



HAL
open science

Les cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux humain : Etude de leur potentiel myogénique

Ari Massoudi

► **To cite this version:**

Ari Massoudi. Les cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux humain : Etude de leur potentiel myogénique. Biologie cellulaire. Université Nice Sophia Antipolis, 2007. Français. NNT: . tel-00156629

HAL Id: tel-00156629

<https://theses.hal.science/tel-00156629>

Submitted on 21 Jun 2007

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

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

UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS

UFR SCIENCES

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES

de l'UNIVERSITE de Nice-Sophia Antipolis

Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Présentée et soutenue par

Ali MASSOUDI

le 20 Avril 2007

Les cellules souches mésenchymateuses

du tissu adipeux humain :

Etude de leur potentiel myogénique

JURY:

Professeur Claude DESNUELLE

Président

Docteur Josiane FONTAINE-PERUS

Rapporteur

Professeur Louis CASTEILLA

Rapporteur

Docteur Christian DANI

Examineur

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
ABREVIATIONS	4
Avant-propos	5
INTRODUCTION	6
I Les cellules souches	7
I.1 Présentation des cellules souches	7
I.2 Place des cellules souches adultes parmi les autres cellules	8
I.3 Cellules souches et thérapie cellulaire	8
I.4 La transplantation	9
I.4.1 Approches actuelles de la transplantation	9
I.4.2 Perspectives d'utilisation des cellules ES.....	10
I.4.3 Utilisation thérapeutique des cellules souches adultes	12
I.4.4 Perspectives d'utilisation des cellules souches adultes	12
II Cellules souches, concepts et théories	14
II.1 La cellule souche, une cellule indifférenciée	14
II.2 Traits importants caractérisant les cellules souches	15
II.2.1 Clonogénicité	15
II.2.2 Auto-renouvellement.....	15
II.2.2.1 Modèle symétrique	16
II.2.2.2 Modèle asymétrique.....	16
II.2.3 Cellule souche et brin d'ADN immortel	18
II.2.3.1 Présentation	18
II.2.3.2 Théories	20
II.2.4 Hiérarchie ontogénique au cours de l'histogenèse	20
II.2.5 Développement régulé chez les Vertébrés	22
II.2.5.1 Inductions instructives	23
II.2.5.2 Inductions permissives.....	23
II.2.5.3 Compétence cellulaire	23
II.2.6 Restriction de lignage et de potentiel	25
II.2.6.1 Restriction de lignage des progéniteurs	25
II.2.6.2 Restriction du potentiel des cellules souches	27
II.2.6.3 Théories	27
II.2.7 Multipotence des cellules souches	29
II.2.7.1 Plasticité	29
II.2.7.2 Trans-détermination.....	29
II.2.7.3 Trans-différenciation	30
II.2.7.4 Fusion cellulaire	31
II.3 Autres traits caractérisant les cellules souches	32
II.3.1 Phénotype « Side Population ».....	32
II.3.2 Activité phagocytaire constitutive.....	32
II.3.3 Capacité immunosuppressive	32

II.3.4	Cellule souche adulte et homéostasie tissulaire.....	34
II.4	Obtention, culture et caractérisation des cellules souches	36
II.4.1	Culture des cellules souches.....	36
II.4.2	Sénescence cellulaire.....	36
II.4.3	Cellule souche et sénescence réplivative.....	38
II.4.4	Différents stades de transformation.....	38
II.5	Cellules souches mésenchymateuses (MSC)	40
II.5.1	Introduction.....	40
II.5.2	Localisation <i>in vivo</i> des MSC.....	40
II.5.2.1	MSC et fibroblastes ?.....	40
II.5.2.2	MSC et péricytes ?.....	41
II.5.3	Existence <i>in vivo</i> des MSC.....	45
II.5.4	Définition de l'ISCT	45
II.6	Cellules hMADS, MSC du tissu adipeux humain	47
II.6.1	Présentation du tissu adipeux	47
II.6.1.1	Tissu adipeux blanc (TAB).....	47
II.6.1.2	Tissu adipeux brun (TABr).....	49
II.6.1.3	Origine embryo-fœtale du tissu adipeux blanc	50
II.6.2	Obtention et propriétés des cellules hMADS	50
II.7	Muscle squelettique.....	53
II.7.1	Introduction.....	53
II.7.2	Tissu musculaire strié squelettique.....	53
II.7.3	Différents types de fibres musculaires	55
II.7.4	Adaptabilité du muscle squelettique.....	57
II.7.4.1	Hypertrophie/hypotrophie.....	57
II.7.4.2	« Transition » fibre rapide ⇔ lent	57
II.7.5	Myogenèse chez l'adulte.....	58
II.7.5.1	Introduction	58
II.7.5.2	Aspects cellulaires de la régénération musculaire	58
II.7.5.3	Aspects moléculaires de la régénération.....	59
II.8	Dystrophie Musculaire de Duchenne	62
II.8.1	Génétique de la Dystrophie Musculaire de Duchenne	62
II.8.2	Physiopathologie de la DMD	63
II.8.3	Perspectives thérapeutiques pour traiter la DMD.....	64
II.8.3.1	Cytothérapie.....	65
II.8.3.2	Génothérapie.....	66
II.8.3.3	Pharmacothérapie	68
RESULTATS	70	
III	Modification génétique des cellules hMADS	71
III.1	Introduction.....	71
III.2	Résultats.....	71
III.2.1	Transduction par le lentivirus nlsLacZ.....	72
III.2.2	Transduction par le lentivirus GFP	72

III.3 Conclusion	74
III.4 Matériels et Méthodes.....	74
III.4.1 Transduction lentivirale.....	74
III.4.2 Différenciation des cellules hMADS	74
IV Potentiel myogénique des cellules hMADS.....	76
V Conversion myogénique des cellules hMADS.....	77
V.1 Introduction.....	77
V.2 Résultats.....	77
V.3 Conclusion	79
V.4 Matériels et Méthodes.....	79
V.4.1 Transduction lentivirale et induction myogénique	79
V.4.2 RT-PCR.....	80
VI Discussion et Perspectives.....	81
VI.1 Programmation myogénique des cellules hMADS.....	81
VI.1.1 Transactivation des loci musculaires.....	81
VI.1.2 Répressions des loci non-musculaires	86
VI.2 Altération du transcriptome des myocytes après fusion avec les cellules hMADS	88
VI.3 Fusion des cellules hMADS avec les myocytes	89
VII Conclusion.....	91
VIII Références.....	92
ANNEXES	107

ABBREVIATIONS

ADN	Acide DesoxyriboNucleique
aFABP	adipocyte-Fatty Acid Binbing Protein
ALP	AlkaLine Phosphatase
AMGD	AMino-GlycosiDes
ARN	Acide RiboNucleique
C/EBP	CCAAT/Enhancer Binding Protein
CBF	Core Binding Factor
cellules ES	cellules souches embryonnaires (Embryonic Stem cells)
cellules hMADS	human Multipotent Adipose tissue Derived Stem
DFSH	Dystrophie Facio-Scapulo-Humérale
DMD	Dystrophie Musculaire de Duchenne
DPC	Doublements de Populations Cumulés
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
GAG	GlycosAminoGlycanes
GFP	Green Fluorescent Protein
GPDH	Glycerol-3-Phosphate- DésHydrogénase
HAT	Histone Acetyl-Transferase
HDAC	Histone DeaCetylAse
HSC	Hematopoietic Stem Cells (cellules souches hématopoïétiques)
IP	Inhibiteur du Protéasome
ISCT	International Society for Cellular Therapy
LB	Lame Basale
LPL	LipoProtein Lipase
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MSC	Mesenchymal Stem Cells (cellules souches mésenchymateuses)
NSC	Neural Stem Cells (cellules souches nerveuses)
PG	ProtéoGlycanes
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
TAB	Tissu Adipeux Blanc
TABr	Tissu Adipeux Brun
VD3R	Vitamin-D3 Receptor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Avant-propos

Les cellules souches et la thérapie cellulaire génèrent un engouement certain aussi bien pour les biologistes que pour les cliniciens et le grand public. Dans le même temps, nombreuses sont les interrogations et doutes qui restent à être éclaircis.

Mon projet de doctorat s'est intéressé à un modèle nouveau de cellules souches obtenues à partir du tissu adipeux humain, les cellules hMADS.

Lors de mon arrivée dans le laboratoire en première année de thèse, l'isolement de ces cellules était tout à fait récent. L'objectif de mon projet a été d'évaluer **les potentialités musculaires** de cette population cellulaire. Il m'a donc fallu caractériser ces cellules et mettre en place tous les outils nécessaires à l'étude des événements cellulaires et moléculaires impliqués dans l'engagement de ces cellules. Parmi ces outils, l'obtention de cellules hMADS génétiquement modifiées s'est avérée obligatoire.

En introduction de ce manuscrit, nous présenterons tout d'abord « les cellules souches ». Nous tenterons de présenter les définitions, concepts et théories autour de ces cellules. Puis nous aborderons plus particulièrement la question des cellules souches mésenchymateuses, dont les cellules hMADS en font partie. Enfin, nous aborderons le tissu musculaire squelettique, la myogenèse et la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD). La DMD est une myopathie génétique, candidat possible pour la thérapie cellulaire, à laquelle les cellules hMADS pourraient contribuer dans une perspective de traitement de cette maladie.

Ce projet orienté à long terme vers la thérapie cellulaire chez l'homme, représente principalement les étapes indispensables pour comprendre et rationaliser les mécanismes de réparation par les cellules hMADS.

INTRODUCTION

I Les cellules souches

I.1 Présentation des cellules souches

Que ce soit dans un organisme adulte ou au cours du développement embryonnaire, on distingue quatre types de cellules souches en fonction de la diversité des types cellulaires qu'elles peuvent engendrer.

En premier lieu, l'œuf zygote et très vraisemblablement chacun des huit premiers blastomères qui en dérivent par clivage, peuvent être considérés comme des cellules souches **totipotentes** puisqu'ils peuvent engendrer un individu complet.

Puis, on distingue les cellules souches **pluripotentes** de l'embryon (embryoblastes ou cellules de la couche cellulaire interne du blastocyste) qui donnent, *in vitro* mais également *in vivo* (après réimplantation dans un blastocyste), la plupart des types cellulaires mis à part les tissus extra-embryonnaire à l'origine du placenta.

Enfin, les cellules souches **multipotentes** se différencient en un nombre restreint de types cellulaires. Chez l'embryon, les cellules des feuillets ectodermiques, mésodermiques, endodermiques, ainsi que les cellules de la crête neurales sont considérées comme multipotentes. Chez l'adulte, les cellules souches les mieux caractérisées sont les cellules souches hématopoïétiques, localisées dans la moelle osseuse, qui engendrent uniquement les cellules des lignages myéloïdes et lymphoïdes, soit une dizaine de types cellulaires.

Pour définir « les cellules souches », on dispose d'un certain nombre de traits phénotypiques. Ces caractères seront abordés plus précisément au chapitre II de ce manuscrit.

I.2 Place des cellules souches adultes parmi les autres cellules

Dans l'espèce humaine, on estime qu'un adulte est composé de dix trillions de cellules (10^{18}). Les cellules contribuant à la structure-fonction des tissus et organes sont différenciées en 411 types cellulaires selon une estimation récente [1]. Ces cellules différenciées pour la plupart ne se divisent plus. Toutefois, pour remplacer ces cellules spécialisées qui disparaissent à cause du vieillissement ou de lésions, on estime qu'à chaque seconde plus de vingt millions de divisions cellulaires sont nécessaires. Les cellules qui assurent cette fonction de renouvellement des cellules différenciées sont appelées cellules souches adultes. Ces cellules, fondamentales à l'homéostasie tissulaire, offrent également des perspectives thérapeutiques prometteuses. Les cellules souches adultes peuvent être extraites de la plupart des tissus, y compris du cerveau [2-4] et du cœur [5-7], organes longtemps considérés comme définitivement « post-mitotique » et donc réfractaire à toute régénération. Ce sont des cellules moins fréquentes par rapport aux cellules différenciées, bien que plus abondantes dans certains tissus (comme le cordon ombilical). On estime par exemple la fréquence des cellules souches de la rétine à 1 pour 500 autres cellules [8], et dans la moelle osseuse la fréquence des HSC [9, 10] et des MSC [11, 12] est de 1 cellule souche pour 10^5 autres cellules. Ces fréquences varient sensiblement en fonction des donneurs, mais également en fonction de l'âge des donneurs avec une possible raréfaction au cours de la vie.

Les cellules souches sont généralement difficiles à identifier et à purifier, de plus leur culture *in vitro* est loin d'être totalement maîtrisée.

I.3 Cellules souches et thérapie cellulaire

Certaines maladies résultent de la destruction (totale ou partielle) ou d'un dysfonctionnement d'un tissu ou d'un organe.

Dans certains cas, les greffes d'organes ou les transplantations de tissu permettent de traiter ces maladies. Les premières greffes d'organe datent des années 1950. Depuis, elles se sont considérablement développées avec l'amélioration des techniques chirurgicales et l'apparition des nouveaux médicaments immunodépresseurs qui limitent les problèmes liés au rejet de la greffe. Toutefois, une étape limitante reste la disponibilité des greffons immunologiquement compatibles.

Une alternative prometteuse à ces méthodes est la thérapie cellulaire/tissulaire. Elle consiste à transplanter des cellules souches (thérapie cellulaire) ou un tissu formé *in vitro* à partir de cellules souches (thérapie tissulaire) pour remplacer des tissus/organes lésés. Cette thérapie, encore limitée aujourd'hui, pourrait s'avérer très prometteuse.

Dans la suite de cet exposé et pour des raisons didactiques, le terme de thérapie cellulaire englobera la notion de thérapie tissulaire.

I.4 La transplantation

I.4.1 Approches actuelles de la transplantation

L'un des traitements les plus anciens faisant intervenir des cellules souches adultes est la transplantation de moelle osseuse, dans laquelle des cellules souches hématopoïétiques sont transférées via une greffe de moelle osseuse issue d'un donneur adulte. Elle est utilisée de façon routinière depuis les années 1970 en hématologie et permet de traiter certaines maladies du sang et du système immunitaire. Dans tous les cas de figure, la technique de thérapie cellulaire consiste à transférer des cellules souches dans le tissu à réparer puis à obtenir et à maintenir une différenciation adéquate *in vivo*. Les techniques reposent sur le transfert de cellules allogéniques, c'est-à-dire qui proviennent d'un donneur génétiquement différent mais proche du patient.

Deux problèmes se posent :

- Le premier problème rencontré en thérapie cellulaire est celui de la quantité de cellules à transplanter. Pour y remédier, dans le cadre des protocoles expérimentaux précédents, le donneur doit recevoir avant le prélèvement des cellules un traitement qui stimule la multiplication des cellules souches présentes dans le sang ou la moelle osseuse.
- Le second problème est celui de la compatibilité immunologique et le risque de rejet du transplant/greffon. Pour le limiter, de façon générale pour tous les protocoles thérapeutiques, la réussite de la thérapie cellulaire requiert que le donneur et le receveur soient les plus compatibles possibles. Cela signifie qu'ils doivent présenter des antigènes d'histocompatibilité les plus proches possibles. Cette condition obligatoire limite fortement le nombre de greffon disponible. En outre, le receveur sera traité « à vie » avec des immunosuppresseurs afin de réduire ses défenses immunitaires, condition requise pour le succès de la greffe. L'inconvénient est qu'il devient alors très sensible

aux agents pathogènes et infectieux. Certaines cellules souches présenteraient des propriétés immunosuppressives qui pourraient être exploitées en allogreffes sans traitement pharmacologique immunosuppressif.

Les greffes qui ne posent pas de problèmes majeurs concernent les autogreffes (cellules, tissus du patient), pour exemple, la transplantation de peau chez les grands brûlés ou de moelle osseuse dans les cas de patient ayant eut une irradiation intensive suite à une leucémie.

I.4.2 Perspectives d'utilisation des cellules ES

Les cellules souches embryonnaires (cellules ES) sont le prototype même de cellules souches. Les techniques de culture de cellules ES murines ont apporté les bases méthodologiques à la culture de cellules souches embryonnaires humaines, bien que des différences existent [13]. Ainsi, à partir des cellules du bouton embryonnaire (embryoblastes) de blastocystes humains, une soixantaine de culture de cellules ES ont été établie dans le monde [13]. Ces cellules pourraient être utilisées en thérapie cellulaire. Toutefois, chez la souris comme chez l'homme, on est encore loin de maîtriser leur différenciation *in vitro* et a fortiori après leur transplantation dans l'organisme adulte. De plus, l'obstacle de l'incompatibilité immunologique demeure. Enfin, rappelons que l'utilisation de cellules ES humaines suscite un important débat d'ordre éthique.

En attendant le développement des thérapies cellulaires utilisant les cellules souches adultes, une alternative serait de produire des cellules ES génétiquement identiques au patient en recourant au clonage thérapeutique (Figure 1) [14, 15]. Dans ce but, une cellule somatique, différenciée ou non, est prélevée chez le patient destinataire de la greffe. Cette cellule est ensuite fusionnée, par choc électrique, avec un ovocyte énuclée receveur provenant d'une tiers personne. Alternativement, le noyau de la cellule somatique peut être directement transféré par micro-injection dans l'ovocyte receveur. Puis, le noyau de la cellule du patient est déprogrammé par le cytoplasme de l'ovocyte, et il en résulte ainsi un œuf zygotique totipotent ayant le même génome que le patient donc immunologiquement compatible. Au stade du blastocyste, les embryoblastes (cellules de la couche interne - Inner Cell Mass-) sont prélevés et pourront être cultivés [16]. On disposerait alors d'une source quasi-illimitée de cellules ES pluripotentes pour le patient. Néanmoins, pour des raisons éthiques, le blastocyste humain ainsi créé doit être détruit, et ne doit jamais être transféré dans une mère porteuse afin d'éviter tout risque de clonage reproductif [17, 18].

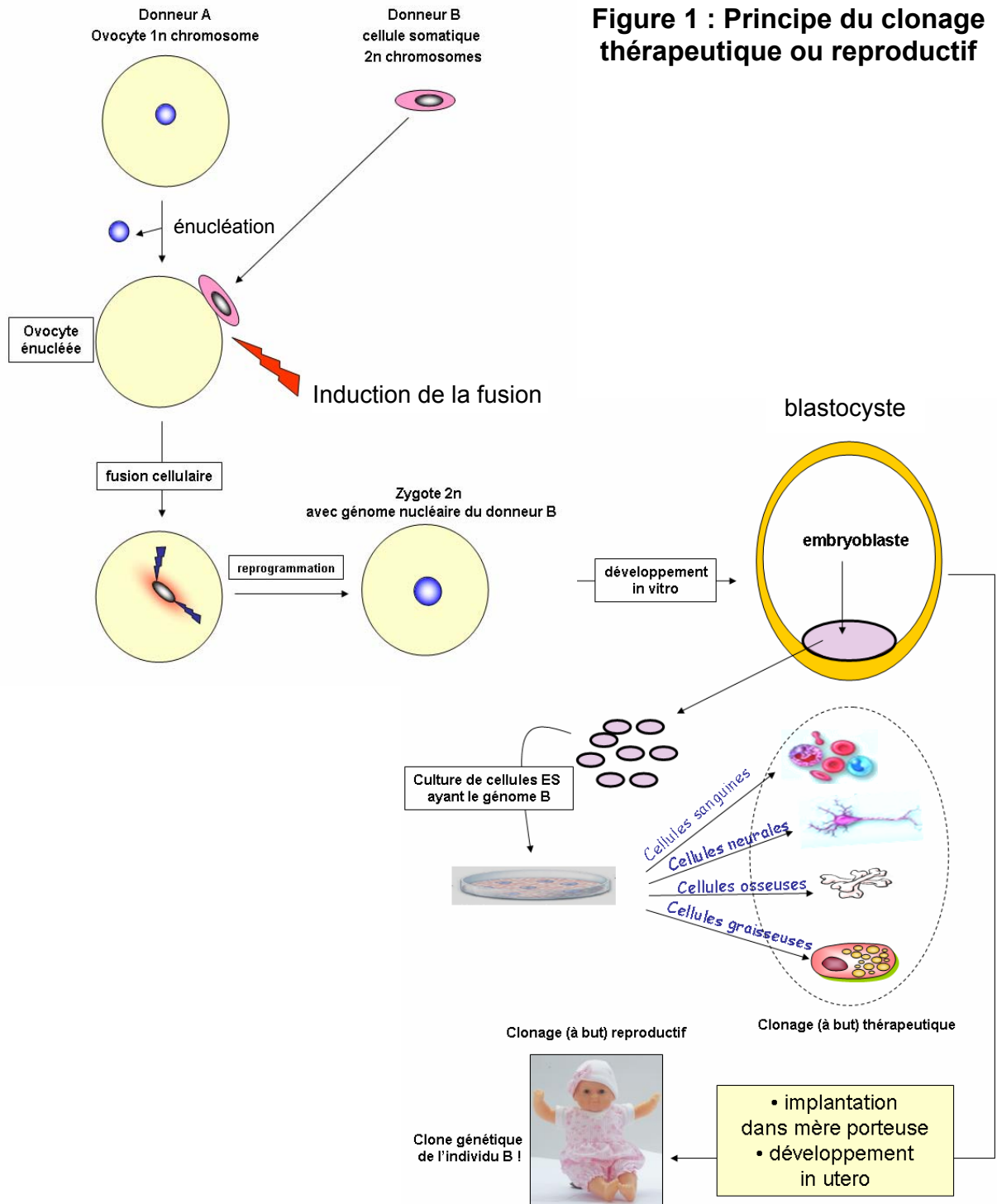


Figure 1 : Principe du clonage thérapeutique ou reproductif

I.4.3 Utilisation thérapeutique des cellules souches adultes

À l'exception des greffes de moelle osseuse et de peau, à ce jour il n'existe pas de thérapie systématique utilisant la transplantation de cellules souches, qu'il s'agisse de cellules souches indifférenciées ou de cellules plus ou moins différenciées *in vitro*. Enfin, on ne sait pas contrôler la multiplication et le maintien de la différenciation des cellules *in vivo*, une fois quelles sont administrées au patient.

Chez les muridés, les premiers essais ont concerné le traitement des maladies auto-immunes, neuro-dégénératives et la réparation du cœur après un infarctus. L'injection intra-cardiaque ou intra-vasculaire après un infarctus du myocarde [19, 20], et plus récemment de cellules souches adultes [6, 7, 21, 22] permet une certaine restauration de la fonction cardiaque. Appliquée à l'espèce humaine, cette technique nécessiterait d'injecter des millions de cellules préparées au préalable à partir des cellules souches du patient, ce qui est difficilement compatible avec la brutalité d'un infarctus et l'urgence du traitement.

Outre le rejet des cellules transplantées, d'autres risques sont à envisager : les cancers, les infections et les différenciations inappropriées. Les similitudes entre cellules cancéreuses et cellules souches font craindre que ces dernières puissent se transformer en cancers ou promouvoir le développement de tumeurs préexistantes [23]. Un autre risque majeur est la transmission d'agents infectieux. Comme pour toutes les greffes, les transplantations et les transfusions, il faut s'assurer que le donneur de cellules souches ne soit pas porteur d'agents infectieux. Il faut s'assurer également que la culture des cellules souches est saine, exempt de contamination microbienne. Enfin, si on transplante dans un organe lésé des cellules souches provenant d'un autre tissu, ces cellules pourraient générer des types cellulaires inadéquats non compatibles avec la fonction du tissu/organe à restaurer.

I.4.4 Perspectives d'utilisation des cellules souches adultes

Ces dernières années, des travaux indiquent que des cellules souches à fort potentiel régénératif sont présentes dans de nombreux tissus de l'adulte et pourraient à terme être utilisées en thérapie cellulaire.

Par exemple, dans le système nerveux, des cellules souches neurales entretiendraient *in vivo* une neuro-gliogenèse continue [4, 24]. Ainsi, chez la souris et dans l'espèce humaine, une population de cellules souches multipotentes a été isolée à partir de cerveaux d'individus adultes. Cette population relativement homogène engendre *in vitro* des neurones et des cellules

gliales [2, 3]. On peut également citer les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse qui sont à l'origine des lignages myéloïdes et lymphoïdes [25]. Les cellules souches adultes représenteront un outil indispensable à la thérapie cellulaire. Elles seront transplantées dans les tissus qui nécessitent une réparation, et s'y différencieront *in situ*. Alternativement, on pourra envisager de plus ou moins les différencier préalablement *in vitro* dans le type cellulaire déficient, avant une transplantation. Dans tous ces cas de figure, les problèmes liés aux rejets de greffe seront réduits si les cellules souches sont prélevées sur le patient lui-même.

Toutefois, *in vitro*, on ne sait pas encore maîtriser les conditions de culture de ces cellules souches adultes pour leur permettre une expansion suffisante d'une part, et d'autre part pour orienter leur différenciation vers le type cellulaire adéquat.

L'utilisation des cellules souches adultes permettra également d'éviter l'utilisation des cellules souches embryonnaires humaines pour lesquelles des questions éthiques majeures se posent. Néanmoins une caractérisation exhaustive des différents paramètres évoqués précédemment doit être menée avant une application clinique chez l'Homme.

II Cellules souches, concepts et théories

La définition minimum mais insuffisante, attribuable à une cellule souche serait une cellule « indifférenciée » ayant « le potentiel » de se différencier en au moins un type cellulaire. Cette potentialité se définit par la capacité qu'a cette cellule d'acquérir les fonctionnalités spécifiques nécessaire à la physiologie d'un tissu donné.

II.1 La cellule souche, une cellule indifférenciée

Une cellule « indifférenciée » (ou blaste) ne présente les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles d'aucun des tissus adultes. La cytologie du blaste met en évidence un rapport nucléo-cytoplasmique élevé c'est-à-dire peu de cytoplasme, peu d'organelles et un noyau sphérique et proéminent [26-30]. Cet état peut être en soi considéré comme une caractéristique, une identité propre et matérialisé par l'expression d'une cohorte de marqueurs de surface et, surtout par l'expression de facteurs de transcription « garant » de cet état « souche ».

Pour exemple, les embryoblastes ainsi que les cellules ES qui en dérivent expriment les facteurs de transcriptions STAT3, Oct3/4 et Nanog. Ces protéines fondamentales répriment l'engagement de ces cellules vers les lignages ectodermiques, mesodermiques et endodermiques tout en préservant leurs capacités différenciatrices (pluripotence) aux cours des générations cellulaires [31]. Chez l'adulte, les HSC sont caractérisables par l'expression d'une combinaison de marqueurs de surface particuliers (par ex. CD45, CD34), ainsi que par l'expression de facteurs de transcription, Bmi-1 et HOXB4, fondamentaux à l'auto-renouvellement de ces cellules [32].

II.2 Traits importants caractérisant les cellules souches

II.2.1 Clonogénicité

La clonogénicité définit que les propriétés « souches » sont présentes intrinsèquement dans une cellule. Cette notion exclut la coopérativité cellulaire comme étant responsable du phénotype « souche » d'une population cellulaire ; mais également, le fait que plusieurs types de précurseurs sans relation filiale immédiate puissent être la cause de la multipotence de cette même population.

II.2.2 Auto-renouvellement

L'auto-renouvellement définit la capacité qu'ont les cellules souches de proliférer tout en maintenant au fil des générations leurs potentialités [33].

Deux types d'auto-renouvellements sont possibles, symétrique ou asymétrique (Figure 2).

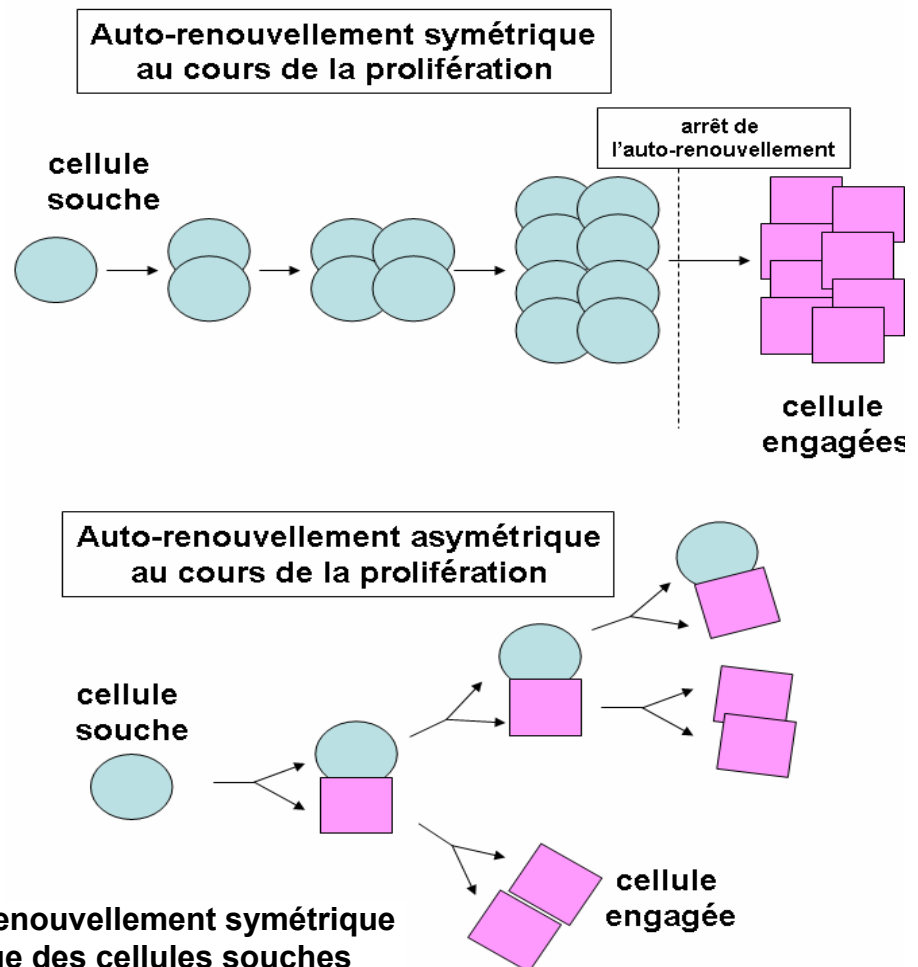


Figure 2 : Auto-renouvellement symétrique ou asymétrique des cellules souches

II.2.2.1 Modèle symétrique

Dans le modèle « symétrique », chaque cellule souche/progénéiteur se divise et génère deux cellules filles identiques et équivalentes entre-elles mais également par rapport à la cellule mère (divisions homoplastiques). Lorsque les signaux contrôlant positivement l'auto-renouvellement viennent à manquer ou lorsque des signaux contrôlant positivement la détermination apparaissent, l'ensemble des cellules souches s'engagent alors vers la différenciation (engagement symétrique).

Pour illustration, *in vitro*, les cellules ES s'auto-renouvelleraient et s'engageraient de façon symétrique [34].

II.2.2.2 Modèle asymétrique

Le modèle « asymétrique » (ou hétéroplastiques) peut-être stochastique ou déterministe (Figure 3).

II.2.2.2.1 Modèle asymétrique-déterministe

Dans le modèle asymétrique-déterministe, une molécule « régulant » l'auto-renouvellement et/ou l'engagement aura une localisation/production subcellulaire privilégiée au niveau d'un des deux pôles de la cellule avant la cytodivision, ainsi les deux cellules filles résultantes différeront phénotypiquement et donc n'auront pas le même destin. La nature de la molécule ainsi distribuée peut-être protéique (facteurs de transcription), voire même l'ADN génomique nucléaire (voire infra).

Relativement bien connu chez la Drosophile, on pensait que ce type d'auto-renouvellement n'avait pas été conservé lors de l'évolution chez les mammifères. Récemment, il a été mis en évidence chez la souris, par différents type de cellules souches tels que les NSC [35], les cellules satellites musculaires [36, 37] et les cellules souches de l'épithélium intestinal ou de la glande mammaire [38, 39].

II.2.2.2.2 Modèle asymétrique-stochastique

Le modèle asymétrique-stochastique, est en fait un auto-renouvellement symétrique car les deux cellules filles sont identiques et équivalentes, mais un microenvironnement immédiat différent induit l'une vers la différenciation et/ou l'autre en auto-renouvellement. Si au contraire, le microenvironnement est le même, les deux cellules filles auront le même destin (différenciation, ou auto-renouvellement).

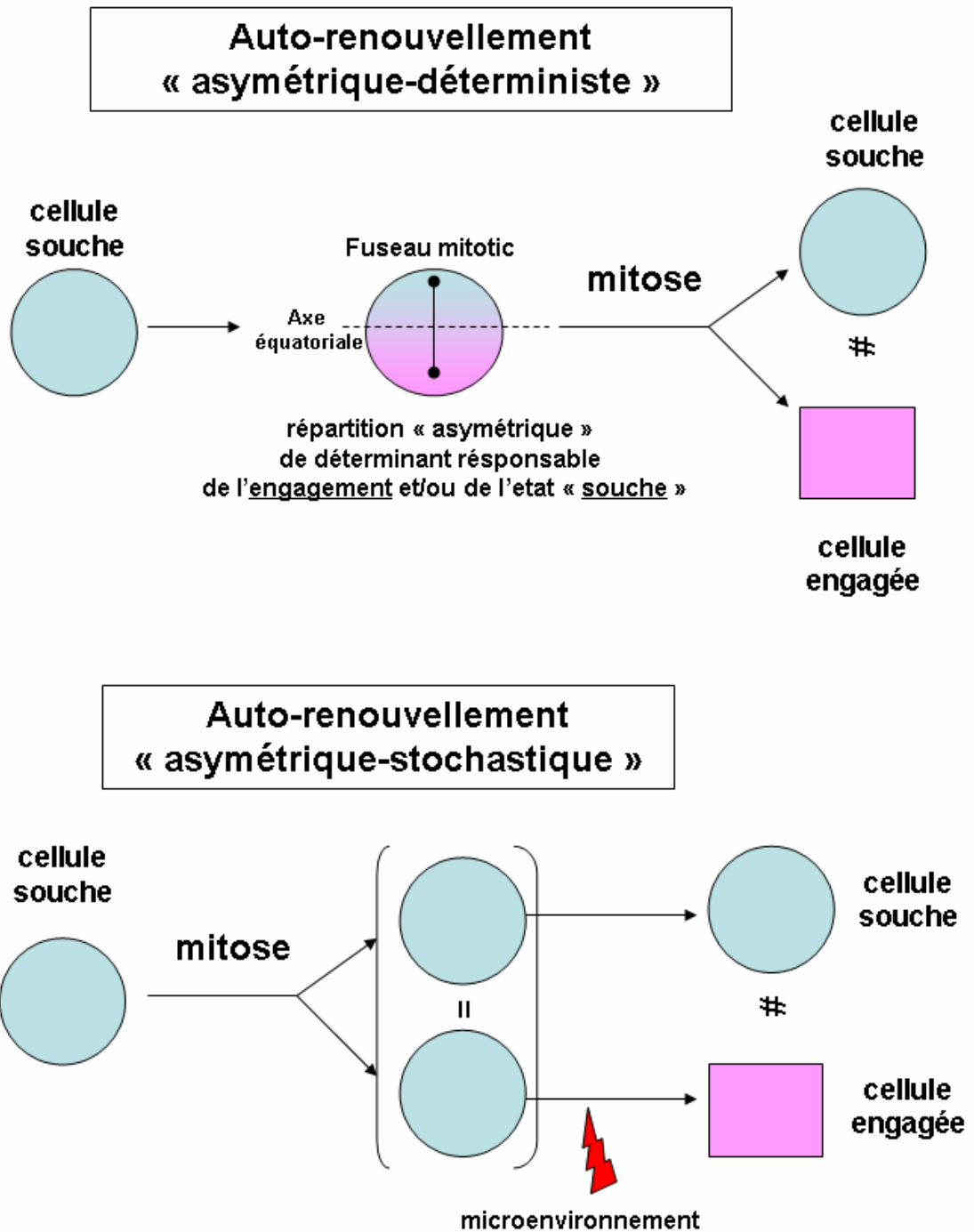


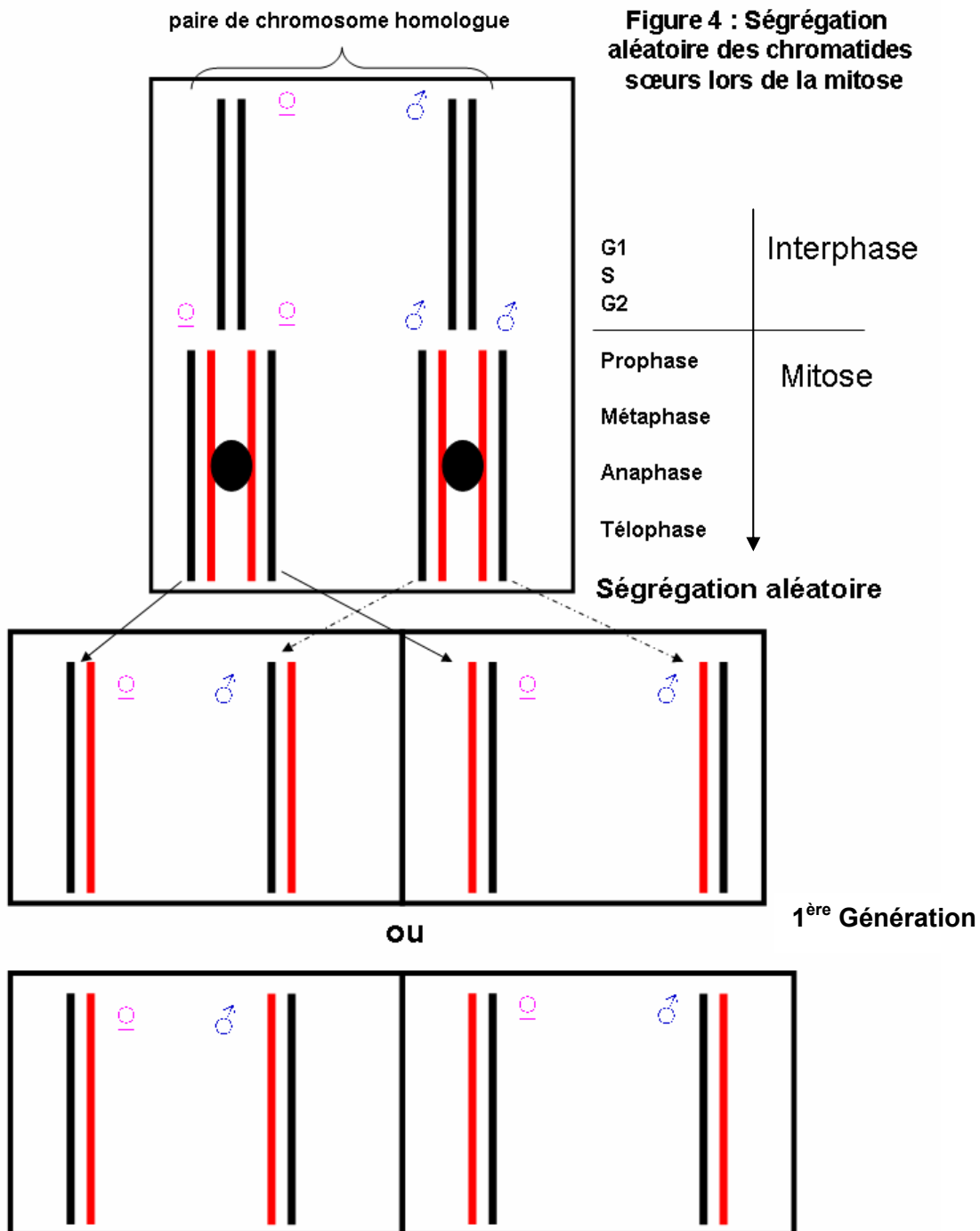
Figure 3 : Auto-renouvellement assymétrique des cellules souches

Le modèle symétrique permet une « augmentation » du capital (pool) de cellules souches. Il intervient au cours du développement embryonnaire précoce ou lors de lésion tissulaire. Le modèle asymétrique permet le « maintien » du capital de cellules souches ; ce modèle est donc plus adapté au renouvellement tissulaire normal.

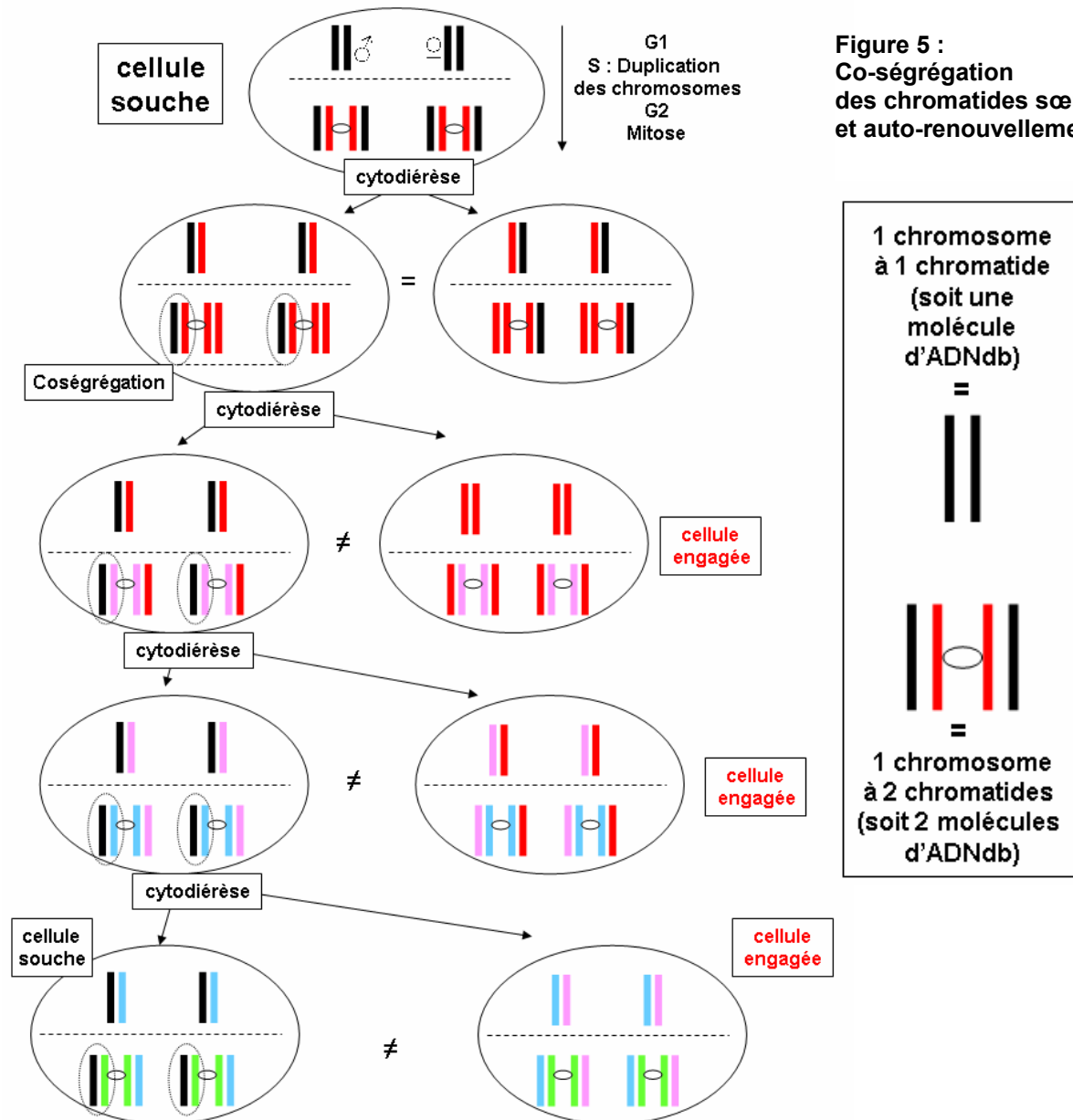
II.2.3 Cellule souche et brin d'ADN immortel

II.2.3.1 Présentation

Chez les eucaryotes, au cours du cycle cellulaire, les chromatides sœurs d'un chromosome sont séparées l'une de l'autre à l'anaphase et distribuées aléatoirement à chaque centrosome pour être *in fine* ségréguées dans chaque une des deux cellules filles (Figure 4).



Récemment, et dans certaines cellules souches (cellules satellites, NSC et cellules souches épithéliales) une ségrégation non-aléatoire des chromatides a été mise en évidence [35, 36, 38, 39]. Cette transmission non-aléatoire entraîne la co-ségrégation des chromatides contenant un brin d'ADN matrice ancestral. Ainsi, au fil des générations cellulaires, les cellules souches de la population, à la différence des cellules engagées, contiennent et transmettent ces brins « d'ADN immortel » (Figure 5). Une telle transmission de l'ADN démontre *per se* que les cellules souches s'auto-renouvellent de façon asymétrique-déterministe.



II.2.3.2 Théories

La transmission préférentielle (ou exclusive ?) des brins d'ADN ancestraux dans les cellules souches pourrait permettre à ces cellules de posséder une information génétique originelle c'est-à-dire la moins copiée, et donc potentiellement la moins mutée possible.

Alternativement mais non-exclusivement, ces brins d'ADN pourraient être marqués dans la cellule souche ancestrale (modifications épigénétiques telles que des méthylations ?). Ainsi, on pourrait attribuer une fonction causale à la transmission asymétrique de l'ADN « immortel » ; cette ADN conférerait alors aux cellules qui les héritent, le phénotype « souche ».

II.2.4 Hiérarchie ontogénique au cours de l'histogenèse

La détermination définie initialement par les embryologistes du début du XXe siècle, correspond à un processus conférant aux cellules souches la capacité intrinsèque (programme génétique) de se différencier en un type cellulaire. Les cellules souches, une fois « déterminées » sont dénommées « progéniteurs ». Ainsi, un progéniteur pourra s'engager irrémédiablement dans le processus de différenciation pour lequel il est programmé, et ceci insensiblement vis-à-vis des signaux micro-environnementaux. Expérimentalement ceci se traduit par la capacité à générer un tissu ectopique une fois transplanté dans une région secondaire de l'embryon.

Cette vision de la détermination a quelque peu évolué. En effet, bien que possédant le « programme », certains progéniteurs ne pourront s'engager dans le processus différenciateur que s'ils reçoivent de leur environnement des signaux permissifs.

Par conséquent, comment expérimentalement distinguer une cellule souche qui par essence est « indéterminée » de l'un des ces progéniteurs ?

Lorsque des marqueurs différentiellement exprimés entre l'état « souche » et le progéniteur sont connus, la question peut être résolue. En effet, il est facile de suivre la modulation de l'expression de tels marqueurs au cours de la progression cellule souche au progéniteur.

A l'inverse, lorsque de tels marqueurs sont inconnus, ce qui est le cas pour les MSC, il est difficile de distinguer conceptuellement la cellule souche d'un progéniteur qui présenterait macroscopiquement les mêmes propriétés telles que la multipotence, l'auto-renouvellement et la clonogénicité...etc.

