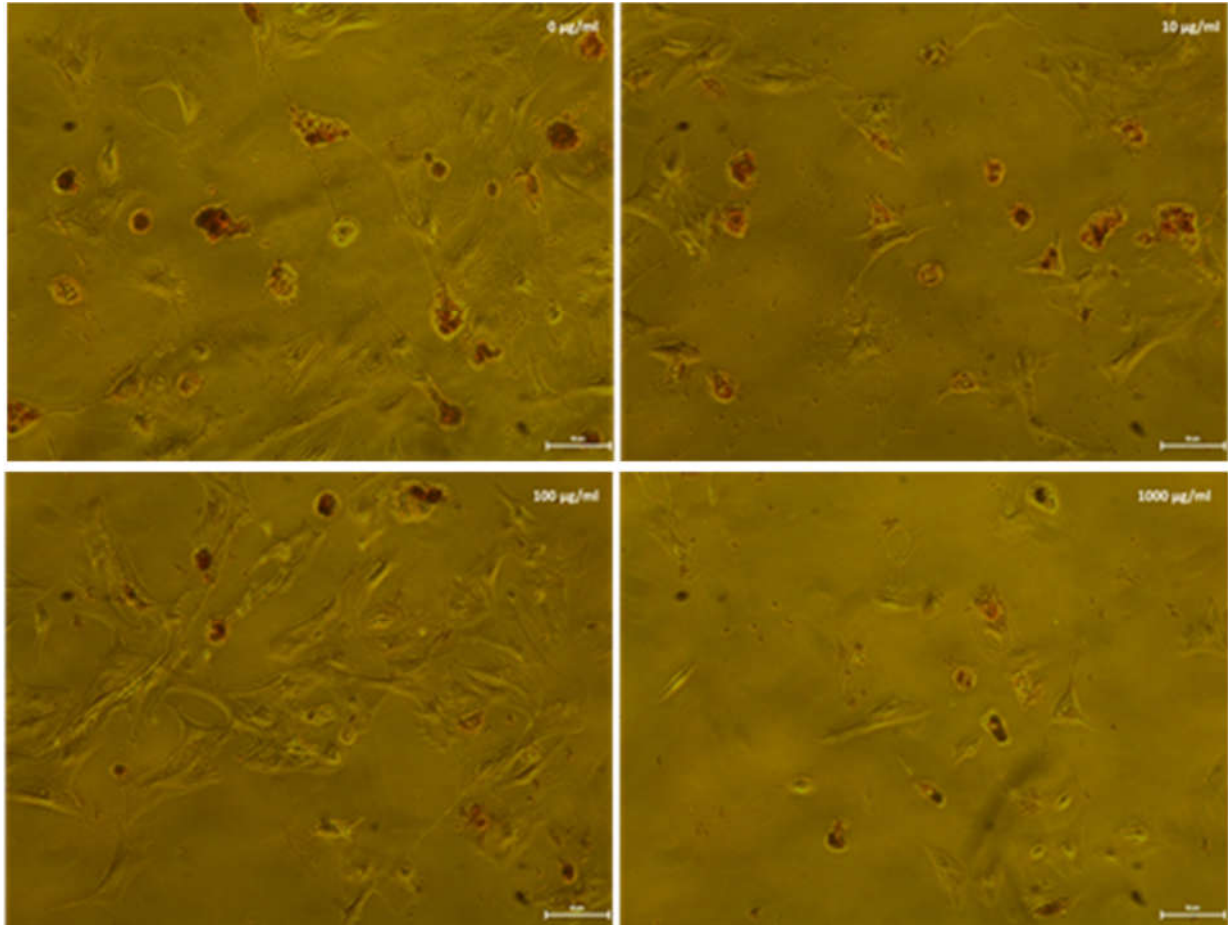


Figure 33 : Coloration des cellules avec Oil Red O après 21 jours de culture en milieu de différenciation adipocytaire. Les cellules ont été lavées avec du PBS et fixées dans 10% de formol pendant 1 h à 4 ° C, colorés pendant 15 minutes à température ambiante avec une solution de travail de Oil Red O, puis Rincé 3 fois avec de l'eau distillée. (Barre graduée 60 μm , grossissement (X40)).

Discussion

Lors de la différenciation chondrogénique des CSM, nos résultats ont démontré un effet inhibiteur de la laminarine sur la prolifération. Pourtant, bien que le nombre de cellules ait diminué pour toutes les doses de laminarine, seule la dose de 1000 µg/ml est statistiquement significative. Il est important de noter que des résultats d'études antérieures ont montré que le traitement par gavage avec le polycan qui est un β-glucane d'*Aureobasidium pullulans* purifié a induit une augmentation du taux de prolifération des chondrocytes dans le cartilage articulaire du tibia et du fémur chez des rats arthrosiques [305]. Bien que dans un cas pareil, l'hydrolyse de la laminarine serait catalysée par des enzymes laminarinases qui rompent les liaisons β- (1 → 3) [314], dans notre étude, les CSM ont été directement stimulés *in vitro* par la laminarine et nos résultats ont montré un effet inhibiteur de cette dernière sur la prolifération des CSM au cours de leur différenciation chondrocytaire.

En ce qui concerne les résultats de l'expression de l'ARNm de nucléostemine et de l'endogline pendant le processus de différenciation chondrogénique, nous n'avons pas montré de différence significative entre les cellules traitées à la laminarine et les cellules non traitées, malgré la légère augmentation du niveau de l'expression d'ARNm qu'on a remarqué pour les cellules traitées avec 100 et 1000 µg/ml à la fois pour la nucléostemine et l'endogline. Ces résultats ont été confirmés par une coloration par immunofluorescence qui a montré que les cellules traitées avec 100 et 1000 µg/ml de laminarine préservaient fortement le signal nucléostemine dans leurs noyaux durant le processus de différenciation chondrogénique. En outre, les cellules traitées avec 100 et 1000 µg/ml de laminarine ont exprimé un moindre signal de Collagène II comparativement à des cellules traitées à 10 µg/ml et celles non traitées. Par contre, seul le niveau d'ARNm de Thy1 présentait une perte remarquable dans toutes les cellules traitées à la laminarine par rapport aux cellules non traitées. Il est à noter que Thy1 est un marqueur définissant les CSM selon le Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee de la Société internationale pour la thérapie cellulaire [44].

Concernant les résultats de l'expression des ARNm des marqueurs chondrocytaires, nous avons démontré un niveau d'expression plus élevé de collagène II et de l'aggrecane dans les cellules de toutes les conditions expérimentales de traitement par la laminarine par rapport au CSM non différenciés. Le potentiel des CSM de la moelle osseuse ou du tissu adipeux pour se différencier en lignée chondrocytaire a été établi et diverses approches sont testées *in vitro*

pour l'utilisation de ces cellules pour générer du cartilage [315, 316]. Dans ce contexte, Helrosfen et ses collaborateurs ont démontré que l'ARNm codant pour le Collagène II et l'aggrécane était déjà très élevé au jour 7 de la différenciation chondrocytaire *in vitro* des CSM dérivées de moelle osseuse humaine [317]. De plus, il a été rapporté que le polycan a pu préserver la structure de la matrice extra cellulaire du cartilage dans un modèle d'arthrose murine rappelons que une étude antérieure a rapporté que le polycan a inhibé les modifications dégénératives du cartilage et la perte de la matrice du cartilage articulaire [305]. Tout en sachant que le Collagène II et l'aggrécane sont les protéines essentielle synthétisée par les chondrocytes pour construire le cartilage articulaire [318]. Pour les résultats d'immunofluorescence, nous avons observé une augmentation du signal de nucléostemine et une diminution du signal de collagène II lors de l'augmentation de la concentration en laminarine. Ce constat laisse supposer que des doses plus élevées de laminarine peuvent conserver le caractère « souche » des cellules durant la chondrogenèse. Dans notre étude, nous avons aussi stimulé les CSM avec les mêmes doses de la laminarine dans un contexte de différenciation adipocytaire, dans cela nous avons observé, lors d'une coloration avec Oil Red O, la présence des lipides chez toutes les cellules des différentes conditions expérimentales de traitement à la laminarine qui à priori ne semble pas inhiber l'adipogenèse des CSM après 21 jours. Malgré que les glucanes sont capables d'interagir avec une variété de récepteurs biologiques tel que le Dectin-1, le « Complement Receptor 3 » (CR3), les scavangers ou les récepteurs Toll-like (TLR) [319] seulement les TLR sont présents chez les CSM [320] et sont capable de répondre à des dérivés de bactéries et de sucres comme le poly (I: C) et le LPS qui activent particulièrement les TLR3 et 4 et induisent une inhibition de la différenciation adipocytaire [313]. Certes, nous n'avons pas identifié les récepteurs impliqués dans la liaison de la laminarine, mais nos résultats laissent supposer que la laminarine n'active pas les voies des TLR3 et 4.

2. Les cellules humaines :

2.1. Stimulation des CSM humaine avec la laminarine

2.1.1. Dénombrement des CSM humaine

Afin d'exploier la réaction des CSM sous stimulation de la laminarine in vitro, les cellules ont étéensemencées au nombre de 10^5 dans des flacons de 25 cm^2 puis traitées avec 0, 10, 100 ou 1000 $\mu\text{g/ml}$ de laminarine pendant 7 jours. D'après la figure 33 A, nos résultats ont montré que, après le 7 jours de traitement par laminarine, le nombre de cellules a diminué significativement par rapport aux cellules non traitées. Les taux de cellules traitées avec 1000 $\mu\text{g/ml}$ de laminarine ont diminué significativement environ 5 fois par rapport aux cellules non traitées et environ 1,5 fois pour les cellules traitées avec 100 $\mu\text{g/ml}$ de laminarine comparativement à celles non traitées. En outre, nous avons également observé une légère diminution pour les cellules traitées avec 10 $\mu\text{g/ml}$ de laminarine comparativement aux cellules non traitées.