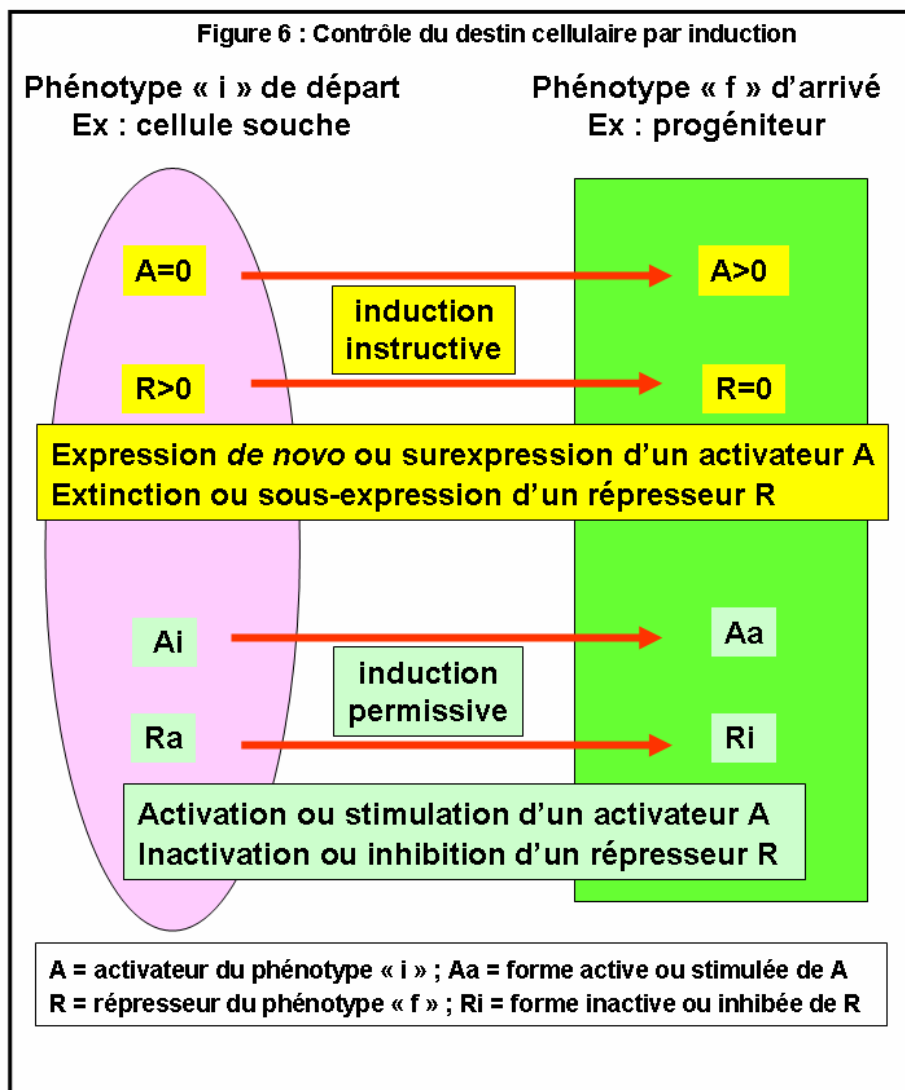
Enfin, les progéniteurs génèrent à leur tour des cellules, dénommées « précurseurs », plus avancées dans le programme. Les précurseurs, cellules (à priori) unipotentes, bien que ne présentant pas toutes les fonctionnalités du phénotype terminal, peuvent exprimer quelques marqueurs spéciaux du phénotype terminal. Les précurseurs s'engagent alors dans le processus de différenciation de l'hématopoïèse. Notons que les progéniteurs/précurseurs sont dénommés « transit-amplifying cells » en rapport à leur propension à proliférer rapidement (à la différence des cellules souches - en théorie -) avant de s'engager dans la différenciation.

La différenciation est une modification du phénotype principalement qualitative (acquisition de nouvelles propriétés). Une fois différenciée, une cellule peut encore évoluer par une augmentation quantitative de son phénotype (par exemple transformation d'un adipocyte multiloculaire vers le stade uniloculaire, d'un monocyte en macrophage, ou encore la transformation d'un myotube en myofibre). Ce processus ultime de la différenciation est dénommé maturation.

II.2.5 Développement régulé chez les Vertébrés

Chez les Vertébrés, chaque étape de l'histogenèse, et donc la progression dans un lignage à partir d'une cellule souche jusqu'à l'état différencié, nécessite des interactions complexes et spécifiques avec le microenvironnement. Ces interactions (médiateurs cellulaires endo, auto, para et/ou juxtacrine) qui permettent la modification du destin cellulaire, ont été initialement décrites au début du XXe siècle sous le terme d'induction. L'élaboration spatio-temporelle de ces inductions permet aux différentes différenciations de se produire aux bons moments et aux bons endroits au cours de l'embryogenèse, mais très vraisemblablement lors de l'histogenèse chez l'adulte également.

On peut décrire deux types d'induction : l'induction instructive et l'induction permissive (Figure 6).



II.2.5.1 Inductions instructives

La cellule souche, le progéniteur ou le précurseur, avant de recevoir l'induction, n'ont pas la capacité intrinsèque de progresser dans le lignage. L'induction instructive leur confère cette potentialité. La conséquence moléculaire de ce type d'induction sera l'acquisition par expression *de novo* d'un activateur A spécifique du stade suivant. Les effets de doses sont également à inclure dans ce type d'induction, en envisageant par exemple que la surexpression de A une fois dépassant un seuil critique, puisse entraîner la progression. Inversement et de façon non-exclusive, l'extinction totale ou partielle (sous-expression en deçà d'un certain seuil) d'un répresseur R du stade suivant peut-être envisagée. La nature moléculaire de A ou R peut être des facteurs de transcription (trans-activateur et trans-répresseur), voire des modulateurs épigénétiques.

II.2.5.2 Inductions permissives

Une cellule souche, le progéniteur ou le précurseur possèdent intrinsèquement la potentialité de progresser dans le lignage. Mais cette progression nécessitera aux cellules de recevoir une induction pour acquérir le phénotype suivant. D'un point de vue moléculaire, on peut envisager que l'induction permissive entraîne la transformation d'un activateur A présent initialement sous une forme inactive ou inhibée A_i , en une forme active ou stimulée A_a . A_a entraînera alors l'acquisition identitaire du stade suivant. Parallèlement, la transformation d'un répresseur actif R_a en répresseur inactivé ou inhibé n'est pas à exclure.

La progression dans une étape d'un lignage peut-être la sommation des deux types d'induction.

II.2.5.3 Compétence cellulaire

Quelque soit le type d'induction, **la compétence** de la cellule à répondre aux signaux inducteurs doit également être prise en compte. Cette compétence cellulaire se traduit moléculairement par l'expression de tous les composants des voies de signalisations nécessaires à la perception et à l'intégration des signaux inducteurs. Si la cellule n'est pas compétente au moment et au lieu où s'élaborent ces signaux, ces derniers n'auront aucun effet.

D'un point de vue expérimental, la prospection de potentiel différenciateur des cellules souches adultes se fait principalement *in vitro*. Cela consiste à soumettre les cellules à un environnement « mimant » au mieux le microenvironnement inducteur qui promouvoir *in vivo* leurs différenciations. La difficulté vient du fait que nos connaissances de tels microenvironnements

inducteurs naturels sont partielles. D'autre part, vu le nombre important de paramètres intervenant, il est très difficile de reconstituer *in vitro* ces conditions spécifiques en respectant toute leur complexité.

Enfin, la compétence ou la non-compétence des cellules souches interrogées est également à prendre en compte, bien que difficile à vérifier expérimentalement à cause de la dégénérescence et de la multiplicité des voies de signalisation.

La nature des signaux et mécanismes inducteurs contrôlant l'état « souche » et la détermination des cellules souches adultes, particulièrement celles des MSC, sont très peu connus. Ceci étant dû au fait que jusqu'à récemment on pensait que chez l'adulte seuls persistaient des progéniteurs et des précurseurs relativement restreints dans leurs lignages. Par conséquent, les travaux se sont donc concentrés sur la différenciation à proprement parler pour lesquels une abondante littérature est disponible. Ces événements précoces font aujourd'hui l'enjeu d'intense recherche. En effet, il sera prometteur de corrélérer leur état indifférencié d'une part, à l'expression de marqueurs de surface spécifiques ce qui faciliterait leur purification/enrichissement, et d'autre part, à l'expression de facteurs de transcription contrôlant l'état « souche » et la détermination. La mise en lumière de tels facteurs permettra de cribler efficacement des conditions trophiques afin de maintenir les cellules souches d'une population cellulaire au cours de leur expansion en culture, mais également, d'orienter finement leur engagement dans un lignage désiré.

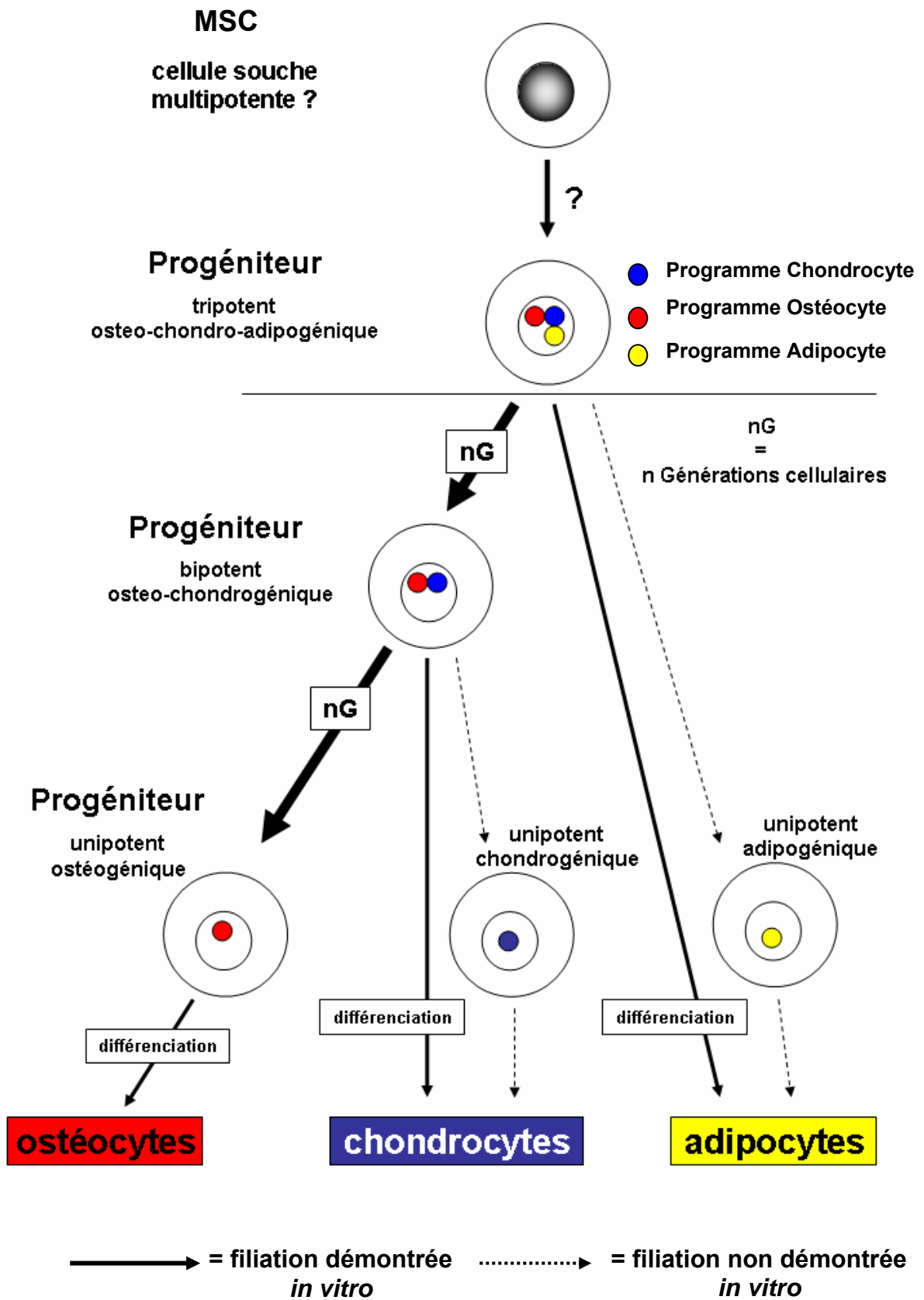
Dans ce but, une des stratégies développées consiste par exemple, à analyser de façon différentielle le transcriptome [40, 41] ou le protéome [42, 43] de MSC en prolifération versus MSC induites en différenciations. Ces approches ont permis de mettre en lumière des gènes candidats pouvant potentiellement réguler ces phénotypes.

II.2.6 Restriction de lignage et de potentiel

II.2.6.1 Restriction de lignage des progéniteurs

Au cours de la progression dans leur lignage, les progéniteurs peuvent présenter une diminution de leurs potentialités différenciatrices. Ce phénomène, dénommé « restriction de lignage », est particulièrement bien connu lors de l'hématopoïèse, où la cellule souche HSC génère deux types de progéniteurs multipotents, l'un à l'origine de la myélo-érythro-thrombopoïèse, et le second à l'origine de la lymphopoïèse [44]. La restriction de lignage concerne également les MSC (Figure 7a). En effet selon une étude récente [45] menée *in vitro* à partir de donneurs humains adultes et à l'échelle clonale, il semblerait qu'au cours des générations, les MSC/progéniteurs tripotents adipo-chondro-ostéogéniques génèrent des progéniteurs bipotents ostéo-chondrogéniques, qui eux-mêmes se restreignent *in fine* en un progéniteur unipotent ostéocytaire. Les auteurs n'ont pas mis en évidence des progéniteurs/précurseurs unipotents adipogéniques ou chondrogéniques. La restriction de lignage pourrait également concerner les MSC issues d'autres tissus tels que le tissu adipeux auquel nous nous intéressons [46].

Figure 7a : Restriction de lignage des MSC humains de la moelle osseuse



II.2.6.2 Restriction du potentiel des cellules souches

Similairement aux progéniteurs, les cellules souches à proprement parler, pourraient également ne pas être épargnées par les phénomènes de restriction de potentiel au cours des générations (Figure 7b). En effet, les MSC obtenues à partir de fœtus présentent des propriétés « souches » plus étendues que leurs « présomptifs » descendants adultes [47]. Lorsqu'elles sont comparées aux MSC adultes (issues de la moelle osseuse), les MSC fœtales présentent des doublements de population cumulés nettement plus élevés avec des temps de génération plus courts, ainsi qu'une activité télomérase fonctionnelle. Contrairement à leurs homologues adultes, les MSC fœtales expriment constitutivement et à l'échelle protéique les facteurs de transcription garants de la pluripotence des cellules ES (Nanog, Oct3 et Rex1) [48]. Enfin, les MSC fœtales présentent une plasticité plus importante. En effet, ces cellules sont capables en réponse à un médiateur cellulaire, la galectin-1, de se déterminer en myoblastes puis de se différencier en myotubes multinucléés [49].

Ces résultats laissent à penser que d'une part l'âge du donneur est important (cellules ES > cellules fœtales > cellules nouveau-nés enfants > cellules adultes) et que d'autre part l'amplification *in vitro* des cellules souches/progéniteurs, bien qu'incontournable, participe à ces phénomènes de restriction de potentiel/lignage. Ces restrictions pourraient être la conséquence passive d'un vieillissement inéluctable.

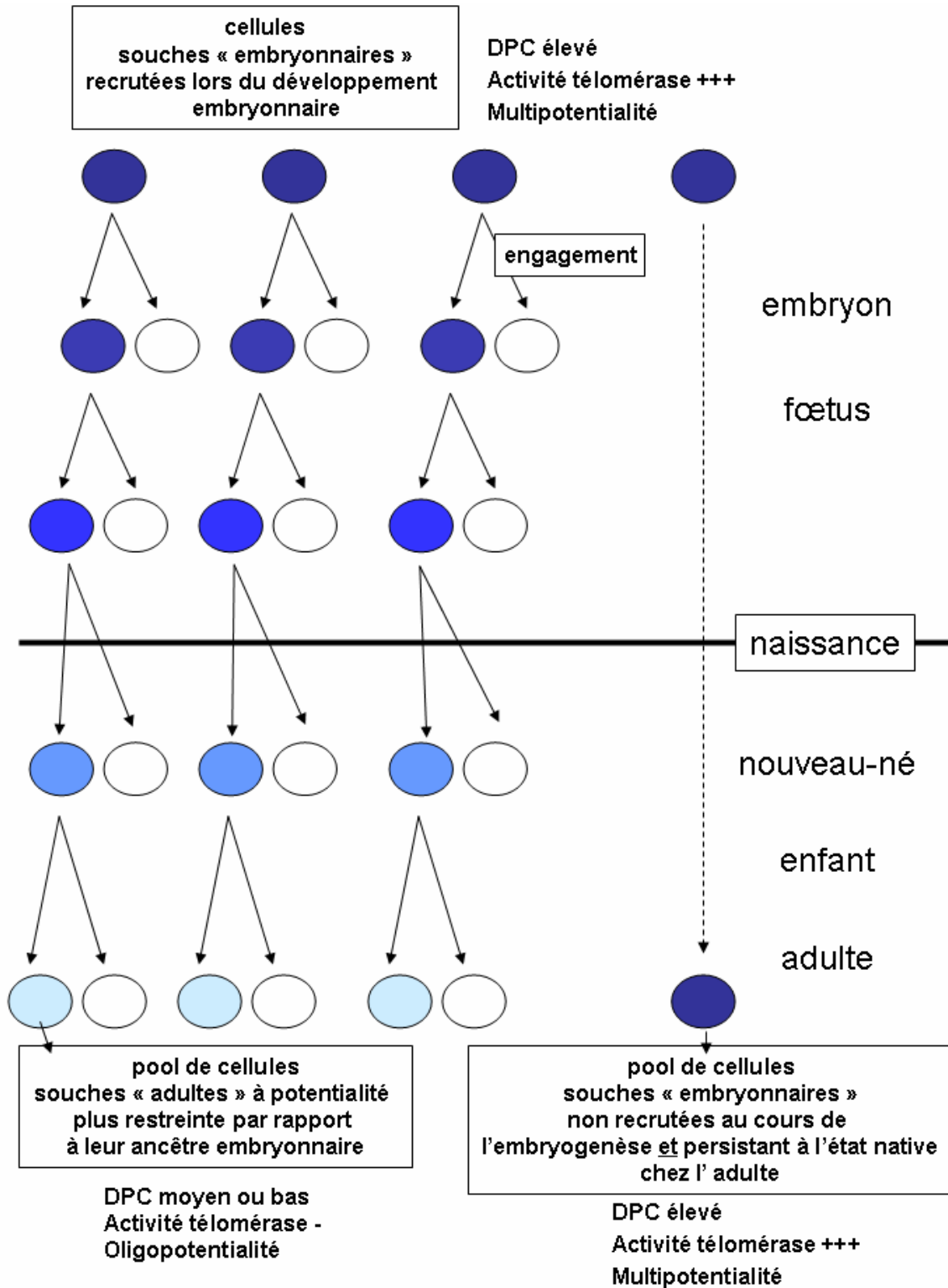
II.2.6.3 Théories

Lors de la délivrance, la barrière placentaire est rompue et une fraction du sang fœtal passe dans la circulation maternelle. Parmi les cellules fœtales, des MSC de sexe mâle ont pu être mises en évidence dans la moelle osseuse de mère ayant eut des garçons plus d'une dizaine d'année après leur accouchement [50].

Une des théories actuelles suggère que les cellules souches obtenues à partir de tissus adultes et présentant des propriétés « souches » les plus étendues sont des cellules qui n'auraient pas été recrutées au cours de l'embryogenèse, persistant ainsi telle quelle dans les tissus adultes (Figure 7b) [51, 52]. Si cette théorie est vraie, de telles cellules souches devraient exister dans les tissus des deux sexes. En revanche, si ces cellules ne sont que la conséquence du passage fœtus/mère d'éléments sanguins fœtaux, alors seules les femmes ayant eu au moins un enfant devraient héberger ces cellules souches à fort potentiel.

On peut évidemment envisager que les deux phénomènes puissent coexister.

Figure 7b : Restriction de potentiel des cellules au cours des générations cellulaires



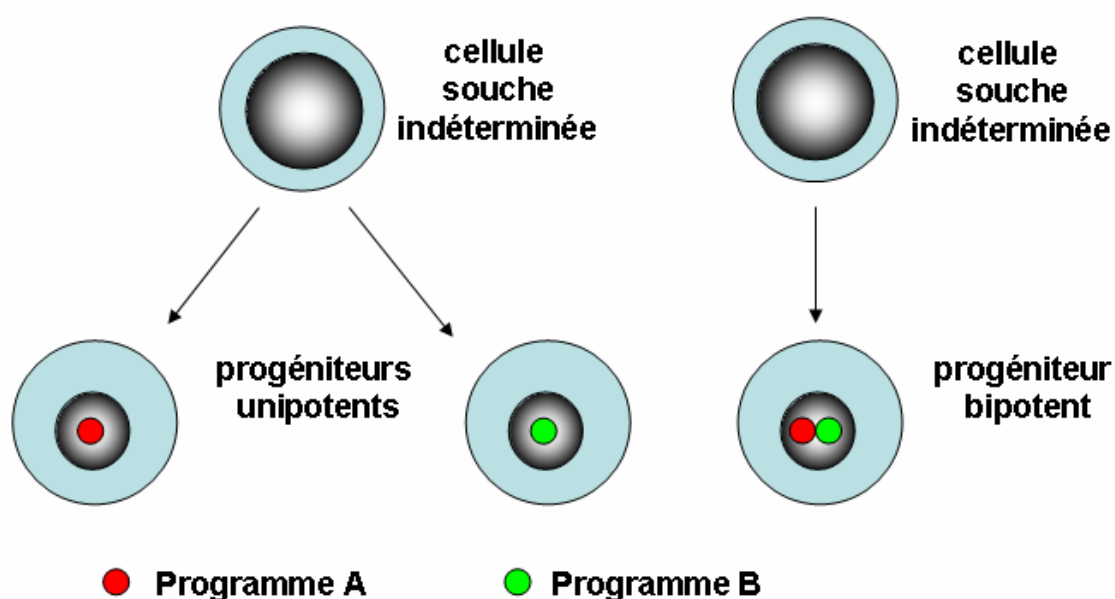
II.2.7 Multipotence des cellules souches

Pour expliquer la multipotence, plusieurs modèles sont possibles.

II.2.7.1 Plasticité

La plasticité est la capacité que possède une cellule souche à acquérir différents programmes de différenciation. Plus le nombre de programme différents qu'une cellule souche est en mesure d'acquérir est élevé, plus elle sera « plastique ». La plasticité se traduirait alors par la génération à partir de la cellule souche **d'un progéniteur multipotent**, c'est-à-dire une cellule co-exprimant plusieurs programmes, ou de **plusieurs progéniteurs à potentialité plus ou moins restreintes et distinctes** (Figure 8).

Figure 8 : Plasticité



II.2.7.2 Trans-détermination

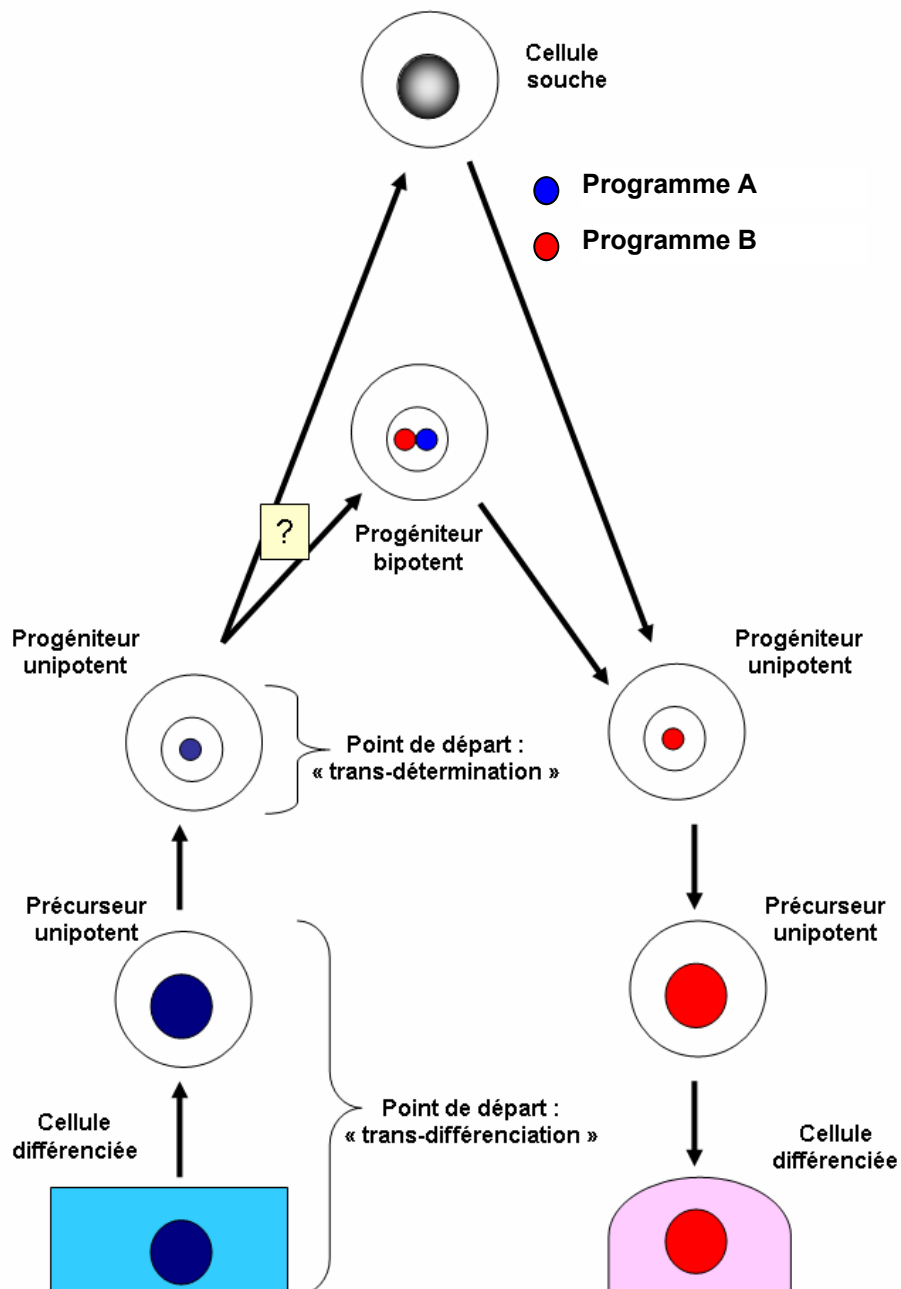
La trans-détermination caractérise le processus par lequel un progéniteur, donc déjà déterminé dans un lignage, acquiert le programme d'un autre lignage. On peut envisager deux voies possibles. La première, le progéniteur se « dé-détermine » et génère une cellule souche qui à son tour peut se déterminer en un autre type de progéniteur. Enfin, le progéniteur pourrait acquérir un programme supplémentaire et devenir un progéniteur bipotent. Ce dernier, éteindrait alors le premier programme avant de s'engager dans le nouveau lignage (Figure 9).

II.2.7.3 Trans-différenciation

La trans-différenciation caractérise le processus par lequel un précurseur voire une cellule différenciée se transforme en une cellule différenciée d'un autre type cellulaire [53-55]. Cela impliquerait que la cellule différenciée ou son précurseur se dé-différencie en progéniteur. Le destin de se dernier serait alors celui évoqué lors de la trans-détermination. Notons tout de même que la trans-différenciation est *in vivo* et *in vitro* un évènement très rare.

Dans la littérature, par manque de consensus des définitions et concepts concernant les cellules souches, les notions de « multipotence » « trans-différenciation » « plasticité » sont souvent amalgamées.

Figure 9 : Trans-détermination et Trans-différenciation

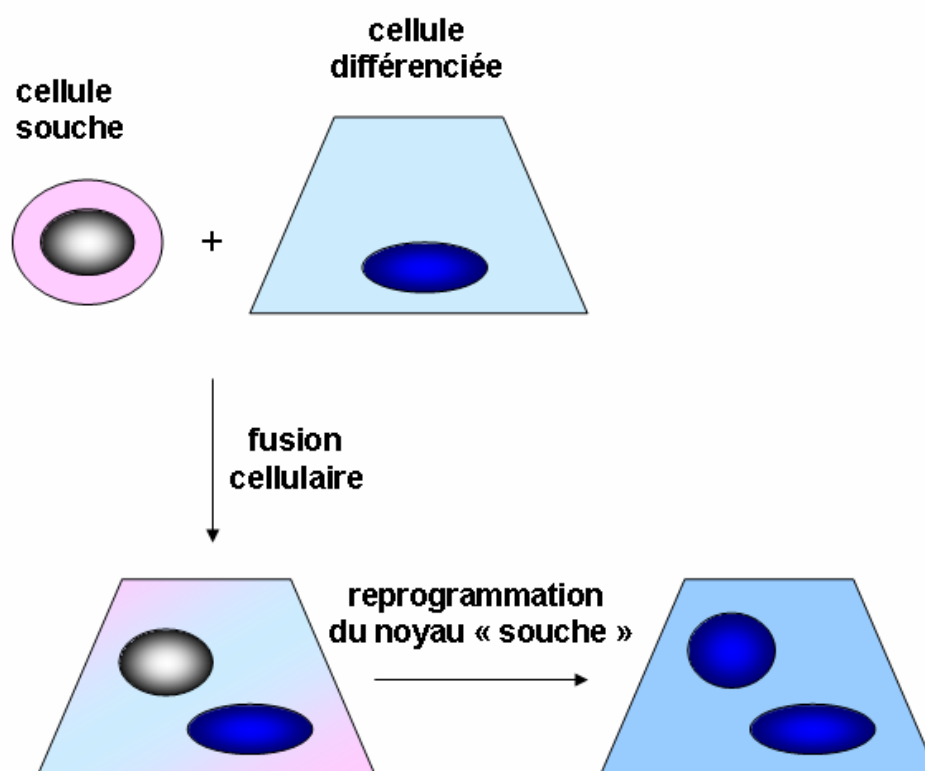


II.2.7.4 Fusion cellulaire

En 2002 ont été réfutées plusieurs conclusions antérieures qui plaidaient en faveur de la « plasticité » ou de la « trans-détermination/trans-différenciation » des cellules souches adultes. Comment expliquer les résultats troublants qui ont suscité un tel enthousiasme en faveur de la plasticité des ces cellules ? On suspecte maintenant que des phénomènes de fusion cellulaire puissent être responsables d'une partie au moins de ces observations. En effet, des cellules souches transplantées ont présenté une fréquence de fusion élevée avec les cellules du parenchyme tout en acquérant le phénotype de ces dernières, donnant l'illusion d'une plasticité ou d'une « trans-détermination/trans-différenciation » [56-60].

Notons qu'*in vivo* la fusion cellulaire est un processus « naturel » intervenant dans la différenciation de certains types cellulaires bien connus (confère chapitre IV Discussion et Perspectives). Aujourd'hui, la cause des fusions observées entre cellules souches et parenchyme est inconnue.

Figure 10 : Fusion cellulaire



II.3 Autres traits caractérisant les cellules souches

II.3.1 Phénotype « Side Population »

Certaines cellules souches à fort potentiel régénératif présentent une activité d'efflux permanent des xénobiotiques [61-65]. Expérimentalement, ces cellules dénommées « Side Population » (SP), sont mises en évidence par FACS comme la fraction cellulaire négative pour la rétention du colorant vital Hoeschst. Cette activité d'efflux serait due à l'expression de transporteurs ATP-dépendants de type ABC (gène ABCG2/BRCP1), responsable de l'export du Hoeschst [66].

A noter que certaines cellules peuvent présenter le phénotype SP sans aucune corrélation avec le phénotype « souche » [67].

II.3.2 Activité phagocytaire constitutive

Une étude récente menée *in vitro* a démontré une certaine similarité entre macrophages et cellules souches [68]. En effet, les cellules souches interrogées (cellules ES, MSC, adipoblastes 3T3-L1, myoblastes C2C12...) présentaient une signature transcriptionnelle relative à la phagocytose, mais également une certaine capacité fonctionnelle à la phagocytose. De façon intéressante, après engagement ou différenciation de ces cellules souches/progéniteurs, les similarités transcriptionnelles et fonctionnelles avec les macrophages chutent ou disparaissent sensiblement suggérant que ce phénotype « phagocyte-like » pourrait être inclus dans les caractéristiques à prendre en compte pour caractériser le phénotype « souche ».

En annexe de ce manuscrit de thèse, est présenté l'article (Charriere, G. M. *et al.*) relatif à ce travail auquel nous avons collaboré.

II.3.3 Capacité immunosuppressive

Certaines cellules souches adultes, les MSC, présentent la capacité d'être non-immunogène notamment mise en évidence dans les expériences d'allo-transplantation, voire en xéno-transplantation [69-71]. En effet, sans traitement pharmacologique immunosuppresseur préalable, ces cellules n'ont subi aucun rejet par l'hôte, même à long terme après la

transplantation [69, 72, 73]. Les études menées ont permis d'apporter quelques lumières sur les mécanismes cellulaires mis en jeu. A titre d'exemple, *in vitro*, dans des expériences de cocultures, ces cellules souches inhiberaient l'activation/prolifération des lymphocytes T (L_T) allo-typiques [69, 74-79]. Néanmoins, de nombreuses questions restent en suspens. Est-ce que cette activité immunosuppressive cible uniquement les L_T qui reconnaissent spécifiquement la cellule souche ? Ou bien, est-ce une activité immunosuppressive à spectre plus large ? Les études citées semblent être en faveur de la seconde hypothèse.

D'un point de vue finaliste, l'intérêt physiologique s'il y en a un, n'est pas bien compris aujourd'hui. Cette propriété de certaines cellules souches adultes pourrait être une persistance des propriétés de leurs ancêtres embryonnaires. En effet, pour des raisons évidentes, l'embryon haplotypique (par rapport au patrimoine génétique maternel) ne doit pas être rejeté par la mère. Au cours de l'évolution, des mécanismes d'immunotolérance se sont mis en place afin de protéger du rejet le développement de l'embryon dans la mère [80].

Enfin, d'un point de vue clinique, l'intérêt de ces cellules souches « immuno-privilégiées » dans les allo-transplantations est évident, d'une part via leur potentielle contribution à l'histogénèse de l'organe lésé, et d'autre part en favorisant l'acceptation immunologique de transplant/greffe de cellules ou tissus immunogènes [70, 81].

Néanmoins, il ne faut pas exclure que cette propriété pourrait potentiellement favoriser l'échappement tumoral (c'est-à-dire la non reconnaissance par le système immunitaire) de cellules cancéreuses préexistantes.

II.3.4 Cellule souche adulte et homéostasie tissulaire

Une cellule souche adulte participe à l'homéostasie de son tissu, et est capable de régénérer ce même tissu après destruction.

Cette propriété bien que vraie pour de nombreuses cellules souches de tissu (cellules satellites, spermatogonies A, HSC...etc.), n'est pas applicable à l'ensemble des cellules souches adultes. En effet, après un dommage tel un infarctus du myocarde, les cardiomyocytes autour ou proche de la zone nécrotique s'activent, prolifèrent et se redifférencient en cardiomyocytes [82]. De plus des cellules souches cardiogéniques ont également été identifiées dans le cœur adulte [5, 7, 83]. Mais cette néo-cardiomyogenèse, due à la prolifération/différenciation des cardiomyocytes ou des cellules souches cardiaques seraient largement insuffisant pour produire suffisamment de cellules différenciées, et donc *in fine* pour restaurer la fonction cardiaque [84]. A terme, la zone myo-nécrotique est remplacée par du tissu conjonctif cicatriciel, la fibrose, responsable en grande partie de la physiopathologie post-ischémique.

Dans le cerveau adulte, la neurogenèse ne concernerait en réalité qu'une minorité de types neuronaux [4, 24], alors que la gliogenèse s'étendrait à l'ensemble des régions du cerveau avec même une augmentation avec l'âge (métaplasie des neurones par la glie) [85, 86].

La capacité régénérative de certains tissus/organes semble être négativement corrélée au degré d'évolution des Vertèbres [87]. En effet, à l'opposé des Urodèles (lézards) capables de régénérer entièrement leurs membres après amputation, les Mammifères en sont incapables. De plus, chez les Mammifères, les capacités régénératives des muscles cardiaque ou squelettique, se restreignent sensiblement de la souris à l'homme [88].

Ces différences évolutives sont directement liées à la capacité de production des cellules souches et de leurs recrutements dans les voies de différenciations. Chez les Urodèles, après amputation, les cellules épidermiques viennent recouvrir le site mis à nu, et forme un centre inducteur. Quant aux cellules mésodermiques différenciées (chondrocytes, myofibres) proches de la zone amputée, elles se dédifférencient en cellules souches, se multiplient pour enfin reformer l'ensemble des structures musculaires et osseuses [89, 90]. Ce processus de dédifférenciation, participant fortement à la « production » de cellules souches (en parallèle à l'auto-renouvellement), n'est pas connu *in vivo* chez les Mammifères ; vraisemblablement cette capacité a été perdue lors de l'évolution. Néanmoins, *in vitro*, des études ont montré que la dédifférenciation était possible, soit plus ou moins spontanément [53, 54], soit dans des conditions plus artificielles après transfection et expression ectopique d'ADNc [91, 92] ou après traitement des cellules avec des molécules issues de la chimie de synthèse [93, 94].

Enfin, la diminution des capacités régénératives chez les primates comparés à celles des murins pourraient être due non seulement à une moindre capacité des cellules souches adultes à s'auto-renouveler (production de cellules souches), mais également à une capacité moindre à s'engager dans les processus différenciateurs ou à une plasticité moins étendue de ces mêmes cellules.

II.4 Obtention, culture et caractérisation des cellules souches

II.4.1 Culture des cellules souches

L'obtention et l'établissement d'une population de cellule souche suit les règles de la mise en culture de cellules animales. Les primo-cultures sont obtenues soit par migration des cellules à partir d'explant tissulaire, soit par dissociation (le plus souvent par traitement protéasique) d'un tissu suivi par la mise en culture de la suspension cellulaire ainsi obtenue. Certaines cellules de la suspension adhèrent, plus ou moins rapidement, au plastique des boîtes de culture, puis prolifèrent sous l'effet des facteurs de croissance du sérum. Les subcultures (repiquages ou passages) à partir de la primo-culture sont dénommées cultures secondaires.

La population cellulaire obtenue proliférera de façon exponentielle en effectuant un nombre restreint de doublements de population cumulés (DPC) jusqu'à l'entrée dans la phase de « crise ». La « crise » se caractérise d'abord par un ralentissement (présénescence) puis par l'arrêt définitif de prolifération (sénescence) de la population cellulaire [95, 96].

Le nombre de DPC maximum, ou limite de Hayflick, que peuvent effectuer les cellules en culture avant d'atteindre la crise dépend entre autre, de l'espèce, du tissu/organe mais surtout de l'âge du donneur [97-99]. En effet, plus le donneur est jeune et plus le nombre de DPC réalisable pour un type cellulaire donné sera élevé. Concernant les cultures de cellules souches, si les conditions trophiques nécessaires au maintien de la population souches sont réunies, alors des DPC très élevés pourraient être comptabilisés sans signes majeurs de sénescence ou de dérives telles que des engagements ou la transformation [100-103]. Au contraire si les conditions de cultures ne sont pas optima, passage après passage, le pourcentage de cellules souches au sein de la population s'amenuise inévitablement.

II.4.2 Sénescence cellulaire

La sénescence est un état cellulaire particulier, distinct de la quiescence ou de l'apoptose. Le phénotype des cellules sénescents a été décrit par [104-111].

La machinerie de réplication de l'ADN nucléaire étant incapable de terminer la synthèse des néo-brins aux extrémités télomériques, cycle après cycle, les chromosomes se raccourcissent inévitablement [112]. Ce raccourcissement des chromosomes est perçu par la cellule comme un

stress génotoxique [113]. Le raccourcissement des télomères et les autres dommages que subit le génome nucléaire au fil des générations cellulaires (mutations ponctuelles, cassure double brin de l'ADN, etc. ...) entraînent l'activation de la protéine suppresseur de tumeur p53 (famille des gènes proto-anti-oncogènes). La protéine p53 entrainera la mise en « pause » momentanée du cycle cellulaire en phase G1 afin que les systèmes de réparation de l'ADN corrigent les dommages avant la duplication des chromosomes [114, 115]. Si les dommages sont trop importants, la surexpression prolongée de la protéine p53 entrainera la sortie définitive du cycle cellulaire, et la mise en sénescence, voire l'apoptose (notion de cumul des dommages) de la cellule [116]. La sénescence causée spécifiquement par le raccourcissement des télomères est dénommée « sénescence répllicative ».

Néanmoins, certaines cellules, dites « transformées », peuvent échapper à la sénescence car elles auront été « immortalisées » [117]. Ces cellules transformées présenteront des mutations entraînant une insensibilité aux signaux contrôlant le cycle cellulaire - par exemple, perte de fonction d'anti-oncogène (pRB, p53, p16...) et/ou gain de fonction d'oncogène (c-myc, c-jun, télomérase...).

Chez les rongeurs, comme la souris et, à un moindre degré, le rat et le hamster, l'émergence de cellules transformées *in vitro* s'observe relativement fréquemment. L'expansion de ces cellules transformées a permis l'établissement de nombreuses lignées cellulaires dites « continues » (ou transformées) dont certaines présentent des potentialités différenciatrices, par exemple les lignées 3T3-L1 (à potentiel adipogénique) [118] et C2C12 (à potentiel adipo-ostéomyogénique) [119-121] de souris. En revanche, bien que quelques lignées aient pu être établies (ex. les lignées HaCaT et NIKS à potentiel épidermique [122, 123]) à partir de cellules « spontanément » transformées *in vitro*, les cellules humaines « échappent » beaucoup plus rarement à la crise. Les cultures secondaires de cellules souches sont regrettamment dénommées « lignées » du fait de leur DPC « généralement » élevé entraînant une confusion avec les lignées transformées. Pour des raisons didactiques, nous distinguerons donc dans cet exposé les primo-cultures et cultures secondaires, des lignées (sous-entendues « transformées »).

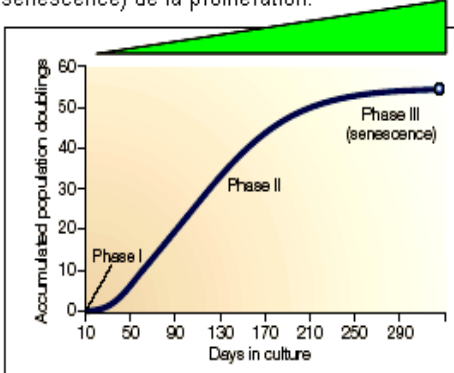
II.4.3 Cellule souche et sénescence répliative

Dans les cellules ES, ainsi que dans certaines cellules souches adultes (ex. : les spermatogonies), les extrémités des chromosomes sont maintenues par la télomérase, enzyme intervenant dans la réplication des télomères [103, 124, 125]. L'expression et l'activité de la télomérase permet, si elle est maintenue au fil des générations, à une cellule souche d'atteindre des DPC quasi-illimités.

II.4.4 Différents stades de transformation

Plus les cellules prolifèrent, et plus elles accumulent des mutations qui peuvent entraîner leur transformation. Des tests fonctionnels permettent d'évaluer le degré de transformation d'une population cellulaire (Figure 11). Bien qu'insuffisants isolément, ces tests doivent être impérativement appliqués aux cultures secondaires dans lesquelles on suppose la présence de cellules souches. En effet, l'amplification nécessaire des cellules souches, *in vitro*, peut conduire à leur transformation et à l'altération des propriétés « souches » [126-128].

Figure 11 : Tests d'évaluation de la transformation cellulaire

<p>Etablissement de la limite de Hayflick</p>	<p>Il est impératif de mener les expériences fonctionnelles sur une culture « saine » cad avant la crise. Pour cela, on évalue le nombre de DPC en fonction du temps (en fonction des passages en pratique). On peut ainsi établir une courbe tri-phasique qui donnera accès aux phases : I de latence (culture primaire), phase II exponentielle (culture secondaire) et III crise (présénescence puis sénescence) de la prolifération.</p>  <p>Risque de transformation</p>
<p>Activité β-galactosidase à pH6</p>	<p>La sénescence cellulaire peut être révélée par l'expression de l'activité β-galactosidase endogène à pH6. Plus le pourcentage de cellules présentant cette activité sera élevé, et plus la culture sera sénescente.</p>
<p>Sensibilité aux régulateurs du cycle cellulaire</p>	<p>Indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance</p> <p>Les cellules normales, mises en culture, prolifèrent en réponse aux facteurs de croissance présents dans le sérum jusqu'à ce qu'elles atteignent la confluence.</p> <p>Ces facteurs de croissance, via notamment la signalisation engendrée par des récepteurs à activité tyrosine kinase, permettent la progression des cellules à travers la phase G1 du cycle cellulaire. Expérimentalement, un test consiste à abaisser ou enlever le sérum dans le milieu de culture. Si les cellules continuent de proliférer dans ces conditions, on peut alors « supposer » l'existence de mutations de type gain de fonction d'oncogène au sein de la population cellulaire.</p> <p>Perte de l'inhibition de contact</p> <p>A la confluence, les molécules d'adhésion établies entre les cellules provoquent l'inhibition des divisions cellulaires (inhibition de contact). Cette inhibition fait intervenir des cascades de signalisation intracellulaires partant de ces protéines (notamment les cadhérines et les sélectines) et aboutissant sur des protéines répresseurs de la prolifération cellulaire. Si les cellules continuent de proliférer après la confluence (ce qui se caractérise par la formation de foyer cellulaire multicouche), on peut supposer la présence de mutations de type perte de fonction d'anti-oncogène.</p>
<p>Test de dépendance d'ancrage</p>	<p>Toutes les cellules des vertébrés, exceptées les cellules sanguines, nécessitent un support solide (MEC) pour leur survie, leur migration, leur prolifération et leur différenciation. La perte de cette nécessité d'ancrage solide peut refléter une transformation assimilable à l'invasion métastatique des cellules cancéreuses <i>in vivo</i>.</p> <p>Le test consiste à ensemercer les cellules sur de l'agar semi-solide, puis d'évaluer la capacité de ces cellules à proliférer et à former des colonies sur ce support.</p>
<p>Caryotype</p>	<p>Une culture secondaire de cellules souches doit être « normale », par conséquent les cellules doivent avoir un caryotype euploïde à 2n chromosomes. Le test le plus pertinent est le caryotypage par la technique « COBRA-FISH » qui permet de mettre en évidence les anomalies de faible envergure.</p>
<p>Tumorigénicité <i>in vivo</i></p>	<p>Ce test consiste à vérifier la capacité des cellules former une tumeur <i>in vivo</i> après transplantation chez des souris immunodéprimées (de type Nod/Scid irradiées ou les souris RAG).</p>

II.5 Cellules souches mésenchymateuses (MSC)

II.5.1 Introduction

Initialement, des cellules souches non-hématopoïétiques ont été obtenues à partir de la moelle osseuse [129-131]. Ces cellules présentent à l'échelle clonale, la capacité à générer les cellules spécialisées du lignage mésenchymateux, c'est-à-dire les adipocytes de la moelle ainsi que chondrocytes et ostéocytes du tissu squelettique de l'os [12, 45, 132].

Ces cellules souches mésenchymateuses, ou plus exactement leurs homologues en termes de morphologie et de capacités différenciatrices, ont également été extraites à partir du stroma, c'est-à-dire le tissu conjonctif de soutien, de nombreux autres organes [72, 133-137], y compris d'organes dont le parenchyme est d'origine endodermique tels que le foie [135], le pancréas [138] ou les poumons [139].

Notons que leur localisation histo-anatomique, ni même leur existence réelle *in vivo* ne sont à ce jour clairement établies.

II.5.2 Localisation *in vivo* des MSC

II.5.2.1 MSC et fibroblastes ?

Attribuer une localisation stromale aux MSC entraîne d'emblée une confusion avec la cellule canonique du tissu conjonctif de soutien, c'est-à-dire le fibroblaste, ou plus exactement « les » fibroblastes. En effet, sous la dénomination fibroblaste se cachent une grande hétérogénéité cellulaire [140-144].

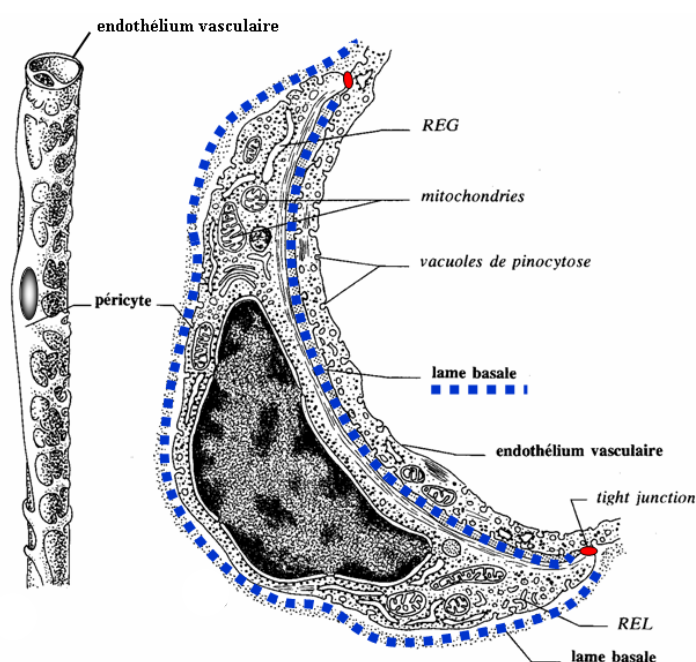
Les MSC et les fibroblastes sont-elles deux dénominations pour une même cellule ? Ou bien, MSC et fibroblastes sont-elles deux populations distinctes ? Dans ce cas, existe-t-il une relation filiale telle que les MSC généreraient les fibroblastes ou inversement ? La dénomination « fibroblaste » a été attribuée à l'origine sur des critères histo-anatomiques (microscopie électronique) à des cellules indifférenciées se localisant dans le stroma, cellules entourées et sécrétrices de collagène. A l'inverse, une culture de cellules stromales n'acquière « le label » MSC qu'à postériori, après extravasation et après des tests fonctionnels *in vitro* [12, 133].

In vitro, les expériences de différenciation menées sur les MSC à l'échelle clonale ont mis en évidence qu'au sein de la population cellulaire, il y avait en plus des clones multi, oligo, et unipotents, des cellules n'ayant aucune potentialité différenciatrice dans le lignage mésenchymateux adipo-ostéo-chondrocytaire [45, 133]. Est-ce que ces cellules « apotentes » (« nullipotent » en anglais) pourraient être des fibroblastes ? Si oui, ont-elles été générées à partir des MSC (multipotente par « essence »), ou bien sont-elles une contamination ? Si on admet une telle filiation, alors le phénotype « fibroblastes » doit-il être considéré comme un type cellulaire différencié à part entier ? Alternativement, ces clones « apparemment apotents » pourraient être des progéniteurs issus de la MSC mais n'ayant pas les potentialités adipo-ostéo-chondrocytaires. Les milieux inducteurs testés seraient donc inefficaces sur ces cellules. Dans ce cas de figure, quel serait alors le ou les types cellulaires que ces progéniteurs pourraient engendrer, et dans quel milieu/conditions de culture inducteurs ?

II.5.2.2 MSC et péricytes ?

Des travaux, dont certains sont récents, suggèrent plutôt une localisation/origine périvasculaire aux MSC [135, 145, 146]. La notion de cellules périvasculaires inclue les péricytes des vaisseaux capillaires, les leiomyocytes de la media et les fibroblastes de l'adventice des vaisseaux de plus gros calibre. Les péricytes (cellules de Rouget) entourent et stabilisent l'endothélium des vaisseaux capillaires (Figure 12). Ces cellules, par leur capacité contractile modifient le calibre des vaisseaux capillaires et joueraient donc un rôle dans la régulation des échanges entre le compartiment sanguin et le secteur interstitiel, mais également dans la stabilisation des vaisseaux capillaires [147-149].

Figure 12 : Le péricyte, cellule périvasculaire capillaire



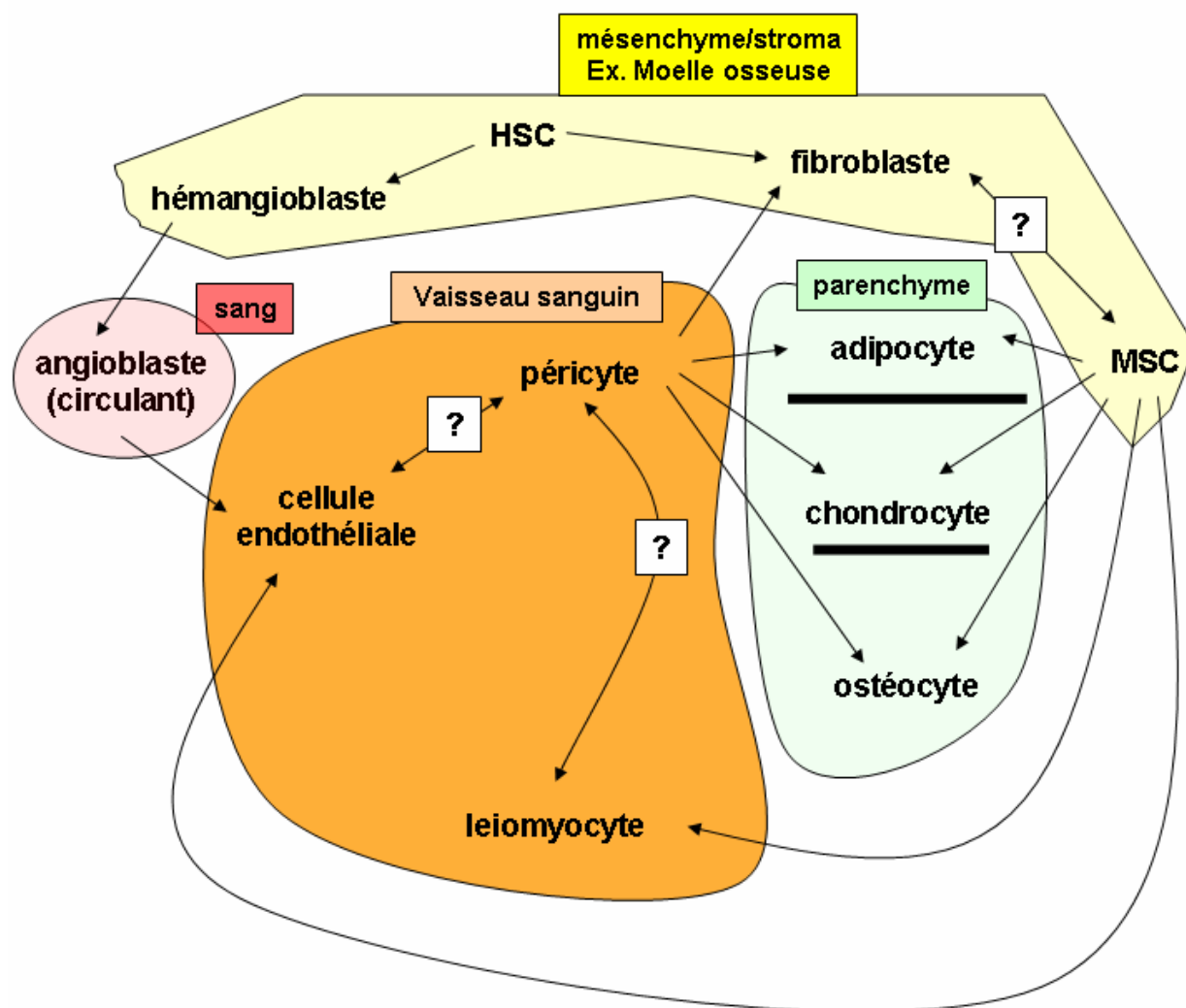
Plusieurs arguments sont en faveur de cette localisation ou origine des MSC.

Les péricytes, cellules quiescentes *in vivo*, sont des cellules n'exprimant pas les marqueurs de surface CD34, CD31 et CD45 à l'image des MSC. Les deux premiers CD étant des marqueurs associés aux cellules endothéliales, et CD34 et CD45 sont associés aux cellules souches hématopoïétiques. De plus, les péricytes peuvent être identifiés par l'expression d'un marqueur de surface relativement spécifique, le ganglioside 3G5 pour lequel un anticorps monoclonal est disponible [150-152]. Il serait intéressant de vérifier l'expression du 3G5 par les MSC. Les péricytes exprimeraient l'actine des muscles lisses (SMA, smooth muscle α -actin) [153, 154]. Ce dernier marqueur ne semble pas faire l'unanimité dans la littérature, ceci étant vraisemblablement lié à une hétérogénéité des péricytes. En effet, certains auteurs ont rapporté l'expression de la SMA uniquement par certains péricytes pré et post-capillaires, et ont remarqué son absence systématique dans les péricytes enveloppant les « vrais » capillaires (midcapillaires) [154]. Ces péricytes pré et post-capillaires auraient ainsi un phénotype plus proche des leiomyocytes de la media des vaisseaux de type veinules et artérioles. Une ontogénie ne serait donc pas à exclure entre péricytes et leiomyocytes.

Similairement aux MSC, les péricytes sont capables de générer *in vitro* et *in vivo* les types cellulaires du lignage mésenchymateux, c'est-à-dire adipocytes, chondrocytes et ostéocytes [135, 155, 156]. Par ailleurs, les MSC peuvent également se différencier dans les types cellulaires du lignage vasculaire en donnant des cellules endothéliales [157-161] ainsi que des leiomyocytes [162-165]. Les relations filiales qui pourraient exister entre les lignages mésenchymateux, vasculaires et hématopoïétiques restent donc encore pleinement à élucider (Figure 12) [166-169].

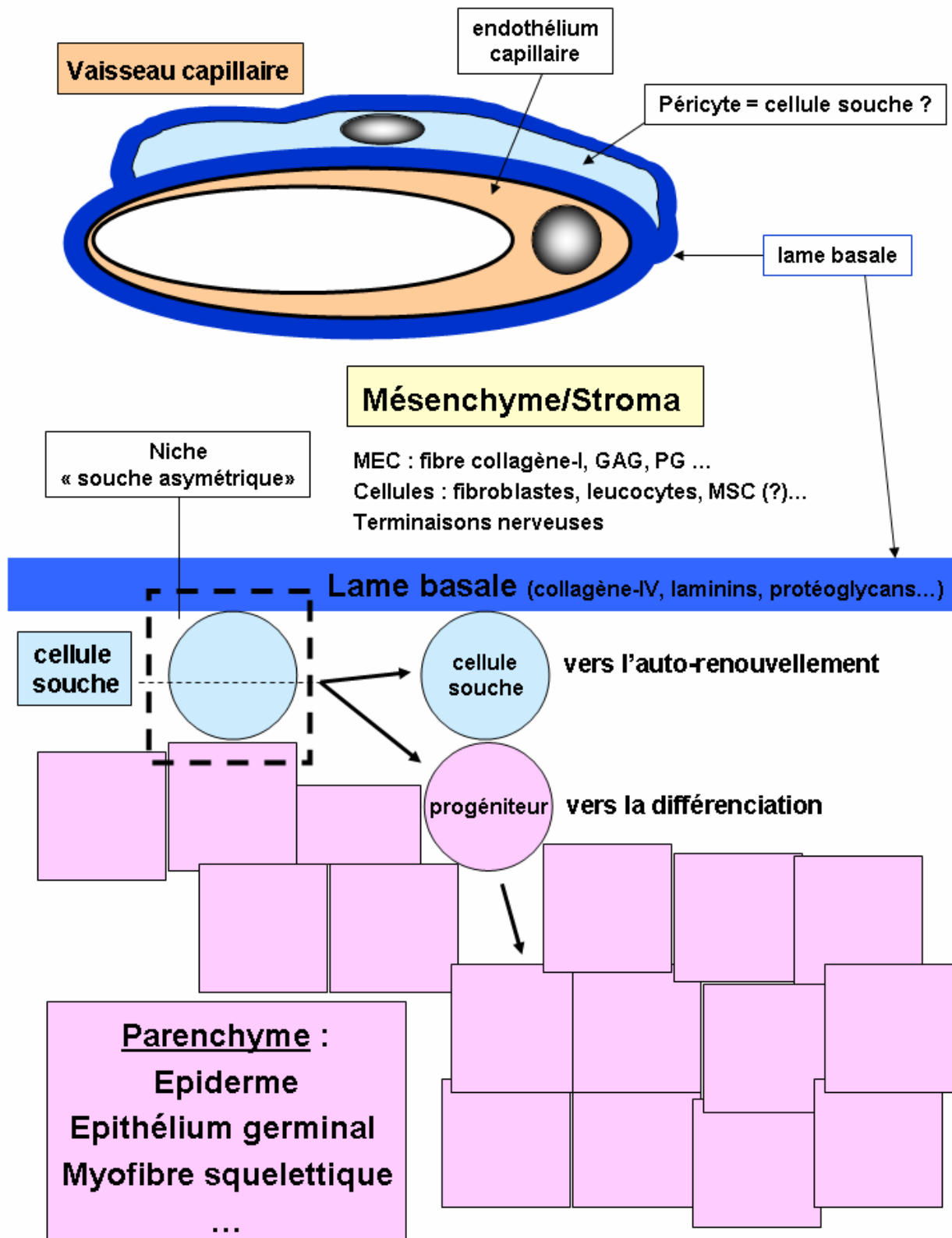
Concernant le microenvironnement tridimensionnel (niche) des péricytes, ceux-ci sont enveloppés d'une matrice particulière, la lame basale. Or les cellules souches de tissus les mieux localisées *in vivo* sont justement au contact intime d'une lame basale (cellules satellites musculaires [170], spermatogonies A [171], cellules souches épithéliales [172] ...). Bien que la présence d'une lame basale ne soit pas obligatoire pour la constitution d'une niche « souche » (par exemple la niche des HSC [173, 174]), la composition biochimique particulière des lames basales [175] (collagène de type IV, laminines, ...) leurs confèrent des capacités de tampon et de filtre sélectif vis-à-vis des nutriments et des cytokines. La lame basale participerait donc au maintien d'une homéostasie locale particulière nécessaire à la biologie de ces cellules souches en régulant la biodisponibilité de nombreux facteurs trophiques. La lame basale pourrait ainsi participer au devenir des cellules filles au cours de l'histogenèse en régulant l'auto-renouvellement/engagement des cellules souches (Figure 13) [176].

Figure 13 : Filiation ontogénique possible entre les lignages hématopoïétique, vasculaire et mésenchymateux



Enfin, les péricytes ont la capacité de phagocytose [177-179]. A ce jour il n'a pas été établi si cette capacité leur est intrinsèque, ou bien si une différenciation préalable en monocyte/macrophage est nécessaire. Si la première hypothèse se confirmait, cela contribuerait à renforcer l'idée que les péricytes puissent être des cellules souches.

Figure 14 : Lame basale et niche « souche »



II.5.3 Existence *in vivo* des MSC

L'absence de marqueurs spécifiques, n'a pas permis à ce jour de localiser les MSC par microscopie au sein de leurs tissus. En effet, après extravasation et mise en culture, il n'est pas exclu que des altérations phénotypiques puissent se produire et être la cause de propriétés nouvelles. Parmi les altérations possibles, on peut concevoir que des progéniteurs, des précurseurs, voir même des cellules différenciées puissent *ex-vivo* se dé-déterminer, se désengager ou se dédifférencier, et acquérir des propriétés « souches » (trans-détermination/trans-différenciation) [54, 55]. Egalement, on peut imaginer qu'*in vivo* le microenvironnement tissulaire puisse réprimer les différenciations incompatibles avec la fonction du tissu/organe, mais qu'à l'inverse, après extravasation, la levée de ces freins permette aux cellules souches l'expression de leurs plasticités.

Ces questions restent encore à élucider.

II.5.4 Définition de l'ISCT

Récemment, due à l'absence d'une dénomination commune et claire entre les différents laboratoires du domaine, l'ISCT (International Society for Cellular Therapy) a statué sur une définition concernant les MSC [180, 181].

La définition de l'ISCT stipule que :

« Toute population cellulaire obtenue à partir d'un tissu/organe ayant *in vitro* les caractéristiques minimums suivantes :

- Adhérence au plastique (par opposition aux cellules hématopoïétiques)
- Capacité à se différencier dans les types cellulaires du lignage mésenchymateux (adipo-ostéo-chondrocytes),
- Combinatoire d'expression des marqueurs de surface présentés par la **Figure 15**

sera dénommée « Multipotent Mesenchymal Stromal cells ».

Toutefois l'acronyme X-derived MSC sera préservé, avec X référant au tissu/organe d'obtention (exemple Adipose tissue-derived MSC). Les auteurs devront démontrer à l'échelle clonale que leur population cellulaire présente les propriétés « souches » afin de pouvoir qualifier la population de « Mesenchymal Stem Cells ».

A noter également qu'un marqueur de surface des cellules ES, SSEA-4, a été récemment mis en évidence pour les MSC humaines issues de la moelle osseuse à partir de donneurs adultes [182].

Si cette expression se confirmait aux MSC issus d'autres tissus, des études prospectives sur ces cellules pourront être envisagées plus facilement.

Les MSC pourraient donc, en plus du lignage mésenchymateux, avoir la potentialité de se différencier dans de nombreux types cellulaires soit après transplantation dans un organe secondaire, soit après traitement inducteur avec des cytokines spécifiques en culture. Même si elles seraient potentiellement le fruit « d'artefact » lié à leur extravasation, ces potentialités nouvelles méritent une complète caractérisation car la thérapie cellulaire offre un espoir thérapeutique complémentaire à l'approche pharmacologique classique.

Figure 15 : Marqueurs de surface des MSC

Cellules	MSC	hMADS	Autre cellules (HSC ou cellules hématopoïétiques), (autres lignages)
Marqueurs de surface « ISCT »			
CD105/endoglin/SH2 Membre de la famille des récepteurs au TGFβ	+	+	+ (monocytes/macrophages), (endothélium)
CD90/Thy-1	+	+	+ (HSC), (endothélium)
CD73 Nucléoside Mono-Phosphate ecto-5'-nucleosidase	+	?	+ (cellules dendritiques, Lymphocytes B et T)
CD45 Récepteur de l'ac. Hyaluronique (adhésion cellulaire)	-	?	+ (HSC, cellules dendritiques, Lymphocytes B et T, Natural Killer, monocytes/macrophages, granulocytes)
CD34 Récepteur de L-sélectine (adhésion cellulaire)	-	-	+ (HSC), (endothélium et cellules satellites)
CD19	-	?	+ (cellules dendritiques, Lymphocytes B)
CD14 Récepteur LPS	-	?	+ (monocytes/macrophages, granulocytes)
CD11b/intégrine αM/Mac-1 Récepteur fibrinogène	-	?	+ (Lymphocytes B et T, Natural Killer, cellules dendritiques, monocytes/macrophages, granulocytes)
HLA-DR/CMH-II	-	-	+ (monocytes/macrophages et les cellules dendritiques)

II.6 Cellules hMADS, MSC du tissu adipeux humain

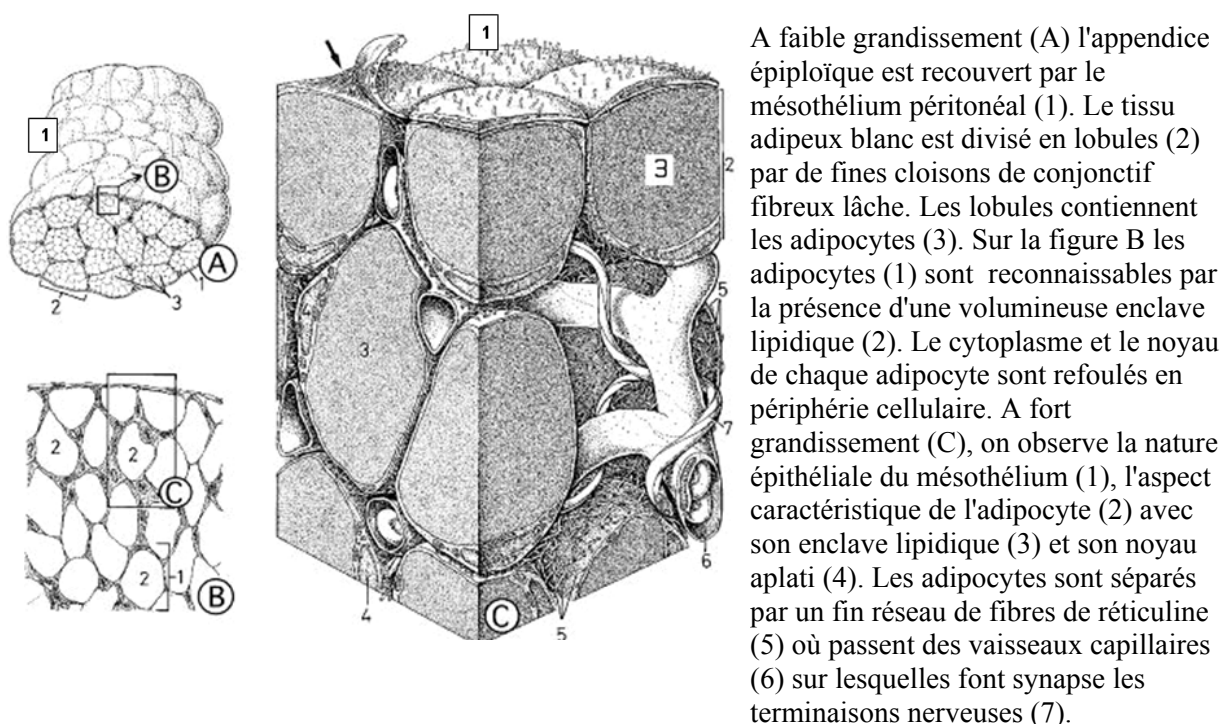
II.6.1 Présentation du tissu adipeux

Il existe deux types de tissus adipeux, le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun [183].

II.6.1.1 Tissu adipeux blanc (TAB)

Le TAB est constitué d'adipocytes, cellules différenciées gorgées de lipides (Figure 16). Les adipocytes représentent 40 à 60% des types cellulaires du tissu adipeux. Les adipocytes sont émaillés par un réseau de fibres de réticuline (fibre de collagène de type III) [184]. Le tissu conjonctif de soutien (riche en fibres de collagène de type I) est traversé par de très nombreux vaisseaux capillaires, ainsi que par des fibres nerveuses orthosympathiques noradrénergiques. Les autres éléments cellulaires du stroma sont des leucocytes tissulaires (des histiocytes et des mastocytes), ainsi que des cellules de type fibroblastique parmi lesquelles on suppose l'existence des cellules souches mésenchymateuses/progéniteurs du tissu adipeux.

FIGURE 16 : Tissu adipeux blanc, exemple de l'appendice épiploïde



On distingue sur des critères anatomiques et fonctionnels, trois types de tissus adipeux blancs, le TAB de structure, le TAB de réserve et le TAB de la moelle osseuse.

II.6.1.1.1 TAB de structure

Il constitue un support adaptatif face à des contraintes mécaniques et de pressions au niveau de nombreux organes qu'il entoure (reins, ganglions lymphatiques, graisse périorbitaire des yeux, etc). Ce tissu adipeux possède ainsi un rôle de protection, ou de répartition des charges (coussinets palmo-plantaires, zones périphériques des grosses articulations).

Ce tissu adipeux peut aussi représenter un tissu de comblement transitoire dans des organes ou tissus soumis à remaniements. C'est le cas des seins chez la femme, où le tissu adipeux occupe une grande part volumique en dehors des épisodes de lactation où les glandes mammaires vont se développer pour devenir sécrétrices.

Par définition, le tissu adipeux de structure est peu sensible aux conditions nutritionnelles ; il ne varie que peu, même dans des conditions d'amaigrissement extrême : il ne disparaît jamais totalement

II.6.1.1.2 TAB de réserve

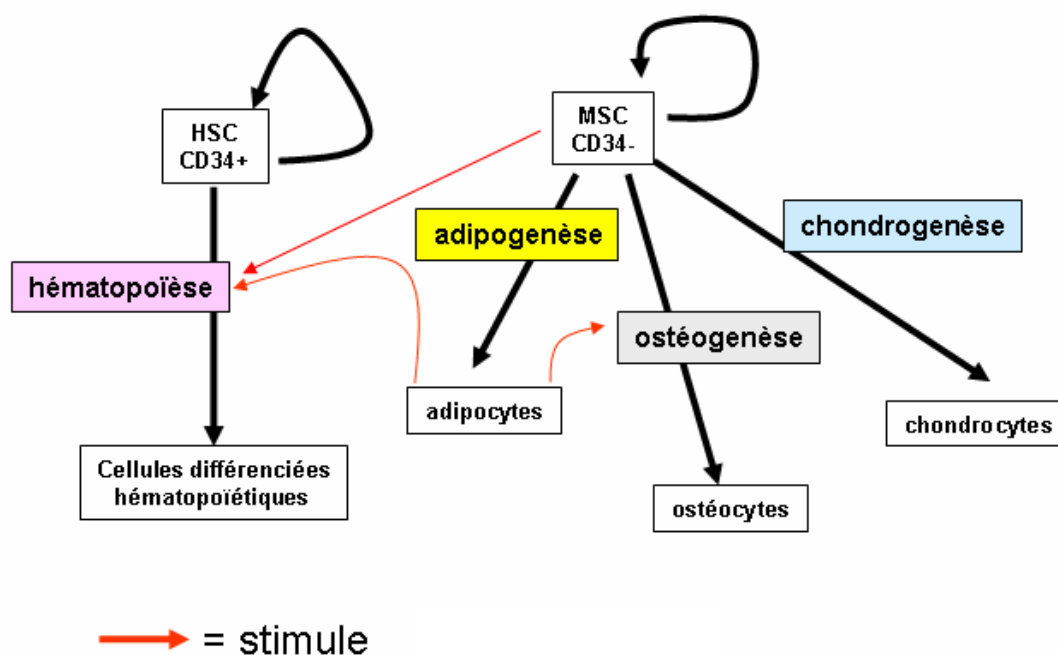
Le tissu adipeux de réserve est très largement répandu. Il occupe principalement les zones sous-cutanées ainsi que la cavité abdominale. Son rôle principal est le stockage des nutriments énergétiques sous forme de triglycérides. A noter également, que ce tissu adipeux sécrète de nombreuses hormones (leptine, adiponectine...) dans la circulation générale impliquées notamment dans la régulation du métabolisme énergétique ; et à ce titre il est considéré comme faisant parti du système endocrinien [185, 186]. Enfin ce tissu possède de fortes capacités d'isolement thermique assurant ainsi une protection contre le froid.

Le tissu adipeux blanc de réserve est particulièrement sensible aux conditions métaboliques, s'hypertrophiant en réponse à un régime hypercalorique, ou à l'inverse, s'hypotrophiant au cours des carences d'apport où il peut quasiment disparaître laissant place à des pré-adipocytes conséquence de la lipolyse intense qu'on subit les adipocytes. L'hypertrophie du tissu adipeux se caractérise à l'échelle cellulaire d'abord par l'hypertrophie d'adipocytes préexistants, puis se poursuit par une hyperplasie qui nécessite un recrutement de cellules souches/progéniteurs/précurseurs dans l'adipogenèse (prolifération et différenciation).

II.6.1.1.3 TAB de la moelle osseuse

Les adipocytes sont le type cellulaire quantitativement majoritaire dans la moelle osseuse. Ces adipocytes ainsi que leur ancêtre MSC, via vraisemblablement des interactions paracrines, auraient un rôle trophique positif sur l'hématopoïèse [187-189] ainsi que sur l'ostéogenèse (Figure 17) (résultats du laboratoire).

Figure 17 : Relation trophique entre les lignées hématopoïétique et mésenchymateuse



II.6.1.2 Tissu adipeux brun (TABr)

Il est largement répandu chez les animaux hibernant, et est spécialisé dans la thermogénèse, c'est-à-dire la production de chaleur [190]. Cette thermogénèse permet à ces animaux de conserver un minimum de température dans l'attente du réveil. Les dépôts de TABr sont beaucoup plus vascularisés que le tissu blanc. A la différence des adipocytes blancs, les adipocytes bruns sont **directement** innervés par des efférences orthosympathiques noradrénergiques. Ces efférences contrôlent positivement la lipolyse et la mitochondrogenèse dans les adipocytes bruns.

Chez l'homme le TABr est bien développé chez le nouveau-né; son rôle serait de protéger ce dernier de l'agression thermique qu'il subirait à sa naissance. Le tissu brun disparaît ensuite assez rapidement. Chez l'adulte, le tissu adipeux brun en tant que tel n'existe plus, mais des adipocytes bruns (ou de phénotype proche) peu fréquents pourraient persister dispersés au sein du tissu adipeux blanc.

UCP1 (Uncoupling Protein 1)/thermogénine, une protéine spécifique des adipocytes bruns se localisant au niveau de la membrane interne mitochondriale, dissiperait le gradient électrochimique de protons générés par la chaîne respiratoire. Ainsi, le gradient de protons étant fortement altéré, la production d'ATP devient minoritaire devant la production de chaleur.

II.6.1.3 Origine embryo-fœtale du tissu adipeux blanc

Au cours de l'embryogenèse, le tissu adipeux n'est pas détectable de façon macroscopique. Peu d'informations sont disponibles sur le développement du TAB. Dans le tronc et les membres, le TAB se forme principalement après la naissance dans les territoires mésenchymateux. Le mésenchyme étant d'origine mésodermique, on peut supposer que les adipocytes sont issus de progéniteur mésodermique mésenchymateux.

A ce jour l'ontogénie des adipocytes n'est pas clairement identifiée, en excluant les adipocytes de la tête pour lesquels une origine neur-ectodermique a pu être établie.

En effet, le mésoderme ne colonisant pas la région **craniale** de l'embryon, le mésenchyme cranial provient uniquement des cellules de la crête neurale après leur migration. Grâce aux expériences de transplantation caille/poulet [191], et plus récemment via une approche transgénique chez la souris utilisant le système Cre-Lox (résultats du laboratoire), il a été démontré que des cellules multipotentes issues de la crête neurale étaient à l'origine du tissu adipeux céphalique.

II.6.2 Obtention et propriétés des cellules hMADS

A partir d'exérèses chirurgicale de tissu adipeux blanc en provenance de nouveau-nés ou d'enfants âgés de moins de 8 ans, notre laboratoire a établi plusieurs culture de MSC, dénommées cellules hMADS (human Multipotente Adipose tissue Derived Stem cells) (Figure 18) [69, 72].

Lors de la digestion du tissu adipeux par un traitement à la collagénase, deux fractions cellulaires se distinguent : une fraction de cellule « flottante » contenant les adipocytes, et une fraction contenant les cellules stroma-vasculaires en suspension (SVF). La SVF est mise en culture primaire en présence de sérum, et après 15h d'incubation les cellules non-adhérentes sont éliminées. Puis, les cellules adhérentes, dont l'origine est vraisemblablement stromale, sont amplifiées. Les populations cellulaires résultantes, après analyse, présentent les propriétés caractéristiques de cellules souches :

- Des DPC élevés sans signe majeur de sénescence ou de transformation.
- Caryotype euploïde à 2n chromosomes.
- Population « homogène » par rapport à l'expression des CD de surface évalués par FACS, et correspondant à la signature des MSC (Figure 15).
- Multipotence adipo-ostéo-chondrocytaire, vérifiée à l'échelle clonale [102].

- Présence de cellules souches au sein de la population, capables d'auto-renouvellement, vérifiée à l'échelle clonale [102].
- Non-immunogène

Tissu adipeux humain
obtenue
par « exérèse » chirurgicale

Figure 18 : Obtention des cellules hMADS

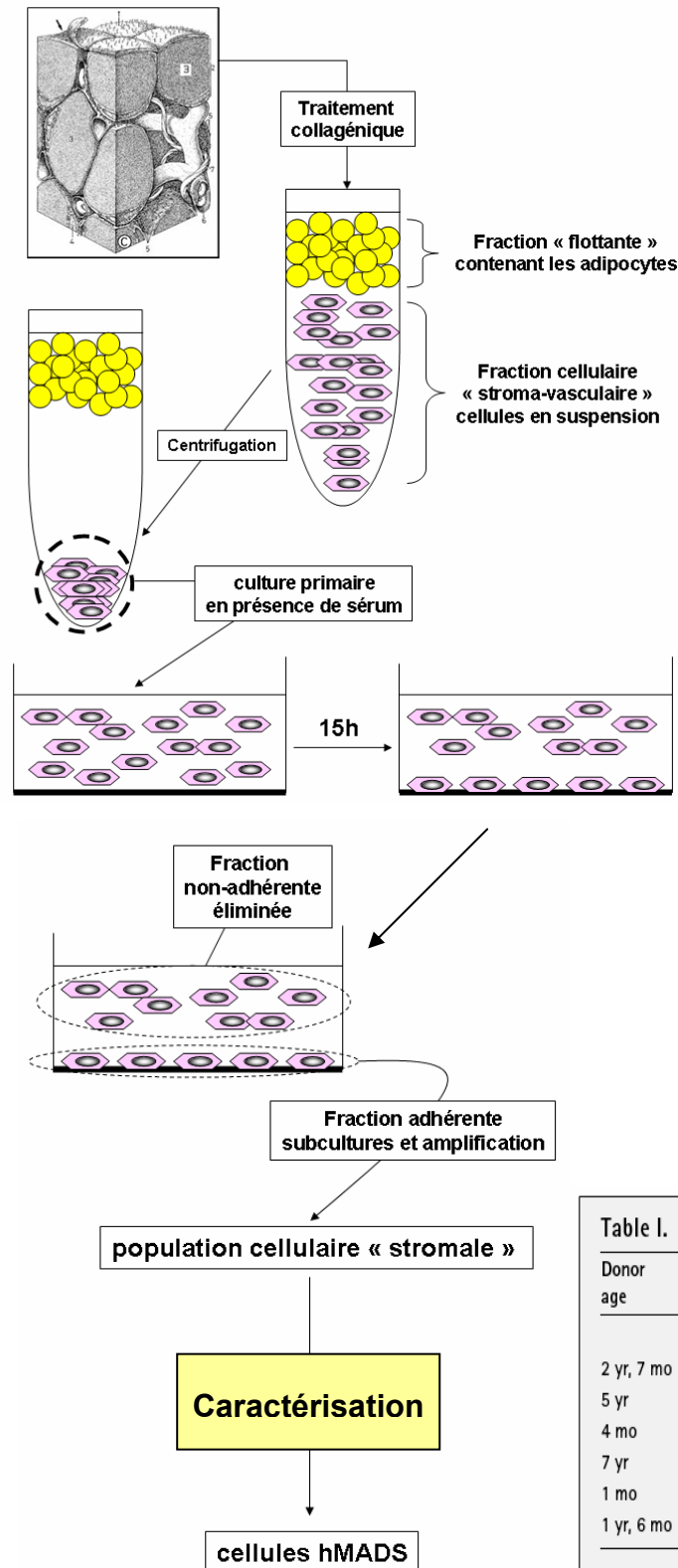
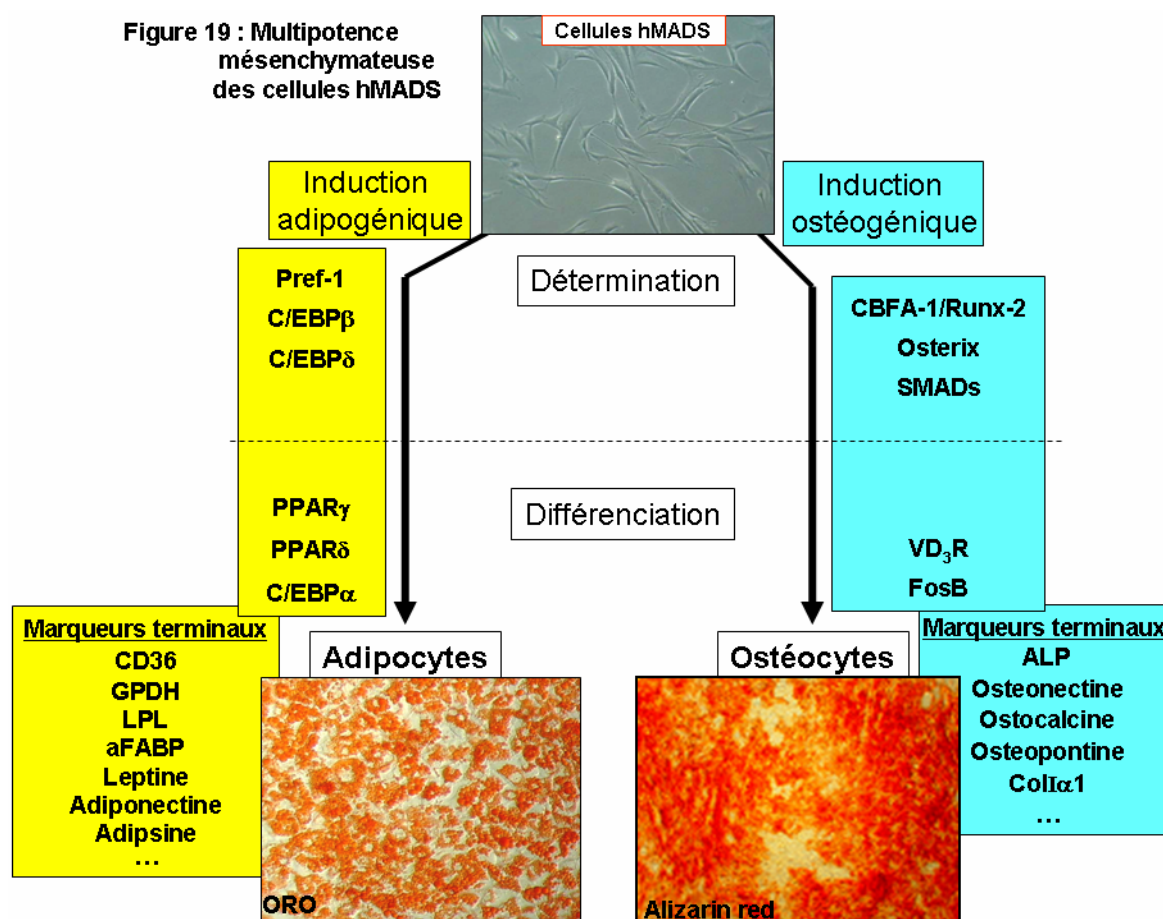


Table I. Isolation of hMADS cells from different donors

Donor age	Sex	Anatomical area	Sample weight	SV fraction	PDs (CA cells)	Cell population
			mg	cell no. $\times 10^5$		
2 yr, 7 mo	F	umbilical	300	4	>160	hMADS-1
5 yr	M	pubic	400	5	>200	hMADS-2
4 mo	M	prepubic	210	4	>160	hMADS-3
7 yr	F	inguinal	2,100	20	40	hMADS-4
1 mo	F	inguinal	200	3.5	20	hMADS-5
1 yr, 6 mo	M	scrotum	200	3.5	>150	hMADS-6

(d'après Rodriguez, A. M. et al. J. Ex. Med. 2005)

Concernant leur multipotence, une fois induite dans les différentes voies mésenchymateuses adipo-ostéo-chondrocytaire, par ajout de milieux de différenciation définis, les cellules hMADS expriment de façons régulées dans le temps, les marqueurs moléculaires causals de ces voies de différenciation (facteurs de transcription clés) (Figure 19). Leurs différenciations finales se révèlent par l'acquisition de la morphologie spécifique et de fonction spécialisée du type cellulaire en question, conséquence de l'expression de marqueurs terminaux spécifiques. Notons également que le rendement de différenciation des cellules hMADS est très élevé ; par exemple, macroscopiquement, plus de 80 % des cellules présentent le phénotype différencié de l'adipocyte. En conclusion, les données de notre laboratoire semblent indiquer que la multipotence adipo-ostéo-chondrocytaire des cellules hMADS soit le fruit d'une véritable « plasticité » comme définie précédemment.



En annexe de ce manuscrit de thèse est présenté un article du laboratoire (Elabd C. *et al.*) auquel j'ai collaboré. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au potentiel ostéogénique des cellules hMADS *in vitro* et *in vivo*.

L'objectif de ce projet de doctorat consistant à évaluer le potentiel myogénique des cellules hMADS, le chapitre suivant abordera par conséquent le muscle squelettique ainsi que la myogénèse.

II.7 Muscle squelettique

II.7.1 Introduction

Les muscles sont constitués par des cellules spécialisées, les fibres musculaires (myofibrilles ou rhabdomyocytes). Les fibres ont la propriété d'être excitables et contractiles et de développer des forces mécaniques. Elles possèdent des myofibrilles riches en actine et myosine. C'est l'interaction actine-myosine qui confère les propriétés fonctionnelles à ce type de tissu.

Il existe trois grands types de tissus musculaires en fonction des cellules constitutives :

- le tissu musculaire strié squelettique. Il contrôle la posture et les mouvements du corps. La contraction est sous le contrôle des efférences motrices volontaire (motoneurone). Les muscles squelettiques sont caractérisés par des cellules dont l'agencement microfibrillaire des complexes acto-myosiques abouti à la présence caractéristique d'une striation transversale.
- le tissu musculaire strié cardiaque. Les cellules possèdent aussi une striation transversale mais la contraction est involontaire et soumise à un automatisme rythmique
- le tissu musculaire lisse. Il est associé à des fonctions végétatives. Le contrôle de leur contraction est assujéti aux efférences du système nerveux végétatif involontaires.

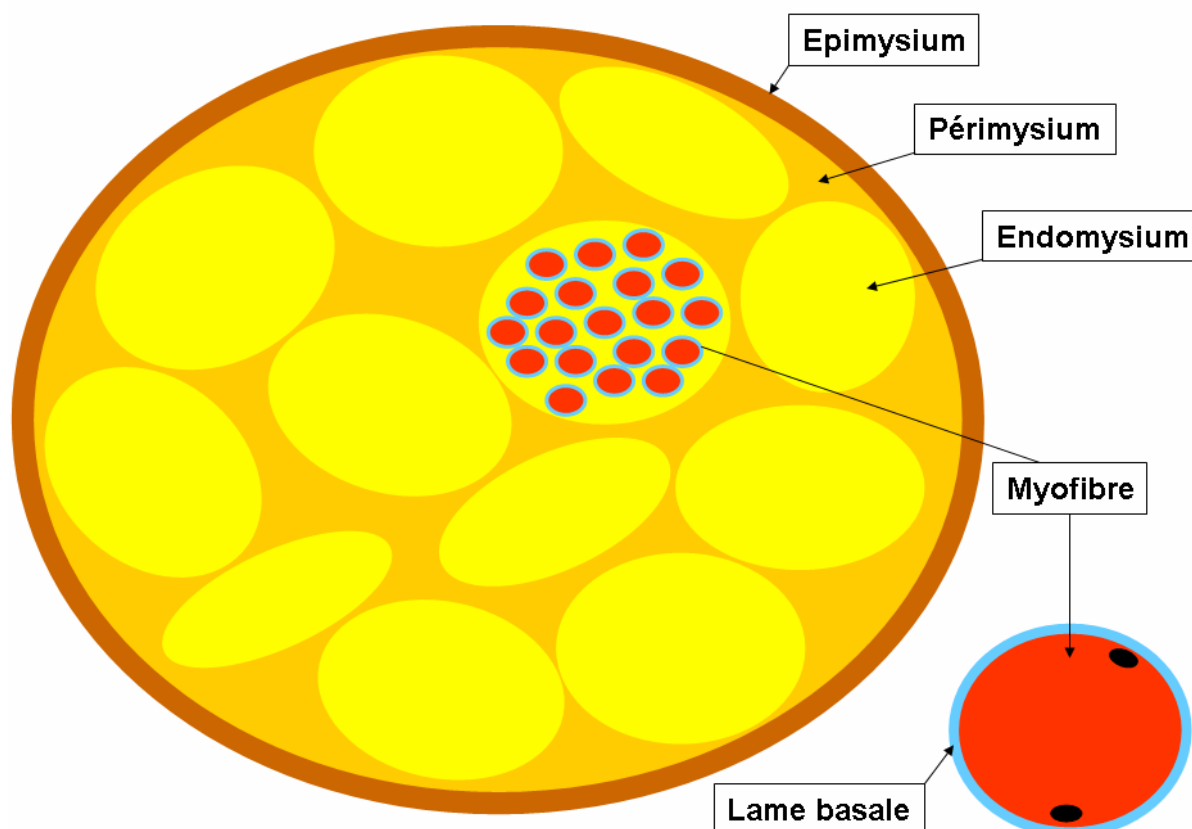
II.7.2 Tissu musculaire strié squelettique

Le muscle peut être assimilé à un système mécanique comportant à la fois une composante contractile et une composante élastique associée. La force élastique développée lors d'un étirement musculaire est une force de rappel physique, ne nécessitant aucune énergie métabolique. Il existe de nombreux types de muscles squelettiques. Leurs propriétés (contractibilité, excitabilité, élasticité) dépendent de l'équilibre entre les cellules musculaires et le tissu conjonctif qui les composent.

Les muscles squelettiques s'insèrent en général sur les os par l'intermédiaire de tendons. Ils peuvent aussi s'insérer sur des cartilages ou sur des lames fibreuses (aponévroses).

Plusieurs couches de tissus conjonctifs fibreux séparent les composantes des muscles squelettiques (Figure 20).