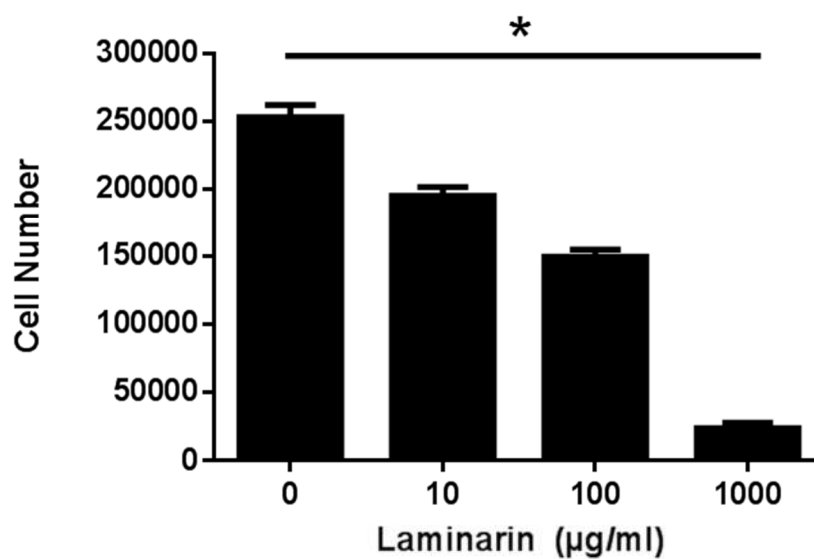
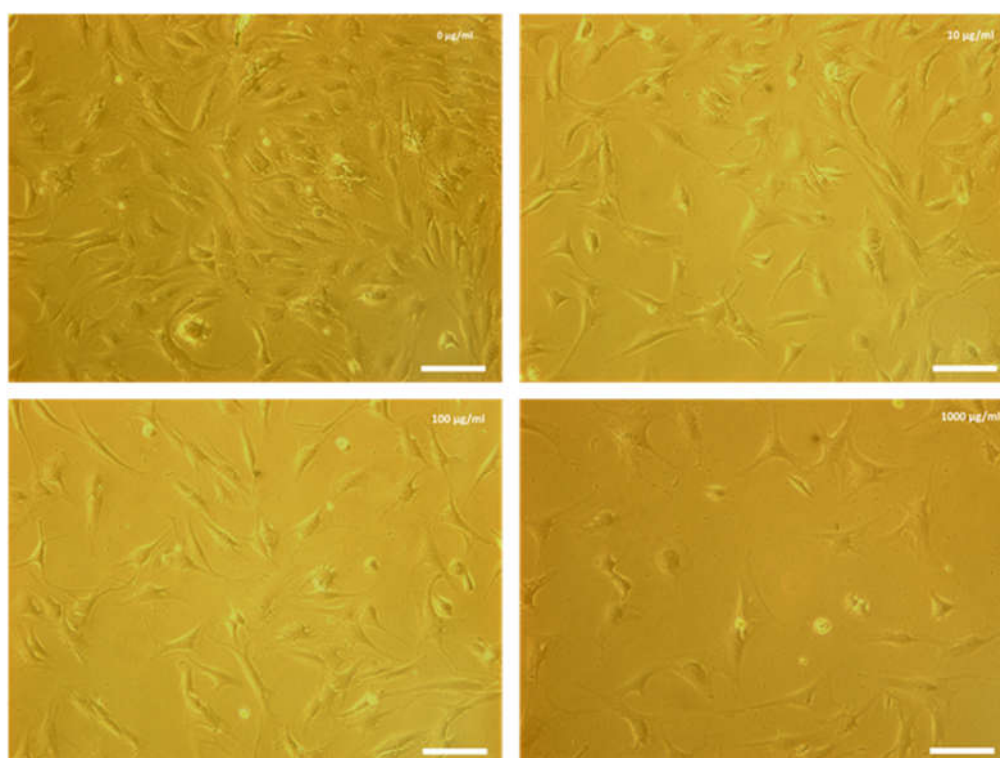
A**B**

Figure 34 : CSM humaines après 7 jours de traitement par la laminarine. (A) Comptage des cellules au jour 7. Les données ($n = 3$ répliques biologiques) sont présentées en tant que moyenne $\pm$ SEM (* $p < 0,05$). (B) Microscopie des CSM humaines au jour 7. Les cellules ont été cultivées dans un milieu de base et traitées avec la laminarine (0, 10, 100 et 1000 $\mu\text{g/ml}$) pendant 7 jours. (Barre graduée 60 μm , grossissement (X20)).

2.2. Prolifération et viabilité

Afin d'explorer l'effet de la laminarine sur la croissance des CSM humaines, le taux de prolifération a été exploré par le test MTT. Les résultats ont montré qu'après 24 h, seulement le taux de prolifération des cellules traitées par 1000 µg/ml de laminarine a diminué significativement par rapport aux cellules non traitées ($62.33\% \pm 3$).

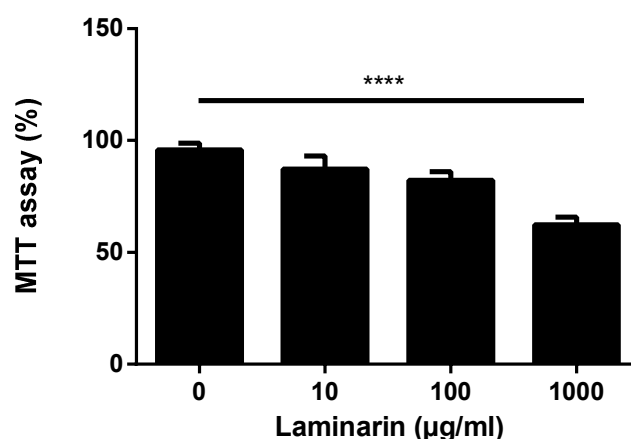


Figure 35 : Viabilité et prolifération des CSM humaines. Effet des différentes doses de laminarine sur la prolifération cellulaire des CSM humaines. Les données (n = 6 répliques biologiques) sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SEM (* p < 0,05).

2.3. Différentiation des CSM sous la stimulation de laminarine

2.3.1. Dénombrement des cellules :

Sous la condition de culture de différenciation des CSM humaine en chondrocytes, les cellules ont étéensemencées au nombre de 10^4 dans des plaques à 6 puits puis traitées avec 0, 10, 100 ou 1000 µg/ml de laminarine. Après 21 jours de chondrogenèse, le nombre de cellules traitées avec de la laminarine 1000 µg/ml a été réduit environ de 10 fois par rapport à ceux non traités. Cependant, le nombre de cellules traitées avec la laminarine 10 ou 100 µg/ml a diminué légèrement par rapport aux cellules non traitées.

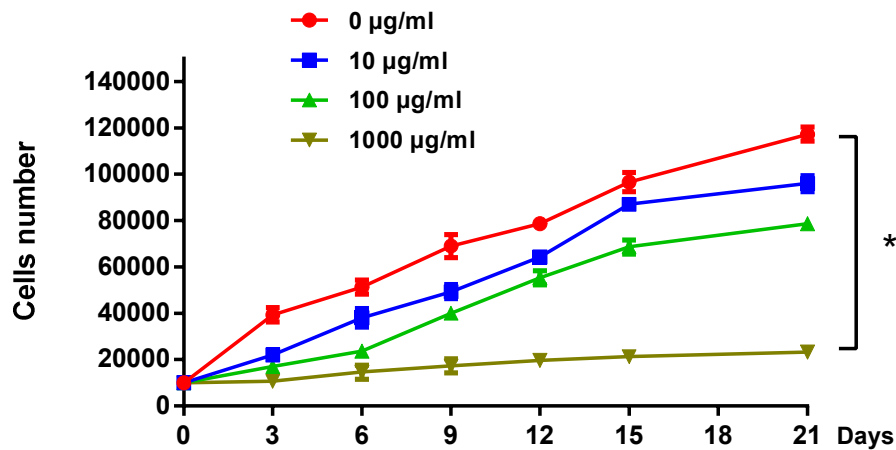


Figure 36 : Comptage des CSM durant la différenciation chondrocytaire sous traitement de laminarin. Comptage des cellules au jours 3, 6, 9, 12, 15 et 21. Les données (n = 3 répliques biologiques) sont présentées en tant que moyenne $\pm$ SEM (* p < 0,05).

2.3.2. Expression des marqueurs définissant les CSM humaines :

- ARNm de l'endoglin

Après 21 jours de cultures dans les conditions de différenciation chondrocytaire et sous le traitement de la laminarine, les résultats de l'analyse par RT-qPCR affichent une expression supérieure non significative de l'ARNm de l'endoglin des cellules traitées (10, 100 et 1000 µg/ml) par rapport aux cellules non traitées. Cependant l'expression de l'ARNm de l'endoglin de toutes les cellules (0, 10, 100 et 1000 µg/ml) est inférieure à celle des CSM (contrôle).

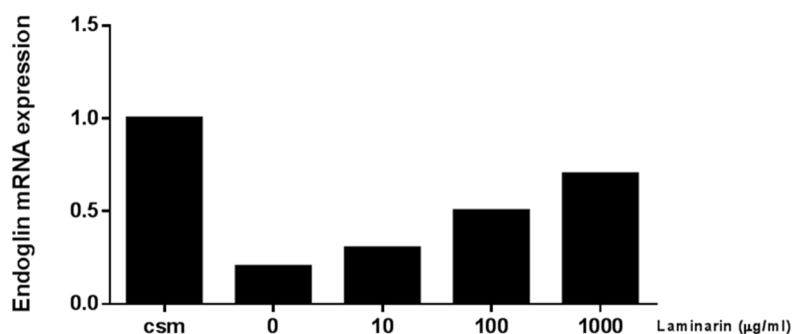


Figure 37 : Effet de la laminarine sur l'expression de l'ARNm de l'endoglin lors de la différenciation chondrogénique des CSM humaines. Les cellules ont été cultivées en milieu de différenciation chondrocytaire et traitées avec la laminarine (0, 10, 100 et 1000 ug/ml) pendant 21 jours. Les données (n = 1 réplique biologique).

- Immunomarquage de la Nucléostémine

Après 21 jours de culture dans le milieu de différenciation chondrocytaire sous le traitement des différentes doses de laminarine (0, 10, 100 et 1000 $\mu\text{g/ml}$), le signal fluorescent du nucléostémine (en rouge dans les noyaux marqués en bleu) est visiblement plus fort chez les cellules traitées par 100 et 1000 $\mu\text{g/ml}$ par rapport aux cellules traitées par 10 $\mu\text{g/ml}$ et aux cellules non traitées.