Figure 20 : Tissu musculaire squelettique



Chaque muscle est revêtu d'un tissu conjonctif dense, riche en collagène, l'épimysium. L'épimysium constitue une véritable enveloppe individualisante. L'épimysium pénètre dans le muscle et forme le périmysium qui cloisonne les myofibrilles innervées par le même motoneurone en faisceaux (10 à 100 fibres par faisceaux). Le périmysium est richement vascularisées. Le stroma en rapport immédiat avec les fibres est nommé endomysium, dans lequel s'insinuent les terminaisons nerveuses, ainsi que le réseau capillaire terminal. Enfin, chaque fibre musculaire est entourée par une lame basale. Entre la lame basale et le sarcolemme (membrane plasmique de la myofibrille), se localisent les cellules souches musculaires, dénommées « cellules satellites ». Le nombre de cellules satellites par fibre varie de cinq à trente selon les types de fibres, et leur répartition semblent être aléatoire autour des fibres.

L'unité fonctionnelle du tissu musculaire squelettique est la fibre musculaire (myofibrille ou rhabdomyocyte). Une fibre est un long cylindre multinucléé (plusieurs centaines de noyaux) contenant mitochondries, réticulum endoplasmique et myofibrilles. Les fibres sont disposées parallèlement. Elles mesurent de 10 à 100 μm de diamètre et peuvent atteindre 1mm à 40 mm de longueur suivant le muscle et l'espèce. Chaque fibre est formée de la fusion de plusieurs

centaines de cellules dénommées myocytes. Les noyaux des fibres musculaires sont accolés à la membrane plasmique (sarcolemme).

Notons également, que des fibres musculaires spécialisées en mécanorécepteurs de la sensibilité proprioceptive sont présentes en proportions variables au sein du tissu musculaire squelettique. Les dendrites afférentes de la proprioception s'enroulent autour de ces fibres et forment les fuseaux neuro-musculaires qui renseignent le système nerveux central de l'état de tension des muscles.

II.7.3 Différents types de fibres musculaires

Chez l'homme, on distingue trois principaux types de fibres musculaires squelettiques, selon leurs capacités contractiles et métaboliques, nommées fibres lentes (ou de type I), fibres intermédiaires (ou de type IIA) et fibres rapides (ou de type IIB) (Figure 21) [192-194]. Les muscles riches en fibres lentes présentent un réseau de vaisseaux capillaires plus développé que les muscles à fibres rapides.

Figure 21 : Différents type de fibres squelettiques

Nomenclature Brooke et Kaiser (1970) Ashmore et Doerr (1971) Peter <i>et al</i> (1972)	Type de fibres		
	I βR SO	IIA αR FOG	IIB αW FG
Physiologie			
Unité motrice	Slow Fatigue Resistant (S)	Fast Fatigue Resistant (FR)	Fast Fatigable (FF)
Contraction	Lente	Rapide	Rapide
Résistance à la fatigue	+++	++	+
Morphologie			
Surface plaque motrice	+	+++	+++
Réticulum sarcoplasmique	+	+++	+++
Tubules transverses	+	+++	+++
Couleur	Rouge	Rouge	Blanche
Myoglobine	+++	+++	+
Densité capillaire	+++	++	+
Nombre de mitochondries	+++	+++	+
Epaisseur de la strie Z	+++	++	+
Richesse en collagène	+++	++	++
Aire de section	+	+++	+++
Métabolisme énergétique			
Teneur en Glycogène	+	+++	+++
Teneur en Lipides	+++	+++	+
ATPase myofibrillaire	+	+++	+++
Hexokinase	+++	++	+
Phosphorylase	+	++	+++
Enzymes glycolytiques	+	++	+++
Enzymes mitochondriales	+++	++	+

R = Red; W = White; SO = Slow Oxidative; FG = Fast Glycolytic

La classification se dessine ainsi :

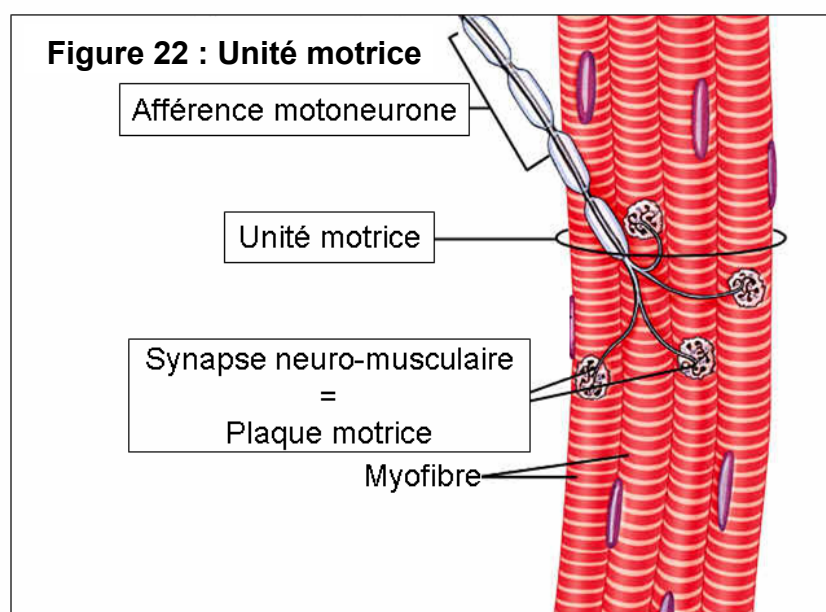
Fibres de type I : à contraction lente et résistantes à la fatigue. Ces fibres contiennent beaucoup de myoglobine, de mitochondries. Ce sont des fibres qui hydrolysent lentement l'ATP et sont petites en diamètre. Elles sont surtout retrouvées dans les muscles posturaux comme les muscles intervertébraux.

Fibres de type IIA : fibres oxydatives à contraction rapide et résistantes à la fatigue. Ces fibres contiennent beaucoup de myoglobine, de mitochondries.

Fibres de type IIB : fibres glycolytiques à contraction rapide et sensibles à la fatigue. Ces fibres contiennent peu ou pas de myoglobine, de mitochondries. Elles ont une haute teneur en glycogène et possèdent le plus grand diamètre.

Les fibres de type I et IIA produisent de l'ATP par la glycolyse ou la β -oxydation en aérobiose. Les fibres de type IIB le produisent par la glycolyse en anaérobiose lactique, voire par la voie de la créatine-phosphate en anaérobiose analactique.

Même si, la plupart des muscles squelettiques contiennent une combinaison des trois types de fibres, les fibres d'une même unité motrice sont toutes du même type (Figure 22). Une unité motrice est constituée par l'ensemble des fibres musculaires innervées par les efférences d'un même motoneurone. Les différents types de fibres sont utilisés selon le besoin de la contraction. Par exemple, un effort léger et peu puissant, mais soutenu n'activera que les unités motrices reliées aux fibres de type I ; un effort plus intense et soutenu activera les fibres à contraction rapide de type IIA ; enfin, un effort nécessitant une puissance maximale et brève activera en plus les fibres IIB.



II.7.4 Adaptabilité du muscle squelettique

II.7.4.1 Hypertrophie/hypotrophie

Les muscles sont dotés de remarquables capacités adaptatives, notamment lors de modifications chroniques de l'activité physique. Dans le cas d'une surcharge d'activité chronique, la réponse adaptative consistera en l'augmentation de la masse du muscle et donc de sa force. Ainsi mieux doté, le muscle ne sera plus en situation de stress. A l'inverse, lors d'une diminution chronique de la sollicitation d'un muscle, la réponse consistera en une diminution de la masse du muscle. En effet le maintien de cette masse représenterait un coût énergétique superflu par rapport aux besoins. La variation de la masse musculaire est directement corrélée aux variations du volume des fibres musculaires (hypertrophie ou hypotrophie). Le volume d'une fibre est, quant à lui, directement en rapport avec son contenu protéique et son activité métabolique.

L'hypotrophie des fibres est due à une augmentation du catabolisme protéique [195] et à une perte des myonuclei par un processus de type apoptotique [196, 197].

L'hypertrophie est également bi-causale, due à une synthèse accrue des microfibrilles (hypertrophie anabolique) [198], mais aussi au recrutement et à l'incorporation de précurseurs, les myocytes, (et donc de noyaux) dans les fibres musculaires (hypertrophie développementale) [199], l'ensemble contribuant à l'augmentation des capacités anaboliques des fibres.

II.7.4.2 « Transition » fibre rapide ⇔ lent

L'adaptabilité du muscle squelettique est aussi qualitative. En effet, en réponse à une activité physique chronique effectuée en aérobie ou en anaérobie, la proportion des différents types de fibres dans un muscle peut-être modifiée en fonction des besoins [200].

Par exemple, un athlète qui effectue un sport d'endurance (course ou natation par exemple) modifie graduellement certaines fibres type IIB en fibres type IIA. Dans ce type d'entraînement, la masse musculaire augmente peu.

En opposé, les haltérophiles, qui demandent une force élevée pendant un court laps de temps, accroissent non seulement la taille et la force des fibres à contraction rapide mais également leur proportion.

Le tissu conjonctif ainsi que le tissu vasculaire musculaire dans ces processus adaptatifs, subissent également un remodelage important tant qualitatif que quantitatif [201-203]. En annexe de ce manuscrit de thèse est présenté un article (Pisani D. *et al*) auquel j'ai collaboré

durant mon stage de DEA. Cette étude concerne la caractérisation fonctionnelle de la Myoduline/Tendin/Chondromodulin-I-like, gène sous-exprimé après l'atrophie du muscle squelettique.

II.7.5 Myogenèse chez l'adulte

II.7.5.1 Introduction

En absence de tous stress, les muscles squelettiques sont des organes « post-mitotiques ». Néanmoins, en réponse à une dégénérescence musculaire, une néo-myogenèse (par opposition aux myogenèses embryonnaires, fœtales et post-natales) se met en place pour réparer les fibres abîmées. Cette néo-myogenèse chez l'adulte est nommée « régénération musculaire ».

Les causes de la dégénérescence musculaire sont nombreuses (déchirure mécanique de fibres dues à une surcharge d'activité physique [199, 204] ou à un traumatisme, défaut génétique [205, 206], administration de venins [207], brûlure thermique [208]...) et mènent toutes à la nécrose des fibres musculaires [209].

La régénération peut concerner moins d'une dizaine de fibres nécrosées à une centaine voire des milliers ce qui peut représenter plus de 80% d'un muscle !

A noter qu'en absence de tous stimuli dégénératifs, il existe un renouvellement (turn-over) relativement lent du tissu musculaire (comparé à des tissus comme la moelle osseuse ou les épithéliums dits à renouvellement rapide et continu). Ainsi, on estime que seulement 1 à 2 % des noyaux d'une fibre seraient remplacés chaque semaine [210].

II.7.5.2 Aspects cellulaires de la régénération musculaire

Les capacités régénératives du muscle squelettiques sont dues quasi-exclusivement aux cellules souches de ce tissu, les cellules satellites [211, 212].

La quasi-totalité des cellules satellites sont en quiescences (G0). Lors d'un stress, les cellules satellites s'activent et réintègrent la phase G1 du cycle cellulaire. Cette activation est induite par de nombreux médiateurs cellulaires, libérés notamment par les fibres endommagées [213]. Les macrophages, attirés par les signaux sécrétés par les cellules satellites activées [214], nettoient les débris provenant de la fibre endommagée. Réciproquement, les macrophages protègent de l'apoptose les cellules satellites, et favorisent leur prolifération [215]. Les cellules satellites se déterminent dans le lignage musculaire (progéniteurs : myoblastes), se divisent activement et

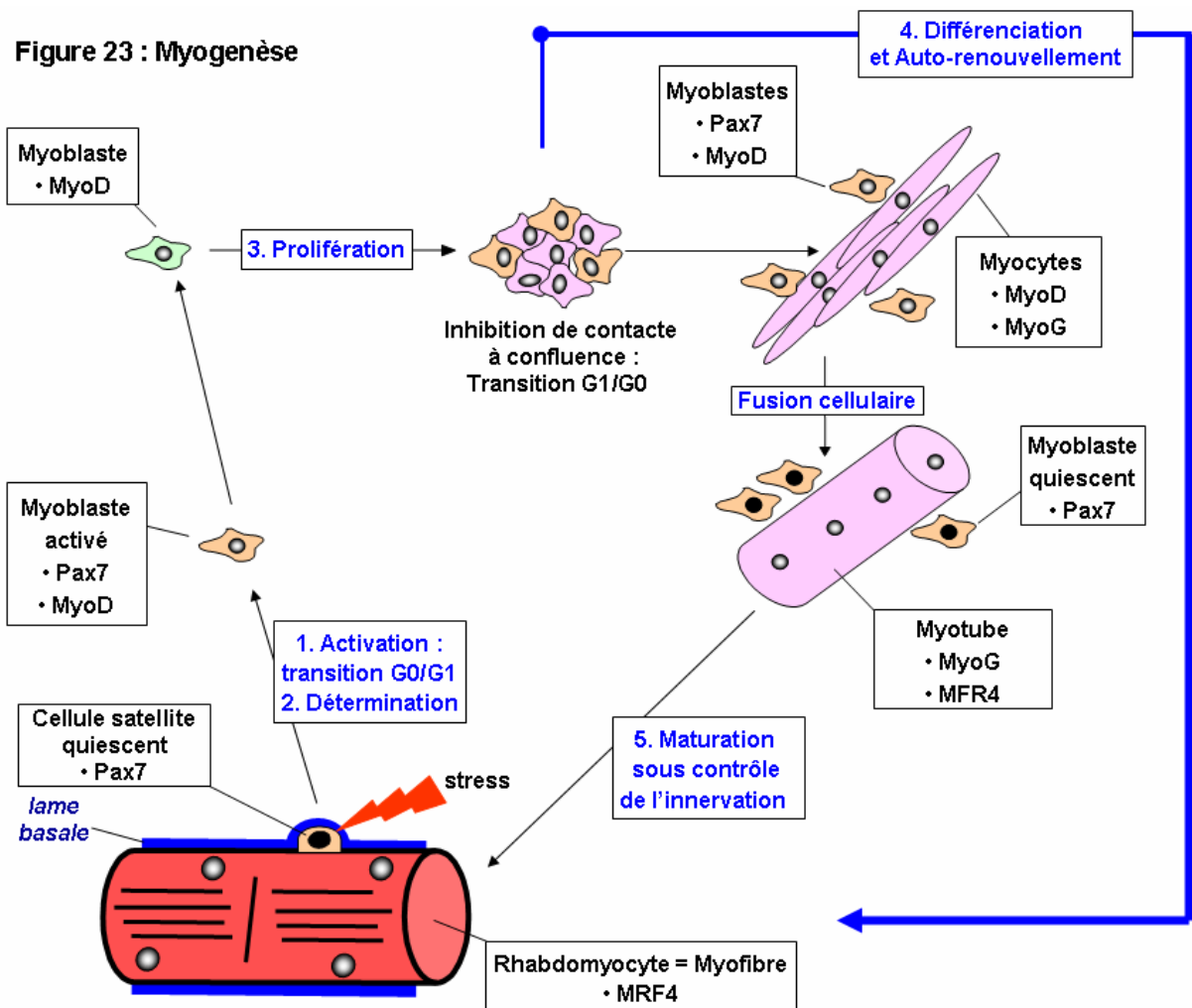
migrent les unes vers les autres pour occuper la zone nécrosée. Une fraction des ces myoblastes s'engage dans la différenciation (précurseurs : myocytes), alors qu'une autre fraction reconstitue le pool de cellules satellites (auto-renouvellement) [216]. Les myocytes sortent du cycle cellulaire, s'alignent, puis fusionnent pour former un myotube (myofibre immature) qui se transforme ensuite sous l'action de l'innervation en fibre, caractérisée notamment par la densité des modules micro-fibrillaires de contraction, les sarcomères. Les noyaux des fibres lésées, chez les Mammifères sont incapables de réintégrer le cycle cellulaire, et ne participent donc pas à la régénération [217]. Notons également que l'intégrité de la lame basale est fondamentale à la régénération musculaire [218].

II.7.5.3 Aspects moléculaires de la régénération

L'activation, la détermination, la prolifération, la différenciation et l'auto-renouvellement des cellules satellites sont sous le contrôle d'une série de facteurs de transcription à structure hélice-boucle-hélice basique (bHLH) dénommés Myogenic Regulatory Factors (MRF) [212]. Les MRF sont myf-5, MyoD, myogénine (abrégé ici en MyoG) et MRF4 qui avec leurs co-facteurs d'hétérodimerisation, les facteurs de transcription de la famille MEF, contrôlent les événements énoncés précédemment au cours de la myogenèse. Il faut également inclure en tant que MRF les facteurs de transcription à domaine paired, Pax3 et Pax7.

II.7.5.3.1 Rôle des MRF

Pax3 et Pax7 réguleraient la détermination et l'auto-renouvellement des cellules satellites, myf5 et MyoD leur détermination, MyoD et MyoG leur différenciation, et enfin MyoG et MRF4 la différenciation/maturation des myotubes. La figure ci-après (Figure 23) récapitule la séquence d'événement intervenant dans la régénération en y incluant le pattern d'expression des MRF. Par souci de clarté, sont représentés uniquement les MRF dont l'expression a été étudiée au cours de mon projet de recherche.



La fusion cellulaire est un processus essentiel et obligatoire de la différenciation myogénique. La fusion sera abordée au cours du chapitre IV Discussion et Perspectives de ce manuscrit.

II.7.5.3.2 Multipotence des cellules satellites

Les cellules satellites, bien qu'étant une population cellulaire hétérogène, comportent de véritables cellules souches, qui à l'échelle clonale sont multipotentes [219-224] et capables d'auto-renouvellement [211, 216]. Pour illustration (Figure 24), nous avons mis en culture des cellules satellites à partir de myofibres issues de biopsies musculaires de patients atteints de Dystrophie Facio-Scapulo-Humérale (DFSH) (collaboration menée avec le groupe dirigée par le Prof. Claude Desnuelle, CHU de Nice), grâce à la technique « fibre isolée » [225, 226] qui exclut les contaminations par des cellules extra-satellitaires. Une fois la confluence atteinte, le milieu de prolifération a été échangé contre un milieu de différenciation « adipogénique » (le même utilisé pour les cellules hMADS [72]). Dans ces conditions, en parallèle à la formation de myotubes, des adipocytes contenant des gouttelettes lipidiques se sont formés.

Ce résultat vérifie *in vitro* le potentiel adipogénique des, ou de certaines, cellules satellites (ici de patients atteints de DFSH) chez l'homme [221].

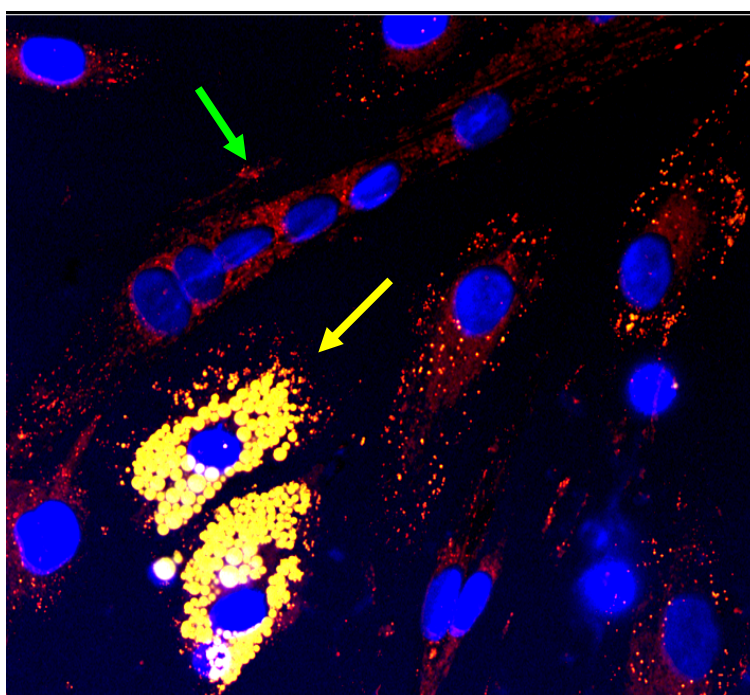


Figure 24 : Potentiel adipogénique des cellules satellites humaines *in vitro*

Après 10 jours en milieu différenciateur adipogénique, la culture de cellules satellites DFSH a été fixée puis marquée par le colorant Nyle Red présentant une affinité élevée pour les lipides neutres (triglycérides). Le Nyle Red associé aux lipides, fluoresce en jaune après excitation à 570 nm. Sur la microphotographie confocale, la flèche jaune indique un adipocyte, et la flèche rouge, un myotube. La fluorescence rouge est probablement due à un marquage aspécifique du Nyle Red. Les noyaux ont été contre-marqués par le colorant Hoechst (fluorescence bleue).

II.8 Dystrophie Musculaire de Duchenne

II.8.1 Génétique de la Dystrophie Musculaire de Duchenne

La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique très invalidante et fatale (décès vers l'âge de 20 ans). Le diagnostic est souvent réalisé après l'âge de 2 ou 3 ans, c'est à dire après l'apparition des premiers signes cliniques (apparition de faiblesse musculaire).

La DMD est une maladie récessive due à des mutations du gène *DMD*, codant pour la dystrophine, dont le locus se localise sur le chromosome X. Cette maladie touche quasi-exclusivement les garçons, avec une prévalence de 1 cas sur 3 500 naissances mâles. 70 % des cas sont dus à une transmission héréditaire par la mère du chromosome X mutant. La fréquence des femmes porteuses d'un allèle morbide *DMD* s'élève à 1 sur 25000 femmes dans la population, dont la plupart sont asymptomatiques. Par conséquent, l'établissement du pedigree familial ne pourra se faire qu'après naissance d'un premier enfant atteint de DMD ou d'un cas connu dans la famille. Le conseil génétique à titre prédictif est d'autant plus difficile que dans environ 30% des cas, la mutation du gène de la dystrophine n'est pas retrouvée chez les mères d'enfants malades; ces cas de DMD sont vraisemblablement dus à des néo-mutations survenues lors de la gamétogenèse des parents. Néanmoins, le diagnostic prénatal est réalisable dans les cas familiaux de DMD.

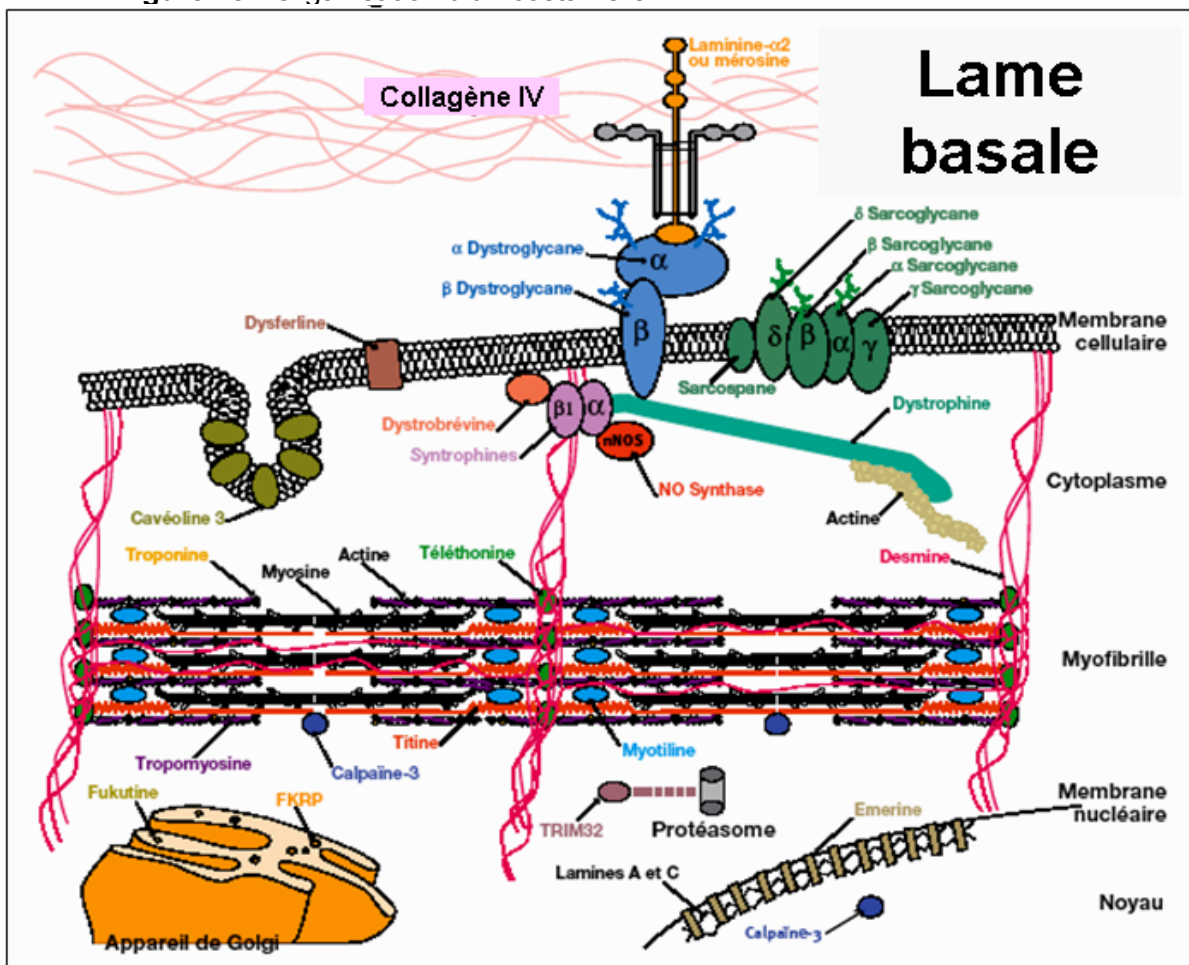
Le gigantisme du gène *DMD* (le plus grand gène chez l'homme avec 2,6 Mpb) et sa structure atypique (79 exons dont 22 exons répétés codant pour les domaines spectrines) rendent les probabilités d'altération du gène plus élevée.

Au moment de l'écriture de ce manuscrit, cette maladie inévitable et fatale ne bénéficie toujours pas de traitements efficaces.

II.8.2 Physiopathologie de la DMD

La dystrophine est une protéine exprimée principalement par les myofibres striés squelettiques et cardiaques, ainsi que par certains neurones [227]. Cette protéine se localise sous la membrane plasmique. Elle interagit à un complexe de protéines qui relie l'intérieur (cytosquelette) et l'extérieur (lame basale/matrice extracellulaire) des fibres musculaires ; l'ensemble de ce complexe moléculaire est dénommé « costamère » (Figure 25).

Figure 25 : Organisation d'un costamère



Dans les DMD, la dystrophine mutée (plus de 4700 mutations répertoriées chez l'Homme [228]) est une protéine écourtée, due le plus souvent à des délétions du gène, qui est rapidement dégradée par le protéasome. L'absence de la dystrophine déstabilise ses inter-actants membranaires (protéines du complexe composé par les sarcoglycanes et dystroglycanes) qui sont également dégradés [229, 230]. Il s'ensuit une fragilisation de la membrane de la fibre musculaire qui n'est plus en mesure de résister au cycle de contraction. Il en résulte une nécrose cellulaire, qui entraîne le recrutement des cellules satellites dans le processus myogénique

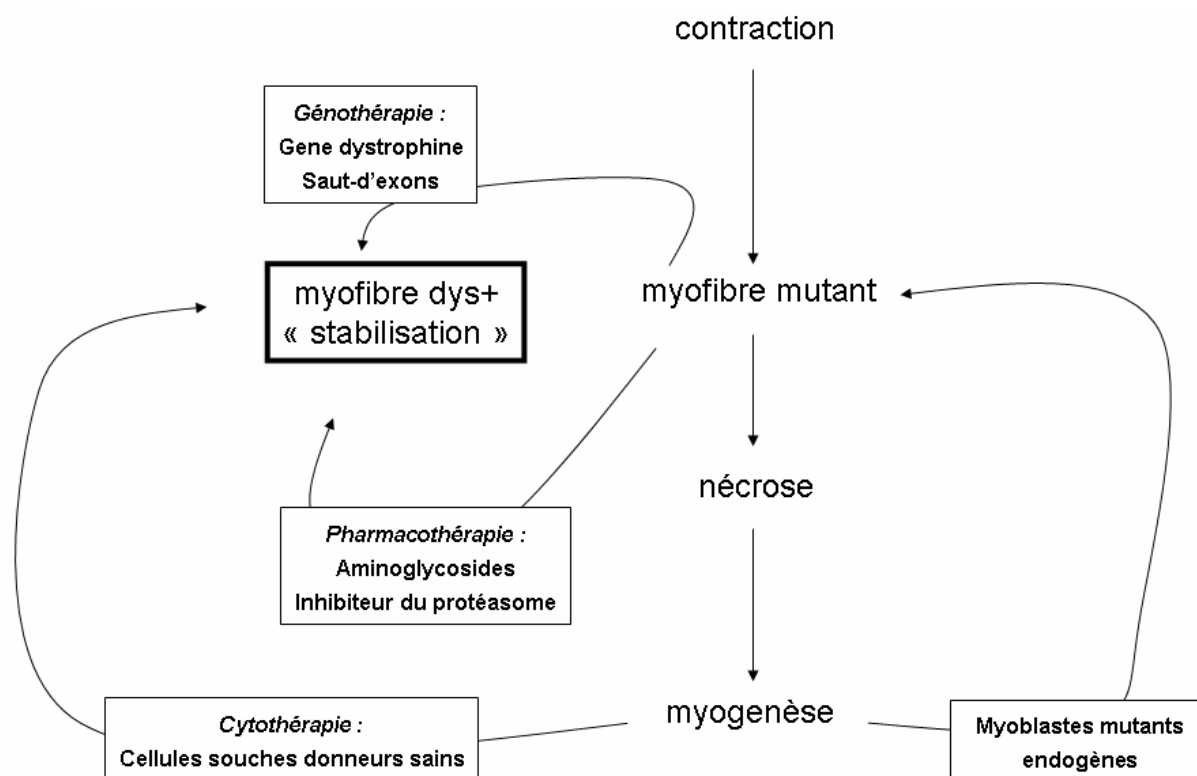
aboutissant à la formation de nouvelles myofibres mutantes. Ainsi, un cercle vicieux de nécrose/régénération se déroule en permanence dans les muscles des ces patients [205]. Une fois les capacités régénératives du muscle dépassées par épuisement du nombre et/ou de la qualité des cellules satellites, une métaplasie fibro-adipocytaire s'installe et entraîne des complications cliniques telles que l'insuffisance respiratoire et cardiaque dont l'issue ultime, malheureusement, sera le décès du patient.

II.8.3 Perspectives thérapeutiques pour traiter la DMD

La DMD étant une maladie génétique récessive, rend conceptuellement la complémentation génétique par apport d'un allèle sauvage possible. Si au fur et à mesure des cycles de nécrose/régénération, on est en mesure d'augmenter le pourcentage de fibres exprimant une dystrophine fonctionnelle, on stabiliserait alors ces fibres, c'est-à-dire qu'elles ne seraient plus assujetties à la dégénérescence causées par les contractions.

Quelles stratégies à employer pour amener dans la myofibre mutante un allèle codant pour une dystrophine fonctionnelle ? Ci-après, sont présentées à titre indicatif les différentes approches (Figure 26) ; nous ne discuterons pas de leurs avantages et désavantages respectifs car cela dépasserait le cadre de ce manuscrit.

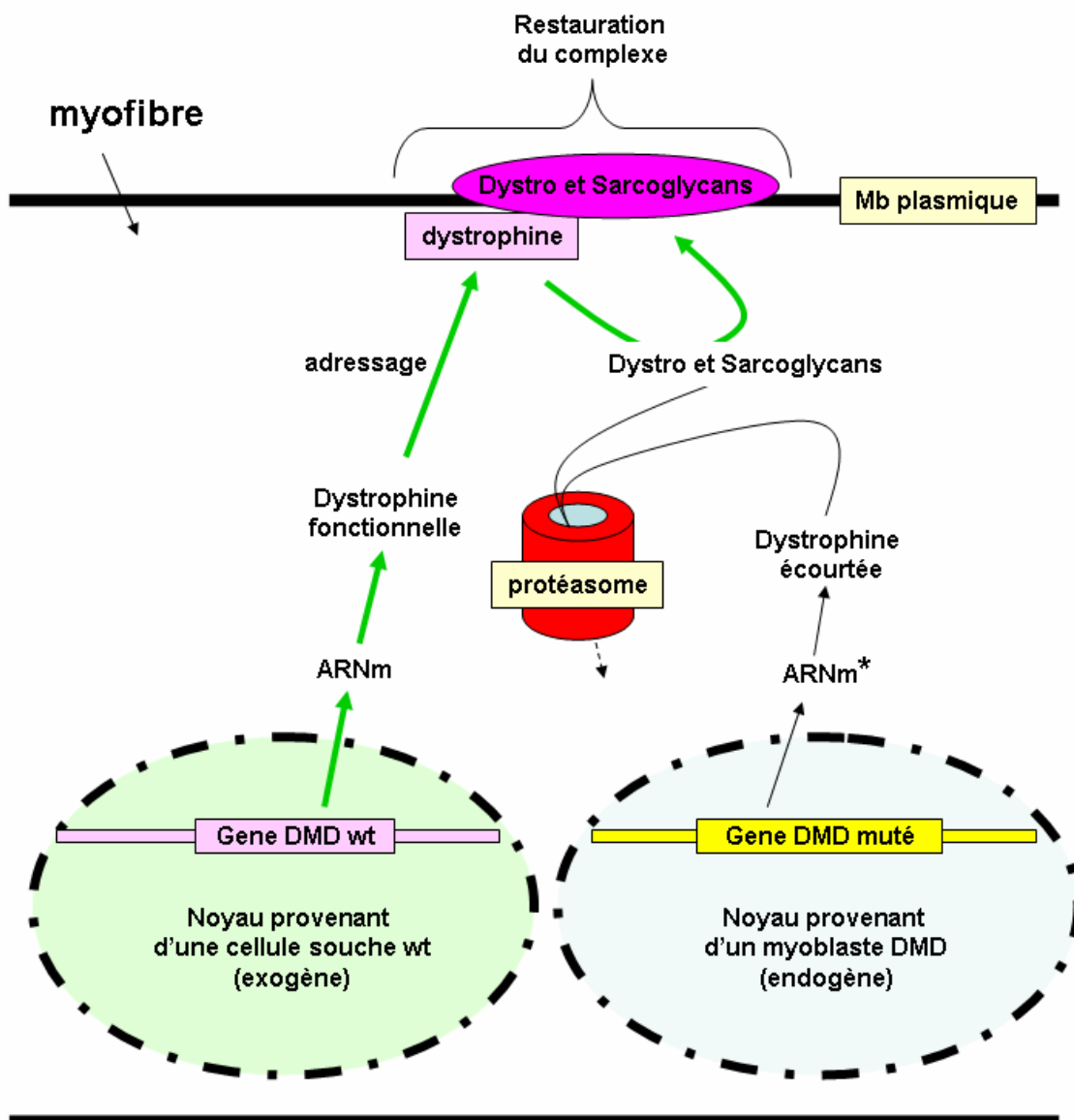
Figure 26 : Les différentes stratégies en vue d'une thérapeutique pour traiter la DMD



II.8.3.1 Cytothérapie

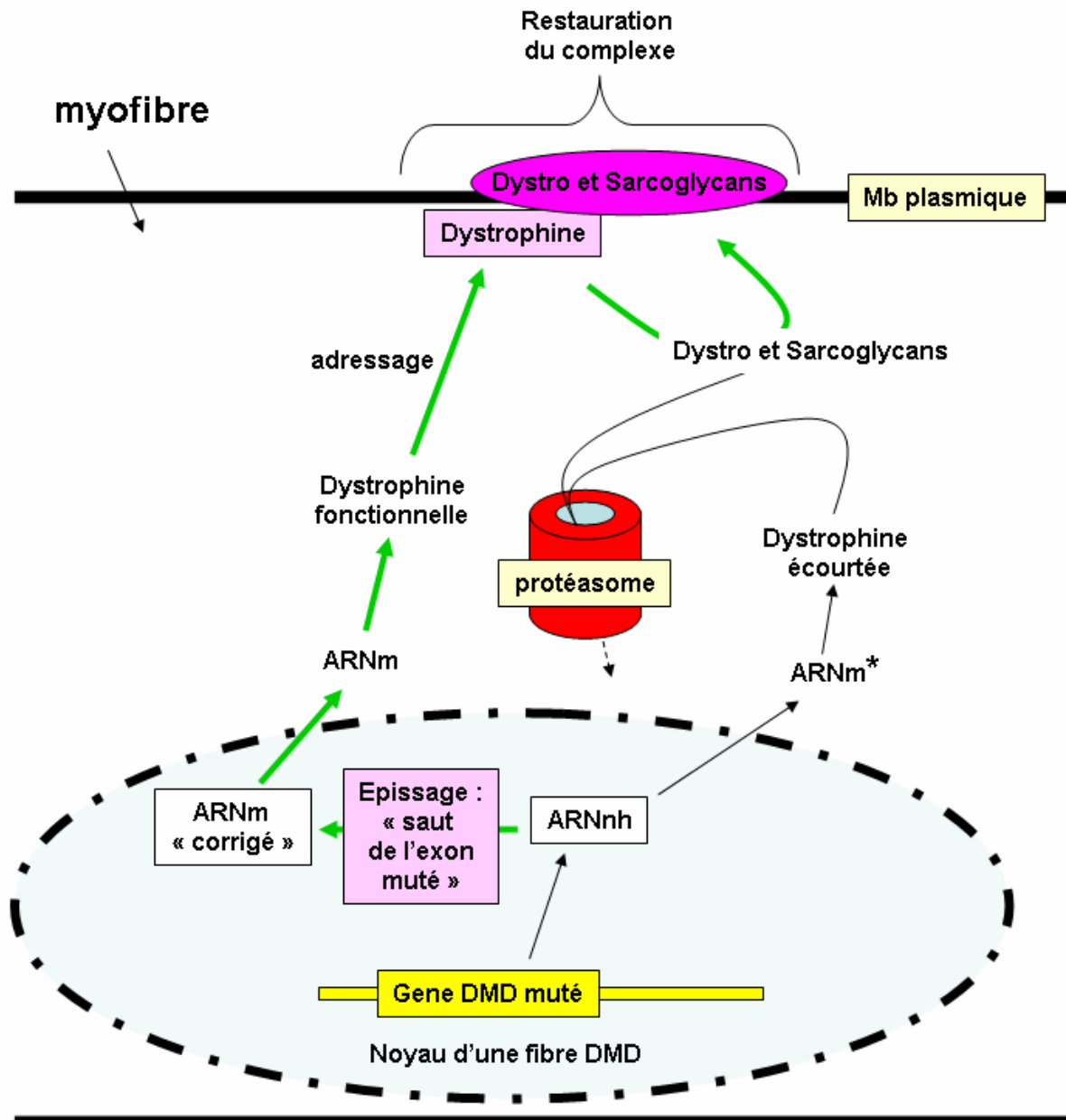
Actuellement, parmi les pistes explorées, il y a l'approche par thérapie cellulaire. Elle consiste à transplanter dans les muscles malades des cellules souches/progéniteurs en provenance d'un donneur sain [231, 232]. Une fois transplantée, si ces cellules contribuent à la formation de myofibre d'une part, et d'autre part si elles expriment la dystrophine, on pourra espérer « court-circuiter » le cercle vicieux énoncé précédemment (Figure 27). On peut également envisager d'utiliser les cellules souches/progéniteurs du patient en auto-transplantation ; mais une transgénèse *ex-vivo* de ces cellules sera alors obligatoire afin qu'elles puissent exprimer une dystrophine fonctionnelle (thérapie génique combinée à la thérapie cellulaire) [233, 234].

Figure 27 : Stratégie par thérapie cellulaire



Notons que le « saut d'exon » (ou « exon-skipping ») [233, 242, 243], une approche alternative de la thérapie génique (ou post-génique) a suscité un grand enthousiasme du à une grande efficacité de restauration phénotypique observée chez la souris mdx, modèle murin de DMD [205, 244]. Cette approche consiste à éliminer l'exon mutant contenant le codon stop prématuré dans l'ARN nucléaire hétérogène en provoquant un épissage alternatif exogène (Figure 29).

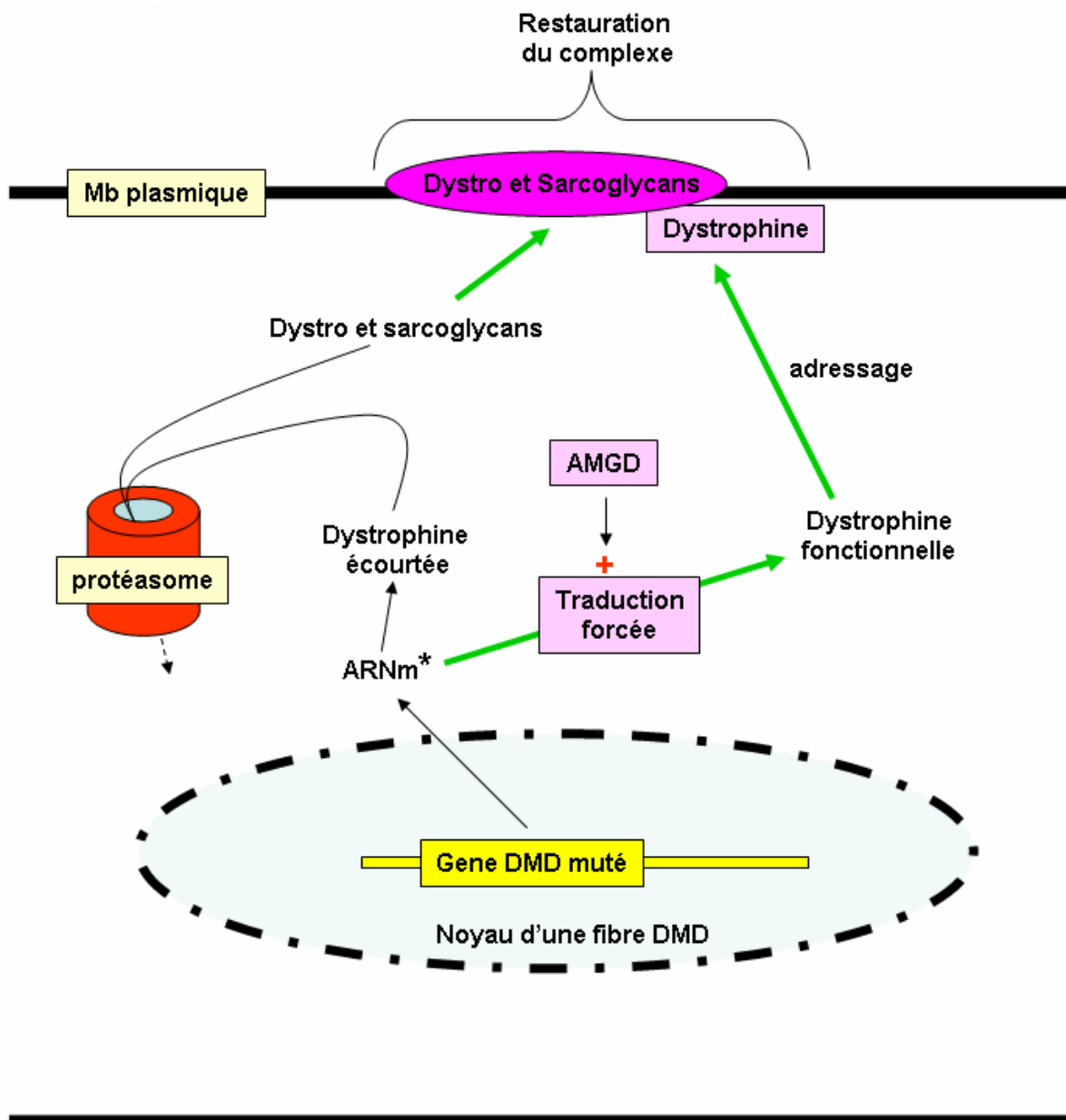
Figure 29 : Génomothérapie par « saut d'exon »



II.8.3.3 Pharmacothérapie

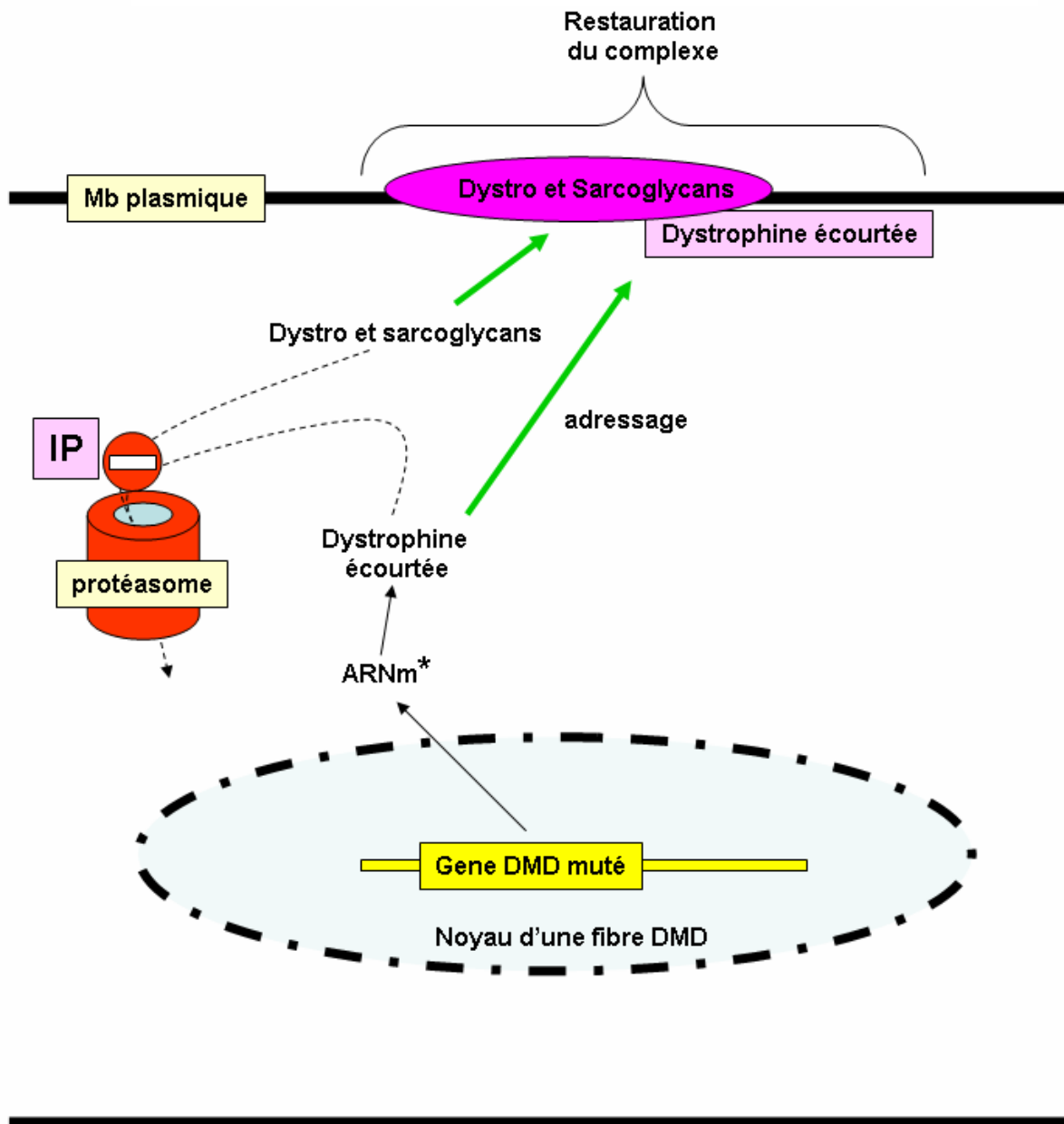
Des études menées *in vitro* et *in vivo* ont révélé que les antibiotiques de la famille des aminoglycosides (ex. : gentamicine) induisent l'expression de dystrophine par les fibres malades [245, 246]. Leur mode d'action serait de forcer les ribosomes à continuer la traduction de l'ARN messager malgré la présence de codon stop (Figure 30) [247-249]. Cette approche ne serait applicable qu'à environ 5-10% des patients DMD [250, 251].

Figure 30 : Stratégie pharmacologique par « aminoglycosides (AMGD) »



Enfin, un inhibiteur du protéasome (le MG-132) a également permis lors d'essais réalisés *in vivo* chez la souris mdx, ou *ex-vivo* sur des biopsies musculaires provenant de patients atteints de DMD, d'induire l'expression de dystrophines (mutantes) et de ces inter-actants dystroglycans et sarcoglycans (Figure 31) [252, 253].

Figure 31 : Stratégie pharmacologique par « inhibiteur du protéasome (IP) »



RESULTATS

III Modification génétique des cellules hMADS

III.1 Introduction

Afin de distinguer les cellules hMADS des myoblastes, et de suivre leurs devenir lors des expériences de co-cultures (confère chapitre IV de ce manuscrit), il nous a fallu marquer ces cellules par des gènes rapporteurs tels que la GFP ou le LacZ (β -galactosidase de *E.coli*).

Tout d'abord, nous avons testé de nombreuses méthodes de transfection telles que la lipofection (Lipofectamins, Fugen6, Exgen, Dreamfect-Magnetofection), l'électroporation et la transduction virale par les vecteurs AAV (Adeno-Associated-Virus). Ces essais ont été quasi-infructueux, résultant dans le meilleur des cas à 1% de cellules exprimant la β -galactosidase après 3 jours de transfection d'un plasmide d'expression CMV-LacZ.

Puis, nous avons opté pour la transduction rétrovirale par les lentivirus recombinants issus du VIH [254]. Les cellules hMADS ont été transduites soit par un lentivirus permettant l'expression de la GFP sous le contrôle du promoteur PGK (Phospho-Glycérate-Kinase), soit par un lentivirus permettant via le promoteur CMV (CytoMegalovirus) l'expression d'un LacZ possédant un signal de localisation nucléaire (nlsLacZ).

III.2 Résultats

Pour chacun de ces deux vecteurs lentiviraux, nous avons testé différentes MOI (Multiplicity Of Infection) : 0,5 ; 5 ou 10 virus par cellules.

Trois jours après les transductions, les résultats les plus élevés ont été obtenus avec une MOI de 10, avec plus de 95% des cellules hMADS positives pour l'expression de la GFP ou de la β -galactosidase (résultats non présentés).

Puis nous avons prospecté la stabilité de l'expression des transgènes au cours des générations cellulaires, mais également, afin de vérifier si la transduction n'avait pas perturbé l'auto-renouvellement des cellules hMADS, après différenciation dans les lignages adipocytaires ou ostéocytaires.

III.2.1 Transduction par le lentivirus nlsLacZ

Les cellules hMADS transduites avec le nlsLacZ (cellules nlsLacZ-hMADS), après 5 passages post-transduction, se différencient efficacement en ostéocytes (Figure 32a) ou en adipocytes (Figure 32b et b'). De plus, le pourcentage de cellules exprimant la β -galactosidase fut inchangé et avoisinait les 95%.

Néanmoins, après 20 passages post-transduction, le pourcentage de cellules nlsLacZ-hMADS s'effondrent à 5-10% de cellules exprimant la β -galactosidase (Figure 1c).

Cette chute pourrait être due à la répression du promoteur CMV causé par la séquence LacZ [255]. A la vue des ces résultats, nous avons utilisé pour les expériences de co-cultures uniquement les cellules nlsLacZ-hMADS à des passages entre 1 et 5 post-transductions.

III.2.2 Transduction par le lentivirus GFP

A passage 5 et à passage 20 post-transduction, plus de 95% des cellules hMADS transduites avec le lentivirus GFP présentaient la fluorescence caractéristique de la GFP (non présenté).

Les cellules GFP-hMADS, à passage 20 post-transduction, se différencient normalement en ostéocytes (Figure 32d et d') ou en adipocytes (Figure 32e et e'), tout en exprimant la GFP.

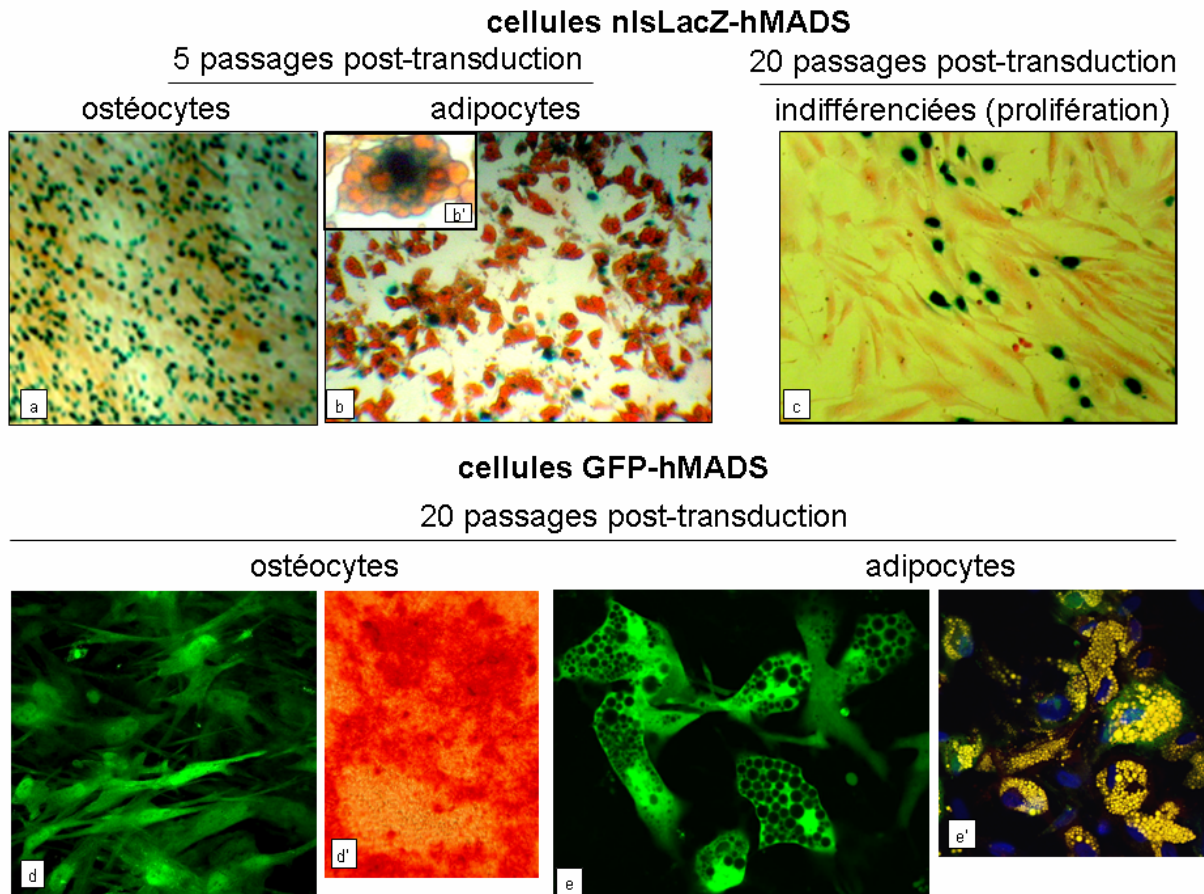


Figure 32 : Transduction lentivirale des cellules hMADS

La différenciation des cellules hMADS en ostéocytes est révélée par l'activité phosphatase alcaline (a, en brun) ou par la coloration de la matrice extra-cellulaire minéralisée au rouge alizarine (d', en rouge).

La différenciation des cellules hMADS est révélée par l'apparition de gouttelettes lipidiques mis en évidence par la coloration à l'huile rouge (b, en rouge ; b', agrandissement) ou par le Nile Red (e', en jaune).

L'activité la β -galactosidase est révélée par coloration X-Gal (a, b, b' et c, en bleue) et l'expression de la GFP par microscopie confocale (d et e).

III.3 Conclusion

Ces résultats ont permis de révéler la transduction lentivirale comme un outil particulièrement efficace pour modifier le patrimoine génétique des cellules hMADS. Non seulement, nous avons pu atteindre des pourcentages très élevés de cellules positives (à MOI 10), mais également une expression stable au cours des générations (pour le lentivirus GFP) et après différenciation. Ces résultats sont en accord avec les études de transduction menées sur les MSC humains issus de la moelle osseuse [256-258].

Néanmoins, le principal désavantage de cette méthode est qu'il nécessite un confinement « L2/L3 » aussi bien pour la production de ces vecteurs, que pour la transduction des cellules ciblées. Nous disposons aujourd'hui d'une alternative efficace, la nucléofection [259], ne nécessitant pas les précautions d'un laboratoire L2/L3.

III.4 Matériels et Méthodes

III.4.1 Transduction lentivirale

Les lentivirus GFP (Généthon, Ivry, France) et nlsLacZ (Claude Bagnis, Etablissement Français du Sang Alpes Méditerranée, Marseille, France) ont été dilués (MOI 0,5 ; 5 ou 10 virus par cellules) dans du milieu de prolifération, DMEM contenant 10% de sérum supplémenté avec 10mg/ml de Polybrène (Sigma–Aldrich). Le mélange vecteur/Polybrène est laissé pendant 15 mn à température ambiante, puis la suspension est ajoutée aux cellules. Après 15h d'incubation, les cellules sont lavées avec du PBS, puis du milieu de prolifération est ajouté. La transduction des cellules a été réléguée en salle de culture de confinement L2/L3.

Trois jours après la transduction, l'expression des transgènes est analysée. L'activité β -galactosidase est détectée par une cytochimie X-Gal et l'expression de la GFP est évaluée par FACS et par microscopie confocale.

III.4.2 Différenciation des cellules hMADS

La différenciation adipocytaire se fait, une fois les cellules à confluence, dans un milieu sans sérum DMEM/F12 (v/v) supplémenté avec de l'insuline humaine (0,86 μ M), de l'hormone

thyroïdienne T3 (0,2nM), du BRL 49653 (agoniste de PPAR γ , 1 μ M) de la transferrine (10 μ g/ml), de l'IBMX (activateur de la voie PKA, 100 μ M) et de la dexaméthasone (1 μ M).

La différenciation ostéoblastique se fait, une fois les cellules à confluence, dans un milieu DMEM contenant 10% de sérum, de l'acide ascorbique (10 μ M), du β -glycérophosphate (10mM) et de la dexaméthasone (0,1 μ M).

Le milieu de différenciation est changé tous les deux jours et concernant la différenciation adipocytaire, la dexaméthasone et l'IBMX sont présents dans le milieu uniquement les deux premiers jours de différenciation.

IV Potentiel myogénique des cellules hMADS

Les résultats préliminaires du laboratoire indiquaient que les cellules hMADS transplantées (par injection intra-musculaire dans le muscle *Tibialis anterior*) chez la souris mdx pouvaient contribuer à la formation de myofibres contenant des noyaux humains [69]. Ces fibres présentaient également une immuno-réactivité positive contre la dystrophine d'origine humaine. L'objet de ce projet de doctorat, soutenu par l'Association Française contre les Myopathies (AFM), consistait à élucider les mécanismes par lesquels les cellules hMADS contribuent à la myogenèse. Plus précisément, nous avons prospecté l'existence d'une plasticité intrinsèque envers le lignage musculaire squelettique, c'est-à-dire la capacité qu'auraient ces cellules d'acquérir le programme myogénique. Dans ce but, la réponse des cellules hMADS (expression des MRF et formation de myotubes) à de nombreuses conditions inductrices connues pour réguler la détermination/différenciation musculaire a été évaluée.

Les résultats de nos investigations ont été en contradiction d'une part avec le dogme propagé par certaines écoles d'une plasticité étendue des MSC, plasticité incluant le programme musculaire, et d'autre part avec les résultats des études menées avec les MSC murines. Ces contradictions ont été discutées dans notre article actuellement soumis à publication.

Enfin, nous avons mis en place une approche expérimentale originale pour comprendre le processus de contribution myogénique des cellules hMADS ; l'analyse des résultats, nous ont amené à proposer un modèle sortant des consensus habituels.

Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells acquire muscle identity only after spontaneous fusion with myoblasts

Ali Massoudi, Christian Dani and Claude Albert Dechesne

Institut de Recherche Signalisation, Biologie du Développement et Cancer, UMR 6543 CNRS
Université Nice-Sophia Antipolis, Centre de Biochimie, Faculté des Sciences, Parc Valrose,
06108 Nice cedex 2, France

Address correspondence to C. A. Dechesne: dechesne@unice.fr ; phone number: 33 492 07 69
94, fax: 33 492 07 64 04

Running title: hMADS cell myogenic potential

Abbreviations used in this paper: MSC, Mesenchymal Stem Cells; hMADS, human Multipotent Adipose-tissue Derived Stem cells; DMD, Duchenne Muscular Dystrophy; MRFs, Myogenic Regulatory Factors; PM, Proliferation Medium; DM, Differentiation medium; GFP, Green Fluorescent Protein; IF, Intermediate Filament; PEG, PolyEthylene Glycol.

Abstract

Mesenchymal Stem Cells have an intrinsic capacity to differentiate into various cell types in culture or after transplantation. Previously we have shown that multipotent stem cells derived from human adipose tissue (hMADS cells) were able to restore dystrophin expression after transplantation in *mdx* mice. In the current study, we investigated the mechanism of skeletal muscle phenotype acquisition by hMADS cells. We first tested various culture conditions to induce an intrinsic myogenic program in hMADS cells. Myotube formation and muscle determination/differentiation factors, i. e. Pax7, myf-5, MyoD and myogenin were assessed. No myogenic conversion could be detected under these conditions. In contrast, when co-cultured with myoblasts, hMADS cells reproducibly contributed to hybrid myotube formation, expressed several muscle differentiation markers and had the ability to restore dystrophin expression in human dystrophic background. Interestingly, this myogenic conversion was not associated by the expression of key transcription factors for muscle determination/differentiation.

Therefore, our results clearly demonstrated that acquisition of myogenic identity by hMADS cells did not occur via a bona fide determination/differentiation process. We propose a model of myogenic conversion of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue in which, only after fusion, transcription factors of myoblasts were able to program hMADS genome toward the skeletal muscle lineage.

Key Words: Human mesenchymal stem cells, myogenesis, Duchenne Muscular Dystrophy.

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSC), one type of adult stem cell, isolated from the stroma of several organs have been proposed to contribute to the regeneration of different tissues including liver, blood, skeletal tissues, heart, and skeletal muscle (1-5). From a cell therapy perspective adipose tissue presents several advantages as a source of MSC compared to other organs as it is very large and can be easily harvested by surgery with little trouble (6-10).

Our laboratory has isolated a novel mesenchymal cell population, named hMADS cells (human Multipotent Adipose tissue-Derived Stem cells) from human infant adipose tissue. hMADS cells exhibit fundamental stem cell properties at the single cell level such as self-renewal, multipotency and high telomerase activity (11, 12). Indeed, they can be extensively propagated *in vitro* without any karyotype alteration or transformation while maintaining their differentiation capacities. These cells are able to differentiate under specific inductive media into adipocytes, osteocytes, and chondrocytes. In addition, more detailed investigations showed that adipocyte and osteocyte differentiation of hMADS cells are temporally regulated by the expression of determination/differentiation transcription factors specific of these two lineages (13). Interestingly, these adipose tissue-derived stem cells display skeletal muscle potentialities. Indeed, *in vivo*, after injection into skeletal muscle of *mdx* mice, hMADS cell nuclei and human dystrophin protein were detected in fully mature myofibers (12). *Mdx* mice are a model of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), a fatal X-linked myopathy. In this disease, DMD symptoms are caused by mutations of dystrophin gene leading to the absence of dystrophin and dystrophin-associated proteins (14-16). Although skeletal muscle contribution of MSC after *in vivo* transplantation has been well documented, little evidence of functional commitment to the myogenic phenotype has been reported (17, 18). It remains unclear whether MSC can be either programmed to differentiate into fully functional specialized cells or recruited by surrounding cells via cell fusion, thereby acquiring cellular identity and functions (19-24).

Skeletal muscle development requires well defined steps including cell to cell fusion. Indeed, after activation, determined progenitor cells, termed myoblasts, commit into the myogenic lineage. Differentiating myoblasts - termed myocytes - then fuse and form multinucleated syncytial cells termed myotubes. Ultimately, myotubes undergo terminal differentiation to form myofibers that express a cohort of myofibrillar proteins organized in sarcomeres (25). Determination, self-renewal and differentiation of myoblasts are strictly controlled by a set of “key” transcription factors, i. e. Myogenic Regulatory Factors (MRFs), such as Pax3, Pax7, MyoD, myf-5, myogenin and MRF4 (26).

In an attempt to delineate further the *in vivo* data obtained with hMADS cells, we investigated their myogenic potential by *in vitro* assays. First, their intrinsic myogenic potential was assessed using various culture conditions. Then, we performed lineage tracking to monitor incorporation of hMADS cells into multinucleated skeletal muscle myotubes. Finally, in order to discriminate between a pre-fusion determination or a post-fusion conversion, expression of numerous skeletal muscle genes encoded by hMADS cells was investigated during the myogenic process. Our results led us to propose a model of myogenic conversion of human adult MSC derived from adipose tissue.

Methods

Materials

Cell culture media were purchased from Cambrex, fetal calf serum (FCS) and horse serum from Dutscher S.A., and chick embryo extract from PAA laboratories. FGF2 and EGF was a product of Euromedex. Matrigel was a product of BD Biosciences. The following mouse monoclonal IgG primary anti-human δ -sarcoglycan (NCL-dSARC) and anti-dystrophin (NCL-DYS3) antibodies were from Novocastra. Mouse monoclonal IgG anti-human nuclei antigen and anti-human nestin from Chemicon, anti-human MyoD (G106-647), anti-Connexin43 (clone 2) and anti-M-Cadherin (Clone 5) from BD Biosciences. The following monoclonal antibodies, mouse IgG anti-Pax7 (PAX7), mouse IgG anti-Myogenin (F5D), mouse IgG anti-desmin (D3), mouse IgM anti-titin (9D10), rat IgG anti-human α 5-integrin (BIIG2) and rat IgG anti-human β 1-integrin (AIIB2) were purchased from Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa). Goat polyclonal IgG anti-MyoD (S-17) was purchased from Santa Cruz. Alexa Fluor594-conjugated secondary antibodies, streptavidin-coupled AlexaFluor596 and Hoechst-34580 were purchased from Molecular Probes. HRP or Biotin-conjugated secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch. HRP-ABC kit and DAB detection kit were from Vector Laboratories. CMV-nlsLacZ and PGK-eGFP-lentivirus vectors were kindly provided by Dr. C. Bagnis (Etablissement Francais du Sang Alpes Méditerranée, Marseille, France). M-MLV reverse transcriptase, RQ1 RNase-free DNase and GoTaq DNA polymerase were purchased from Promega, and TRI-Reagent from Euromedex. All the other products were purchased from Sigma–Aldrich.

Cell cultures

hMADS cells

The establishment, characterization and cultures of hMADS cells have been previously described by (11, 12). hMADS cells used in this report were isolated from the pubic region fat pad of a 5-year old male donors. Cells were inoculated at a density of 4500 cells/cm² in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, low glucose) supplemented with 10% FCS, 2.5 ng/ml hFGF2, penicillin/streptomycin. Proliferating medium (PM) was changed every 2-3 days. hMADS cells were sub-cultured when they reach 9000 cells/cm² (~80% confluence). One passage before co-culture experiments, FGF2 was omitted in the proliferation medium.

C2C12 cells

C2C12 cells (ATCC) were inoculated at 2500 cells/cm² and maintained as undifferentiated myoblasts in PM [DMEM (high glucose) supplemented with 20% FCS,

penicillin/streptomycin]. They were sub-cultured when they reach 25 000 cells/cm² (~80% confluence).

human DMD and wt-myoblasts

Human DMD immortalized but not transformed myoblastic cell line (named here DMD myoblasts) was kindly provided by Pr. D. Trono (Geneva, Switzerland). These cells were cultured as previously described (27). The human wild-type myoblasts derived from a healthy patient were kindly provided by Dr. G. Butler-Browne (Institut de Myologie, Paris, France) and cultured in the same PM than DMD myoblasts, i. e. Ham's F10 supplemented with 20% and penicillin/streptomycin.

Mouse primary satellite cells

Proliferating primary satellite cells were obtained from mdx or wild-type mouse isolated myofibers of tibialis anterior muscle as described previously by (28). Briefly, muscles were incubated for 60 min at 37°C in 0.2% (w/v) type-1 collagenase in DMEM (high glucose) supplemented with penicillin/streptomycin. Myofibers were then isolated by trituration. Isolated myofibers were placed individually in wells of 24well-plates coated with 1 mg/ml Matrigel. PM [DMEM with 10% (v/v) horse serum and 0.5% (v/v) chick embryo extract and penicillin/streptomycin] was added. Under these conditions, myofibers adhere to the substrate and satellite cell-derived myoblasts migrate away from the fiber and proliferate.

All listed-cells were cultured at 37°C in a humidified gassed incubator in 5% CO₂ atmosphere.

Co-cultures

hMADS/C2C12 cells co-cultures: proliferating hMADS cells and C2C12 cells were mixed in a ratio of 3:1, and inoculate at 20 000 cells/cm² in PM. In a couple of day after plating, cells reached 100% confluence and PM was shifted to differentiation medium (DM) [DMEM (high glucose) supplemented with 10 µg/ml insulin, 5 µg/ml transferrin and 1µM dexamethasone and penicillin/streptomycin]. DM was changed every two days. From initial pating until day 4 in DM, a ratio of 0.4-0.5 ml media per cm² culture area was used.

Highly mature myotubes (i.e. > 6 days in DM) were obtained as previously described (29) with some modifications. Cells were plated onto collagen/Matrigel-coated [0.1 mg/ml rat tail collagen, 0.3 mg/ml Matrigel] coverslips. Since day 4 to day 10-14 in DM a ratio of 0.3 ml media per cm² culture area was used.

hMADS/DMD cells co-cultures: the same methods as above were used with some modifications. hMADS and DMD cells were mixed at a ratio of 1:1. DM was DMEM (high glucose) supplemented with 10ng/ml EGF, 0.05% (w/v) BSA, 1 mM creatine, 110 µg/ml pyruvate, and 50 µg/ml uridine and penicillin/streptomycin.

hMADS/human wt-myoblasts co-cultures: hMADS cells and wt-myoblasts were mixed at a ratio of 1:1. DM was DMEM (high glucose) supplemented with 10 µg/ml insulin, 5 µg/ml transferrin and penicillin/streptomycin.

hMADS/mouse primary satellite cells co-cultures : when a sufficient number of satellite cells has migrate from myofibers (~40% confluence), ~8 500 hMADS cells were added per well onto satellite cells grown on matrigel-coated 24-well plates. 24h after hMADS cell addition, PM was shifted to DM (DMEM supplemented with 10 % HS, 2% FCS, 0.5 % chick embryo extract and penicillin/streptomycin).

Immunocytochemistry

Cells plated on plastic of 48 or 24-well plates, or on coverslips, or collagen/Matrigel-coated coverslips were fixed and assessed for immunostaining. Briefly, cells were rinsed twice with cold phosphate buffer saline (PBS), and then subjected to fixation in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature (RT). Free aldehydes were quenched with 100 mM Tris-pH 8.5, 150 mM NaCl for 5mn. Fixed cells were permeabilized with 0.005% (w/v) digitonin in PBS for 15 min. Permeabilization step was omitted when antigens were at the cell surface (i.e. β 1-integrin, α 5-integrin, M-Cadherin). Unspecific reactions were blocked with 1% BSA plus or less 1% normal goat serum (depending of secondary antibody origin) in PBS for 30 min. Cells were then incubated with primary antibody 1h at RT. After 3 washes 1% BSA in PBS, Alexa Fluor594, HRP-conjugated or biotin-conjugated secondary antibodies were incubated 45 mn at RT (in the dark for the former). Antibodies were diluted at 1-10µg/ml final in 0.1 % carrageenan- λ in PBS (antibody buffer). Antibody buffer for the Alexa Fluor 594-conjugated antibody were supplemented with 0.5 µg/ml Hoechst for nuclei counterstaining. Biotin-conjugated secondary antibodies were detected with streptavidin-coupled AlexaFluor596 or HRP-ABC signal amplification Kit followed DAB detection. Fluorescent-immunostained coverslips were mounted on slides using Mowiol 4-88 solution. Micrographs of DAB-stained cells were directly taken with a numerical camera (DSC-D75, Sony) under a light transmission microscope (Axiovert25, Zeiss).

Confocal image capture

Fluorescent immunostained cells were viewed on a confocal microscope (LSM510 META, Zeiss) using Plan-Neofluar x40/1.3 and Plan-Achromat x63/1.4 oil-immersion objectives. Images were optimized globally for contrast and brightness using imageJ.

Semi-quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted using TRI-Reagent according to manufacturer's instructions and quality was assessed on 1% agarose gel to eliminate any degraded RNA. Reverse transcription was carried out with M-MLV reverse transcriptase and random primers on 1 µg RNA treated with RQ1 RNase-free DNase. PCR was performed with GoTaq DNA polymerase in a total volume of 25 µl. Cycle numbers (n) were optimized for each primer pair to be in the linear range amplification. For normalization all cDNA amounts under comparison were carefully adjusted between 1/25 to 1/50 of reverse transcription solution to give the same quantity of amplified cDNA with mouse hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) or human β-actin primers. General PCR conditions were the following: 3 min at 95°C followed by n cycles of 30 s at 95°C, 30 s 55°C, and 50 s at 72°C with a final elongation step of 5 min at 72°C. 20 µl of PCR products were analyzed on 1-1.5% ethidium bromide stained agarose gels. Mouse primers did not anneal with human cDNAs and human primers did not anneal with mouse cDNAs. Specific PCR conditions for each primer pair were as follows. Mouse HPRT: 249 bp, 35 cycles, forward 5'-GCTGGTGAAAAGGACCTCT-3', reverse 5'-CACAGGACTAGAACACCTGC-3'. Human α-actin: 746 bp, 23 cycles, forward 5'-AGCCATGTACGTTGCTA-3', reverse 5'-AGTCCGCCTAGAAGCA-3'. Human desmin: 519 bp, 35 cycles, forward 5'-CCTACTCTGCCCTCAACTTC-3', reverse 5'-AGTATCCCAACACCCTGCTC-3'. Human enolase-3: 502 bp, 40 cycles, forward 5'-TGACTTCAAGTCGCCTGATGATCCC-3', reverse 5'-TGCGTCCAGCAAAGATTGCCTTGTC-3'. Human muscle creatine kinase: 720 bp, 40 cycles, forward 5'-GGCACAATGACAACAAGAGC-3', reverse 5'-GAAAAGAAGAGGACCCTGCC-3'. Human dystrophin: 778 bp, 33 cycles, forward 5'-TTCTCAGCTTATAGGACTGCC-3', reverse 5'-GGAGTGCAATATTCCACCAT-3'. Human sarcospan: 466 bp, 33 cycles, forward 5'-GGGCTGGGATCATTGTCTGCT-3', reverse 5'-GGAATTCTTAGATCTTTTGCTGGGG-3'. Human Pax7: 465 bp, 35 cycles, forward 5'-GAAGGCCAAACACAGCATCGA-3', reverse 5'-GCCCTGGTGCATGGTGGACGG-3'. Human Myf5: 417 bp, 35 cycles, forward 5'-TGAGAGAGCAGGTGGAGAACTAC-3', reverse 5'-GCCTTCTTCGTCCTGTGTATTAG-3'. Human MyoD1: 503 bp, 35 cycles, forward 5'-AAGCGCCATCTCTTGAGGTA-3', reverse 5'-GCGCCTTTATTTTGATCACC-3'. Human myogenin: 364 bp, 35 cycles, forward 5'-AGCGCCCCCTCGTGTATG-3', reverse 5'-TGTCCCCGGCAACTTCAGC-3'.

Lentiviral transduction protocol

Transduction of hMADS cells was accomplished as follows. Lentiviral vectors (CMV-nlsLacZ and PGK-eGFP vectors) were diluted into 5mL of PM (for infection in a 100-mm dish). Polybrene

was added at a concentration of 10 mg/ml. The viral vector/polybrene mix was left at RT for 15 mn and then added to the cells. After 15h, cells were washed once in PBS, and fresh PM was added. Three days after infection, transgene expression was assessed. Transgenic nuclear β -galactosidase activity was detected by X-Gal staining. Transgenic GFP expression was assessed by confocal microscopy and FACS analysis. More than 95% of cells were positive for the expression of nuclear β -galactosidase or GFP at a MOI of 10 viruses by cell.

Results

Intrinsic myogenic potential of hMADS cells

In order to evaluate the intrinsic ability of hMADS cells to differentiate into the skeletal muscle lineage, various culture conditions were tested. *In vitro*, no myotube formation occurred when hMADS cells were cultured in various media supplemented with hormones and cytokines related to myogenesis (sup S1). We checked the expression of Pax7, MyoD and myogenin proteins after treating hMADS cells with different putative myogenic media. Immunostaining data indicated no detectable expression under these various conditions even in the presence or in absence of serum (sup S1). Moreover, we did not observe any myotube formation by treating hMADS cells with conditioned media from proliferating or differentiating myoblasts of human or mouse origin, or those from regenerating mouse *mdx* or wild-type skeletal muscles. The effect of extracellular matrix components was also assessed. When hMADS cells were cultured on various types of coated dishes i.e. collagen, Matrigel, laminin or gelatin, no myotubes were observed.

Thus, hMADS cells are unable to form myotubes and to express MRFs when maintained in various myogenic media. Therefore, we set up a co-culture assay with myoblasts in order to investigate in details mechanisms by which hMADS cells acquire a myogenic potential.

hMADS cells co-cultured with myoblasts contribute to myotube formation

hMADS cells were maintained in co-culture with primary satellite cells isolated from myofibers of *mdx* mice and the formation of hybrid myotubes was evaluated several days after maintaining cells in differentiation medium. The presence of human nuclei within myotubes was detected by immunostaining using an anti-human nuclei antibody (Figure 1a, a'). Co-cultures with primary satellite cells obtained from myofibers of wild-type mice yielded similar results (not shown).

For a better estimate of hMADS cell myotube contribution, co-cultures were performed with proliferating nlsLacZ-hMADS cells and C2C12 myoblasts and percentage of hybrids were evaluated after myotube formations (Figure 1b). Although, hybrid myotube formation proved to be highly reproducible, the yield remained rather low. Hybrid myotubes represented approximately 1-3 % of total myotubes, in which hMADS nuclei represented 5-10% of total nuclei. No homogenous hMADS cell-derived myotubes could be observed.

Then we investigated whether hMADS cells could also participate into the formation of human myotubes. For this purpose myoblasts derived from a Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) patient (27), was co-cultured with nlsLacZ-hMADS cells (Figure 1c). Similarly to co-cultures

performed with murine myoblasts, hMADS cells contributed to myotube formation as shown by the nuclear β -galactosidase activity. Hybrid myotubes were similarly obtained using human wild-type myoblasts derived from a healthy patient (not shown).

No homogenous hMADS cell-derived myotubes could be observed in any experiments described above.

Interestingly, positive nuclei in all hMADS cells/myoblasts hybrid myotubes showed an anti-human nuclei staining or β -galactosidase activity with a gradient intensity starting in a large nucleus (Figure 1, blue arrows) surrounded by small and weakly stained nuclei (Figure 1, black arrows). The large nuclei were identified like coming from those of hMADS cells whereas the small ones those from myoblasts (Sup S2). Therefore, this observation indicated that nuclear proteins expressed by hMADS cell nuclei could be transferred in mouse nuclei in hybrid myotubes.

Expression of muscle genes encoded by hMADS cells in co-cultures

Expression of several muscle differentiation markers i. e. desmin, enolase-3, muscle creatine-kinase, sarcospan and dystrophin was investigated in co-cultures of hMADS/C2C12 cells by using semi-quantitative RT-PCR and primer combinations that were specific for human transcripts (Figure 2A). This set of genes was induced in a sequence that accurately reflects their regular temporal order during myogenic differentiation.

The myogenic conversion of hMADS cells was then evaluated at the protein level for δ -sarcoglycan and dystrophin expressed only in myotubes.

Forteen days after maintenance in differentiation medium (DM), hMADS/C2C12 co-cultures expressed human δ -sarcoglycan and confocal microscopy revealed both a striated sarcoplasmic reticulum (Figure 3A, blue arrow) and a sarcolemmal staining (Figure 3A, yellow arrow) pattern in accordance with the sub-cellular localisation observed in skeletal muscle (30, 31).

Next, the ability of hMADS cells to complement dystrophin in a human dystrophic background was assessed. For this purpose, co-cultures were performed with hMADS cells and human DMD myoblasts.

After 10 days under DM, cultures were stained with anti-dystrophin (Figure 6a) or anti- δ -sarcoglycan antibodies (Figure 6b). In both cases, positive staining was observed but the number of δ -sarcoglycan-positive myotubes was higher than that of dystrophin-positive

myotubes (see Discussion). Human myoblasts were used as a positive control for antibody reactions (not shown).

Altogether, these data indicate that fusion with human or murine myoblasts led hMADS cells to express a functional myogenic program.

Expression of MRFs in hMADS/C2C12 cell co-cultures

hMADS cells could have acquired myoblasts identity by the complex inductive co-culture micro-environment, and then committed to differentiate and fuse with myoblasts. To test this hypothesis, GFP-hMADS/C2C12 cells co-cultures were carried out and expression of the MRFs Pax7, MyoD and myogenin was assessed. Immunostaining at different time-points during myogenesis using the highly sensitive labeled-streptavidin / biotin-coupled secondary antibody detection system, did not allow the detection of MRFs in mono-nucleated GFP-hMADS cells (Figure 5). Similar results were obtained in co-cultures of hMADS cells and DMD myoblasts, excluding species-specific barrier in preventing MRF induction. This lack of expression (including myf-5) was confirmed at mRNA level using human specific RT-PCR from hMADS/C2C12 co-cultures (Figure 3B). Control experiments of hMADS cells cultured alone under the same conditions showed no expression of these genes neither at the mRNA level (not shown) nor at the protein level (sup S3).

After two days in DM, myotubes nuclei expressed myogenin, as expected. Surprisingly GFP-hMADS/C2C12 hybrid myotubes showed also a weak nuclear staining for myogenin protein in hMADS-derived nuclei. The anti-myogenin antibody used in this assay recognized mammal myogenin as no human specific myogenin antibodies are available in our knowledge. Expression of myogenin in hMADS nuclei could not be due to *de novo* synthesis in the myotube context as RT-PCR failed to detect myogenin mRNA from human origin (Figure 3B). This data strongly suggested that transcription factors of the host cells (myoblasts) could target to nuclei of donor cells (hMADS cells) and induced the myogenic program.

Desmin and nestin expression in hMADS/C2C12 co-cultures

Although hMADS cells did not express MRFs, the complex muscle micro-environment could have induced the expression of some muscle markers in hMADS cells before fusion (32, 33). To test the hypothesis of a “partial commitment”, we assessed the expression of the muscular intermediate filament (IF) desmin and the neuro-muscular IF nestin.

Before myotube formations, all C2C12 cells were desmin-positive in contrast to GFP-hMADS cells (sup S3). After myotube formation, all myotubes were desmin-positive (not shown). As

the anti-desmin antibody recognized the human and the mouse protein, RT-PCR experiments revealed that human desmin mRNA was indeed expressed (Figure 3a) and thus could have contributed to this protein staining in hybrid myotubes.

Nestin is known to be expressed in motor endplates and myo-tendinous junctions of skeletal muscle, and to play a redundant function with the muscle specific IF desmin (34-37). Using a human specific anti-nestin antibody, we first checked by immunostaining that nestin was expressed in both human wild-type myoblasts (not shown) and DMD myoblasts (sup S4).

Then, co-cultures of GFP-hMADS cells and C2C12 myoblasts were analyzed for human nestin expression at different time-points (Figure 9Aa, b, c, d and e). Mono-nucleated GFP-hMADS cells were always negative before fusion. However, human nestin was clearly detected in GFP-hMADS/C2C12 hybrid myotubes as soon as they formed (2 days in DM). All of the GFP-positive myotubes were human nestin-positive and contained human nuclei. Reciprocally, hybrid myotubes containing hMADS-derived nuclei detected by Hoechst staining proceeded to be always positive for GFP and human nestin. In addition, the staining pattern of human nestin in hybrid myotubes (Figure 9B), i.e. with a higher intensity at the edges, was in accordance with its reported location in skeletal muscle myotubes (34).

Discussion

This study, using hMADS cells, highlights the mechanism of human adult MSC myogenic contribution. First, numerous culture conditions failed to induce myotube formation of hMADS cells even on long-term treatment. This was confirmed by gene expression analysis where no evidence of MRFs expression was found. Second, when co-cultured with human or mouse myoblasts, incorporation of hMADS cells into multinucleated skeletal myotubes was observed by lineage tracking and specific gene expression.

Myogenic potential of adipose tissue-derived stroma-vascular cells from mouse origin has been recently investigated (38). These authors observed a restricted subpopulation of cells possessing a complete myogenic determination/differentiation ability. Interestingly, the group of Braun T. (39, 40) has recently shown that Bone-Marrow derived-Mesenchymal Stem Cells from mouse origin (mBM-MSK) can express MRFs and skeletal muscle markers when co-cultured with feeder-cell layers producing Wnt proteins or, by treating mBM-MSK with chromatin remodelling agents i. e. 5-azacytidine (AZA, a DNA demethylating agent), and Trichostan (an inhibitor of histone desacetylases). Nevertheless, myotube formation was not observed. Under our culture conditions, we tested activation of Wnt-pathway by using lithium chloride and the chemical Bio, two well-known inhibitors of glycogen synthase kinase-3 described as a negative regulator of this pathway (41-43). In both cases, hMADS cells neither expressed MRFs nor did form myotubes (sup S1 and S3). Similarly, after treatment with sodium butanoate, valproic acid (two inhibitors of histone desacetylases) or AZA, hMADS cells did not express MRFs, neither form myotubes. In addition, no differentiation into skeletal muscle was observed when human BM-MSK was treated with AZA (44, 45). Altogether, differences observed with “human” MSC could be explained by a higher plasticity of MSC from “murine” origin. At the cellular level, this decrease of MSC plasticity during evolution might participate in the weaker organ regenerative capacities of phylogenetically newer mammals such as human (46).

Recently, comparative experiments performed between human “fetal” versus “adult” MSC have been reported with respect to myotube formation (44). In contrast to fetal MSC but consistent with our data, these authors failed to differentiate adult MSC into myotubes. In addition, MSC obtained from human embryonic stem cells (47, 48), after treatment with conditioned medium from differentiating C2C12 cells can express MRFs (48). Thus, along the transition of MSC from an “embryo-fetal” to an “infant-adult” stage, there might be a lineage restriction that could explain differences in myogenic potential of MSC (49).

Therefore, *bona fide* myogenic determination/differentiation capacity of “adult” MSC from human remains to be clearly demonstrated.

Consequently, the next issue was to gain molecular insights into the *in vivo* contribution of hMADS cells and human dystrophin expression in mdx mice that we had reported after transplantation in the tibialis anterior muscle (12). Most likely, exogenous hMADS cells transplanted into regenerating mdx mouse muscle interacted preferentially with activated satellite cells (50, 51) whereas interactions with other cell types should have remained of low magnitude, suggesting that hMADS/myoblasts *in vitro* co-cultures were relevant in terms of cell fate recapitulation. Our results clearly demonstrate the fusion of hMADS cells with myoblasts independently of species origin. hMADS cells participate in myotube formation which takes place in the presence of murine or human fusing-myoblasts. In addition, hybrid pre-myotubes (3-5 nuclei per syncytium) suggest that hMADS cells have fused at the beginning of the differentiation process. Nevertheless, the percentage of hMADS-derived hybrid myotubes remains low. Two hypotheses could explain these results. Either, a minor sub-population of hMADS cells has the ability to fuse. Or, all hMADS cells share a weak fusogenic ability under our culture conditions. Some candidate genes reported to be involved in myoblast fusion which are expressed in many cell types, such as some integrins (52-55) and connexin-43 (56-59), are also expressed in hMADS cells (sup S5A, B and C). So far, we have checked the expression of the muscle specific cadherin (M-Cadherin) known to have a role in myoblast fusion (60, 61). M-Cadherin was observed in C2C12 cells but not in hMADS cells (sup S5D). Further investigations should be carried out for better defining fusion capacity of hMADS cells.

Various cells have been reported to be unable to fuse with myoblasts, whereas other cells are able to form hybrids (33, 62-67). Among all these latter cells a low yield of hybrid myotube formation could be noted, suggesting that myoblasts preferentially fused together rather than with other cells. However, fusion ability *per se* may not be sufficient to lead to muscle gene expression (68-71). In contrast to cells that fuse with myoblasts but do not express muscle genes or any genes, some cells after fusion disturb the myogenic program (63, 72). Expression of skeletal muscle genes encoded by the adult stem cell genome in hybrid myotubes is a key issue with respect to transplantation in humans. hMADS cells exhibit a broad myogenic conversion after fusion as shown by expression of mature δ -sarcoglycan and nestin proteins of human origin. Other muscle markers encoded by the hMADS genome were also induced, demonstrating that fusion does not impair a potent expression of muscle genes. In addition, any hMADS cell that fused with myoblasts followed a muscle fate, as revealed by the co-expression of GFP and human nestin protein in GFP-hMADS/C2C12 hybrid myotubes. No GFP-negative and human nestin-negative hybrid myotubes were detected containing hMADS-derived nuclei.

Dystrophin expression is a key issue when considering DMD disease cytotrapy. Our results show that dystrophin was indeed expressed, at odds with a previous report showing the absence of dystrophin expression in hybrid myotubes derived from human BM-MSD/DMD myoblasts (73). Indeed, dystrophin is a very late marker, and we were able to detect a clear linear staining only in highly differentiated myotubes (since day 10 in DM). Under five days in DM, no positive myotubes could be found in accordance with previous reports (29, 74). The discrepancy concerning the number of dystrophin and δ -sarcoglycan-positive myotubes found in hMADS/DMD co-cultures could be due to the late expression of dystrophin, compared to that of δ -sarcoglycan that is easily detectable in myotubes as early as day 4 under DM, whereas, dystrophin protein begins to be synthesized at day 5-6 (29). After this stage, it cannot be ruled out that dystrophin expression remains restricted to mature producing myo-nuclear domains (64). In contrast, δ -sarcoglycan synthesized earlier in an immature syncytium may have been targeted within all the myotubes due to vesicular trafficking (75, 76). The restoration of other dystrophin associated-proteins in hMADS/DMD hybrid myotubes is currently under investigation.

Finally, we have demonstrated that the contribution of hMADS cells to myotube formation is neither due to a determination/différentiation process, i.e. the de novo expression of muscle “key” transcription factors, nor to a “partial” commitment process, i.e. the expression of muscle markers independently of MRFs expression. Indeed, neither Pax7, MyoD, myf-5, or myogenin are expressed by hMADS cells in co-cultures. Rather, by using the marker nestin expressed at all stage of myogenesis, we found that hMADS myogenic conversion occurred only after fusion.

Forced acquisition of muscle identity was first reported by Blau et al. in amniocytes/myoblasts PEG-induced heterocaryons (77). In our model, heterocaryonic hybrids formed spontaneously without PEG. Moreover, in hybrid myotubes, myogenin protein encoded by C2C12 nuclei was detected in hMADS nuclei. This result strongly supports a direct transactivation of hMADS-encoded skeletal muscle genes by MRFs in myotubes, i.e. myogenin, MEF2D, Myf-5, MRF4 (Figure 10). Myogenin, is known to induce MRF4 gene (78), and it could also transactivate this gene in hMADS nuclei; this hMADS-encoded MRF4 could then participate in later stage of muscle conversion (under investigation).

Concomitantly, non-muscle loci could be repressed in hMADS nuclei after fusion with myoblasts, as it has been recently reported in human lymphocyte-B/C2C12 PEG-induced

hybrids (79). This possibility is currently difficult to confirm in our model because specific MSC markers have not yet been identified (80).

Interestingly, human nuclei antigen and β -galactosidase activity encoded by hMADS genes were also detected in mouse-derived nuclei in hybrids. This result suggests that other nuclear proteins encoded by hMADS genome and synthesized in the myotube can be targeted into myoblast-derived nuclei. Thus, the ability of hMADS cells to complement, for instance, lamin-A/C or emerin gene mutations in dystrophic myotubes could be conceivable (81). However, hMADS-encoded nuclear proteins could alter in an unknown manner the transcriptome of myoblast-derived nuclei within hybrids; this possibility is under investigation. Most likely, these putative transcriptional modifications should not disturb myotube/myofiber identity as shown by the numerous skeletal muscle genes expressed in hMADS-derived hybrids [such as titin (sup S2Ab), skeletal muscle myosin, desmin, α -sarcomeric actin, M-Cadherin and α -sarcoglycan proteins (not shown)].

In order to compensate a recessive disorder in regenerative medicine, only 1–10% of normal gene expression appears sufficient to correct for the phenotype at the cell level (82). At the organ level, on a dystrophic background, only 5-10% of restored myofibers seem sufficient to obtain a physiological capital gain (83-85). Thus, despite a low yield of fusion with myoblasts, transplantation of hMADS cells into skeletal muscle could be envisioned.

In conclusion, our results indicate that adipose tissue-derived mesenchymal stem cells could be an attractive tool for myo-cytherapy due to their fusogenic capacity and their efficient myogenic conversion.