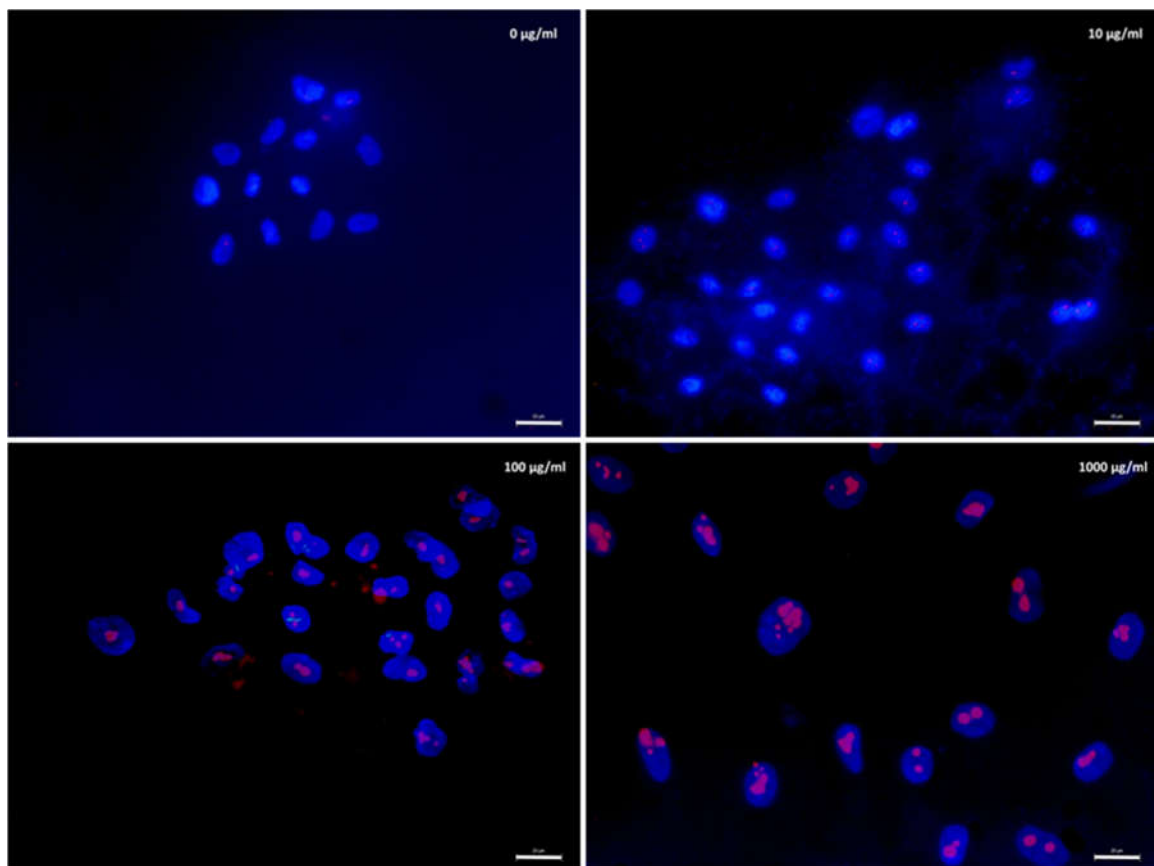


Figure 38 : Immunomarquage du Nucléostémine dans les CSM humaines en voie de différenciation chondrocytaire au J 21 : Double immunomarquage des noyaux (bleu), Nucléostémin (rouge). Les cellules sont observées sous un microscope à épifluorescence x40. (Barre graduée 30 μm).

2.3.3. Expression de l'ARNm des marqueurs définissant les chondrocytes humaines :

Après 21 jours de cultures dans les conditions de différenciation chondrocytaire et sous le traitement de la laminarine, les résultats de l'analyse par RT-qPCR affichent une expression inférieure non significative de l'ARNm du Col2A1, ACAN et Sox9 des cellules traitées par 100 et 1000 $\mu\text{g/ml}$ par rapport aux cellules non traitées, aux cellules traitées par 10 $\mu\text{g/ml}$ et aux CSM contrôles respectivement. Notant que les expressions des ARNm de ces derniers est supérieure pour les cellules non traitées et les cellules traitées par 10 $\mu\text{g/ml}$ en comparaison aux CSM de contrôles.

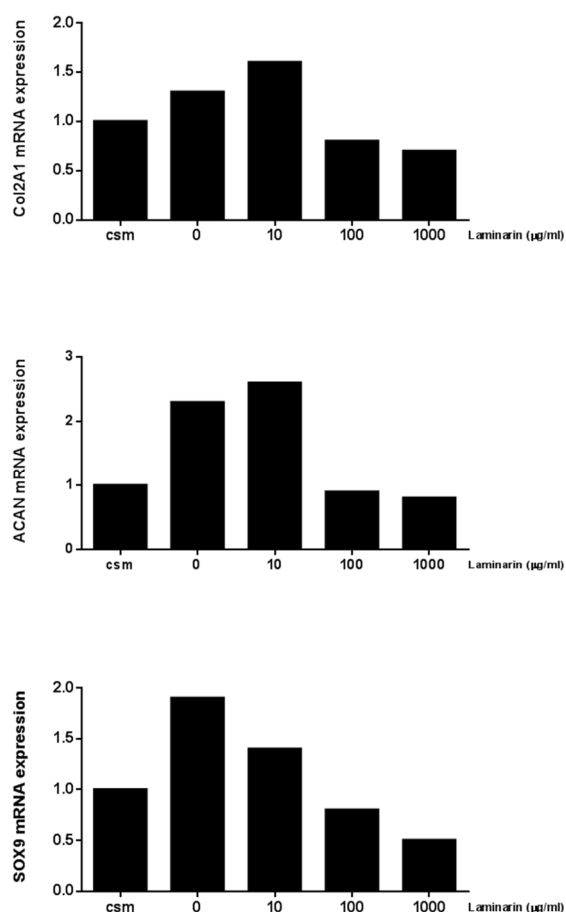


Figure 39 : Effet de la laminarin sur les marqueurs des chondrocytes (Col2A1, ACAN et SOX9) lors de la différenciation chondrogénique des CSM humaine. Les cellules ont été cultivées en milieu de différenciation chondrocytaire et traitées avec la laminarine (0, 10, 100 et 1000 $\mu\text{g/ml}$) pendant 21 jours. Les données ($n = 1$ répliques biologiques).

Discussion

Dans cette partie de notre étude sur les CSM humaine, nos résultats qui portent sur le dénombrement et la prolifération des cellules cultivées dans le milieu de base concordent avec nos résultats obtenus sur les CSM murines. De plus, les résultats préliminaires obtenus lors de la différenciation chondrocytaire à J 21 sont similaires aussi à ceux des cellules murines, néanmoins, d'autres expériences doivent être répétées pour confirmer ces similitudes.

En résumé, nous avons constaté que le nombre des CSM humaines et murines a diminué de façon marquée et significative lorsque nous avons augmenté la concentration de laminarine soit en condition de culture cellulaire normale, soit en chondrogenèse. En outre, la laminarine n'a pas induit d'apoptose pour les CSM et n'a pas changé l'expression de leurs marqueurs spécifiques. Enfin, nous supposons que la laminarine à des doses plus élevées pourrait inhiber la différenciation des CSM en chondrocytes.

Conclusion et perspectives

Les CSM sont des cellules multipotentes qui peuvent se différencier, entre autres, en cellules osseuses, cartilagineuses, adipeuses, musculaires ou stromales. En ingénierie tissulaire du cartilage, les CSM sont de plus en plus utilisées puisqu'elles offrent la possibilité d'être amplifiées tout en maintenant leur état indifférencié. Leur intérêt repose également sur leur potentialité chondro-inductrices. Ainsi, pour favoriser, *in vitro*, la différenciation des CSM en chondrocytes, des structures 3D et/ou des facteurs solubles spécifiques de la chondrogénèse sont utilisés.

L'objectif de ce travail est donc d'optimiser la différenciation chondrocytaires des CSM sous l'effet de la laminarine qui est un β -glucane dérivé des algues marines brunes. Ici, nous avons démontré que la stimulation des CSM à la laminarine avec la dose de 1mg/ml soit en condition de culture de croissance basique ou en chondrogenèse a inhibé la prolifération des cellules sans induire leur apoptose. En outre, dans les conditions de culture chondrogénique, la laminarine utilisée à une dose similaire a empêché la différenciation des CSM en chondrocytes.

Il est évident que d'autres études sont à envisager pour améliorer la compréhension à l'égard de la culture des CSM sous l'effet de la laminarine notamment pour identifier les récepteurs cellulaires mis en évidence dans les voies de signalisation de la prolifération. Il serait intéressant également de voir si ces cellules répondraient de la même manière ou autrement sous l'effet d'autres types de β -glucane et sous d'autres directions de différenciation notamment ostéocytaires et adipocytaires.

Il pourrait être intéressant d'étudier l'effet des β -glucanes sur ces cellules dans des protocoles de différenciation en utilisant des cellules de patients atteints de chondrosarcome ou de mutations génétiques affectant la morphogénèse cartilagineuse comme dans le cas des chondrodysplasies.

Le potentiel thérapeutique des CSM et des β -glucanes peut aussi s'ouvrir sur d'autres perspectives notamment les CSM résidentes dans la peau dans un but d'évaluer la capacité des β -glucanes à réguler la différenciation des cellules souches cutanées en fibroblastes, kératinocytes, mélanocytes et favoriser la réparation, la génération et la cicatrisation de la peau dans un modèle de dermatoses *in vitro* afin de fournir aux industriels cosmétiques les

informations nécessaires sur les concentrations optimales et les effets observés dans cet égard.

Le nombre accru de publications concernant ces cellules montre l'intérêt croissant pour ces dernières en vue d'applications thérapeutiques. Leur multipotence certes, mais également leur facilité de prélèvement, leur rapide propagation *in vitro*, leur stabilité chromosomique et leur fort pouvoir immunosuppresseur en font une cellule d'avenir dans l'arsenal thérapeutique au cours des décennies à venir.