Acknowledgments

We are grateful to Pr. Didier Trono and Drs. Claude Bagnis, Gillian Butler-Browne for providing respectively human DMD myoblast cell line, lentivectors and human primary myoblasts. Special thanks are due to Pr. Gherad Ailhaud and Drs. Laure-Emmanuelle Zaragosi, Florence Massiera, Nathalie Billon, Pascal Peraldi for critical review of the manuscript. We thank also other members of the “Stem Cell Differentiation” and of the “Biology of Adipose Tissue Development” laboratories for helpful comments and discussions. This work was supported by “Association Française contre les Myopathies (AFM)”, and Ali Massoudi was a recipient of an AFM fellowship.

References

1. Verfaillie, C. M. (2002) Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* 12, 502-508
2. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147
3. Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., and Sharkis, S. J. (2001) Multi-Organ, Multi-Lineage Engraftment by a Single Bone Marrow-Derived Stem Cell. *Cell* 105, 369-377
4. Jiang, Y., Vaessen, B., Lenvik, T., Blackstad, M., Reyes, M., and Verfaillie, C. M. (2002) Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 30, 896-904
5. Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A., and Verfaillie, C. M. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49
6. Fraser, J. K., Wulur, I., Alfonso, Z., and Hedrick, M. H. (2006) Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 24, 150-154
7. Guilak, F., Lott, K. E., Awad, H. A., Cao, Q., Hicok, K. C., Fermor, B., and Gimble, J. M. (2006) Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol* 206, 229-237
8. Dicker, A., Le Blanc, K., Astrom, G., van Harmelen, V., Gothstrom, C., Blomqvist, L., Arner, P., and Ryden, M. (2005) Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res* 308, 283-290
9. Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., and Hedrick, M. H. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13, 4279-4295
10. Rodriguez, A. M., Elabd, C., Amri, E. Z., Ailhaud, G., and Dani, C. (2005) The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 87, 125-128
11. Zaragosi, L. E., Ailhaud, G., and Dani, C. (2006) Autocrine FGF2 signaling is critical for self-renewal of Human Multipotent Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells*
12. Rodriguez, A. M., Pisani, D., Dechesne, C. A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J. Y., Wdziekonski, B., Villageois, A., Bagnis, C., Breittmayer, J. P., Groux, H., Ailhaud, G., and Dani, C. (2005) Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* 201, 1397-1405
13. Rodriguez, A. M., Elabd, C., Delteil, F., Astier, J., Vernochet, C., Saint-Marc, P., Guesnet, J., Guezennec, A., Amri, E. Z., Dani, C., and Ailhaud, G. (2004) Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 255-263
14. Matsumura, K., Tome, F. M., Ionasescu, V., Ervasti, J. M., Anderson, R. D., Romero, N. B., Simon, D., Recan, D., Kaplan, J. C., Fardeau, M., and et al.

- (1993) Deficiency of dystrophin-associated proteins in Duchenne muscular dystrophy patients lacking COOH-terminal domains of dystrophin. *J Clin Invest* 92, 866-871
15. Ohlendieck, K., Matsumura, K., Ionasescu, V. V., Towbin, J. A., Bosch, E. P., Weinstein, S. L., Sernett, S. W., and Campbell, K. P. (1993) Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma. *Neurology* 43, 795-800
 16. Cooper, B. J. (1989) Animal models of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Br Med Bull* 45, 703-718
 17. De Bari, C., Dell'Accio, F., Vanlauwe, J., Eyckmans, J., Khan, I. M., Archer, C. W., Jones, E. A., McGonagle, D., Mitsiadis, T. A., Pitzalis, C., and Luyten, F. P. (2006) Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum* 54, 1209-1221
 18. Bacou, F., el Andaloussi, R. B., Daussin, P. A., Micallef, J. P., Levin, J. M., Chammas, M., Casteilla, L., Reyne, Y., and Nougues, J. (2004) Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal muscle. *Cell Transplant* 13, 103-111
 19. Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., Meyer, E. M., Morel, L., Petersen, B. E., and Scott, E. W. (2002) Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416, 542-545
 20. Ying, Q. L., Nichols, J., Evans, E. P., and Smith, A. G. (2002) Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416, 545-548
 21. Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J. M., Fike, J. R., Lee, H. O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S. J., and Alvarez-Buylla, A. (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425, 968-973
 22. Kajstura, J., Rota, M., Whang, B., Cascapera, S., Hosoda, T., Bearzi, C., Nuszynska, D., Kasahara, H., Zias, E., Bonafe, M., Nadal-Ginard, B., Torella, D., Nascimbene, A., Quaini, F., Urbanek, K., Leri, A., and Anversa, P. (2005) Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res* 96, 127-137
 23. Harris, R. G., Herzog, E. L., Bruscia, E. M., Grove, J. E., Van Arnem, J. S., and Krause, D. S. (2004) Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science* 305, 90-93
 24. Ianus, A., Holz, G. G., Theise, N. D., and Hussain, M. A. (2003) In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 111, 843-850
 25. Clark, K. A., McElhinny, A. S., Beckerle, M. C., and Gregorio, C. C. (2002) Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 637-706
 26. Pownall, M. E., Gustafsson, M. K., and Emerson, C. P., Jr. (2002) Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 747-783
 27. Cudre-Mauroux, C., Occhiodoro, T., Konig, S., Salmon, P., Bernheim, L., and Trono, D. (2003) Lentivector-mediated transfer of Bmi-1 and telomerase in muscle satellite cells yields a duchenne myoblast cell line with long-term genotypic and phenotypic stability. *Hum Gene Ther* 14, 1525-1533

28. Rosenblatt, J. D., Lunt, A. I., Parry, D. J., and Partridge, T. A. (1995) Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* 31, 773-779
29. Cooper, S. T., Maxwell, A. L., Kizana, E., Ghoddusi, M., Hardeman, E. C., Alexander, I. E., Allen, D. G., and North, K. N. (2004) C2C12 co-culture on a fibroblast substratum enables sustained survival of contractile, highly differentiated myotubes with peripheral nuclei and adult fast myosin expression. *Cell Motil Cytoskeleton* 58, 200-211
30. Ueda, H., Ueda, K., Baba, T., and Ohno, S. (2001) delta- and gamma-Sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *J Histochem Cytochem* 49, 529-538
31. Estrada, F. J., Mornet, D., Rosas-Vargas, H., Angulo, A., Hernandez, M., Becker, V., Rendon, A., Ramos-Kuri, M., and Coral-Vazquez, R. M. (2006) A novel isoform of delta-sarcoglycan is localized at the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 340, 865-871
32. Goldring, K., Jones, G. E., Thiagarajah, R., and Watt, D. J. (2002) The effect of galectin-1 on the differentiation of fibroblasts and myoblasts in vitro. *J Cell Sci* 115, 355-366
33. Ojima, K., Uezumi, A., Miyoshi, H., Masuda, S., Morita, Y., Fukase, A., Hattori, A., Nakauchi, H., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2004) Mac-1(low) early myeloid cells in the bone marrow-derived SP fraction migrate into injured skeletal muscle and participate in muscle regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 321, 1050-1061
34. Carlsson, L., Li, Z., Paulin, D., and Thornell, L. E. (1999) Nestin is expressed during development and in myotendinous and neuromuscular junctions in wild type and desmin knock-out mice. *Exp Cell Res* 251, 213-223
35. Vaittinen, S., Lukka, R., Sahlgren, C., Hurme, T., Rantanen, J., Lendahl, U., Eriksson, J. E., and Kalimo, H. (2001) The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 588-597
36. Kachinsky, A. M., Dominov, J. A., and Miller, J. B. (1994) Myogenesis and the intermediate filament protein, nestin. *Dev Biol* 165, 216-228
37. Sjoberg, G., Jiang, W. Q., Ringertz, N. R., Lendahl, U., and Sejersen, T. (1994) Colocalization of nestin and vimentin/desmin in skeletal muscle cells demonstrated by three-dimensional fluorescence digital imaging microscopy. *Exp Cell Res* 214, 447-458
38. Di Rocco, G., Iachininoto, M. G., Tritarelli, A., Straino, S., Zacheo, A., Germani, A., Crea, F., and Capogrossi, M. C. (2006) Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci* 119, 2945-2952
39. Belema Bedada, F., Technau, A., Ebel, H., Schulze, M., and Braun, T. (2005) Activation of myogenic differentiation pathways in adult bone marrow-derived stem cells. *Mol Cell Biol* 25, 9509-9519
40. Schulze, M., Belema-Bedada, F., Technau, A., and Braun, T. (2005) Mesenchymal stem cells are recruited to striated muscle by NFAT/IL-4-mediated cell fusion. *Genes Dev* 19, 1787-1798
41. Klein, P. S., and Melton, D. A. (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8455-8459
42. Hedgepeth, C. M., Conrad, L. J., Zhang, J., Huang, H. C., Lee, V. M., and Klein, P. S. (1997) Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action. *Dev Biol* 185, 82-91

43. Meijer, L., Skaltsounis, A. L., Magiatis, P., Polychronopoulos, P., Knockaert, M., Leost, M., Ryan, X. P., Vonica, C. A., Brivanlou, A., Dajani, R., Crovace, C., Tarricone, C., Musacchio, A., Roe, S. M., Pearl, L., and Greengard, P. (2003) GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem Biol* 10, 1255-1266
44. Chan, J., O'Donoghue, K., Gavina, M., Torrente, Y., Kennea, N., Mehmet, H., Stewart, H., Watt, D. J., Morgan, J. E., and Fisk, N. M. (2006) Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration. *Stem Cells*
45. Balana, B., Nicoletti, C., Zahanich, I., Graf, E. M., Christ, T., Boxberger, S., and Ravens, U. (2006) 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *Cell Res* 16, 949-960
46. Borisov, A. B. (1999) Regeneration of skeletal and cardiac muscle in mammals: do nonprimate models resemble human pathology? *Wound Repair Regen* 7, 26-35
47. Olivier, E. N., Rybicki, A. C., and Bouhassira, E. E. (2006) Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Into bipotent Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*
48. Barberi, T., Willis, L. M., Socci, N. D., and Studer, L. (2005) Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med* 2, e161
49. Guillot, P. V., Gotherstrom, C., Chan, J., Kurata, H., and Fisk, N. M. (2006) Human first trimester fetal mesenchymal stem cells (MSC) express pluripotency markers, grow faster, and have longer telomeres compared to adult MSC. *Stem Cells*
50. Collins, C. A., Olsen, I., Zammit, P. S., Heslop, L., Petrie, A., Partridge, T. A., and Morgan, J. E. (2005) Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 122, 289-301
51. Montarras, D., Morgan, J., Collins, C., Relaix, F., Zaffran, S., Cumano, A., Partridge, T., and Buckingham, M. (2005) Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* 309, 2064-2067
52. Schwander, M., Leu, M., Stumm, M., Dorchies, O. M., Ruegg, U. T., Schittny, J., and Muller, U. (2003) Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev Cell* 4, 673-685
53. Brzoska, E., Bello, V., Darribere, T., and Moraczewski, J. (2006) Integrin alpha3 subunit participates in myoblast adhesion and fusion in vitro. *Differentiation* 74, 105-118
54. Lafuste, P., Sonnet, C., Chazaud, B., Dreyfus, P. A., Gherardi, R. K., Wewer, U. M., and Authier, F. J. (2005) ADAM12 and alpha9beta1 integrin are instrumental in human myogenic cell differentiation. *Mol Biol Cell* 16, 861-870
55. Cachaco, A. S., Pereira, C. S., Pardal, R. G., Bajanca, F., and Thorsteinsdottir, S. (2005) Integrin repertoire on myogenic cells changes during the course of primary myogenesis in the mouse. *Dev Dyn* 232, 1069-1078
56. Proulx, A., Merrifield, P. A., and Naus, C. C. (1997) Blocking gap junctional intercellular communication in myoblasts inhibits myogenin and MRF4 expression. *Dev Genet* 20, 133-144
57. Gorbe, A., Becker, D. L., Dux, L., Stelkovich, E., Krenacs, L., Bagdi, E., and Krenacs, T. (2005) Transient upregulation of connexin43 gap junctions and

- synchronized cell cycle control precede myoblast fusion in regenerating skeletal muscle in vivo. *Histochem Cell Biol* 123, 573-583
58. Araya, R., Eckardt, D., Riquelme, M. A., Willecke, K., and Saez, J. C. (2003) Presence and importance of connexin43 during myogenesis. *Cell Commun Adhes* 10, 451-456
 59. Gorbe, A., Becker, D. L., Dux, L., Krenacs, L., and Krenacs, T. (2006) In differentiating pre-fusion myoblasts connexin43 gap junction coupling is upregulated before myoblast alignment then reduced in post-mitotic cells. *Histochem Cell Biol* 125, 705-716
 60. Hollnagel, A., Grund, C., Franke, W. W., and Arnold, H. H. (2002) The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration. *Mol Cell Biol* 22, 4760-4770
 61. Kaufmann, U., Kirsch, J., Irintchev, A., Wernig, A., and Starzinski-Powitz, A. (1999) The M-cadherin catenin complex interacts with microtubules in skeletal muscle cells: implications for the fusion of myoblasts. *J Cell Sci* 112 (Pt 1), 55-68
 62. Shi, D., Reinecke, H., Murry, C. E., and Torok-Storb, B. (2004) Myogenic fusion of human bone marrow stromal cells, but not hematopoietic cells. *Blood* 104, 290-294
 63. Sasao, N., Hirayama, E., and Kim, J. (2004) Formation and characterization of spontaneously formed heterokaryons between quail myoblasts and 3T3-L1 preadipocytes: correlation between differential plasticity and degree of differentiation. *Eur J Cell Biol* 83, 35-45
 64. Chretien, F., Dreyfus, P. A., Christov, C., Caramelle, P., Lagrange, J. L., Chazaud, B., and Gherardi, R. K. (2005) In vivo fusion of circulating fluorescent cells with dystrophin-deficient myofibers results in extensive sarcoplasmic fluorescence expression but limited dystrophin sarcolemmal expression. *Am J Pathol* 166, 1741-1748
 65. Salvatori, G., Lattanzi, L., Coletta, M., Aguanno, S., Vivarelli, E., Kelly, R., Ferrari, G., Harris, A. J., Mavilio, F., Molinaro, M., and et al. (1995) Myogenic conversion of mammalian fibroblasts induced by differentiating muscle cells. *J Cell Sci* 108 (Pt 8), 2733-2739
 66. Rietze, R. L., Valcanis, H., Brooker, G. F., Thomas, T., Voss, A. K., and Bartlett, P. F. (2001) Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* 412, 736-739
 67. Galli, R., Borello, U., Gritti, A., Minasi, M. G., Bjornson, C., Coletta, M., Mora, M., De Angelis, M. G., Fiocco, R., Cossu, G., and Vescovi, A. L. (2000) Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci* 3, 986-991
 68. Lapidos, K. A., Chen, Y. E., Earley, J. U., Heydemann, A., Huber, J. M., Chien, M., Ma, A., and McNally, E. M. (2004) Transplanted hematopoietic stem cells demonstrate impaired sarcoglycan expression after engraftment into cardiac and skeletal muscle. *J Clin Invest* 114, 1577-1585
 69. Welikson, R. E., Kaestner, S., Reinecke, H., and Hauschka, S. D. (2006) Human umbilical vein endothelial cells fuse with cardiomyocytes but do not activate cardiac gene expression. *J Mol Cell Cardiol* 40, 520-528
 70. Wernig, G., Janzen, V., Schafer, R., Zweyer, M., Knauf, U., Hoegemeier, O., Mundegar, R. R., Garbe, S., Stier, S., Franz, T., Wernig, M., and Wernig, A. (2005) The vast majority of bone-marrow-derived cells integrated into mdx

- muscle fibers are silent despite long-term engraftment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11852-11857
71. Dell'Agnola, C., Wang, Z., Storb, R., Tapscott, S. J., Kuhr, C. S., Hauschka, S. D., Lee, R. S., Sale, G. E., Zellmer, E., Gisburne, S., Bogan, J., Kornegay, J. N., Cooper, B. J., Gooley, T. A., and Little, M. T. (2004) Hematopoietic stem cell transplantation does not restore dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs. *Blood* 104, 4311-4318
 72. Hirayama, E., Udaka, Y., Kawai, T., and Kim, J. (2001) Characterization of heterokaryons between skeletal myoblasts and somatic cells formed by fusion with HVJ (Sendai virus); effects on myogenic differentiation. *Cell Struct Funct* 26, 37-47
 73. Goncalves, M. A., de Vries, A. A., Holkers, M., van de Watering, M. J., van der Velde, I., van Nierop, G. P., Valerio, D., and Knaan-Shanzer, S. (2006) Human mesenchymal stem cells ectopically expressing full-length dystrophin can complement Duchenne muscular dystrophy myotubes by cell fusion. *Hum Mol Genet* 15, 213-221
 74. Radojevic, V., Lin, S., and Burgunder, J. M. (2000) Differential expression of dystrophin, utrophin, and dystrophin-associated proteins in human muscle culture. *Cell Tissue Res* 300, 447-457
 75. Ono, T., Ono, K., Mizukawa, K., Ohta, T., Tsuchiya, T., and Tsuda, M. (1994) Limited diffusibility of gene products directed by a single nucleus in the cytoplasm of multinucleated myofibres. *FEBS Lett* 337, 18-22
 76. Rosser, B. W. C., and Bandman, E. (2003) Heterogeneity of protein expression within muscle fibers. *J. Anim Sci.* 81, E94-101
 77. Blau, H. M., Chiu, C. P., and Webster, C. (1983) Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell* 32, 1171-1180
 78. Naidu, P. S., Ludolph, D. C., To, R. Q., Hinterberger, T. J., and Konieczny, S. F. (1995) Myogenin and MEF2 function synergistically to activate the MRF4 promoter during myogenesis. *Mol Cell Biol* 15, 2707-2718
 79. Terranova, R., Pereira, C. F., Du Roure, C., Merkschlager, M., and Fisher, A. G. (2006) Acquisition and extinction of gene expression programs are separable events in heterokaryon reprogramming. *J Cell Sci* 119, 2065-2072
 80. Beyer Nardi, N., and da Silva Meirelles, L. (2006) Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*, 249-282
 81. Morris, G. E. (2001) The role of the nuclear envelope in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Trends Mol Med* 7, 572-577
 82. O'Connor, T. P., and Crystal, R. G. (2006) Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nat Rev Genet* 7, 261-276
 83. Sampaolesi, M., Torrente, Y., Innocenzi, A., Tonlorenzi, R., D'Antona, G., Pellegrino, M. A., Barresi, R., Bresolin, N., De Angelis, M. G., Campbell, K. P., Bottinelli, R., and Cossu, G. (2003) Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* 301, 487-492
 84. Zhang, G., Ludtke, J. J., Thioudellet, C., Kleinpeter, P., Antoniou, M., Herweijer, H., Braun, S., and Wolff, J. A. (2004) Intraarterial delivery of naked plasmid DNA expressing full-length mouse dystrophin in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* 15, 770-782
 85. Matziolis, G., Winkler, T., Schaser, K., Wiemann, M., Krockner, D., Tuischer, J., Perka, C., and Duda, G. N. (2006) Autologous bone marrow-derived cells

enhance muscle strength following skeletal muscle crush injury in rats. *Tissue Eng* 12, 361-367

Figure legends

Figure 1: hMADS cells contribute to myotube formation

hMADS cells were co-cultured with primary mouse mdx satellite cells (a). Cultures were stained after myotube formation with a specific anti-human nuclei antibody. HRP-coupled secondary antibody was used for indirect detection. Human nuclei antigen (arrows) was clearly detected in human-mouse hybrid myotubes (a'). nlsLacZ-hMADS cells were co-cultured with murine C2C12 myoblasts (b) or with human DMD myoblasts (c). After myotube formation, at day 3 in DM, cultures were stained with X-gal to detect β -galactosidase activity. 1-3 % hybrid myotubes were detected. In each hybrid myotube, human nuclei represent approximately 1/10th of total nuclei. Only big blue nuclei were scored as human (blue arrow).

hMADS-derived nuclei in newly formed hybrid myotubes presented a big and a more intense staining (blue arrows). Note also that some myoblasts derived-nuclei are X-gal or human nuclei antigen positive but with a lower intensity (black arrows).

Figure 2: Human muscle gene expression during myogenesis in hMADS/C2C12 co-culture

hMADS and C2C12 myoblasts were co-cultured, and analysed by RT-PCR for expression of human muscle differentiation markers (2A) and MRFs (2B) at different time-points (at confluence 0, or at 1, 2 and 4 days in DM). Primers were designed to specifically amplify human cDNAs. All muscle differentiation markers tested were induced during differentiation suggesting a functional conversion of hMADS cells into the myogenic lineage. Muscle regulatory factors (MRFs) were not expressed at any time-points by hMADS cells in co-culture. Expression of mouse HPRT and human β -actin, ubiquitously and constitutively expressed genes, remained constant. cDNA from human and mouse myogenic cells were used as control.

Figure 3: δ -sarcoglycan protein expression in highly mature hMADS/C2C12 hybrid myotubes

After 14 days in DM, mature GFP-hMADS/C2C12 hybrid myotubes were stained with an anti-human δ -sarcoglycan antibody. AlexaFluor596-coupled secondary antibody was used for indirect detection. Sub-cellular expression was analysed by confocal fluorescence microscopy. δ -sarcoglycan showed both striated-like sarcoplasmic reticulum (blue arrow, e) and sarcolemmal (yellow arrow, e) stainings.

Figure 4: Dystrophin and δ -sarcoglycan protein expression in hMADS/DMD hybrid myotubes

hMADS cells/DMD myoblasts co-cultures or DMD myoblasts cultures were stained after 10 days in DM with anti-dystrophin (a, b) or anti- δ -sarcoglycan (c, d) antibodies. AlexaFluor596-coupled secondary antibody was used for indirect detection. Some myotubes in co-culture showed a clear dystrophin staining with a linear shape (a). The dystrophin-staining was always associated with poly-nuclear zones (a, red arrow) indicating its myotube-associated expression. Although number of positive myotubes was low, it correlated with the yield of hMADS cell myotube contribution. As expected, myotubes derived from DMD myoblasts presented no dystrophin staining (b).

hMADS/DMD co-cultures showed a significant higher number of δ -sarcoglycan positive myotubes (c), with a more intense staining compared to control DMD myotubes (d, yellow arrow). Control co-culture experiments without primary antibody showed no immunoreaction (not shown).

Figure 5: MRF expression in GFP-hMADS/Myoblasts co-cultures

GFP-hMADS cells and C2C12 or DMD myoblasts were co-cultured, and expression of the MRFs Pax7, MyoD and myogenin was analyzed by immunofluorescence at different time-points (proliferation, confluence or 1, 2 and 3 days in DM). To amplify signal of low expressing cells, mouse monoclonal antibodies were detected by biotin-coupled secondary antibody, then revealed by AlexaFluor596-coupled streptavidin. Results are summarized in (5A). At each time-point, mono-nucleated GFP-hMADS cells (green) were negative for any of the MRF tested, whereas they were detected at different time-points in myoblasts (red). “-” for negative cells, and “+” for positive cells. Line 1 = GFP-hMADS/C2C12; line 2 = GFP-hMADS/DMD. Note that the “+” are not correlated with the percentage of expressing cells, nor with the intensity of stainings. For example, Pax7 was detected in numerous DMD cells at confluence, but the percentage of Pax7-positive DMD cells was strongly decreased at day 3 in DM.

Immunofluorescence micrographs of co-cultures at day 2 in DM are presented in (5B) as a representative illustration of (5A). Left column (a, c, e) are GFP-hMADS/DMD co-cultures, and right column (b, d, f), GFP-hMADS/C2C12 co-cultures. As indicated in (f’), a magnification of (f), GFP-hMADS cell nuclei (yellow arrow) were negative for the red staining of myogenin (red arrow). This absence of co-expression was also observed for Pax7 (a-b) and MyoD (c-d) antigens.

Figure 6: Myogenin expression in GFP-hMADS/C2C12 hybrid myotubes

GFP-hMADS/C2C12 co-cultures were assessed for MRF expression by immunofluorescence. The anti-myogenin antibody used in this assay recognized mammal myogenin. In GFP-hMADS/C2C12 hybrid myotubes (a, green), myogenin (b, red) was not only detected as expected in C2C12-derived nuclei (c, granoulous small blue nuclei) but also in hMADS-derived nuclei (b, yellow arrow) but with a less intense staining. hMADS nuclei were clearly identified based on Hoechst staining (c, smooth big blue nucleus).

Figure 7: Human nestin expression in hMADS/C2C12 co-cultures

GFP-hMADS cells and C2C12 myoblasts were co-cultured, and expression of nestin protein was assessed at different time-points (9A). Cultures were stained with an anti-human nestin antibody. To amplify signal of low expressing cells, mouse monoclonal anti-human nestin antibody was detected by biotin-coupled secondary antibody, then revealed by AlexaFluor596-coupled streptavidin. No nestin-positive cells were detected before myotube formation (a, b, c). In contrast, as soon as myotubes appeared (day 2 in DM), clear nestin-positive myotubes were detected (d and e). A magnification of (d) with dissociated channels is presented, yellow arrows indicate hMADS nuclei, and the green arrow indicates a nestin-negative unfused GFP-hMADS cell. All nestin-positive myotubes were GFP positives, and vice versa, suggesting that each hMADS cell fused with myoblasts has been converted into muscle lineage. After 12 days in DM, expression of human nestin was tested in hMADS/C21C12 co-cultures (9B). Human nestin-positive myotubes were clearly detected. Nestin protein staining (red) was more intense at the myotube edges (yellow arrows) suggesting physiological expression and sub-cellular targeting. In attempt to show a whole nestin-positive myotube at high magnification, 3 independent microphotographs were taken (the asterisks of identical color indicate the same position in each image). Scale bar = 100µm.

Figure 8: Model of hMADS cell myogenic conversion

Some hMADS cells fuse with myocytes. These myogenic cells express the MRF myogenin and will differentiate into myotubes. In contrast, Pax7 expressing-myoblasts do not differentiate, and will form the quiescent reserve myogenic precursor pool. After fusion, MRFs of the myotube encoded by myocytes-derived nuclei such as myogenin are imported into hMADS nucleus. This event is followed by a wide transactivation of skeletal muscle genes. Inversely, hMADS encoded-proteins containing a nuclear localisation signal (nls) are also imported into

myocytes-derived nuclei. hMADS cell proteome does not disturb muscle identity, probably due to a dominance of the myotube proteome leading to the formation of a functional mature myotube expressing late skeletal muscle markers such as dystrophin.

Supplemental data legends

Supplemental figure S2: hMADS and C2C12 nuclei detection

S2A: As shown in this magnification (a), after Hoechst dye treatment, hMADS nucleus presented a smooth and less intense staining, in contrast with the granolous (yellow arrows) and high intense mouse nucleus. (a') is a monochrome negative picture of (a) for a better visual appreciation. This difference pattern of Hoechst staining was due to a higher content of mouse genome in AT base pairs (77). Note also the discrepancy of size between hMADS nucleus (average area 300 μm^2) and myoblast nucleus (average area 135 μm^2). This micrograph (a) was taken from co-culture at 1 day in DM, i.e. before myotube formation. This size difference was also noted in newly formed hybrid myotubes (i.e. after 2 days in DM). In more mature myotubes (4-6 days in DM) as shown by the striated-staining of titin protein (in red), hMADS-derived nuclei (green arrow) had the same apparent size and thin shape than myoblasts-derived nuclei (yellow arrows) (average area 110 μm^2) (b).

S2B: After myotube formation at day 3 in DM, GFP-hMADS cells/C2C12 co-cultures were stained with an anti-human nuclei antibody. AlexaFluor596-coupled secondary antibody was used for indirect detection. hMADS/C2C12 hybrid myotubes were identified on the basis of GFP green fluorescence (a). Note that the intensity of GFP fluorescence in hybrid myotubes is lower compared in GFP-hMADS cells, this may be due to a dilution of the GFP protein within syncytium. hMADS derived nuclei (pink arrows) were distinguished of mouse (yellow arrows) on the basis of Hoechst staining (b). Human nuclei antigen was clearly detected in both hMADS and C2C12 derived nuclei, with a higher intensity in the former (c).

Supplemental figure S3: Desmin expression in hMADS/C2C12 co-cultures

GFP-hMADS cells and C2C12 myoblasts were co-cultured, and expression of desmin protein was assessed at different time points. Cultures were stained with a mouse monoclonal anti-desmin antibody. To amplify signal of low expressing cells, primary antibody were detected by biotin-coupled polyclonal goat anti-mouse IgGs, then revealed by streptavidin coupled AlexaFluor596. No desmin positive hMADS cells were detected, in contrast, C2C12 were desmin positive at any time point assessed. The picture presents the desmin staining of co-

culture at day 1 in DM as a representative illustration (yellow arrow indicate GFP-hMADS cells; red arrow indicate C2C12 cells).

Supplemental figure S4: Nestin expression in DMD myogenic cells

Human DMD myoblasts were assessed for nestin protein expression by immunofluorescence at different time points (proliferation, confluence 1, 2, 3, 4 and 5 day in DM). Anti-human nestin antibody was used, followed by an AlexaFluor596 coupled-secondary antibody for indirect detection. Results showed a permanent expression of nestin in human muscle cells. After differentiation, nestin was detected in both unfused myoblasts and in myotubes. As shown in the magnification of a myotube at day 5 in DM, nestin protein located preferentially at edges (yellow arrows). Micrographs are the merge of red (nestin) and blue (Hoechst) channels.

Supplemental figure S5: Fusogenic marker expression in hMADS/C2C12 co-cultures

GFP-hMADS/C21C12 co-cultures were prepared, and after 1 day in DM, cultures were stained with anti-human α 5-integrin (A), anti-human β 1-integrin (B), anti-Connexin43 (C) or anti-M-Cadherin (D) antibodies. AlexaFluor596 coupled-secondary antibody was used for indirect detection. Results indicated that virtually all GFP-hMADS cells expressed α 5-integrin, β 1-integrin and Connexin43. In contrast, no GFP-hMADS cells were positive for the M-Cadherin.

Figure 1

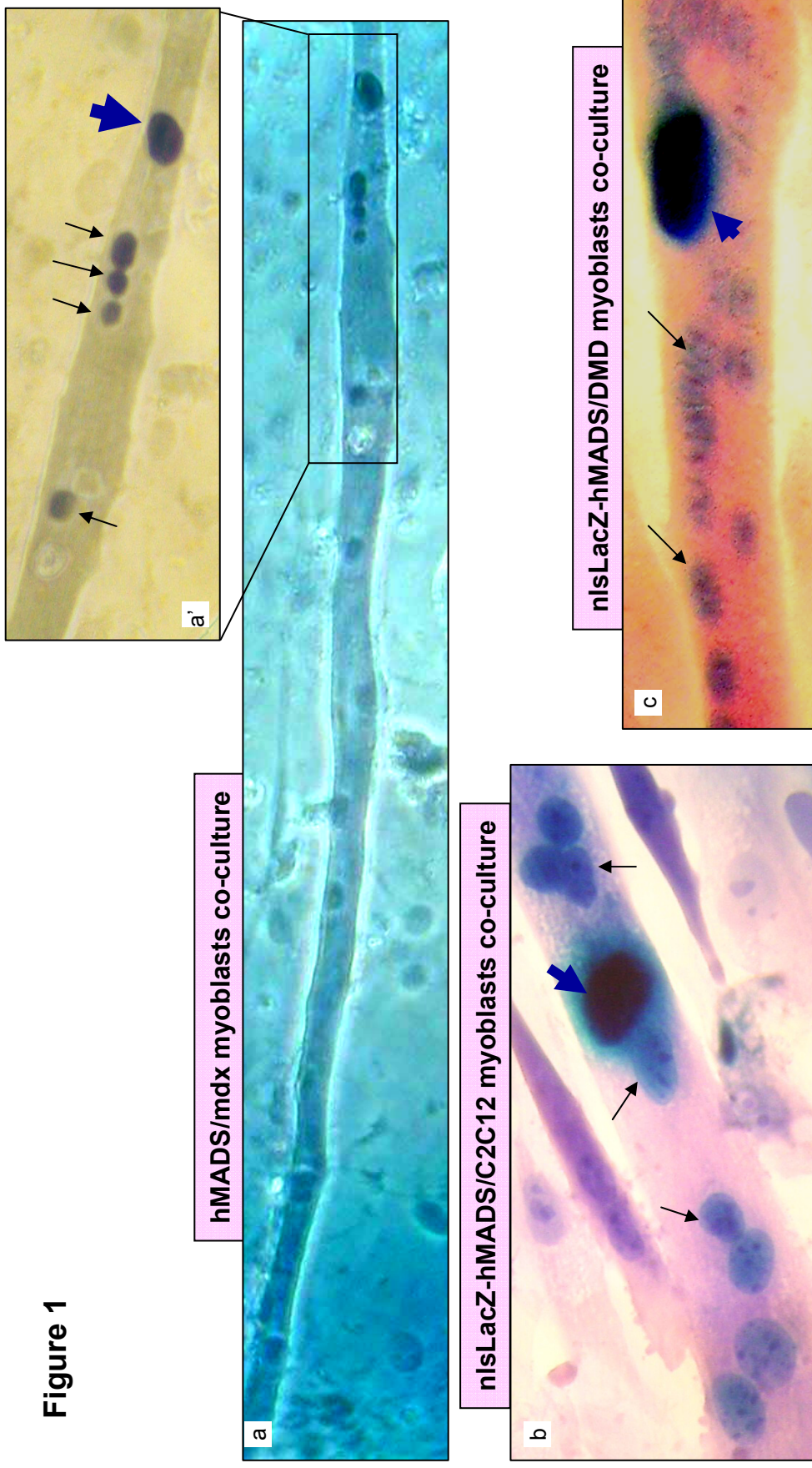


Figure 2

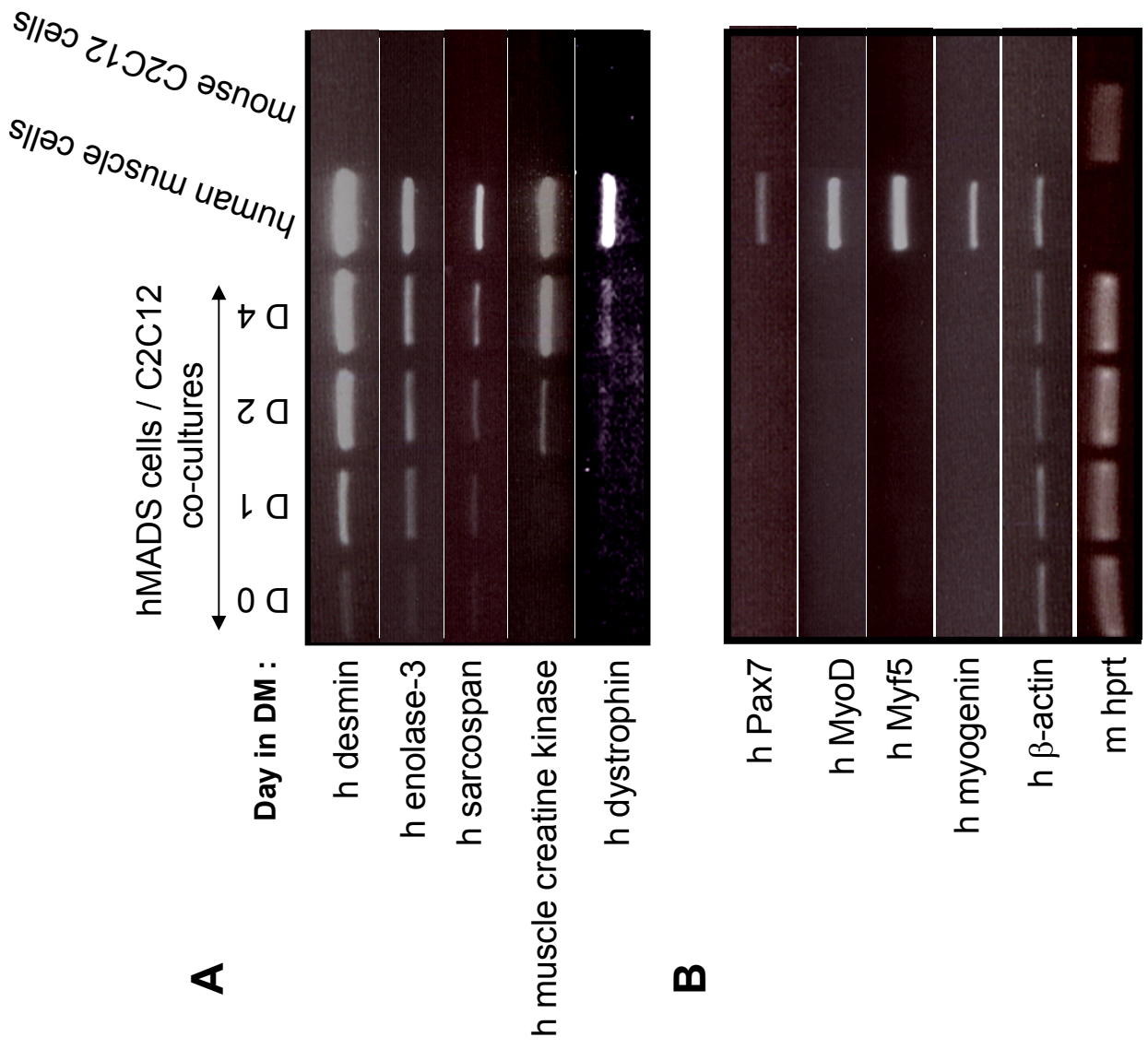


Figure 3

hMADS/C2C12 myoblasts co-culture

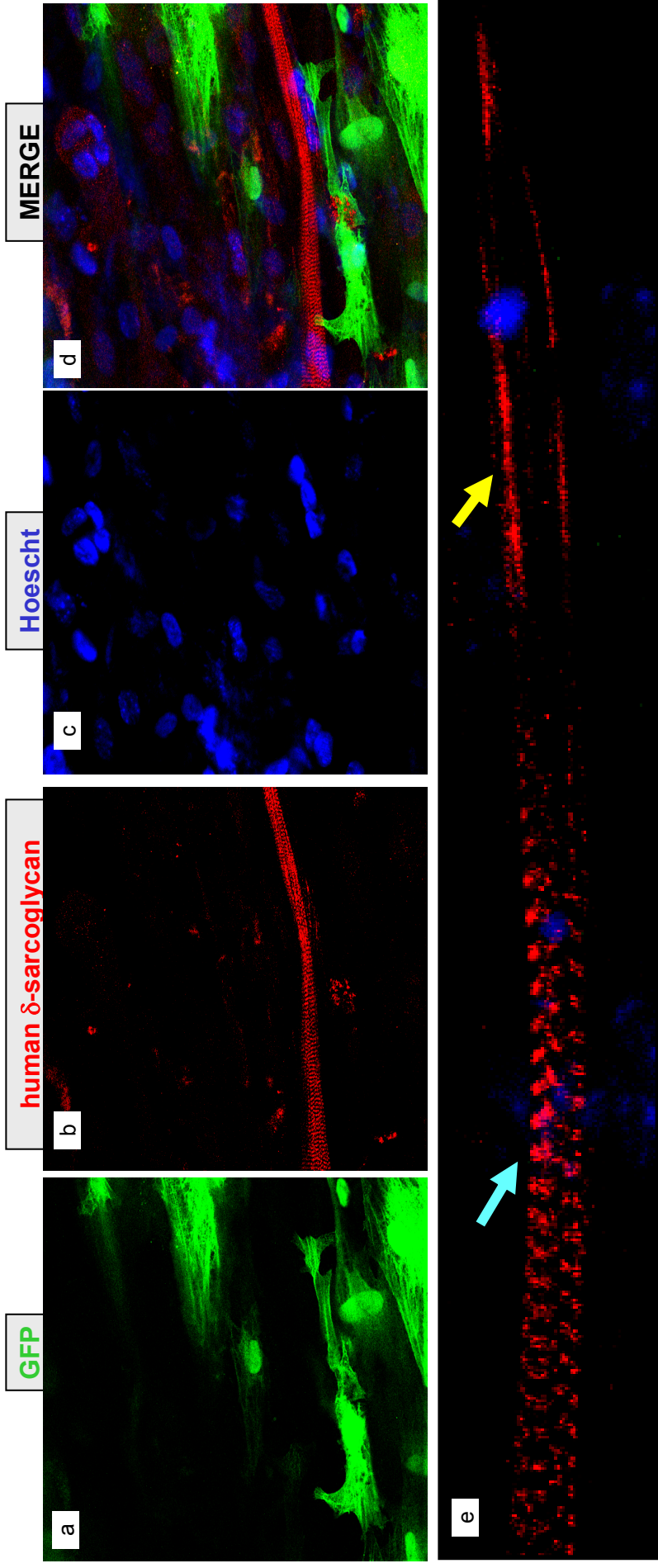


Figure 4

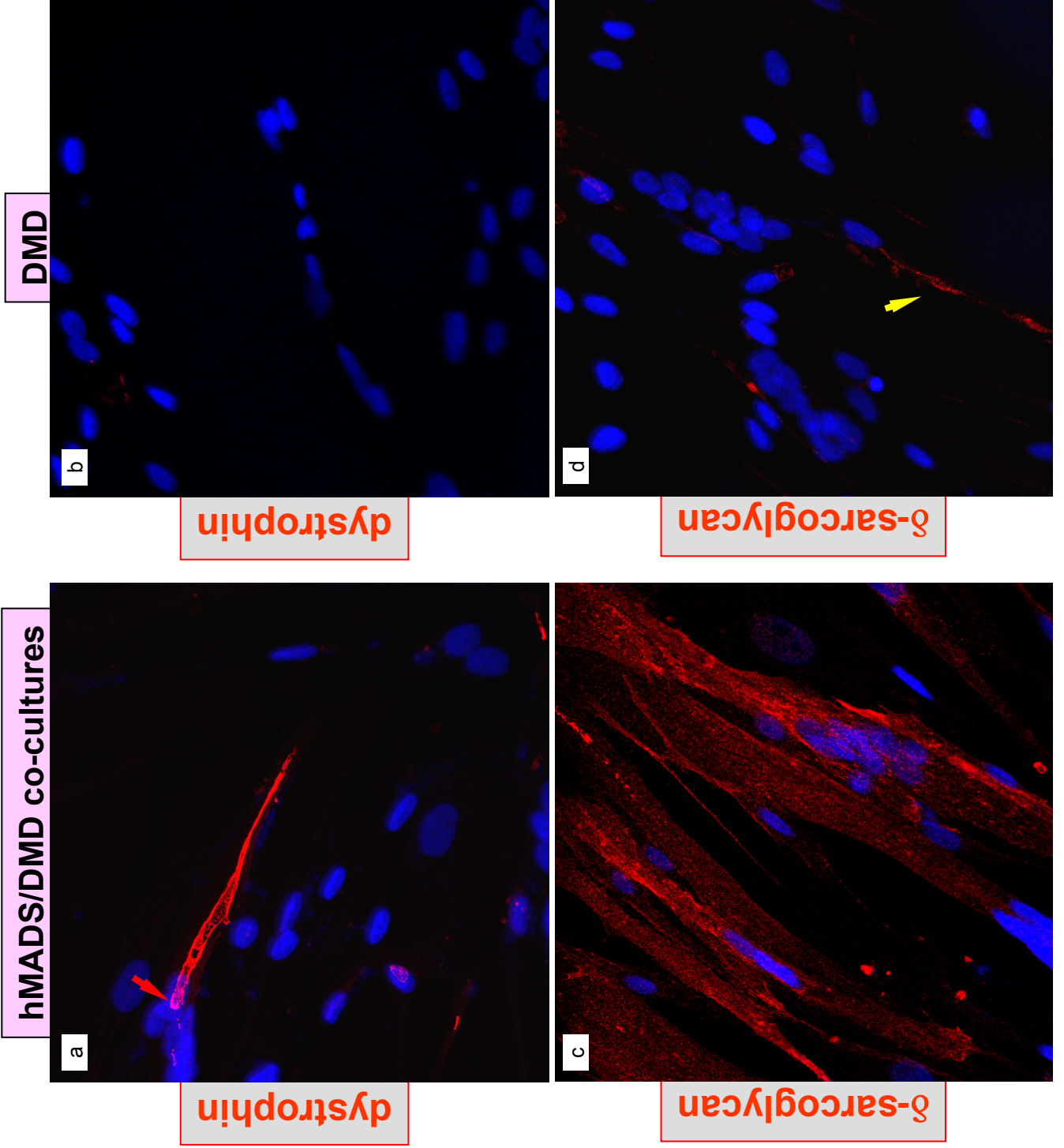


Figure 5A

Stages	Antibodies	proliferation	confluence	Differentiation		
				D1	D2	D3
1	Pax7	/ -	/ -	/ +	/ +	/ +
		/ -	/ -	/ +	/ +	/ +
1	hMyoD	/ -	/ -	/ -	/ -	/ -
		/ -	/ +	/ +	/ +	/ +
1	myogenin	/ -	/ +	/ +	/ +	/ +
		/ -	/ -	/ -	/ +	/ +

■ : negative GFP-hMADS cells; ■ : negative myoblasts; + : positive myoblasts

1 : GFP-hMADS/C2C12 cells co-cultures
2 : GFP-hMADS/DMD cells co-cultures

Figure 5B

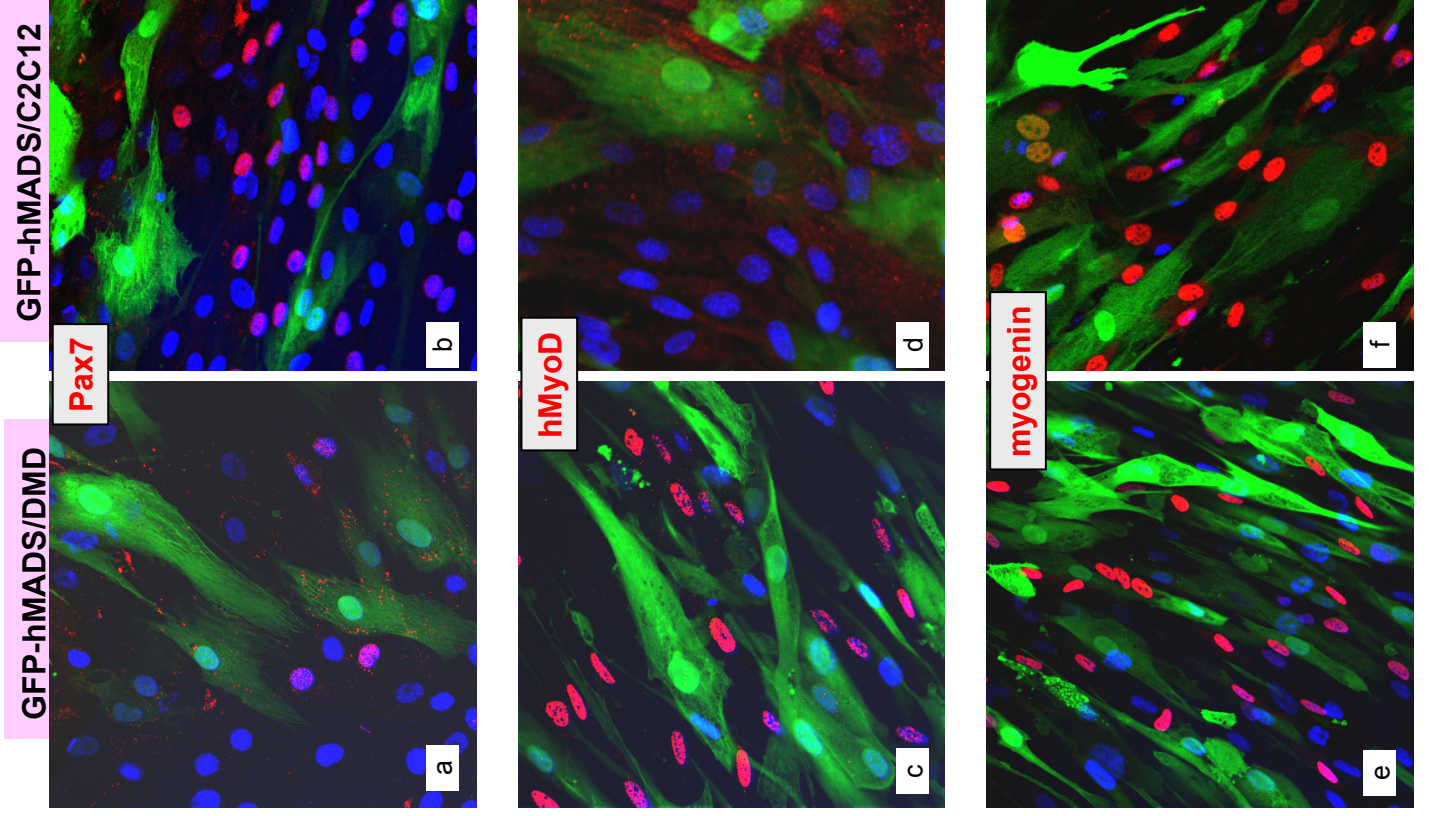


Figure 6

GFP-hMADS/C2C12 co-culture

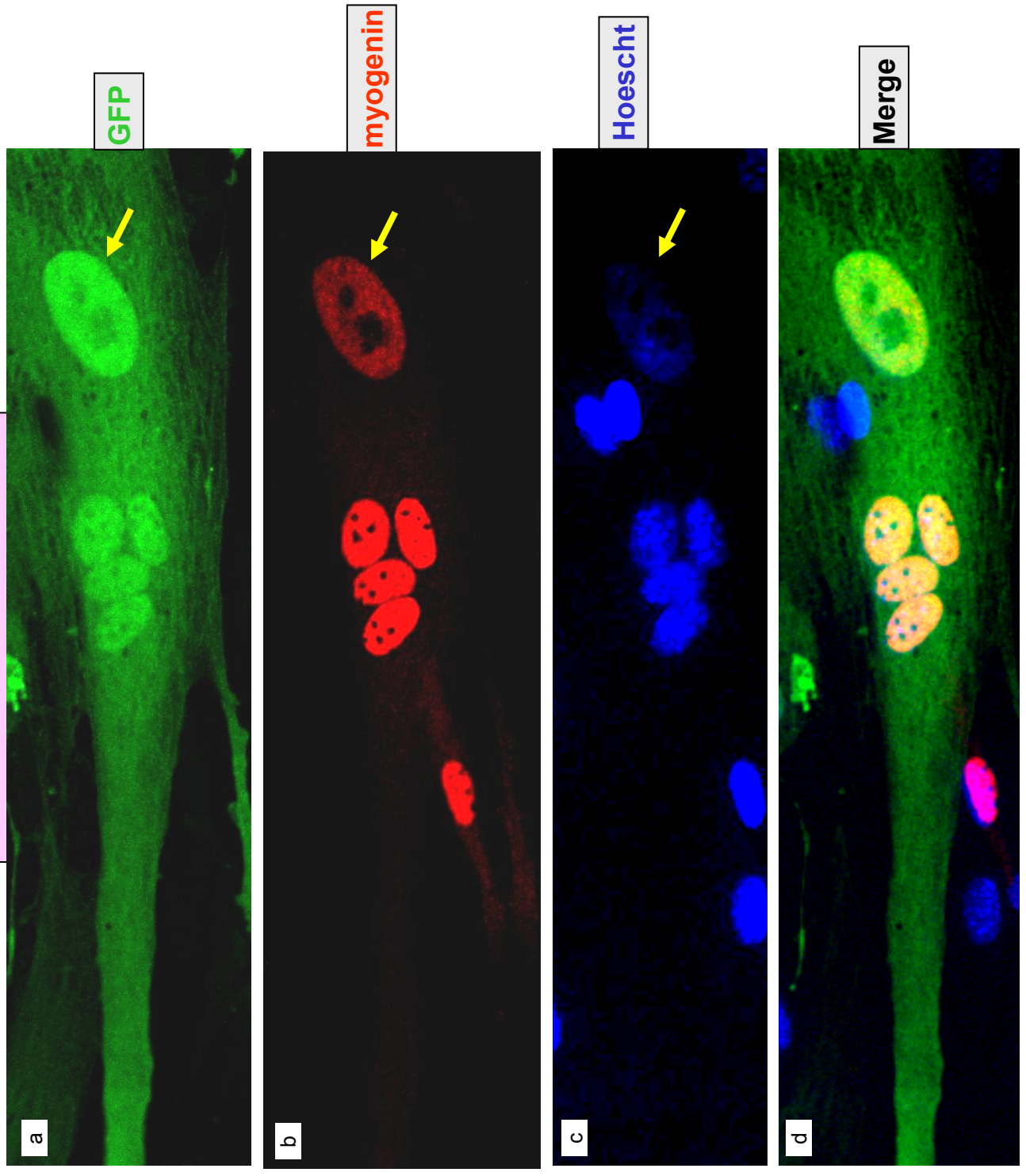
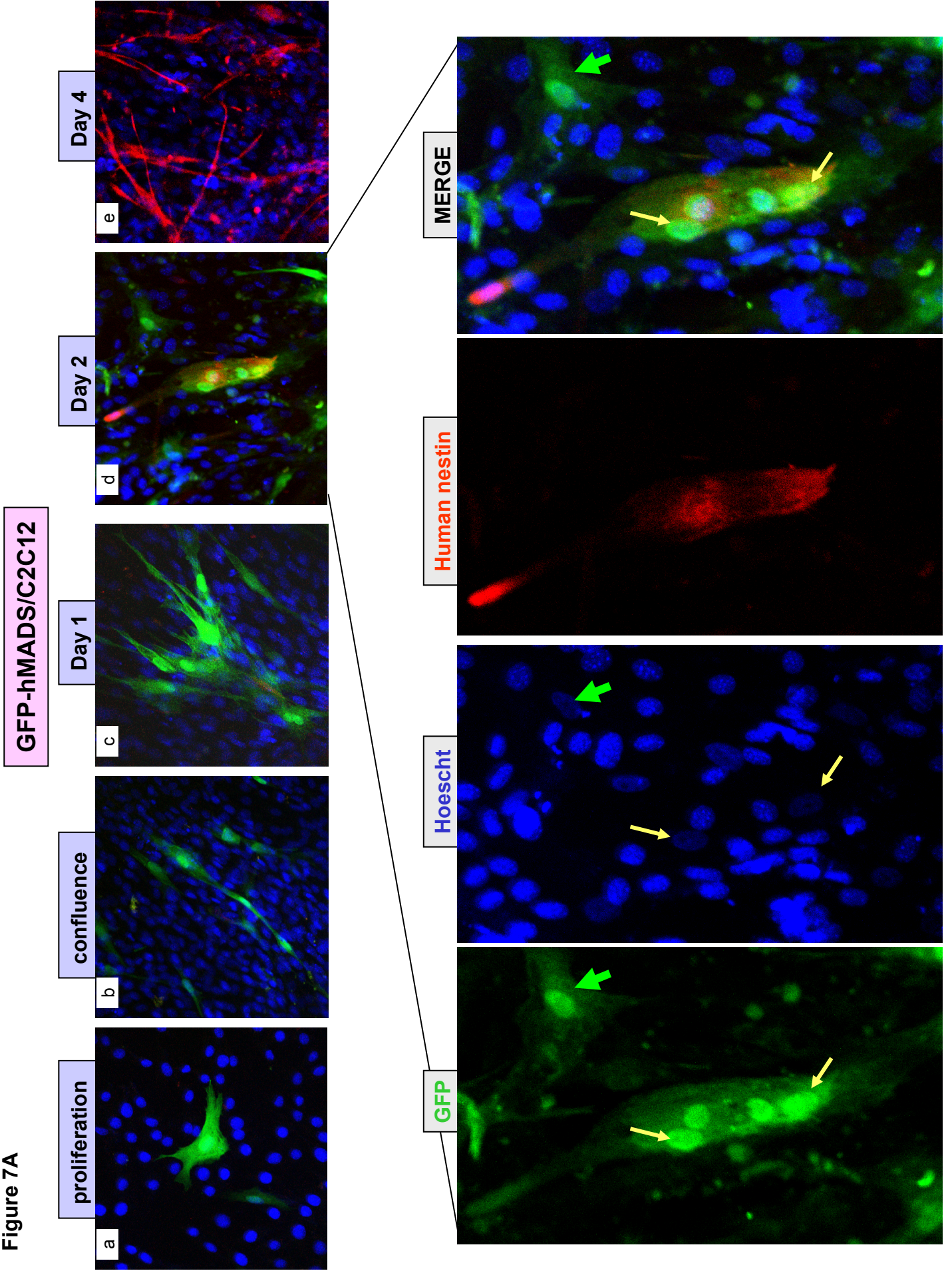


Figure 7A



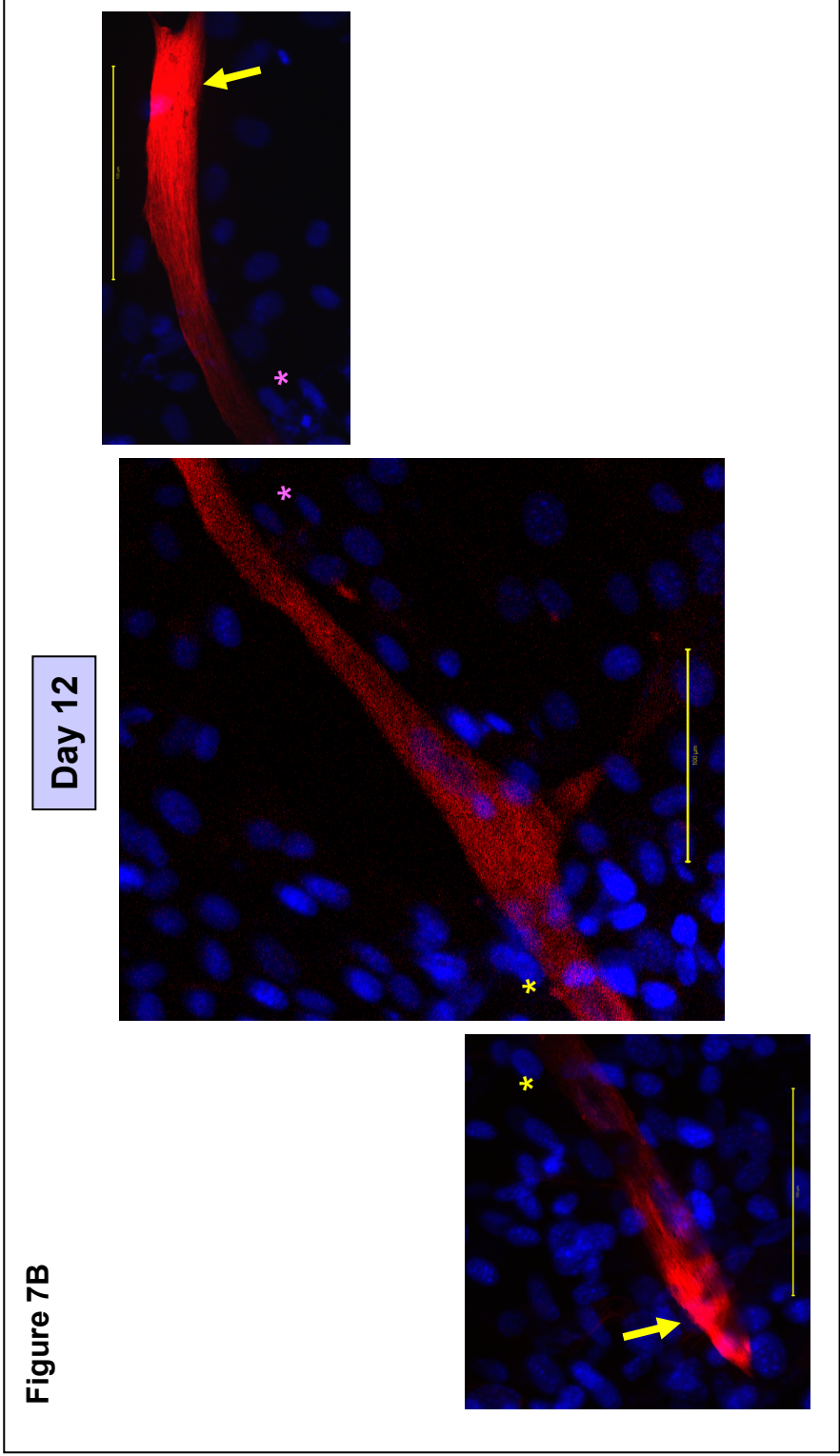
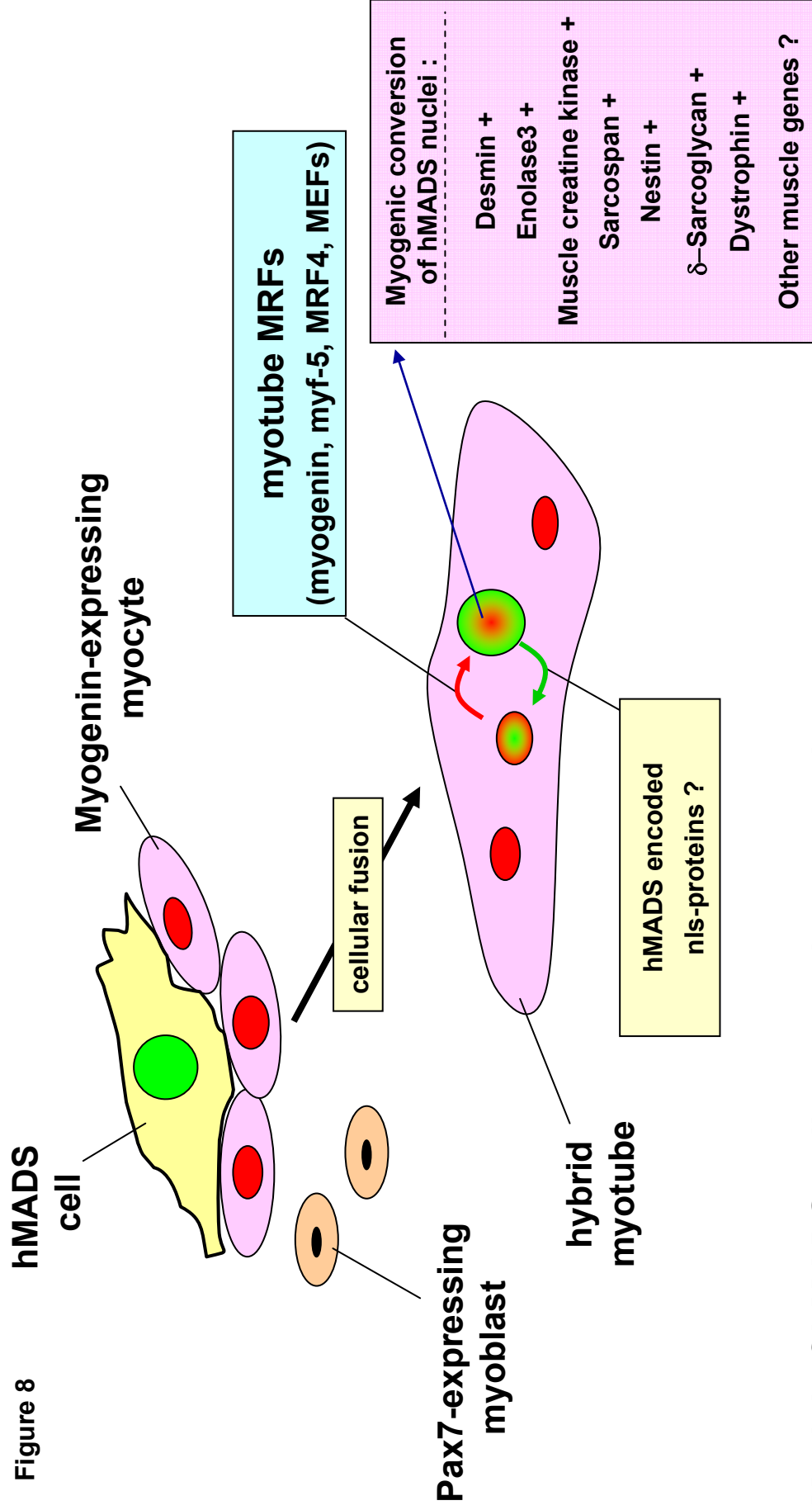


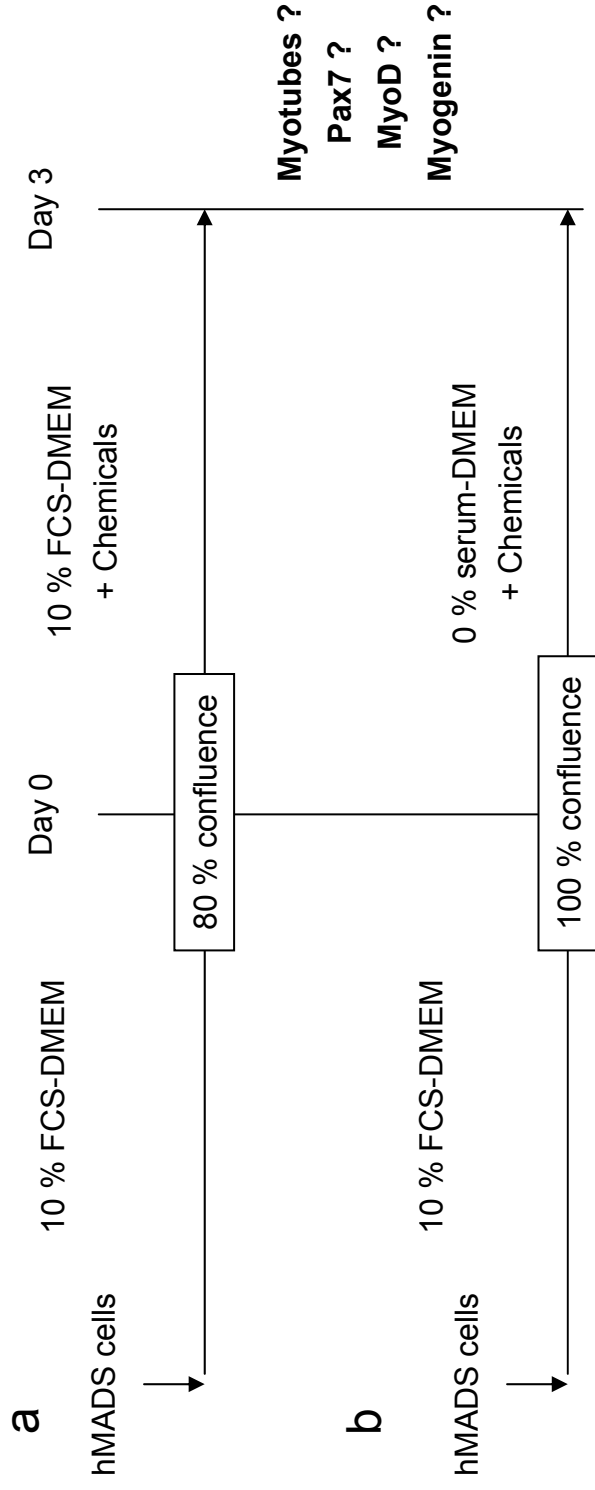
Figure 7B

Day 12

Figure 8



Model of hMADS cell myogenic conversion



Supplemental figure S1 : Different culture media tested to promote hMADS cell myogenesis

hMADS cells were treated during 3 days in the presence (a) or in the absence (b) of serum, with different hormones, cytokines and chemical activators or inhibitors of signaling pathways (see S1c). At day 3 post-treatment, cells were fixed, myotube formations were then checked, and expression of MRFs were assessed by immunocytochemistry. Biotin-conjugated secondary antibodies were used, followed by ABC signal amplification kit and DAB detection. Untreated C2C12 used as a positive control for antibody reaction showed a clear nuclear staining for each MRFs tested.

FCS : Fetal Calf Serum, **DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

Sup S1c

Medium N°	Different hormones, cytokines or chemicals supplemented in the DMEM														Myotube formation		MRF expression					
	AZA 10µM	EGF 100nM	IL-4 1nM	DHT 30nM	Tes 100nM	Ins 1µM	Dex 1µM	Bio 1µM	LICI 5mM	Pur 2µM	Cyc 5µM	T3 0.2nM	VD3 10nM	TPA 5µM	IBMX 100µM	BuS 10mM	VaA 10mM	Rev 5µM	MDA 75µM	Pax7	MyoD	Myogenin
1																				NO	NO	NO
2	AZA																			NO	NO	NO
3		EGF																		NT	NT	NT
4			IL-4																	NO	NO	NO
5				DHT																NO	NO	NO
6					Tes															NO	NO	NO
7						Ins														NO	NO	NO
8							Dex													NO	NO	NO
9								Bio												NO	NO	NO
10								LICI												NO	NO	NO
12									Pur											NO	NO	NO
13										Cyc										NO	NO	NO
14											T3									NO	NO	NO
15												VD3								NO	NO	NO
16														TPA						NO	NO	NO
17															IBMX					NO	NO	NO
18																BuS				NO	NO	NO
19																	VaA			NO	NO	NO
20																		Rev		NO	NO	NO
21						Ins				LICI										NO	NO	NO
22						Ins														NO	NO	NO
23						Ins														NO	NO	NO
24						Ins														NO	NO	NO
25						Ins														NO	NO	NO
26						Ins														NO	NO	NO
27						Ins														NO	NO	NO
28						Ins		Bio												NO	NO	NO
29						Ins		Bio										Rev		NO	NO	NO
30						Ins		Bio								BuS				NO	NO	NO
31						Ins		Bio	Pur									Rev		NO	NO	NO
32						Ins		Bio		Cyc										NO	NO	NO
33						Ins		Bio		Cyc								Rev		NO	NO	NO
34						Ins		Bio												NO	NO	NO
35						Ins		Bio		Cyc								Rev		NO	NO	NO
36						Ins		Bio	Pur											NO	NO	NO
37						Ins		Bio						TPA						NO	NO	NO
38						Ins		Bio						TPA						NO	NO	NO
39						Ins	Dex													NO	NO	NO
40						Ins	Dex	Bio												NO	NO	NO
41						Ins	Dex	Bio						TPA						NO	NO	NO
42						Ins	Dex	Bio					VD3	TPA						NO	NO	NO
43						Ins	Dex	Bio												NO	NO	NO
44						Ins	Dex	Bio		Pur										NO	NO	NO
45						Ins	Dex	Bio		Pur					IBMX					NO	NO	NO
46						Ins	Dex	Bio		Pur				TPA	IBMX	BuS				NO	NO	NO
42						Ins	Dex	Bio		Pur				TPA	IBMX	BuS				NO	NO	NO
43						Ins	Dex	Bio			Cyc				IBMX	BuS				NO	NO	NO
44						Ins	Dex	Bio			Cyc				IBMX	BuS				NO	NO	NO
45						Ins	Dex	Bio				T3		TPA						NO	NO	NO
46						Ins	Dex	Bio					VD3	TPA						NO	NO	NO

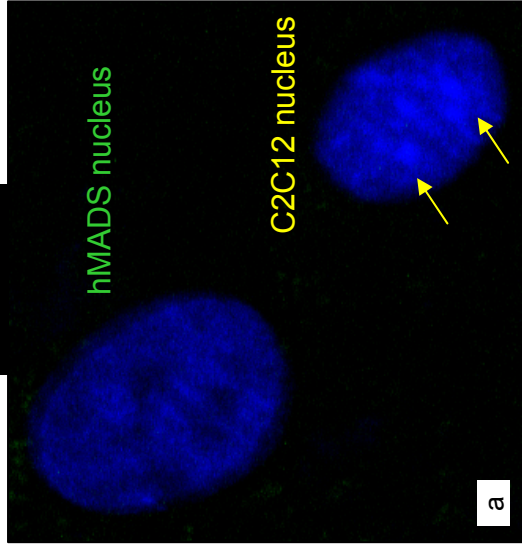
NO : No myotubes were observed or MRF detected

NT : Not Tested

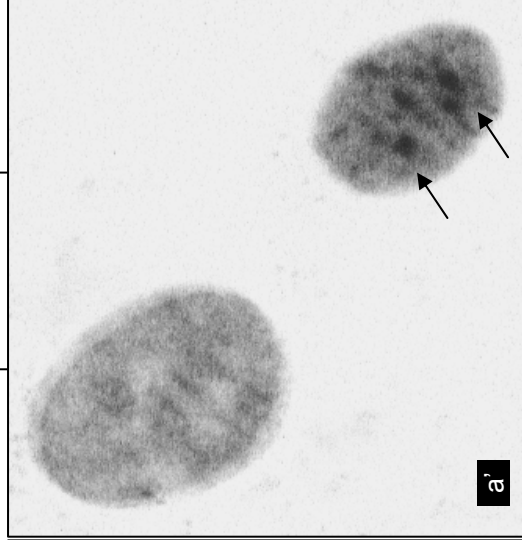
AZA : 5-azacytidin, DNA-demethylating agent; EGF : Epidermal Growth Factor; IL-4 : Interleukin-4; DHT : Dehydrothermal treatment; Tes : Testosterone; Ins : Insulin; Dex : Dexamethasone, glucocorticoid receptor agonist; Bio : Glycogen synthase-3 inhibitor; activator of wnt signaling pathway; LICI : Lithium Chloride; Glycogen synthase-3 inhibitor; Pur : Purmorphamine, an activator of hedgehog signaling pathway; Cyc : Cyclopamine, an inhibitor of hedgehog signaling pathway; T3 : Triiodothyronine, thyroid hormone; VD3 : 1α, 25-dihydroxy-vitamin D3; TPA : 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetate, activator of protein kinase-C; IBMX : IsoButylMethylXanthine, inhibitor of phosphodiesterase; BuS : Sodium Butanoate, inhibitor of histone deacetylase; VaA : Valproic Acid, inhibitor of histone deacetylase; Rev : Reversine; induce C2C12 cells differentiation; MDA : Methyl-Adenosine, promote C2C12 cells differentiation

S2A

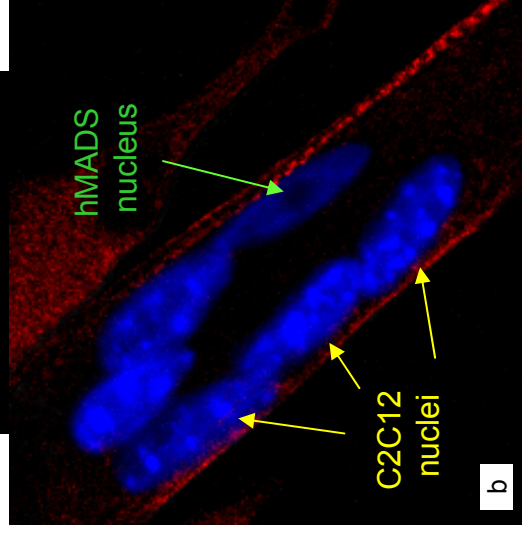
Hoechst



Hoechst

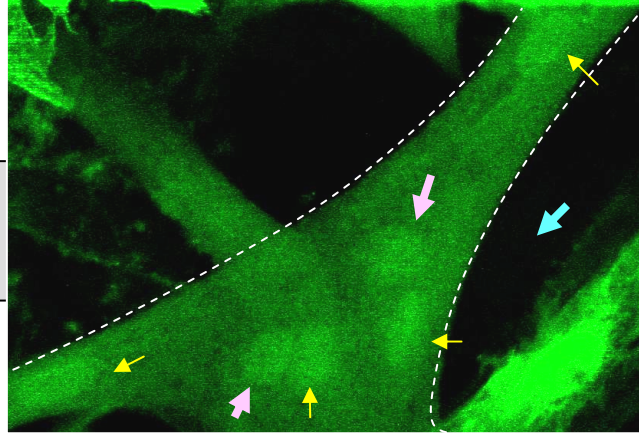


Titin + Hoechst

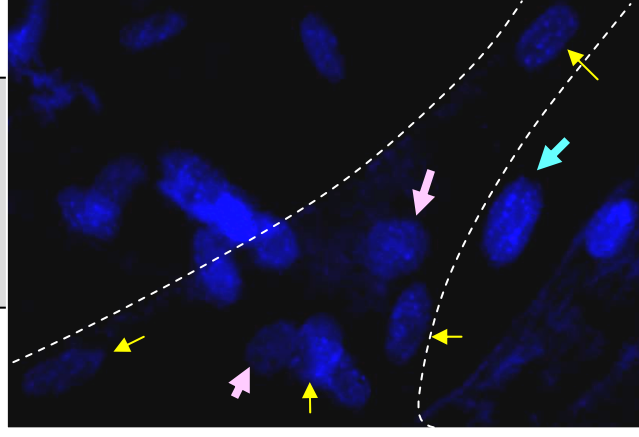


S2B

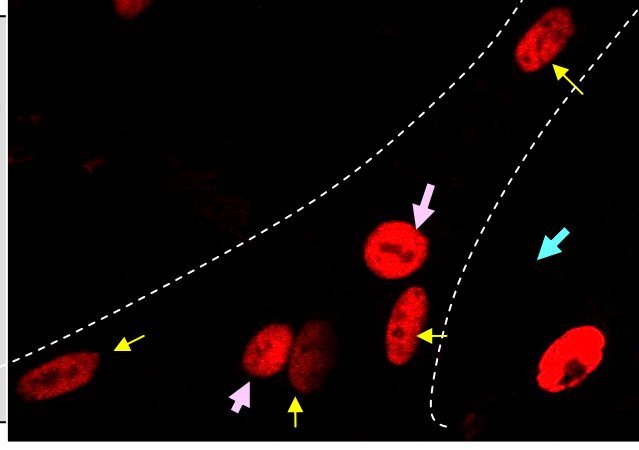
GFP



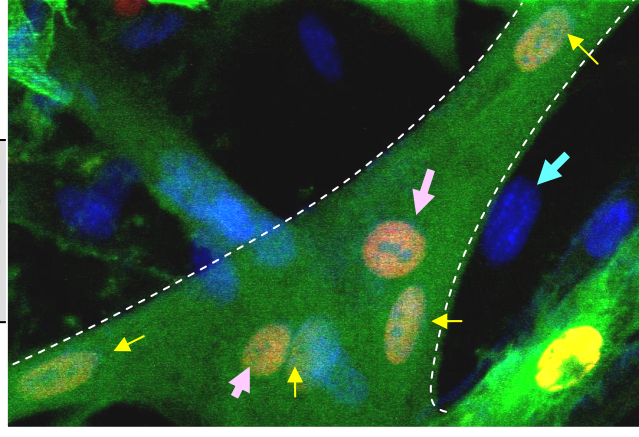
Hoescht



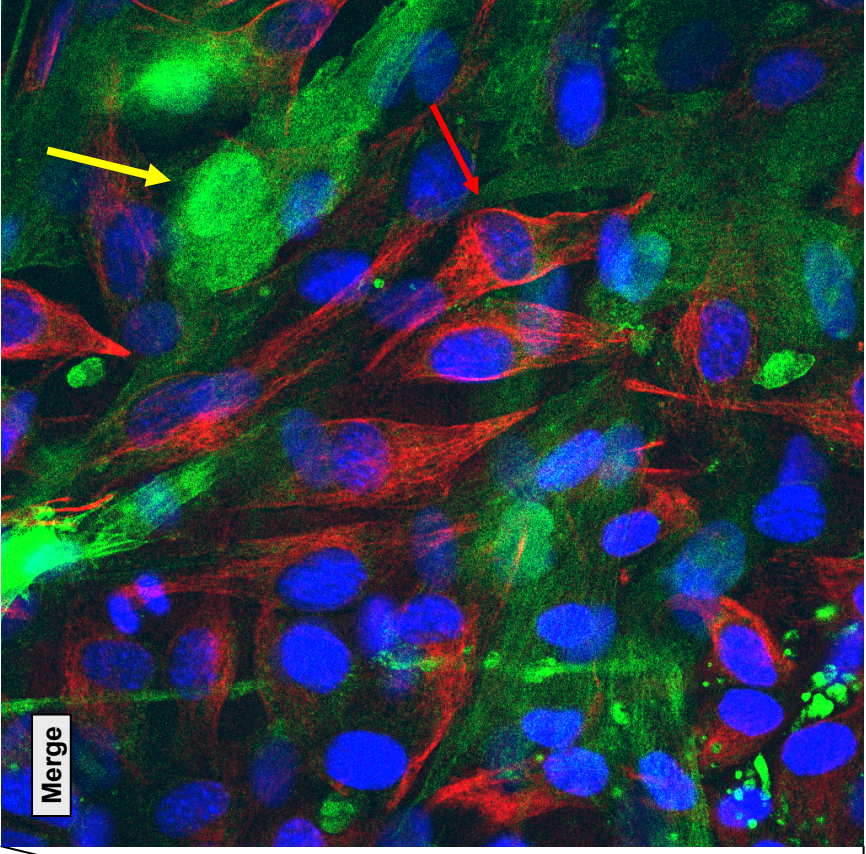
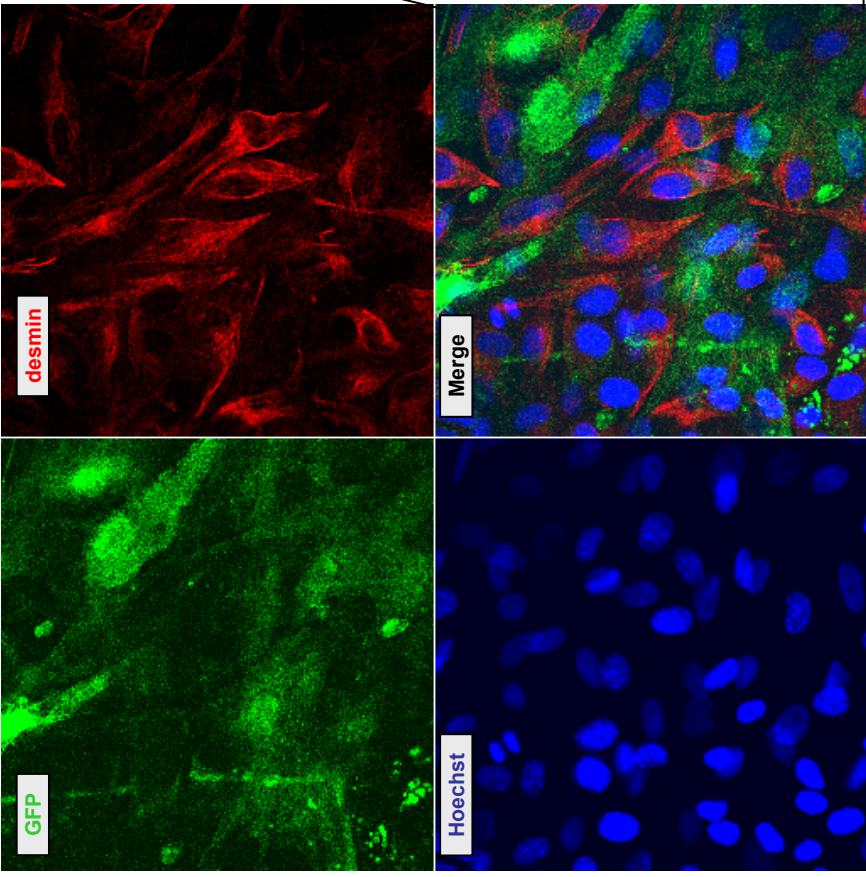
h nuclei antigen



Merge

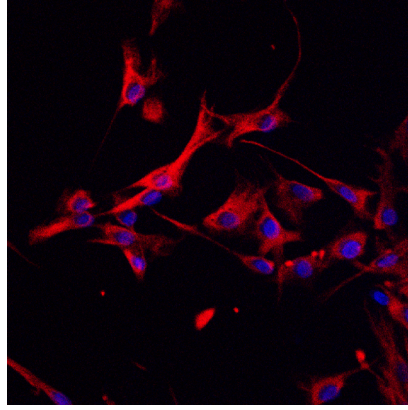


S3

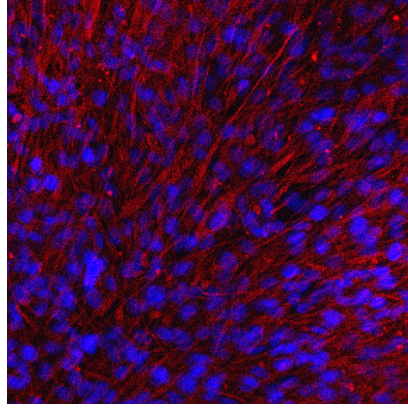


S4

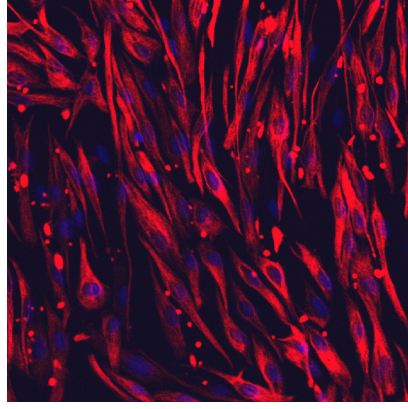
proliferation



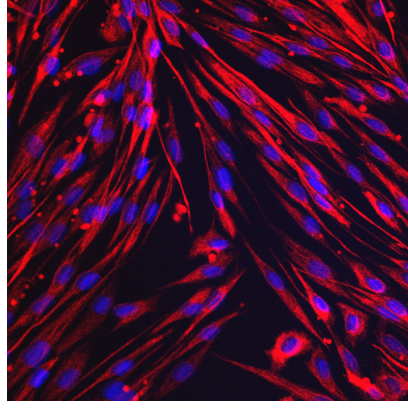
confluence



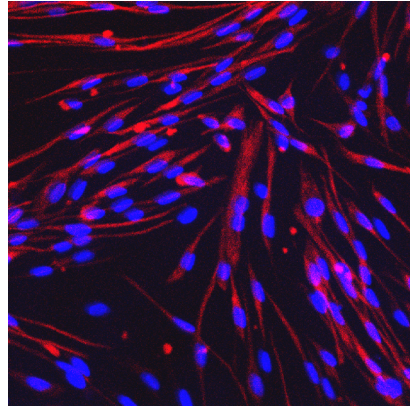
D1



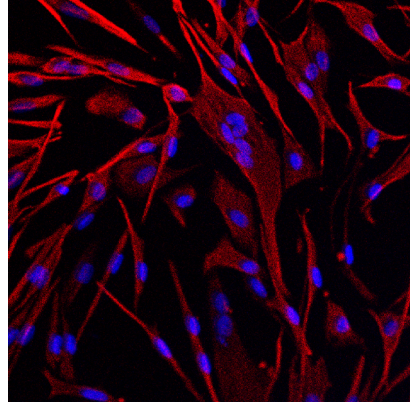
D2



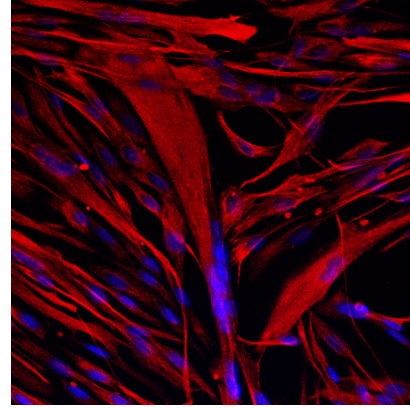
D3



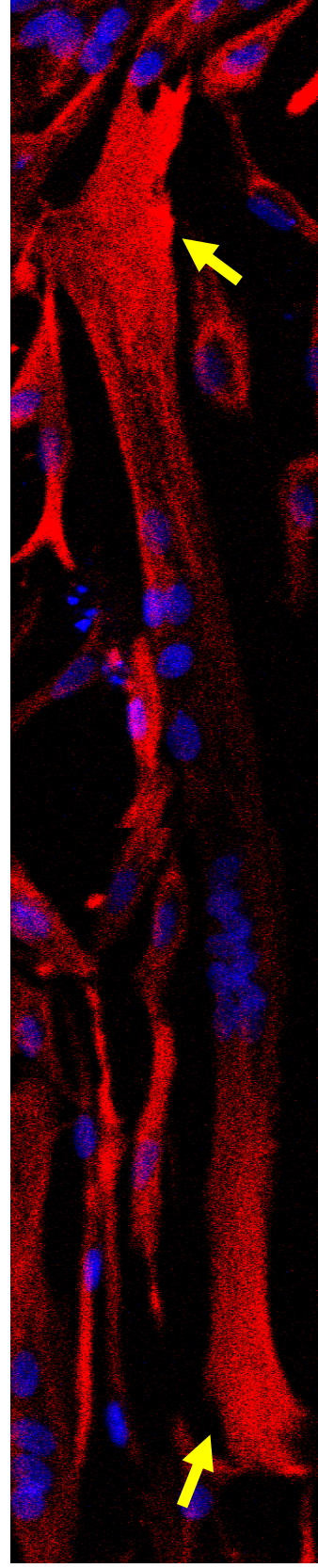
D4



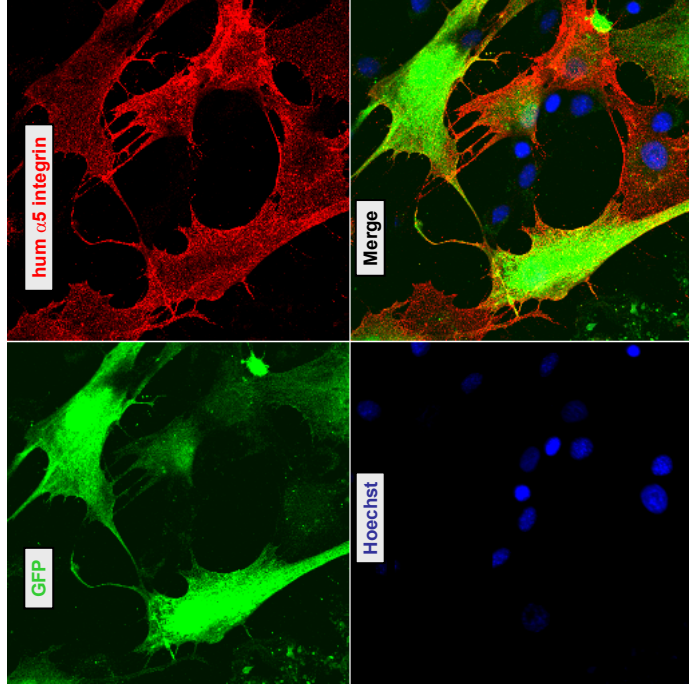
D5



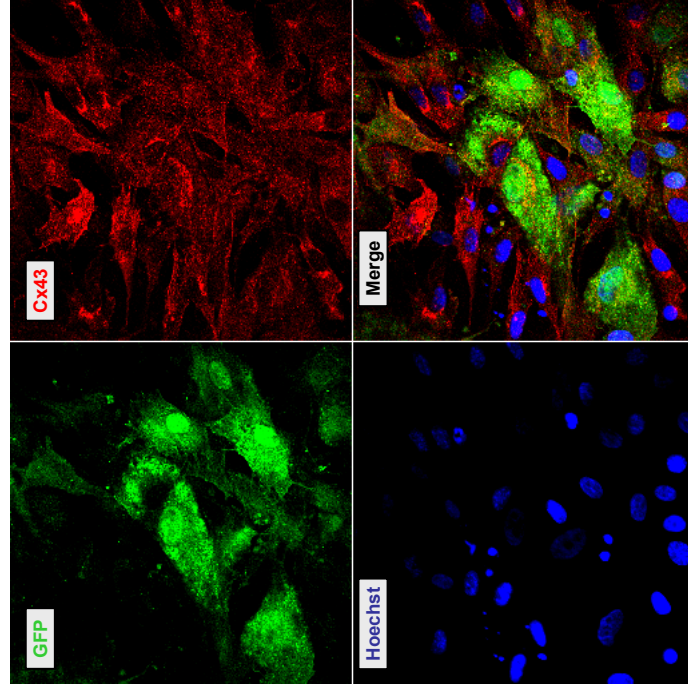
D5



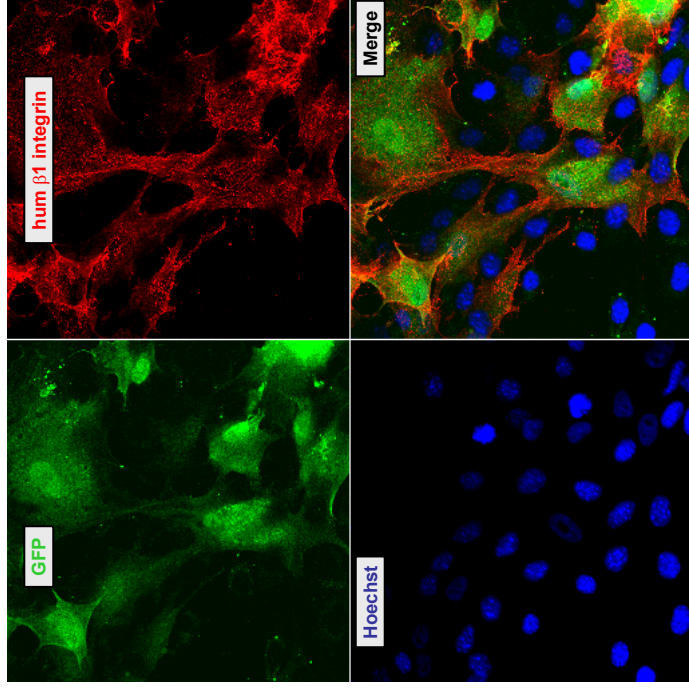
S5 A



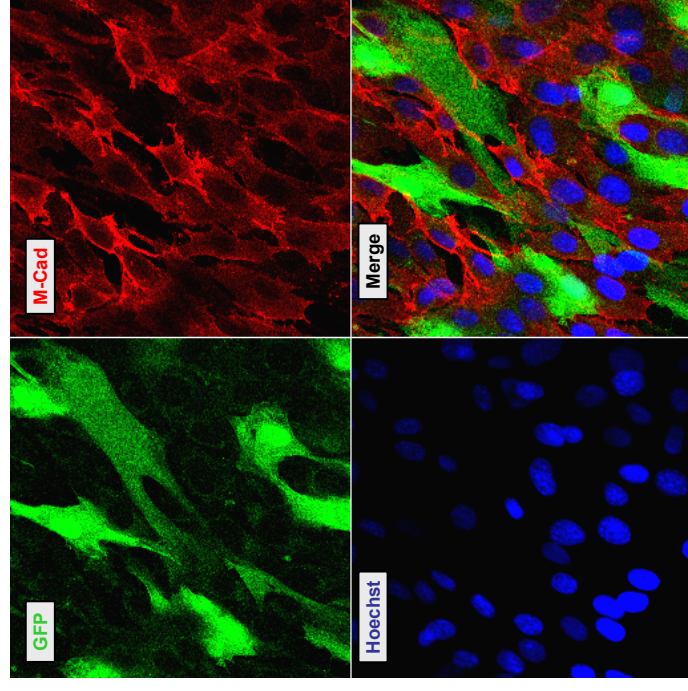
C



B



D



V Conversion myogénique des cellules hMADS

Résultats préliminaires

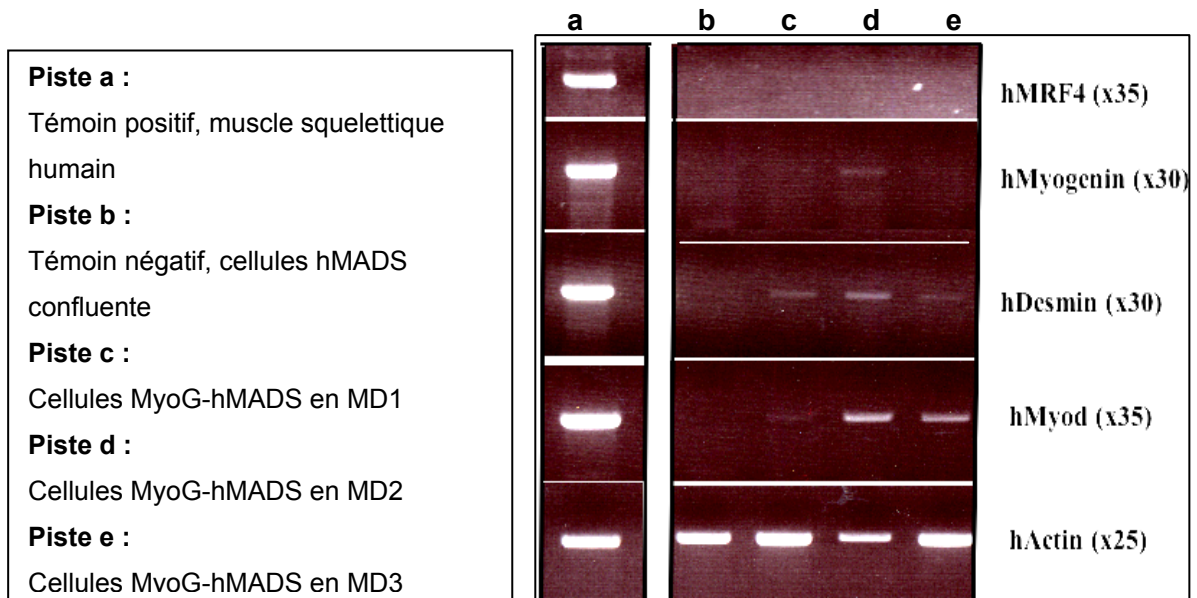
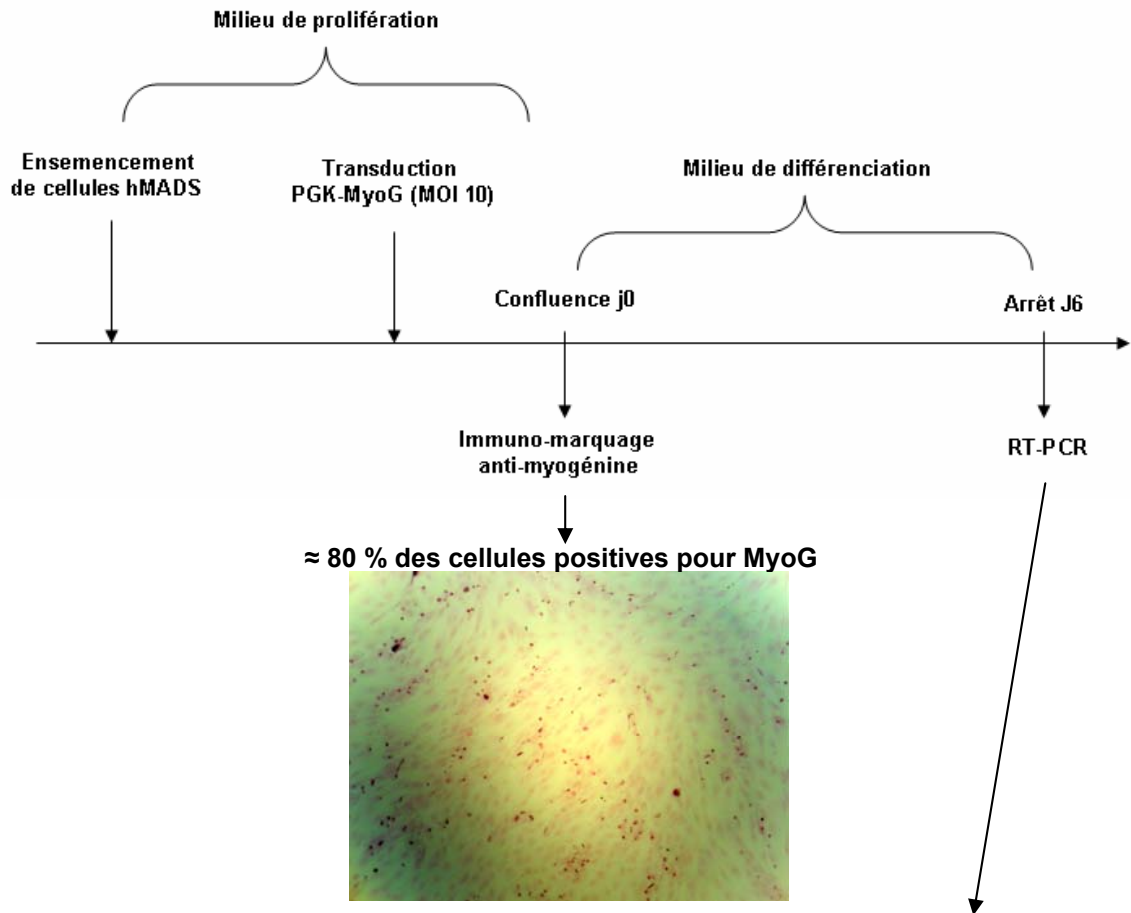
V.1 Introduction