Références Bibliographiques

1. Morrison, S.J., N.M. Shah, and D.J. Anderson, *Regulatory mechanisms in stem cell biology*. Cell, 1997. **88**(3): p. 287-298.
2. Weissman, I.L., *Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution*. cell, 2000. **100**(1): p. 157-168.
3. Smith, A.G., *Embryo-derived stem cells: of mice and men*. Annual review of cell and developmental biology, 2001. **17**(1): p. 435-462.
4. Wilson, A. and A. Trumpp, *Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches*. Nature Reviews Immunology, 2006. **6**(2): p. 93-106.
5. Hui, H., et al., *Stem Cells: General Features and Characteristics*. 2011: INTECH Open Access Publisher.
6. Smith, A., *A glossary for stem-cell biology*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1060-1060.
7. Puzeat, M. and A. Ballis, *Embryonic stem cells: from bench to bedside*. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2007. **82**(3).
8. McLaren, A., *Ethical and social considerations of stem cell research*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 129-131.
9. Yamamoto, M., et al., *Branching ducts similar to mesonephric ducts or ureteric buds in teratomas originating from mouse embryonic stem cells*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2006. **290**(1): p. F52-F60.
10. Ulloa-Montoya, F., C.M. Verfaillie, and W.-S. Hu, *Culture systems for pluripotent stem cells*. Journal of bioscience and bioengineering, 2005. **100**(1): p. 12-27.
11. Klimanskaya, I., et al., *Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres*. Nature, 2006. **444**(7118): p. 481-485.
12. Horie, M., et al., *A Genetically Engineered STO Feeder System Expressing E-Cadherin and Leukemia Inhibitory Factor for Mouse Pluripotent Stem Cell Culture*. Journal of Bioprocessing & Biotechniques, 2012. **2013**.
13. Young, H.E. and A.C. Black, *Adult stem cells*. The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology, 2004. **276**(1): p. 75-102.
14. Reubinoff, B.E., et al., *Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro*. Nature biotechnology, 2000. **18**(4): p. 399-404.
15. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. science, 1998. **282**(5391): p. 1145-1147.
16. Martin, G.R., *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1981. **78**(12): p. 7634-7638.
17. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-156.
18. Bongso, A., et al., *Fertilization and early embryology: Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts*. Human Reproduction, 1994. **9**(11): p. 2110-2117.
19. Thomson, J.A., et al., *Isolation of a primate embryonic stem cell line*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(17): p. 7844-7848.
20. Shambloott, M.J., et al., *Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(1): p. 113-118.
21. Shambloott, M.J., et al., *Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(23): p. 13726-13731.
22. Odorico, J.S., D.S. Kaufman, and J.A. Thomson, *Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines*. Stem cells, 2001. **19**(3): p. 193-204.
23. Reyftmann, L., et al., *[Embryonic stem cells: a position for the obstetrician and gynaecologist. Part one]*. Gynecologie, obstetrique & fertilite, 2004. **32**(10): p. 866-871.
24. Schuldiner, M., et al., *Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(21): p. 11307-11312.

25. Puc  at, M., *Protocols for cardiac differentiation of embryonic stem cells*. Methods, 2008. **45**(2): p. 168-171.
26. O'Donoghue, K. and N.M. Fisk, *Fetal stem cells*. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, 2004. **18**(6): p. 853-875.
27. Ford, C., et al., *Cytological identification of radiation-chimaeras*. Nature, 1956. **177**(4506): p. 452-454.
28. Nowell, P.C., et al., *Growth and continued function of rat marrow cells in x-irradiated mice*. Cancer Research, 1956. **16**(3): p. 258-261.
29. Gengozian, N., et al., *Thymus specificity in lethally irradiated mice treated with rat bone marrow*. Experimental Biology and Medicine, 1957. **96**(3): p. 714-720.
30. Wu, A.M., et al., *Cytological evidence for a relationship between normal hematopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system*. The Journal of experimental medicine, 1968. **127**(3): p. 455-464.
31. Spangrude, G.J., S. Heimfeld, and I.L. Weissman, *Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells*. Science, 1988. **241**(4861): p. 58-62.
32. Friedenstein, A. and K. Lalykina, *Lymphoid cell populations are competent systems for induced osteogenesis*. Calcified Tissue International, 1969. **4**(1): p. 105-106.
33. Lanotte, M., T.D. Allen, and T.M. Dexter, *Histochemical and ultrastructural characteristics of a cell line from human bone-marrow stroma*. Journal of cell science, 1981. **50**(1): p. 281-297.
34. Caplan, A.I., *Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine*. Journal of cellular physiology, 2007. **213**(2): p. 341-347.
35. Peng, L., et al., *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue*. Stem cells and development, 2008. **17**(4): p. 761-774.
36. Majors, A.K., et al., *Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation*. Journal of Orthopaedic Research, 1997. **15**(4): p. 546-557.
37. Jiang, Y., et al., *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*. Nature, 2002. **418**(6893): p. 41-49.
38. Caplan, A., *H2HMJ* 1: DE 2 (H: JHEE2, 5 W2o. U Ls*, 1991. **9**: p. 641q650.
39. Garc  a Quiroz, F., et al., *Isolation of human bone marrow mesenchymal stem cells and evaluation of their osteogenic potential*. Revista Ingenier  a Biom  dica, 2008. **2**(3): p. 48-55.
40. Bortolotti, F., et al., *In vivo therapeutic potential of mesenchymal stromal cells depends on the source and the isolation procedure*. Stem cell reports, 2015. **4**(3): p. 332-339.
41. Ogata, Y., et al., *Purified human synovium mesenchymal stem cells as a good resource for cartilage regeneration*. PloS one, 2015. **10**(6): p. e0129096.
42. Rodr  guez-Fuentes, N., et al., *Isolation of human mesenchymal stem cells and their cultivation on the porous bone matrix*. Journal of visualized experiments: JoVE, 2015(96).
43. Wei, X., et al., *Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy*. Acta Pharmacologica Sinica, 2013. **34**(6): p. 747-754.
44. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-317.
45. Friedenstein, A.J., J. Gorskaja, and N. Kulagina, *Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs*. Experimental hematology, 1976. **4**(5): p. 267-274.
46. Pountos, I. and P.V. Giannoudis, *Biology of mesenchymal stem cells*. Injury, 2005. **36**(3): p. S8-S12.
47. Zvaifler, N.J., et al., *Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals*. Arthritis Research & Therapy, 2000. **2**(6): p. 1.
48. Guo, Z., et al., *In vitro characteristics and in vivo immunosuppressive activity of compact bone-derived murine mesenchymal progenitor cells*. Stem Cells, 2006. **24**(4): p. 992-1000.
49. De Bari, C., et al., *Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis*. Arthritis & Rheumatism, 2006. **54**(4): p. 1209-1221.

50. De Bari, C., et al., *Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane*. Arthritis & Rheumatism, 2001. **44**(8): p. 1928-1942.
51. Jones, E.A., et al., *Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis*. Arthritis & Rheumatism, 2004. **50**(3): p. 817-827.
52. Young, H.E., et al., *Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors*. The Anatomical Record, 2001. **264**(1): p. 51-62.
53. Alsalameh, S., et al., *Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage*. Arthritis & Rheumatism, 2004. **50**(5): p. 1522-1532.
54. Miao, Z., et al., *Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells*. Cell biology international, 2006. **30**(9): p. 681-687.
55. Sibov, T.T., et al., *Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation*. Cytotechnology, 2012. **64**(5): p. 511-521.
56. Cardoso, T.C., et al., *Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system*. BMC biotechnology, 2012. **12**(1): p. 18.
57. Trivanović, D., et al., *Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly*. Srp Arh Celok Lek, 2013. **141**(3-4): p. 178-186.
58. Romanov, Y.A., V.A. Svintsitskaya, and V.N. Smirnov, *Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord*. Stem cells, 2003. **21**(1): p. 105-110.
59. Baksh, D., R. Yao, and R.S. Tuan, *Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow*. Stem cells, 2007. **25**(6): p. 1384-1392.
60. DiGirolamo, C.M., et al., *Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate*. British journal of haematology, 1999. **107**(2): p. 275-281.
61. Murphy, J.M., et al., *Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis*. Arthritis & Rheumatism, 2002. **46**(3): p. 704-713.
62. D'Ippolito, G., et al., *Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow*. Journal of bone and mineral research, 1999. **14**(7): p. 1115-1122.
63. Liao, R., et al., *The bone marrow—cardiac axis of myocardial regeneration*. Progress in cardiovascular diseases, 2007. **50**(1): p. 18-30.
64. Herzog, E.L., L. Chai, and D.S. Krause, *Plasticity of marrow-derived stem cells*. Blood, 2003. **102**(10): p. 3483-3493.
65. Yoshimura, H., et al., *Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle*. Cell and tissue research, 2007. **327**(3): p. 449-462.
66. Bunnell, B.A., et al., *Differentiation of adipose stem cells*. Adipose Tissue Protocols, 2008: p. 155-171.
67. Jurgens, W.J., et al., *Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Cell and tissue research, 2008. **332**(3): p. 415-426.
68. Nakagami, H., et al., *Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy*. Journal of atherosclerosis and thrombosis, 2006. **13**(2): p. 77-81.
69. Aust, L., et al., *Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates*. Cytotherapy, 2004. **6**(1): p. 7-14.

70. Akino, K., et al., *Bone morphogenetic protein-2 regulates proliferation of human mesenchymal stem cells*. Wound repair and regeneration, 2003. **11**(5): p. 354-360.
71. Yang, X.-F., et al., *High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells*. Journal of biomedical science, 2011. **18**(1): p. 1.
72. Merceron, C., et al., *Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue engineering*. Joint Bone Spine, 2008. **75**(6): p. 672-674.
73. Nagamura-Inoue, T. and H. He, *Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: their advantages and potential clinical utility*. World J Stem Cells, 2014. **6**(2): p. 195-202.
74. Ding, D.-C., et al., *Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy*. Cell transplantation, 2015. **24**(3): p. 339-347.
75. McELREAVEY, K.D., et al., *Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord*. Biochemical Society Transactions, 1991. **19**(1): p. 29S-29S.
76. Delorme, B., et al., *Specific Lineage-Priming of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Provides the Molecular Framework for Their Plasticity*. Stem cells, 2009. **27**(5): p. 1142-1151.
77. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. science, 1999. **284**(5411): p. 143-147.
78. Muraglia, A., R. Cancedda, and R. Quarto, *Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model*. J Cell Sci, 2000. **113**(7): p. 1161-1166.
79. Hoffmann, A., et al., *Neotendon formation induced by manipulation of the Smad8 signalling pathway in mesenchymal stem cells*. The Journal of clinical investigation, 2006. **116**(4): p. 940-952.
80. Quevedo, H.C., et al., *Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(33): p. 14022-14027.
81. Oswald, J., et al., *Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro*. Stem cells, 2004. **22**(3): p. 377-384.
82. Snykers, S., et al., *Hepatic differentiation of mesenchymal stem cells: in vitro strategies*. Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications, 2011: p. 305-314.
83. Tondreau, T., et al., *Gene expression pattern of functional neuronal cells derived from human bone marrow mesenchymal stromal cells*. BMC genomics, 2008. **9**(1): p. 1.
84. Wang, G., et al., *Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(1): p. 186-191.
85. Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia, *Mesenchymal stem cells in health and disease*. Nature Reviews Immunology, 2008. **8**(9): p. 726-736.
86. Colter, D.C., et al., *Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(7): p. 3213-3218.
87. Song, L., et al., *Identification and Functional Analysis of Candidate Genes Regulating Mesenchymal Stem Cell Self-Renewal and Multipotency*. Stem cells, 2006. **24**(7): p. 1707-1718.
88. Kolf, C.M., E. Cho, and R.S. Tuan, *Mesenchymal stromal cells: biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. Arthritis research & therapy, 2007. **9**(1): p. 1.
89. Izadpanah, R., et al., *Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue*. Journal of cellular biochemistry, 2006. **99**(5): p. 1285-1297.
90. Boyer, L.A., et al., *Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells*. nature, 2006. **441**(7091): p. 349-353.
91. Metcalf, D., *The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor*. Stem cells, 2003. **21**(1): p. 5-14.

92. Zaragosi, L.E., G. Ailhaud, and C. Dani, *Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells*. *Stem cells*, 2006. **24**(11): p. 2412-2419.
93. Kléber, M. and L. Sommer, *Wnt signaling and the regulation of stem cell function*. *Current opinion in cell biology*, 2004. **16**(6): p. 681-687.
94. Tsutsumi, S., et al., *Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2001. **288**(2): p. 413-419.
95. Boland, G.M., et al., *Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells*. *Journal of cellular biochemistry*, 2004. **93**(6): p. 1210-1230.
96. Ringe, J., et al., *Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs*. *Naturwissenschaften*, 2002. **89**(8): p. 338-351.
97. Delorme, B., S. Chateauvieux, and P. Charbord, *The concept of mesenchymal stem cells*. 2006.
98. Song, L. and R.S. Tuan, *Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow*. *The FASEB Journal*, 2004. **18**(9): p. 980-982.
99. Baksh, D., L. Song, and R. Tuan, *Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy*. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2004. **8**(3): p. 301-316.
100. Pevsner-Fischer, M., S. Levin, and D. Zipori, *The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity*. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2011. **7**(3): p. 560-568.
101. Taylor, S., R. Smith, and P. Clegg, *Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction?* *Equine veterinary journal*, 2007. **39**(2): p. 172-180.
102. Wexler, S.A., et al., *Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not*. *British journal of haematology*, 2003. **121**(2): p. 368-374.
103. Sell, S., *Stem cells*, in *Stem cells handbook*. 2004, Springer. p. 1-18.
104. Simmons, P.J. and B. Torok-Storb, *Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1*. *Blood*, 1991. **78**(1): p. 55-62.
105. Delorme, B., et al., *Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells*. *Blood*, 2008. **111**(5): p. 2631-2635.
106. Sacchetti, B., et al., *Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment*. *Cell*, 2007. **131**(2): p. 324-336.
107. Quirici, N., et al., *Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies*. *Experimental hematology*, 2002. **30**(7): p. 783-791.
108. Pountos, I., et al., *Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application*. *Injury*, 2007. **38**: p. S23-S33.
109. Barry, F.P., *Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells*. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 2003. **69**(3): p. 250-256.
110. Motaln, H., C. Schichor, and T.T. Lah, *Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies*. *Cancer*, 2010. **116**(11): p. 2519-2530.
111. Mets, T. and G. Verdonk, *Variations in the stromal cell population of human bone marrow during aging*. *Mechanisms of ageing and development*, 1981. **15**(1): p. 41-49.
112. Mosna, F., L. Sensebé, and M. Krampera, *Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide*. *Stem cells and development*, 2010. **19**(10): p. 1449-1470.
113. Mödder, U.I., et al., *Characterization of mesenchymal progenitor cells isolated from human bone marrow by negative selection*. *Bone*, 2012. **50**(3): p. 804-810.
114. Quirici, N., et al., *Anti-L-NGFR and-CD34 monoclonal antibodies identify multipotent mesenchymal stem cells in human adipose tissue*. *Stem cells and development*, 2009. **19**(6): p. 915-925.

115. Aslan, H., et al., *Osteogenic differentiation of noncultured immunoisolated bone marrow-derived CD105+ cells*. Stem cells, 2006. **24**(7): p. 1728-1737.
116. Fortier, L.A., *Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications*. Veterinary Surgery, 2005. **34**(5): p. 415-423.
117. Young, H.E., et al., *Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering*. Cell biochemistry and biophysics, 2004. **40**(1): p. 1-80.
118. Muschler, G.F., C. Nakamoto, and L.G. Griffith, *Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering*. J Bone Joint Surg Am, 2004. **86**(7): p. 1541-1558.
119. Semedo, P., et al., *How do mesenchymal stem cells repair?* 2011: INTECH Open Access Publisher.
120. Kalinina, N., et al., *Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair*. Acta Naturae (англоязычная версия), 2011. **3**(4 (11)).
121. Méndez-Ferrer, S., et al., *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche*. nature, 2010. **466**(7308): p. 829-834.
122. Rubina, K., et al., *Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation*. Tissue Engineering Part A, 2009. **15**(8): p. 2039-2050.
123. Lopatina, T., et al., *Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo*. PloS one, 2011. **6**(3): p. e17899.
124. Kinnaird, T., et al., *Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms*. Circulation research, 2004. **94**(5): p. 678-685.
125. Trivanović, D., et al., *Mesenchymal Stem Cells from Different Tissues: Immune Status and Activity*. J Immunol Infect Dis, 2016. **3**(1): p. 102.
126. Griffin, M.D., et al., *Anti-donor immune responses elicited by allogeneic mesenchymal stem cells: what have we learned so far*. Immunology and cell biology, 2013. **91**(1): p. 40-51.
127. Le Blanc, K., et al., *Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells*. The Lancet, 2004. **363**(9419): p. 1439-1441.
128. Jiang, S., et al., *Novel insights into a treatment for aplastic anemia based on the advanced proliferation of bone marrow -derived mesenchymal stem cells induced by fibroblast growth factor 1*. Molecular medicine reports, 2015. **12**(6): p. 7877-7882.
129. Ciccocioppo, R., et al., *Ex vivo immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells on Crohn's disease mucosal T cells are largely dependent on indoleamine 2, 3-dioxygenase activity and cell-cell contact*. Stem cell research & therapy, 2015. **6**(1): p. 1.
130. El-Akabawy, G. and L.A. Rashed, *Beneficial effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in a non-immune model of demyelination*. Annals of Anatomy- Anatomischer Anzeiger, 2015. **198**: p. 11-20.
131. Mathiasen, A.B., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with severe ischaemic heart failure: a randomized placebo-controlled trial (MSC-HF trial)*. European heart journal, 2015. **36**(27): p. 1744-1753.
132. dos Santos, F., et al., *A xenogeneic-free bioreactor system for the clinical-scale expansion of human mesenchymal stem/stromal cells*. Biotechnology and bioengineering, 2014. **111**(6): p. 1116-1127.
133. Wang, Y., et al., *Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications*. Nature immunology, 2014. **15**(11): p. 1009-1016.
134. Shi, C., et al., *Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands*. Immunity, 2011. **34**(4): p. 590-601.
135. Chen, L., et al., *Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing*. PloS one, 2008. **3**(4): p. e1886.

136. Mantovani, A., *MSCs, macrophages, and cancer: a dangerous menage-a-trois*. Cell Stem Cell, 2012. **11**(6): p. 730-732.
137. DelaRosa, O. and E. Lombardo, *Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential*. Mediators of inflammation, 2010. **2010**.
138. Meisel, R., et al., *Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2, 3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation*. Blood, 2004. **103**(12): p. 4619-4621.
139. Choi, H., et al., *Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- κ B signaling in resident macrophages*. Blood, 2011. **118**(2): p. 330-338.
140. Aggarwal, S. and M.F. Pittenger, *Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1815-1822.
141. Beyth, S., et al., *Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness*. Blood, 2005. **105**(5): p. 2214-2219.
142. Ramasamy, R., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle*. Transplantation, 2007. **83**(1): p. 71-76.
143. Krampera, M., et al., *Role for interferon- γ in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells*. Stem cells, 2006. **24**(2): p. 386-398.
144. Potian, J.A., et al., *Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens*. The Journal of Immunology, 2003. **171**(7): p. 3426-3434.
145. Tuan, R.S., *Biology of developmental and regenerative skeletogenesis*. Clinical orthopaedics and related research, 2004. **427**: p. S105-S117.
146. DeLise, A., L. Fischer, and R. Tuan, *Cellular interactions and signaling in cartilage development*. Osteoarthritis and cartilage, 2000. **8**(5): p. 309-334.
147. Goldring, M.B., K. Tsuchimochi, and K. Ijiri, *The control of chondrogenesis*. Journal of cellular biochemistry, 2006. **97**(1): p. 33-44.
148. Eames, B.F., L. De La Fuente, and J.A. Helms, *Molecular ontogeny of the skeleton*. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, 2003. **69**(2): p. 93-101.
149. Lefebvre, V., P. Li, and B. De Crombrughe, *A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene*. The EMBO journal, 1998. **17**(19): p. 5718-5733.
150. Yoon, B.S., et al., *Bmpr1a and Bmpr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(14): p. 5062-5067.
151. Ducy, P., et al., *Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation*. cell, 1997. **89**(5): p. 747-754.
152. Watanabe, H., M.P. de Caestecker, and Y. Yamada, *Transcriptional cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways regulates transforming growth factor- β -induced aggrecan gene expression in chondrogenic ATDC5 cells*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(17): p. 14466-14473.
153. Tuli, R., et al., *Transforming growth factor- β -mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(42): p. 41227-41236.
154. Nakamura, K., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase functionally contributes to chondrogenesis induced by growth/differentiation factor-5 in ATDC5 cells*. Experimental cell research, 1999. **250**(2): p. 351-363.
155. Tuan, R.S., G. Boland, and R. Tuli, *Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering*. Arthritis Res Ther, 2002. **5**(1): p. 1.
156. Massagué, J., S.W. Blain, and R.S. Lo, *TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders*. Cell, 2000. **103**(2): p. 295-309.

157. Chen, D., M. Zhao, and G.R. Mundy, *Bone morphogenetic proteins*. Growth factors, 2004. **22**(4): p. 233-241.
158. Hartmann, C., *A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis*. Trends in cell biology, 2006. **16**(3): p. 151-158.
159. Boskey, A., et al., *BMP-6 accelerates both chondrogenesis and mineral maturation in differentiating chick limb-bud mesenchymal cell cultures*. Journal of cellular biochemistry, 2002. **84**(3): p. 509-519.
160. Gooch, K., et al., *Bone morphogenetic proteins-2,-12, and-13 modulate in vitro development of engineered cartilage*. Tissue engineering, 2002. **8**(4): p. 591-601.
161. Nochi, H., et al., *Adenovirus Mediated BMP-13 Gene Transfer Induces Chondrogenic Differentiation of Murine Mesenchymal Progenitor Cells*. Journal of bone and mineral research, 2004. **19**(1): p. 111-122.
162. Maumus, M., C. Jorgensen, and D. Noël, *Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: role of secretome and exosomes*. Biochimie, 2013. **95**(12): p. 2229-2234.
163. Bornes, T.D., A.B. Adesida, and N.M. Jomha, *Mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic articular cartilage defects: a comprehensive review*. Arthritis research & therapy, 2014. **16**(5): p. 432.
164. Wu, L., et al., *Trophic effects of mesenchymal stem cells in chondrocyte co-cultures are independent of culture conditions and cell sources*. Tissue Engineering Part A, 2012. **18**(15-16): p. 1542-1551.
165. Ryu, J.-S., et al., *Co-culture with human synovium-derived mesenchymal stem cells inhibits inflammatory activity and increases cell proliferation of sodium nitroprusside-stimulated chondrocytes*. Biochemical and biophysical research communications, 2014. **447**(4): p. 715-720.
166. Wu, L., et al., *Fibroblast growth factor-1 is a mesenchymal stromal cell-secreted factor stimulating proliferation of osteoarthritic chondrocytes in co-culture*. Stem cells and development, 2013. **22**(17): p. 2356-2367.
167. Maumus, M., et al., *Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis*. Stem cell research, 2013. **11**(2): p. 834-844.
168. Manferdini, C., et al., *Adipose stromal cells exert anti-inflammatory effects on chondrocytes and synoviocytes from osteoarthritis patients via PGE2*. Arthritis Rheum, 2013. **65**: p. 1271-1281.
169. Manferdini, C., et al., *Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Exert Antiinflammatory Effects on Chondrocytes and Synoviocytes From Osteoarthritis Patients Through Prostaglandin E2*. Arthritis & Rheumatism, 2013. **65**(5): p. 1271-1281.
170. Van Buul, G., et al., *Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture*. Osteoarthritis and Cartilage, 2012. **20**(10): p. 1186-1196.
171. Jorgensen, C. and D. Noël, *Mesenchymal stem cells in osteoarticular diseases*. Regenerative medicine, 2011. **6**(6s): p. 44-51.
172. ter Huurne, M., et al., *Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis*. Arthritis & Rheumatism, 2012. **64**(11): p. 3604-3613.
173. Desando, G., et al., *Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model*. Arthritis research & therapy, 2013. **15**(1): p. R22.
174. Orozco, L., et al., *Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study*. Transplantation, 2013. **95**(12): p. 1535-1541.
175. Roghayeh Fazeli, M., et al., *Long-term follow-up of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in patients with knee, ankle, or hip osteoarthritis*. Archives of Iranian medicine, 2015. **18**(6): p. 336.

176. Nauta, A.J. and W.E. Fibbe, *Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells*. Blood, 2007. **110**(10): p. 3499-3506.
177. Flomenberg, N., et al., *Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome*. Blood, 2004. **104**(7): p. 1923-1930.
178. Bouffi, C., et al., *Multipotent mesenchymal stromal cells and rheumatoid arthritis: risk or benefit?* Rheumatology, 2009. **48**(10): p. 1185-1189.
179. Zhang, H., X. Zeng, and L. Sun, *Allogeneic bone-marrow-derived mesenchymal stem cells transplantation as a novel therapy for systemic lupus erythematosus*. Expert opinion on biological therapy, 2010. **10**(5): p. 701-709.
180. Xu, J., et al., *Allogeneic mesenchymal stem cell treatment alleviates experimental and clinical Sjögren syndrome*. Blood, 2012. **120**(15): p. 3142-3151.
181. Ezquer, F.E., et al., *Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice*. Biology of Blood and Marrow Transplantation, 2008. **14**(6): p. 631-640.
182. Okamoto, R., et al., *Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract*. Nature medicine, 2002. **8**(9): p. 1011-1017.
183. Singh, J., J. O Onimowo, and W. S Khan, *Bone marrow derived stem cells in trauma and orthopaedics: a review of the current trend*. Current stem cell research & therapy, 2015. **10**(1): p. 37-42.
184. Shao, J., W. Zhang, and T. Yang, *Using mesenchymal stem cells as a therapy for bone regeneration and repairing*. Biological research, 2015. **48**(1): p. 1.
185. Pereira, R.F., et al., *Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(3): p. 1142-1147.
186. Horwitz, E.M., et al., *Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(13): p. 8932-8937.
187. Dennis, J.E. and P. Charbord, *Origin and differentiation of human and murine stroma*. Stem cells, 2002. **20**(3): p. 205-214.
188. Psaltis, P.J., et al., *Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair*. Stem Cells, 2008. **26**(9): p. 2201-2210.
189. Wakitani, S., T. Saito, and A.I. Caplan, *Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine*. Muscle & nerve, 1995. **18**(12): p. 1417-1426.
190. Makino, S., et al., *Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro*. The Journal of clinical investigation, 1999. **103**(5): p. 697-705.
191. Bittira, B., et al., *In vitro preprogramming of marrow stromal cells for myocardial regeneration*. The Annals of thoracic surgery, 2002. **74**(4): p. 1154-1160.
192. Xu, W., et al., *Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro*. Experimental Biology and Medicine, 2004. **229**(7): p. 623-631.
193. Shake, J.G., et al., *Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects*. The Annals of thoracic surgery, 2002. **73**(6): p. 1919-1926.
194. Silva, G.V., et al., *Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model*. Circulation, 2005. **111**(2): p. 150-156.
195. Tang, J., et al., *Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion*. European journal of cardio-thoracic surgery, 2006. **30**(2): p. 353-361.

196. Lim, S.Y., et al., *The effects of mesenchymal stem cells transduced with Akt in a porcine myocardial infarction model*. Cardiovascular research, 2006. **70**(3): p. 530-542.
197. Mangi, A.A., et al., *Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts*. Nature medicine, 2003. **9**(9): p. 1195-1201.
198. Urbanek, K., et al., *Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival*. Circulation research, 2005. **97**(7): p. 663-673.
199. Wollert, K.C., et al., *Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial*. The Lancet, 2004. **364**(9429): p. 141-148.
200. Chen, S.-l., et al., *Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction*. The American journal of cardiology, 2004. **94**(1): p. 92-95.
201. Wang, S.-s., et al., *Mesenchymal stem cells stabilize atherosclerotic vulnerable plaque by anti-inflammatory properties*. PloS one, 2015. **10**(8): p. e0136026.
202. Jiang, H., et al., *Potential role of mesenchymal stem cells in alleviating intestinal ischemia/reperfusion impairment*. PloS one, 2013. **8**(9): p. e74468.
203. Chamberlain, J., et al., *Efficient generation of human hepatocytes by the intrahepatic delivery of clonal human mesenchymal stem cells in fetal sheep*. Hepatology, 2007. **46**(6): p. 1935-1945.
204. Sato, Y., et al., *Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion*. Blood, 2005. **106**(2): p. 756-763.
205. Serralta, A., et al., *Influence of preservation solution on the isolation and culture of human hepatocytes from liver grafts*. Cell transplantation, 2005. **14**(10): p. 837-843.
206. Serralta, A., et al., *Functionality of cultured human hepatocytes from elective samples, cadaveric grafts and hepatectomies*. Toxicology in vitro, 2003. **17**(5): p. 769-774.
207. Lee, K.D., et al., *In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells*. Hepatology, 2004. **40**(6): p. 1275-1284.
208. Caplan, A.I. and J.E. Dennis, *Mesenchymal stem cells as trophic mediators*. Journal of cellular biochemistry, 2006. **98**(5): p. 1076-1084.
209. Parekkadan, B., et al., *Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells*. Biochemical and biophysical research communications, 2007. **363**(2): p. 247-252.
210. Banas, A., et al., *IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury*. Stem cells, 2008. **26**(10): p. 2705-2712.
211. Behr, L., et al., *Intra renal arterial injection of autologous mesenchymal stem cells in an ovine model in the postischemic kidney*. Nephron Physiology, 2007. **107**(3): p. p65-p76.
212. Lange, C., et al., *Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats*. Kidney international, 2005. **68**(4): p. 1613-1617.
213. Tögel, F., et al., *Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2005. **289**(1): p. F31-F42.
214. Chen, Y., et al., *Hepatocyte growth factor modification promotes the amelioration effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on rat acute kidney injury*. Stem cells and development, 2010. **20**(1): p. 103-113.
215. Cao, H., et al., *Mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord ameliorate ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats*. Biotechnology letters, 2010. **32**(5): p. 725-732.
216. Ozawa, K., et al., *Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs)*. Journal of autoimmunity, 2008. **30**(3): p. 121-127.

217. Nakamizo, A., et al., *Human bone marrow–derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas*. Cancer research, 2005. **65**(8): p. 3307-3318.
218. Wang, H., et al., *Trafficking Mesenchymal Stem Cell Engraftment and Differentiation in Tumor-Bearing Mice by Bioluminescence Imaging*. Stem cells, 2009. **27**(7): p. 1548-1558.
219. Matuskova, M., et al., *HSV-tk expressing mesenchymal stem cells exert bystander effect on human glioblastoma cells*. Cancer letters, 2010. **290**(1): p. 58-67.
220. Bexell, D., et al., *Bone marrow multipotent mesenchymal stroma cells act as pericyte-like migratory vehicles in experimental gliomas*. Molecular Therapy, 2009. **17**(1): p. 183-190.
221. Dwyer, R.M., et al., *Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer*. Stem Cell Research & Therapy, 2010. **1**(3): p. 1.
222. Sasportas, L.S., et al., *Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(12): p. 4822-4827.
223. Hu, Y.-L., et al., *Mesenchymal stem cells: a promising targeted-delivery vehicle in cancer gene therapy*. Journal of Controlled Release, 2010. **147**(2): p. 154-162.
224. Sundin, M., et al., *Mesenchymal stem cells are susceptible to human herpesviruses, but viral DNA cannot be detected in the healthy seropositive individual*. Bone marrow transplantation, 2006. **37**(11): p. 1051-1059.
225. van der Laan, L.J., et al., *Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice*. Nature, 2000. **407**(6800): p. 90-94.
226. Djouad, F., et al., *Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals*. Blood, 2003. **102**(10): p. 3837-3844.
227. Feng, B. and L. Chen, *Review of mesenchymal stem cells and tumors: executioner or coconspirator?* Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals, 2009. **24**(6): p. 717-721.
228. Zhu, W., et al., *Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo*. Experimental and molecular pathology, 2006. **80**(3): p. 267-274.
229. Zhu, Y., et al., *Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1*. Leukemia, 2009. **23**(5): p. 925-933.
230. Rubio, D., et al., *Spontaneous human adult stem cell transformation*. Cancer research, 2005. **65**(8): p. 3035-3039.
231. Jequier, E., *Carbohydrates as a source of energy*. The American journal of clinical nutrition, 1994. **59**(3): p. 682S-685S.
232. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Complex Carbohydrates Are Formed by Linkage of Monosaccharides*. 2002.
233. Boddohi, S. and M.J. Kipper, *Engineering nanoassemblies of polysaccharides*. Advanced Materials, 2010. **22**(28): p. 2998-3016.
234. Kushchevskaya, N. and N. Mishchuk, *Preparation of colloidal iron particles by a thermochemical method*. Colloid Journal, 2003. **65**(1): p. 44-46.
235. Thakur, V.K. and M.K. Thakur, *Handbook of sustainable polymers: Processing and applications*. 2016: CRC Press.
236. Synytsya, A. and M. Novak, *Structural analysis of glucans*. Annals of translational medicine, 2014. **2**(2): p. 17-17.
237. Delattre, C., T.A. Fenoradosoa, and P. Michaud, *Galactans: an overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides*. Brazilian archives of biology and technology, 2011. **54**(6): p. 1075-1092.
238. Vijn, I. and S. Smeekens, *Fructan: more than a reserve carbohydrate?* Plant physiology, 1999. **120**(2): p. 351-360.
239. Zeković, D.B., et al., *Natural and modified (1→3)-β-D-glucans in health promotion and disease alleviation*. Critical reviews in biotechnology, 2005. **25**(4): p. 205-230.
240. Vetvicka, V., *Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug*. World journal of clinical oncology, 2011. **2**(2): p. 115.

241. Di Luzio, N.R., *Immunopharmacology of glucan: a broad spectrum enhancer of host defense mechanisms*. Trends in Pharmacological Sciences, 1983. **4**: p. 344-347.
242. Teas, J., *The dietary intake of Laminaria, a brown seaweed, and breast cancer prevention*. Nutrition and cancer, 1982. **4**(3): p. 217-222.
243. Usui, T., et al., *Isolation and characterization of antitumor active β -D-glucans from the fruit bodies of Ganoderma applanatum*. Carbohydrate Research, 1983. **115**: p. 273-280.
244. Keogh, G.F., et al., *Randomized controlled crossover study of the effect of a highly β -glucan-enriched barley on cardiovascular disease risk factors in mildly hypercholesterolemic men*. The American journal of clinical nutrition, 2003. **78**(4): p. 711-718.
245. Kale, M., B. Hamaker, and N. Bordenave, *Oat β -Glucans: Physicochemistry and Nutritional Properties*. Oats Nutrition and Technology, 2013: p. 123-169.
246. Kavanagh, K., *Fungi: biology and applications*. 2011: John Wiley & Sons.
247. Beauvais, A., et al., *Aspergillus cell wall and biofilm*. Mycopathologia, 2014. **178**(5-6): p. 371-377.
248. Free, S.J., *Fungal cell wall organization and biosynthesis*. Adv Genet, 2013. **81**: p. 33-82.
249. Miura, N.N., et al., *Blood clearance of (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan in MRL lpr/lpr mice*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 1996. **13**(1): p. 51-57.
250. Brown, G.D. and S. Gordon, *Immune recognition: a new receptor for β -glucans*. Nature, 2001. **413**(6851): p. 36-37.
251. Vetvicka, V., et al., *Orally administered marine (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity*. International journal of biological macromolecules, 2007. **40**(4): p. 291-298.
252. Barsanti, L., et al., *Chemistry, physico-chemistry and applications linked to biological activities of β -glucans*. Natural product reports, 2011. **28**(3): p. 457-466.
253. Babineau, T.J., et al., *Randomized phase I/II trial of a macrophage-specific immunomodulator (PGG-glucan) in high-risk surgical patients*. Annals of surgery, 1994. **220**(5): p. 601.
254. Kirmaz, C., et al., *Effects of glucan treatment on the Th1/Th2 balance in patients with allergic rhinitis: a double-blind placebo-controlled study*. European cytokine network, 2005. **16**(2): p. 128-134.
255. Harada, T., et al., *Production of a firm, resilient gel-forming polysaccharide by a mutant of Alcaligenes faecalis var. myxogenes 10C3*. Agricultural and Biological Chemistry, 1966. **30**(2): p. 196-198.
256. Food and D. Administration, *Food additives permitted for direct addition to food for human consumption: Curdlan. 21 CFR 172*. Federal Reg, 1996. **61**(242): p. 65941.
257. Indergaard, M. and K. Ostgaard, *Polysaccharides for food and pharmaceutical uses*. 1991.
258. Nagaoka, M., et al., *Anti-ulcer effects and biological activities of polysaccharides from marine algae*. Biofactors, 2000. **12**(1-4): p. 267-274.
259. Graiff, A., et al., *Chemical characterization and quantification of the brown algal storage compound laminarin — A new methodological approach*. Journal of Applied Phycology, 2016. **28**(1): p. 533-543.
260. Walsh, A., et al., *Effect of dietary laminarin and fucoidan on selected microbiota, intestinal morphology and immune status of the newly weaned pig*. British Journal of Nutrition, 2013. **110**(9): p. 1630-1638.
261. Devillé, C., et al., *Study on the effects of laminarin, a polysaccharide from seaweed, on gut characteristics*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007. **87**(9): p. 1717-1725.
262. Délérís, P., H. Nazih, and J. Bard, *Seaweeds in human health*. Seaweed in health and disease prevention. Academic Press, Elsevier, Amsterdam, 2016: p. 319-367.
263. Rahar, S., et al., *Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans*. Journal of advanced pharmaceutical technology & research, 2011. **2**(2): p. 94.
264. Brown, G.D. and S. Gordon, *Immune recognition of fungal β -glucans*. Cellular microbiology, 2005. **7**(4): p. 471-479.

265. Willment, J.A., et al., *The human β -glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells*. European journal of immunology, 2005. **35**(5): p. 1539-1547.
266. Herre, J., S. Gordon, and G.D. Brown, *Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages*. Molecular immunology, 2004. **40**(12): p. 869-876.
267. Palma, A.S., et al., *Ligands for the β -glucan receptor, Dectin-1, assigned using "designer" microarrays of oligosaccharide probes (neoglycolipids) generated from glucan polysaccharides*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(9): p. 5771-5779.
268. Willment, J.A., S. Gordon, and G.D. Brown, *Characterization of the human β -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(47): p. 43818-43823.
269. Rogers, N.C., et al., *Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins*. Immunity, 2005. **22**(4): p. 507-517.
270. Underhill, D.M., et al., *Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production*. Blood, 2005. **106**(7): p. 2543-2550.
271. Brown, G.D., *Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor*. Nature Reviews Immunology, 2006. **6**(1): p. 33-43.
272. Roeder, A., et al., *Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity*. Medical Mycology, 2004. **42**(6): p. 485-498.
273. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. Annual review of immunology, 2003. **21**(1): p. 335-376.
274. Lebron, F., et al., *Pneumocystis carinii cell wall β -glucans initiate macrophage inflammatory responses through NF- κ B activation*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(27): p. 25001-25008.
275. Ross, G.D., *Regulation of the Adhesion versus Cytotoxic Functions of the Mac-1/CR3/ α M β 2-Integrin Glycoprotein*. Critical Reviews™ in Immunology, 2000. **20**(3).
276. Xia, Y. and G.D. Ross, *Generation of recombinant fragments of CD11b expressing the functional β -glucan-binding lectin site of CR3 (CD11b/CD18)*. The Journal of Immunology, 1999. **162**(12): p. 7285-7293.
277. Vetvicka, V. and J.-C. Yvin, *Effects of marine β -1, 3 glucan on immune reactions*. International immunopharmacology, 2004. **4**(6): p. 721-730.
278. Diniz, S., et al., *PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages*. Journal of leukocyte biology, 2004. **75**(4): p. 649-656.
279. Rice, P.J., et al., *Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucans*. Journal of Leukocyte Biology, 2002. **72**(1): p. 140-146.
280. Assanasen, C., et al., *Cholesterol binding, efflux, and a PDZ-interacting domain of scavenger receptor-BI mediate HDL-initiated signaling*. The Journal of clinical investigation, 2005. **115**(4): p. 969-977.
281. Kim, T., Y.-J. Kim, and E.-H. Sohn, *Effects of Beta-glucan from Coriolus versicolor on Scavenger Receptor B1 Expression and their Involvement of Dectin-1 and Casein Kinase 2*. Korean Journal of Plant Resources, 2012. **25**(6): p. 664-669.
282. Chen, J. and R. Seviour, *Medicinal importance of fungal β -(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-glucans*. Mycological research, 2007. **111**(6): p. 635-652.
283. Masuda, Y., et al., *Soluble β -glucan from Grifola frondosa induces proliferation and Dectin-1/Syk signaling in resident macrophages via the GM-CSF autocrine pathway*. Journal of leukocyte biology, 2012. **91**(4): p. 547-556.
284. Plato, A., S.E. Hardison, and G.D. Brown. *Pattern recognition receptors in antifungal immunity*. in *Seminars in immunopathology*. 2015. Springer.
285. Gantner, B.N., et al., *Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2*. The Journal of experimental medicine, 2003. **197**(9): p. 1107-1117.
286. Seong, S.K. and H.W. Kim, *Potentialiation of innate immunity by β -glucans*. Mycobiology, 2010. **38**(2): p. 144-148.

287. Chan, G.C.-F., W.K. Chan, and D.M.-Y. Sze, *The effects of β -glucan on human immune and cancer cells*. Journal of hematology & oncology, 2009. **2**(1): p. 1.
288. Mansell, P., et al., *Macrophage-mediated destruction of human malignant cells in vivo*. Journal of the National Cancer Institute, 1975. **54**(3): p. 571-580.
289. Hong, F., et al., *Mechanism by which orally administered β -1, 3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models*. The Journal of Immunology, 2004. **173**(2): p. 797-806.
290. Borchers, A.T., C.L. Keen, and M.E. Gershwin, *Mushrooms, tumors, and immunity: an update*. Experimental Biology and Medicine, 2004. **229**(5): p. 393-406.
291. Takaku, T., Y. Kimura, and H. Okuda, *Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action*. The Journal of nutrition, 2001. **131**(5): p. 1409-1413.
292. Lo, H.-C., et al., *Effects of ingested fruiting bodies, submerged culture biomass, and acidic polysaccharide glucuronoxylomannan of *Tremella mesenterica* Retz.: Fr. on glycemic responses in normal and diabetic rats*. Life sciences, 2006. **78**(17): p. 1957-1966.
293. 木方正, et al., *Polysaccharides in fungi. XXXV. Anti diabetic activity of an acidic polysaccharide from the fruiting bodies of *Tremella aurantia**. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 1995. **18**(12): p. 1627-1629.
294. Lang, C.H. and C. Dobrescu, *Interleukin-1 induced increases in glucose utilization are insulin mediated*. Life sciences, 1989. **45**(22): p. 2127-2134.
295. ヤルル・カビル and 木村修一, *Dietary mushrooms reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR)*. Journal of nutritional science and vitaminology, 1989. **35**(1): p. 91-94.
296. Strong, K., et al., *Preventing chronic diseases: how many lives can we save?* The Lancet, 2005. **366**(9496): p. 1578-1582.
297. Nicolosi, R., et al., *Plasma lipid changes after supplementation with β -glucan fiber from yeast*. The American journal of clinical nutrition, 1999. **70**(2): p. 208-212.
298. Chen, J. and K. Raymond, *Beta-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks*. 2008.
299. Portera, C.A., et al., *Effect of macrophage stimulation on collagen biosynthesis in the healing wound*. The American Surgeon, 1997. **63**(2): p. 125-131.
300. Wei, D., et al., *Glucan stimulates human dermal fibroblast collagen biosynthesis through a nuclear factor-1 dependent mechanism*. Wound Repair and Regeneration, 2002. **10**(3): p. 161-168.
301. Patchen, M., et al., *Glucan: mechanisms involved in its "radioprotective" effect*. Journal of leukocyte biology, 1987. **42**(2): p. 95-105.
302. Song, H., et al., *Effect of exopolymers of *Aureobasidium pullulans* on improving osteoporosis induced in ovariectomized mice*. Journal of microbiology and biotechnology, 2006. **16**(1): p. 37.
303. Shin, H.D., et al., *Antiosteoporotic effect of Polycan, β -glucan from *Aureobasidium*, in ovariectomized osteoporotic mice*. Nutrition, 2007. **23**(11): p. 853-860.
304. Jung, M.Y., et al., *Polycan, a β -glucan from *Aureobasidium pullulans* SM-2001, mitigates ovariectomy-induced osteoporosis in rats*. Experimental and Therapeutic Medicine, 2016. **12**(3): p. 1251-1262.
305. Kim, J.W. and S.K. Ku, *Efficacy test of polycan, a beta-glucan originated from *Aureobasidium pullulans* SM-2001, on anterior cruciate ligament transection and partial medial meniscectomy-induced-osteoarthritis rats*. Journal of microbiology and biotechnology, 2012. **22**(2): p. 274-282.
306. Beynen, A. and E. Legerstee, *Influence of dietary beta-1, 3/1, 6-glucans on clinical signs of canine osteoarthritis in a double-blind, placebo-controlled trial*. American Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2010. **5**(2): p. 97-101.

307. Hazot, P. and G.F. MALLEIN, *Gel de cartilage pour la réparation cartilagineuse, comprenant du chitosane et des chondrocytes*. 2016, Google Patents.
308. Ross, G. and T.J. Ross, *Effect of beta-glucan on stem cell recruitment and tissue repair*. 2004, Google Patents.
309. Harnack, U., U. Kellermann, and G. Pecher, *Yeast-derived beta-(1-3),(1-6)-D-glucan induces up-regulation of CD86 on dectin-1-positive human B-lymphoma cell lines*. *Anticancer research*, 2011. **31**(12): p. 4195-4199.
310. Sylla, B., et al., *Oligo-β-(1→3)-glucans: Impact of thio-bridges on immunostimulating activities and the development of cancer stem cells*. *Journal of medicinal chemistry*, 2014. **57**(20): p. 8280-8292.
311. Wang, Y., et al., *GROWTH INHIBITION OF MESENCHYMAL STEM CELLS BY ASPIRIN: INVOLVEMENT OF THE WNT/β-CATENIN SIGNAL PATHWAY*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2006. **33**(8): p. 696-701.
312. Prockop, D.J. and J.Y. Oh, *Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation*. *Molecular Therapy*, 2012. **20**(1): p. 14-20.
313. Waterman, R.S., et al., *A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype*. *PloS one*, 2010. **5**(4): p. e10088.
314. Ferrières, V., et al., *Contribution of Biocatalysis to the Synthesis of β-(1, 3)-Glucans*. *Beta-Glucan, Structure, Chemistry and Specific Application*, 2013: p. 102-111.
315. Friedenstein, A., R. Chailakhyan, and U. Gerasimov, *Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers*. *Cell proliferation*, 1987. **20**(3): p. 263-272.
316. Winter, A., et al., *Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: A comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells*. *Arthritis & Rheumatism*, 2003. **48**(2): p. 418-429.
317. Herlofsen, S.R., et al., *Chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in self-gelling alginate discs reveals novel chondrogenic signature gene clusters*. *Tissue Engineering Part A*, 2010. **17**(7-8): p. 1003-1013.
318. Pearle, A.D., R.F. Warren, and S.A. Rodeo, *Basic science of articular cartilage and osteoarthritis*. *Clinics in sports medicine*, 2005. **24**(1): p. 1-12.
319. Chlubnová, I., et al., *Natural glycans and glycoconjugates as immunomodulating agents*. *Natural product reports*, 2011. **28**(5): p. 937-952.
320. Hwang, S.H., et al., *Toll like receptor 3 & 4 responses of human turbinate derived mesenchymal stem cells: stimulation by double stranded RNA and lipopolysaccharide*. *PloS one*, 2014. **9**(7): p. e101558.

Effets de la Laminarine sur les cellules souches mésenchymateuses : Impact sur la différenciation chondrogénique

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) de la moelle osseuse ont été intensivement étudiées pour leur capacité de régénération et leurs propriétés immunomodulatrices. Beaucoup d'études ont montré que la thérapie qui utilise les CSM améliore les fonctions de tissu ostéo-articulaire particulièrement le cartilage en vue de leur capacité de différenciation en chondrocytes. Les CSM présentent un certain nombre d'avantages pour la médecine régénérative, ces cellules peuvent être facilement isolées et multipliées en culture pour obtenir un nombre approprié pour la thérapie cellulaire. De plus, elles ont une faible immunogénicité, ce que les rend aptes à la transplantation allogénique. Depuis les années 1960, de nombreuses études ont souligné les propriétés médicinales des polysaccharides notamment les β -glucanes qui ont une place particulière du fait de leurs effets immunostimulants. L'objectif de notre travail était de mettre en évidence les capacités d'un β -glucane particulier, la laminarine, sur la prolifération et la différenciation des CSM dans la perspective d'applications dans l'arthrose. Les CSM ont été cultivés dans les milieux de croissance et de différenciation chondrocytaire. La viabilité et l'apoptose des cellules ont été explorées par le comptage, les tests MTT et la coloration à l'annexine V. En outre, l'analyse des protéines spécifiques de la prolifération a été effectuée par le western blott. De plus, l'expression des marqueurs spécifiques des CSM et des chondrocytes a été étudiée à l'aide de la RT-qPCR et de l'immunofluorescence. Nos résultats ont démontré que la stimulation des CSM à la laminarine avec la dose de 1 mg/ml soit en condition de culture de croissance basique ou en chondrogenèse a inhibé la prolifération des cellules sans induire leur apoptose. Encore, dans les conditions de culture chondrogénique, la laminarine à une dose similaire a empêché la différenciation des CSM en chondrocytes.

Mots clefs : Cellules souches mésenchymateuses, prolifération, différenciation chondrocytaire, laminarine.

Growth Inhibition of Mesenchymal Stem Cells by Laminarin: Impact on Chondrocyte Differentiation.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are a population of multipotent cells residing in several readily available adult tissue compartments, thus allowing for their ex vivo expansion. MSCs have a reliable potential for differentiation (plasticity) into cells of the mesodermal lineage (chondrocytes, osteoblasts, adipocytes). Bone marrow-derived MSCs have been a focus of stem cell research in light of their relative ease of isolation and expansion and of their high potential for differentiation. Herein, the aim of the present PhD is to explore the potential of a β -glucan (laminarin) on Mesenchymal stem cell proliferation and differentiation for future benefit for osteoarthritis treatment. MSCs were cultured in MSC growth and chondrogenic differentiation mediums. Cells viability and apoptosis were explored by cell count, MTT assays and Annexin V staining. In addition, Analysis of the specific protein of cell proliferation was performed by western blott. Furthermore, mRNA and protein expression of specific markers for MSCs and chondrocytes were studied using qPCR and immunofluorescence. Our results demonstrated that stimulation of MSC with laminarin at a dose of 1 mg/ml in either basic growth culture or chondrogenesis inhibited cell proliferation without inducing their apoptosis. Furthermore, under chondrogenic culture conditions, laminarin at a similar dose prevented the differentiation of MSC into chondrocytes.

Key words : Mesenchymal stem cells, proliferation, chondrogenic differentiation, laminarin.



Laboratoire : EA 4708 / I3MTO / Université d'Orléans