Dans les myotubes hybrides, nous avons mis évidence dans les noyaux issus des cellules hMADS, la présence de la myogénine codée par le génome des myocytes. Afin de démontrer directement le rôle des MRF du stade myotube dans la programmation myogénique des noyaux hMADS, faire exprimer ces molécules par les cellules hMADS de façon ectopique est une stratégie que nous voulons développer. Dans ce but, nous avons transduit ces cellules avec un vecteur lentiviral permettant l'expression de la myogénine (origine rat) sous le contrôle du promoteur PGK. Puis, une fois confluente, les cellules MyoG-hMADS ont été mises au contact de différents milieux de différenciation « pro-myogénique » pendant 6 jours. Après ce délai, l'expression de quelques marqueurs musculaires a été analysée par RT-PCR.

V.2 Résultats

Trois jours après transduction et à confluence, environ 80% des cellules hMADS présentaient une immuno-réactivité nucléaire positive pour l'expression de la myogénine (Figure 33). Aucune immuno-réactivité n'a été observée ni sur des cellules hMADS non transduites, ni sur des cellules MyoG-hMADS avec omission de l'anticorps primaire anti-myogénine (non présenté). Afin d'autoriser une conversion myogénique, le milieu de prolifération a été échangé contre du milieu de différenciation (MD) « pro-myogénique ». Deux MD ont été testés, MD1 (DMEM sans sérum avec 1µM insuline) et MD2 (MP1 avec 0,5 µM Bio - activateur de la voie de signalisation Wnt -), et comparés au témoin MD3, milieu de prolifération. Les résultats des RT-PCR montrent que les cellules MyoG-hMADS expriment les transcrits de MyoD et de la desmine, avec une légère préférence en MD2 contenant du Bio par rapport à MD1 ou MD3. L'activation de la voie Wnt (canonique) est connue pour potentialiser/stabiliser l'expression des MRF notamment celle de la myogénine [260, 261]. En condition MD2 contenant du Bio, une légère expression de la myogénine endogène a pu être détectée. En revanche, MRF4 a été détecté dans aucune des conditions. De plus nous n'avons pas observé la formation de myotubes quelque soit les conditions testées.

Figure 33 : Conversion myogénique des cellules MyoG-hMADS



V.3 Conclusion

Nous avons testé la transduction lentivirale de la MyoG (de rat) par les cellules hMADS. Cette technique s'est avérée efficace pour permettre l'expression ectopique de ce gène d'intérêt par un grand nombre de cellules. Bien que nous n'ayons pas observé la formation de myotubes, la conversion myogénique a été témoinnée par l'expression des transcrits de MyoD et de la desmine dans les 3 conditions que nous avons testées. Lors de la myogenèse, l'expression de MyoD est normalement éteinte juste après la fusion des myocytes. Dans le contexte artificiel d'une expression ectopique de la myogénine (par transfection dans des lignées fibroblastiques), l'induction de MyoD a été mise en évidence après passage en milieu de différenciation [262]. L'induction inhabituelle, puis le maintien de MyoD en condition sans sérum pourrait, si elle se confirmait à l'échelle protéique, entraver la formation des myotubes.

Enfin, nous n'avons pas détecté l'expression de MRF4, dont l'expression au cours de la myogenèse est secondaire à celle de la myogénine. L'absence de co-facteur de la myogénine tel que MEFD2d [263] pourrait être suffisant pour que l'induction de MRF4 ne puisse se produire dans les cellules MyoG-hMADS.

V.4 Matériels et Méthodes

V.4.1 Transduction lentivirale et induction myogénique

Le lentivirus PGK-Myogénine (Généthon, Ivry, France) a été dilué afin de transduire les cellules avec une MOI de 10 virus par cellules. Trois jours après la transduction, l'expression de la myogénine a été évaluée par immuno-cytochimie avec un anticorps dirigé contre la myogénine (Hybridoma Bank, University of Iowa). Une fois la confluence atteinte, le milieu de prolifération a été échangé contre des milieux de différenciation (MD) « pro-myogénique ». Deux MD ont été testés, MD1 (DMEM sans sérum avec 1 μ M insuline) et MD2 (MP1 avec 0,5 μ M Bio), et comparés au témoin MD3, milieu de prolifération (DMEM supplémenté à 10% de sérum). Les milieux ont été renouvelés tous les 2 jours. Le Bio provient de Calbiochem (GSK-3 inhibiteur IX).

V.4.2 RT-PCR

Les ARNs ont été extraits en utilisant le Tri-reagent suivant les instructions du fabricant (Euromedex), puis quantifiés par mesure de la densité optique à 260 nm. La transcription inverse (RT) a été effectuée en utilisant 100U de transcriptase inverse M-MLV (Moloney-Murine Leukemia Virus), 0,5 mM de dNTP et 20pmol d'amorces aléatoires. La réaction s'effectue 30 minutes à 37°C. Les PCR sont effectuées sur 1µl du produit de la RT dans un volume final de 50µl, en présence de 3mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP, 20pmol de chaque amorce spécifique, 2,5U de polymérase Taq et le tampon nécessaire à l'activité de la polymérase (10mM Tris-HCl pH9, 50mM KCl, 0,1% Triton X-100). Les oligonucléotides utilisés sont regroupés dans la table 1.

Table 1 : Amorces utilisées en PCR

Gène (h : humain)	Séquence des amorces	Nombre de cycle PCR	Taille amplicon
hMyoD	Sens : AAGCGCCATCTCTTGAGGTA Antisens : GCGCCTTATTTTGATCACC	35	503
hMyogénine	Sens : AGCGCCCCCTCGTGTATG Antisens : TGTCCCCGGCAACTTCAGC	30	364
hMRF4	Sens : TGGGGAAAATGTTACTCTGC Anitsens : GAAGGCTACTCGAGGCTGAC	35	601
hDesmine	Sens : CCTACTCTGCCCTCAACTTC Anitsens : AGTATCCCAACACCCTGCTC	30	519
hActine	Sens : AGCCATGTACGTTGCTA Anitsens : AGTCCGCCTAGAAGCA	25	746

VI Discussion et Perspectives

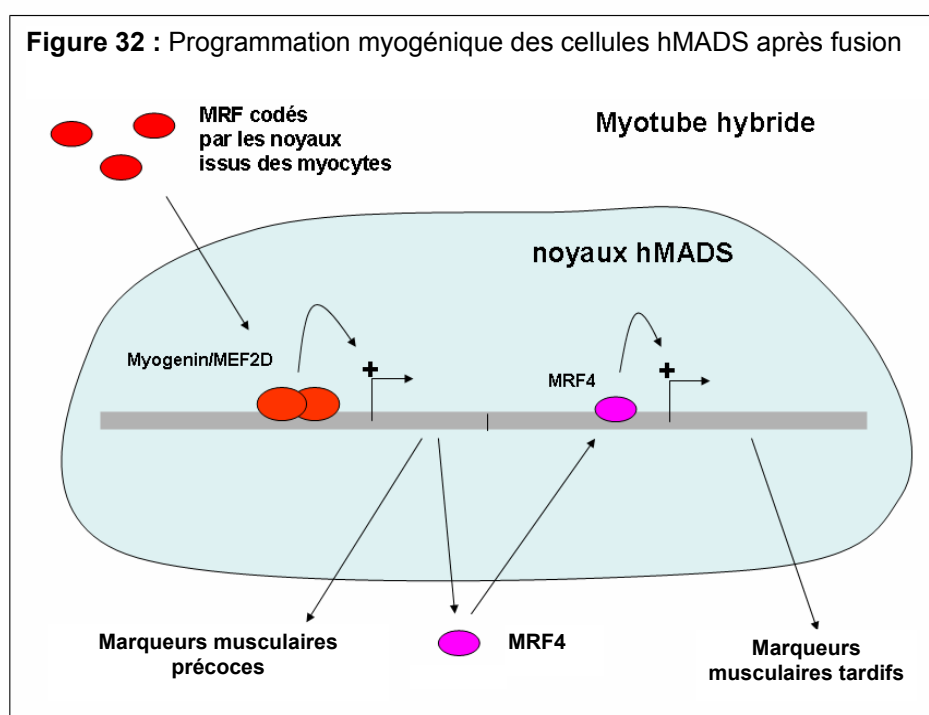
Cette étude a permis d'une part d'écarter l'hypothèse de la plasticité myogénique des cellules hMADS, et d'autre part, d'élucider le processus par lequel ces cellules contribuent à la myogenèse.

En résumé, une fraction des cellules hMADS fusionnent avec les myocytes pour participer à la formation de myotubes. Il s'ensuit alors une programmation myogénique du génome nucléaire hMADS au sein du syncytium.

VI.1 Programmation myogénique des cellules hMADS

VI.1.1 Transactivation des loci musculaires

Les mécanismes de cette programmation pourraient mettre en jeu la trans-activation directe des loci musculaires par les MRF du stade myotube codés par les noyaux issus des myocytes (ex. : myogénine, MEF2D). Ces trans-activations pourraient également concerner le gène MRF4 du génome hMADS. Dans ce cas, ce MRF4 prendrait alors le relais en trans-activant les gènes musculaires tardifs (comme la dystrophine par exemple). Ainsi, la programmation myogénique deviendrait autonome vis-à-vis des MRF codés par les noyaux myocytaires (Figure 32).



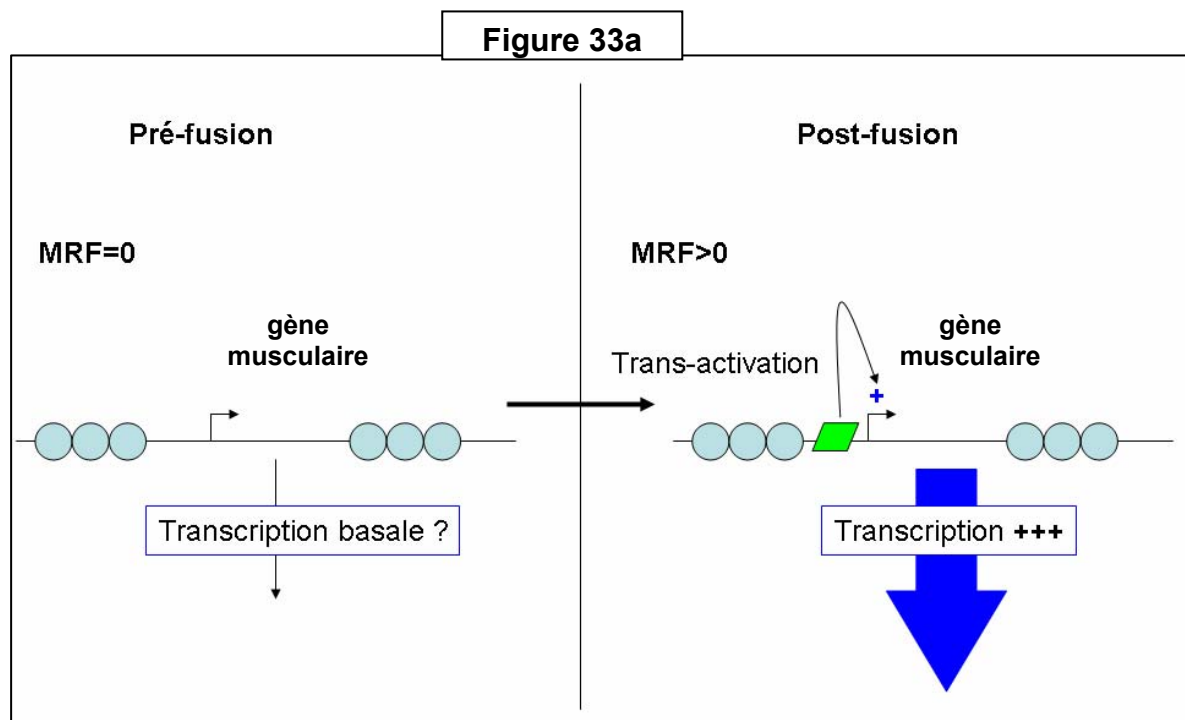
Les arguments en faveur de ces trans-activations comprennent d'une part, la mise en évidence de la myogénine dans les noyaux hMADS, myogénine codée par le génome des myocytes, et d'autre part, l'induction rapide des gènes musculaires codés par les hMADS après la fusion.

Perspective i)

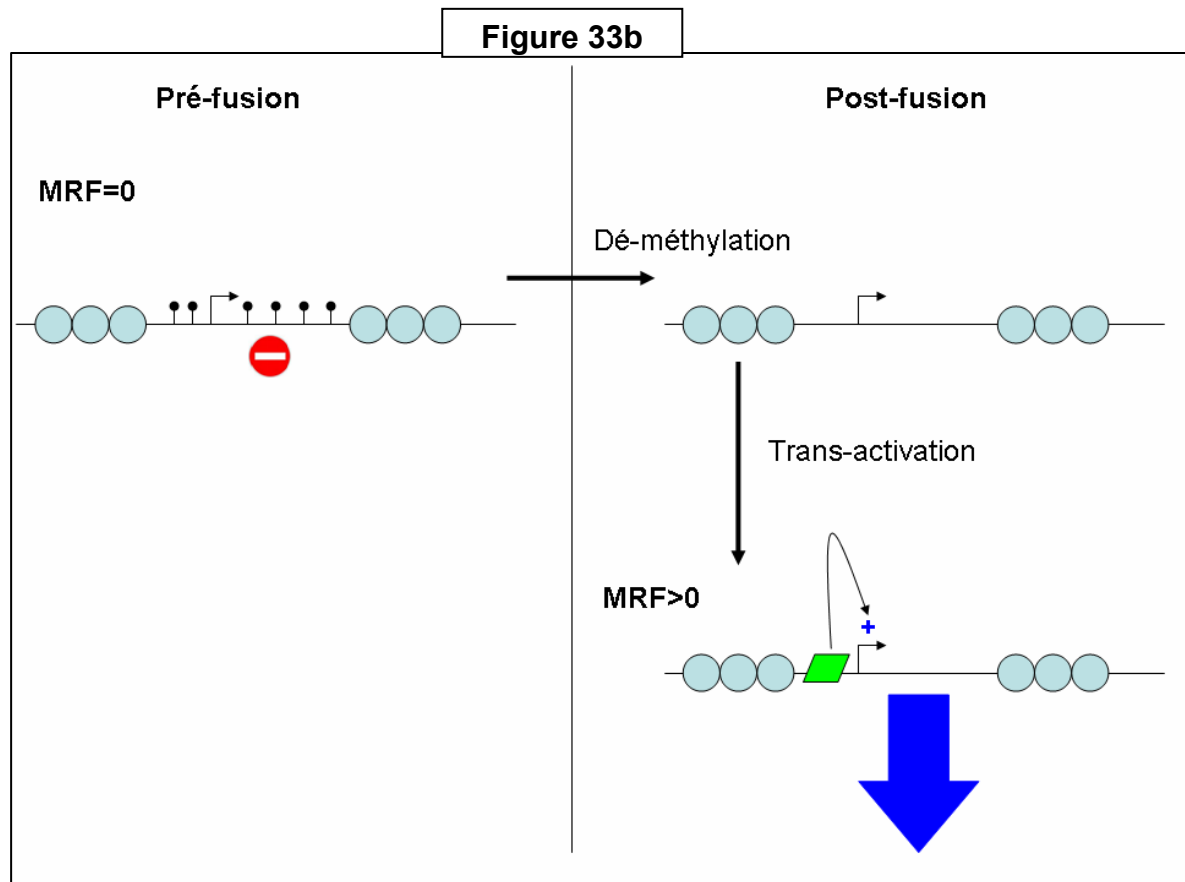
Nous envisageons, à partir des ARNs issus de co-cultures des cellules hMADS et C2C12, de vérifier grâce à des amorces spécifiques l'expression de MRF4 d'origine humaine par RT-PCR.

Concernant la configuration des loci musculaires dans le génome hMADS, avant et après fusion, on peut émettre plusieurs hypothèses (Figure 33) :

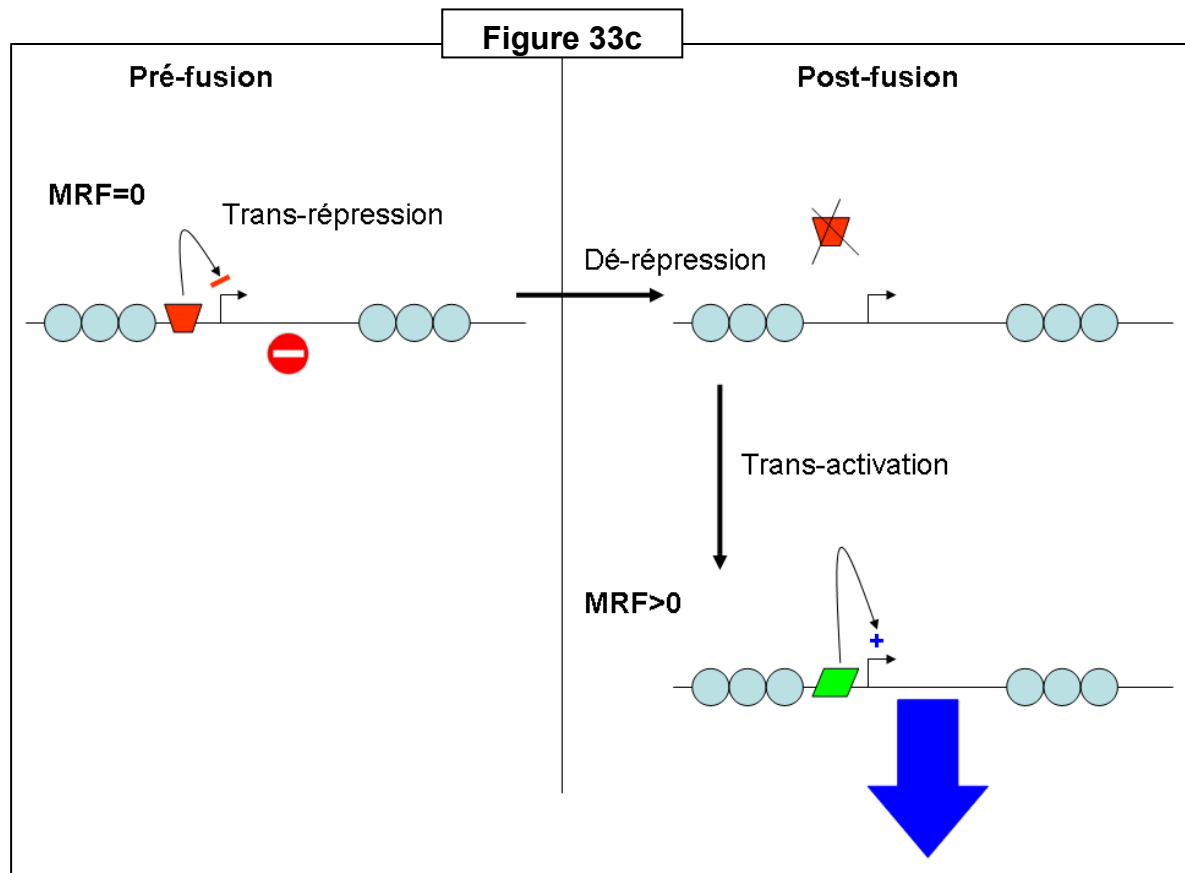
- 1) avant fusion, ces loci sont sous forme d'euchromatine et sont accessibles à la machinerie transcriptionnelle, mais l'absence de MRF rend ces gènes silencieux (Figure 32a)



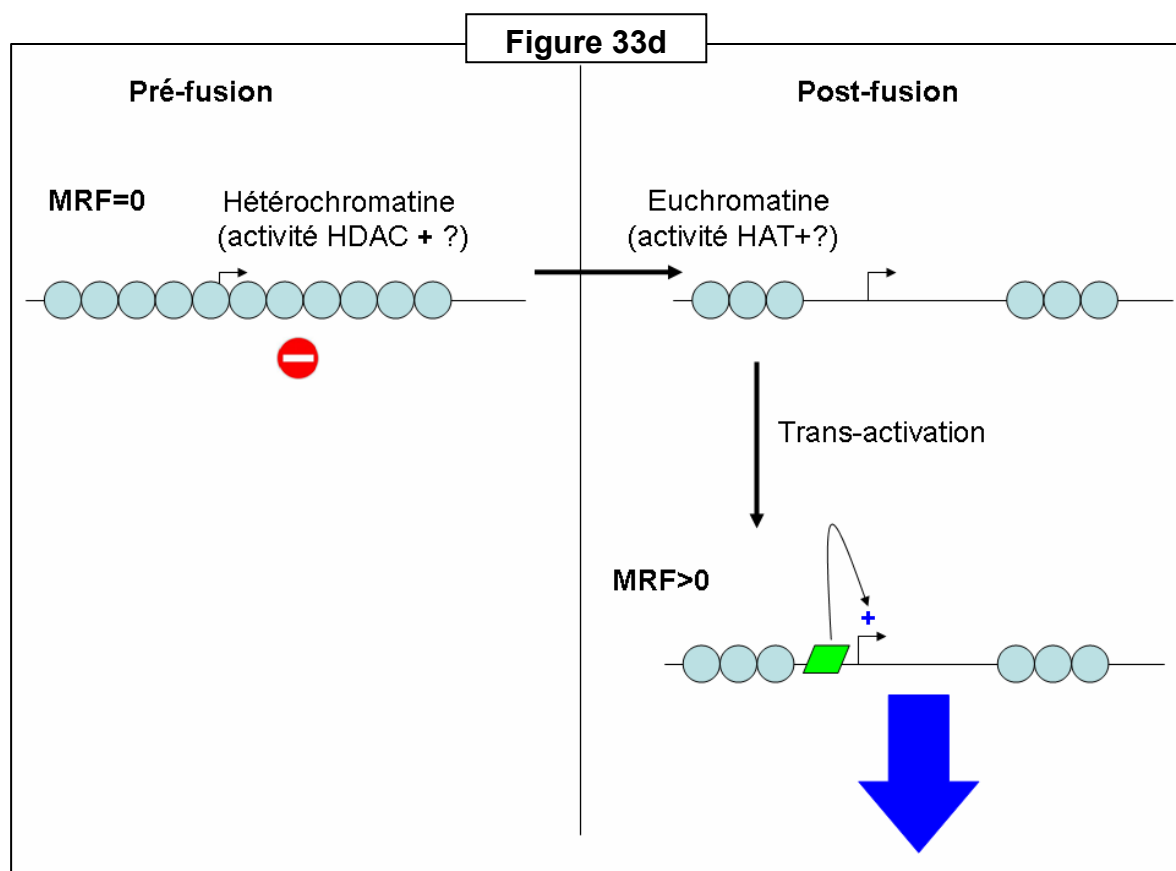
- 2) avant fusion, ces loci sont accessibles, mais le « silencing » par méthylation de leurs promoteurs rend ces gènes silencieux (Figure 33b)



- 3) avant fusion, ces loci, accessibles, sont en permanences éteints par des facteurs de transcriptions répresseurs (Figure 33c)



- 4) avant fusion, les loci sont inaccessibles c'est-à-dire sous forme d'hétérochromatine, et sont donc silencieux (Figure 33d)



Les hypothèses 2), 3) et 4) nécessitent qu'il se produise après la fusion, respectivement la dé-méthylation des promoteurs, l'extinction des facteurs de transcriptions répresseurs et l'ouverture de la chromatine au niveau de ces loci musculaires. L'induction des gènes musculaires hMADS se réalisant rapidement après la fusion (dès la formation des myotubes), ces rapides inductions seraient vraisemblablement incompatibles avec les processus cités car ils nécessiteraient des délais supplémentaires.

De plus, ni la 5-Azacytidine (agent déméthylant de l'ADN) et ni le butyrate de sodium (inhibiteur des histones désacétylases -HDAC-) n'ont permis d'induire la conversion myogénique des cellules hMADS ou des MSC humaines issues de la moelle osseuse [264, 265], à la différence de MSC issues de rongeurs [266, 267].

L'hypothèse 3) est peu probable car de tels facteurs de transcription répresseurs devraient (dans le cas d'une dominance sur les MRF) perturber le phénotype musculaire des myotubes hybrides avant d'être réprimés éventuellement à leur tour [268]. Or, les myotubes hybrides ont une

morphologie comparable aux myotubes ne contenant pas de noyaux hMADS, et présentent un phénotype musculaire si l'on se base sur le large panel de marqueurs musculaires exprimés (desmine, émolase-3, sarcospan, créatine kinase musculaire, M-Cadhérine, myosine musculaire, alpha-actine sarcomérique, delta-sarcoglycane, dystrophine, titine).

Enfin, l'hypothèse 1) serait donc par défaut la plus probable. De plus, une telle configuration devrait autoriser un certain degré de transcription basale (« fuite transcriptionnelle »). Dans ce sens, l'expression des transcrits de la desmine, de l'émolase et de sarcospan humains avant fusion dans les expériences de co-culture de cellules hMADS/C2C12 conforte cette hypothèse (confère Figure 2A, article Massoudi A. *et al*).

Perspective ii)

Afin de mieux comprendre la programmation myogénique des cellules hMADS, une voie indirecte serait de transfecter la myogénine (seule ou en combinaison avec MEF2D) dans ces cellules et de suivre en RT-PCR quantitative l'expression des transcrits de la myogénine et de ses gènes cibles (par exemple la Créatine Kinase Musculaire [263]). Si l'induction de ces gènes cibles se fait rapidement (en moins de 24h) après l'expression de la myogénine, on peut penser que les loci de ces gènes sont accessibles et directement trans-activables (hypothèse 1), a contrario d'intervalles de temps plus espacés.

De plus, nous envisageons de traiter, les cellules hMADS transfectées par les MRF, avec la 5-Azacytidine ou le butyrate afin de vérifier les hypothèses 2) et 4).

VI.1.2 Répressions des loci non-musculaires

La fusion artificielle de lymphocytes B humains avec des myotubes murins a permis de montrer que parallèlement aux trans-activations des loci musculaires, les loci non-musculaires (gènes marqueurs du phénotype lymphocyte B) étaient réprimés [269]. Cette étude a révélé que ces répressions nécessitaient l'activité « Histone Deacetylase (HDAC) ».

Similairement, après leur fusion avec les myocytes, les loci non-musculaires du génome hMADS pourraient également être assujettis à une telle répression épigénétique. Contrairement à cette étude, la vérification de cette hypothèse avec le modèle hMADS est difficilement réalisable. En effet, les cellules hMADS étant des cellules souches adultes et mésenchymateuses, nous ne disposons pas de marqueurs spécifiques dont l'expression pourrait être suivie après la fusion. Néanmoins, des résultats « préliminaires » semblent indiquer qu'un

tel phénomène puisse également se produire après la fusion des cellules hMADS. En effet, lorsque les cellules GFP-hMADS ont été utilisées dans les expériences de co-cultures, la fluorescence de la GFP décroît dans les myotubes hybrides avec le temps passé en culture pour être totalement indétectable à partir de jour 5-6 en milieu différenciateur. Un traitement de 48h des myotubes hybrides avec le Butyrate (inhibiteur de l'activité HDAC) permet de restaurer cette fluorescence (Figure 34). Ce résultat suggère que (le locus ou) les loci où a été intégrée la cassette GFP sont réprimés après la fusion. Ces sites d'intégration pourraient être à proximité de loci non-musculaires assujetti à l'extinction post-fusion.

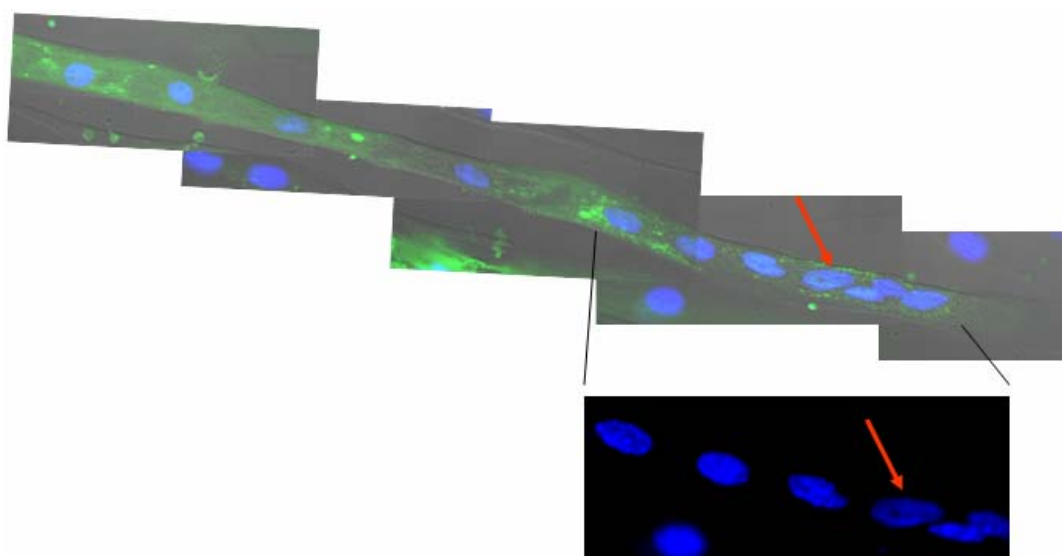


Figure 34 : Réexpression de la GFP après traitement au butyrate

Les cellules GFP-hMADS et C2C12 ont été co-cultivées, et induites en différenciation à la confluence. De jour 4 à 6 en milieu différenciateur, 10mM de butyrate ont été ajoutés au milieu de culture. La microphotographie confocale présente un myotube hybride à jour 6 (noyaux hMADS indiqués par la flèche rouge) exprimant la GFP (fluorescence verte).

Enfin, les noyaux hMADS au sein des myotubes hybrides subissent un remodelage de leur taille et de leur morphologie avec le temps (confère les résultats supplémentaire S5 de l'article Massoudi A. *et al.*). Ces variations de morphologie sont identiques à celles subies par les noyaux myocytaires. En effet, au début de la fusion, les noyaux des cellules hMADS sont plus volumineux que ceux des myocytes. Après 6 jours en milieu différenciateur, les noyaux hMADS et myocytaires présentent la même taille et ont une forme similaire ovoïde. Dans les myotubes plus matures, les réductions de taille et l'affinement morphologique des noyaux sont tels qu'il est impossible de distinguer leur origine en se basant sur la fluorescence du Hoechst. Ces événements suggèrent que ces noyaux sont le siège d'un remodelage chromatinien de grande ampleur participant à la programmation myogénique.

Les noyaux des cellules hMADS qui n'ont pas participé à la formation de myotubes sont épargnés par ces variations morphologiques.

Perspective iii)

Nous prévoyons une analyse transcriptomique différentielle des cellules hMADS avant et après fusion dans notre modèle de co-culture cellulaire. Cette étude devrait nous éclairer sur l'ampleur et le degré de la conversion myogénique des cellules hMADS. La difficulté sera de choisir une méthodologie permettant de discriminer les transcrits provenant des gènes hMADS de ceux issus des gènes myocytaires. Dans ce but, les co-cultures seront réalisées avec les cellules hMADS et les myoblastes de souris et une analyse transcriptomique de type « CGH-array » sera appliquée. Ce type de puce permet de discriminer les promoteurs humains actifs de ceux de la souris.

VI.2 Altération du transcriptome des myocytes après fusion avec les cellules hMADS

Dans les myotubes hybrides, nous avons mis en évidence dans les noyaux des myocytes la β -galactosidase et l'antigène nucléaire humain. Le point commun entre ces deux protéines est qu'elles sont tous deux codées par les noyaux issus des cellules hMADS et qu'elles possèdent une séquence d'adressage aux noyaux (nls, nuclear localisation signal). On peut donc admettre que d'autres protéines nucléaires codées par les noyaux hMADS, et exprimées dans les myotubes hybrides puissent se localiser dans les noyaux issus des myocytes et y exercer leur fonction. Si cette hypothèse se vérifiait, on peut admettre que ces protéines nucléaires puissent entraîner une altération du transcriptome des myocytes. Aujourd'hui nous ne connaissons pas le ou les protéines nucléaires supplémentaires qui pourraient être exprimées par les noyaux hMADS (la *perspective iii*) renseignerait sur ce point). Néanmoins, une telle altération, si elle existe, doit avoir des conséquences minimales sur le phénotype « myotubes ». En effet, les myotubes hybrides ne présentent aucune anomalies morphologiques ; de plus les nombreux marqueurs musculaires exprimés permettent de penser que la présence de noyaux hMADS dans les myotubes hybrides ne puisse être pas délétère.

Si parmi les protéines nucléaires codées par les noyaux hMADS, l'émerine et/ou les lamines A/C, protéines de l'enveloppe nucléaire, sont mis en évidence, on pourrait envisager d'utiliser

les cellules hMADS pour compléter leur absence d'expression dans les cas récessifs de dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss [270].

Perspective iii)

Afin d'évaluer la capacité des cellules hMADS de compléter l'absence d'expression des protéines de l'enveloppe nucléaire, des co-cultures avec des myoblastes provenant de souris invalidées pour les gènes lamin-A/C [271] ou émerine [272] sont envisagées. La formation de myotubes hybrides sera évaluée et l'expression des protéines citées sera étudiée dans les noyaux issus des myocytes.

VI.3 Fusion des cellules hMADS avec les myocytes

Chez les mammifères, la formation de syncytium par fusion cellulaire est un processus fondamental à la différenciation de types cellulaires bien connus c'est-à-dire les myocytes, les ostéoclastes et les macrophages « Giant cells » [273], les cellules trophoblastiques [274] et lors de la fécondation spermatozoïde/ovocyte [275]. Néanmoins, les mécanismes mis en jeu lors de la fusion des cellules de mammifères sont très peu connus. Les molécules de surface potentiellement impliquées dans la régulation de la fusion des cellules sont de deux catégories, celles exprimées de façon quasi-ubiquiste comme certaines intégrines [276-280] ou la connexine-43 [281-284], et celles qui présentent une expression tissulaire plus restreintes comme la M-Cadhérine [285, 286], la N-Cadhérine [287, 288] (exprimées par les myocytes) ou l' α -méltrine/ADAM-12 [278] et le CD9 [279, 289] (exprimées par l'ensemble des cellules à capacité fusogénique avérée).

D'autre part, les expériences de transfection des MRF dans les cellules fibroblastiques ont montré que suivant la lignée utilisée (NIH-3T3 versus C3H10T1/2), l'expression des marqueurs musculaires n'était pas associée obligatoirement à la fusion et la formation de myotubes [262, 290]. Des travaux récents ont renforcé cette idée que le contrôle de la fusion, passant par le facteur de transcription FOXO1, puisse être indépendant des MRF [291, 292].

Concernant nos résultats, une fraction des cellules hMADS fusionne avec les myocytes pour participer à la formation de myotubes.

Deux hypothèses seraient possibles pour expliquer cette fusion :

- 1) il existe une sous-population de cellules hMADS minoritaire plus fusogène. Si cette hypothèse est vraie, alors ces cellules devraient exprimer à leur surface des molécules impliquées potentiellement dans la fusion des cellules de mammifères.

- 2) toutes les cellules hMADS ont la même capacité fusogénique, capacité néanmoins faible. Si cette hypothèse est vraie, alors toutes les cellules hMADS exprimeraient une ou plusieurs molécules de surface impliquées potentiellement dans la fusion cellulaire.

Nos investigations bien que loin d'être exhaustives, n'ont pas permis de mettre en évidence une sous-population de cellules hMADS plus fusogène. Nous avons mis en évidence l'expression homogène de la β 1-intégrine, de la α 5-intégrine et de la connexine-43 par l'ensemble des cellules hMADS. A l'inverse, aucune cellule hMADS n'exprime la M-Cadhérine.

Enfin, notons également que l'expression ectopique dans les cellules hMADS par transfection de la forme dominant-active de FOXO1A [291] n'a pas permis à ces cellules de fusionner à confluence en milieu avec ou sans sérum (résultats non présentés).

Perspective iiiii)

Nous envisageons de poursuivre la prospection des molécules candidates de la fusion exprimées par les cellules hMADS afin de mieux appréhender leur fusion avec les myocytes. Enfin, nous envisageons d'étudier l'effet de la surexpression ou de l'expression ectopique de ces molécules profusion sur le rendement de la fusion. Dans le cas d'effet positif sur ce rendement, l'impact sur la conversion myogénique sera également abordé.

VII Conclusion

Bien que les cellules hMADS ne présentent pas de plasticité myogénique *per se*, ces cellules ont néanmoins un potentiel myogénique certain. Ce potentiel pour qu'il s'exprime, nécessite la présence obligatoire de myocytes en fusion. Par conséquent, on peut envisager d'exploiter ces cellules pour compléter les défauts génétiques des myopathies récessives dans lesquelles la différenciation myogénique n'est pas ou peu altérée.

Enfin, ce travail n'exclut pas dans le tissu adipeux humain, la présence de cellules souches adultes autres que les MSC, et capables d'une plasticité intrinsèque musculaire. En effet, à partir du muscle squelettique, les myoblastes sont couramment purifiés avec un haut rendement grâce à l'expression des marqueurs de surface N-CAM/CD56 ou M-Cadhérine. Il sera donc pertinent de vérifier la présence ou l'absence de cellules exprimant ces marqueurs dans le tissu adipeux et d'évaluer leur potentiel myogénique.

De par son importance quantitative, son accessibilité aisée (notamment le tissu adipeux sous-cutané) et l'image négative dont il bénéficie chez le grand public, ce tissu est un candidat de choix pour la contribution de cellules souches adultes aux perspectives de thérapies cellulaires.

VIII Références

1. Vickaryous MK, Hall BK. **Human cell type diversity, evolution, development, and classification with special reference to cells derived from the neural crest.** *Biol Rev Camb Philos Soc* 2006,81:425-455.
2. Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, *et al.* **Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain.** *Exp Neurol* 1999,156:333-344.
3. Westerlund U, Moe MC, Varghese M, *et al.* **Stem cells from the adult human brain develop into functional neurons in culture.** *Exp Cell Res* 2003,289:378-383.
4. Steindler DA, Pincus DW. **Stem cells and neurogenesis in the adult human brain.** *Lancet* 2002,359:1047-1054.
5. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, *et al.* **Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages.** *Nature* 2005,433:647-653.
6. Dawn B, Stein AB, Urbanek K, *et al.* **Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005,102:3766-3771.
7. Oyama T, Nagai T, Wada H, *et al.* **Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo.** *J Cell Biol* 2007,176:329-341.
8. Coles BL, Angenieux B, Inoue T, *et al.* **Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004,101:15772-15777.
9. Micklem HS, Lennon JE, Ansell JD, Gray RA. **Numbers and dispersion of repopulating hematopoietic cell clones in radiation chimeras as functions of injected cell dose.** *Exp Hematol* 1987,15:251-257.
10. Abkowitz JL, Golinelli D, Harrison DE, Gutter P. **In vivo kinetics of murine hemopoietic stem cells.** *Blood* 2000,96:3399-3405.
11. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. **Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro.** *J Cell Biochem* 1997,64:295-312.
12. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** *Science* 1999,284:143-147.
13. Bongso A, Tan S. **Human blastocyst culture and derivation of embryonic stem cell lines.** *Stem Cell Rev* 2005,1:87-98.
14. Hwang WS, Lee BC, Lee CK, Kang SK. **Human embryonic stem cells and therapeutic cloning.** *J Vet Sci* 2005,6:87-96.
15. Hwang WS, Lee BC, Lee CK, Kang SK. **Cloned human embryonic stem cells for tissue repair and transplantation.** *Stem Cell Rev* 2005,1:99-109.
16. Wang L, Duan E, Sung LY, Jeong BS, Yang X, Tian XC. **Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos.** *Biol Reprod* 2005,73:149-155.
17. Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, *et al.* **Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells.** *Nature* 2000,407:86-90.
18. Revel M. **Human reproductive cloning, embryo stem cells and germline gene intervention: an Israeli perspective.** *Med Law* 2003,22:701-732.
19. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. **Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis.** *J Clin Invest* 1996,98:2512-2523.

20. Hutcheson KA, Atkins BZ, Hueman MT, Hopkins MB, Glower DD, Taylor DA. **Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts.** *Cell Transplant* 2000,9:359-368.
21. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. **Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium.** *Pediatr Transplant* 2003,7 Suppl 3:86-88.
22. Tomita S, Li RK, Weisel RD, *et al.* **Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function.** *Circulation* 1999,100:II247-256.
23. Kucia M, Ratajczak MZ. **Stem cells as a two edged sword - from regeneration to tumor formation.** *J Physiol Pharmacol* 2006,57 Suppl 7:5-16.
24. Taupin P. **Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system: functionality and potential clinical interest.** *Med Sci Monit* 2005,11:RA247-252.
25. Smith C. **Hematopoietic stem cells and hematopoiesis.** *Cancer Control* 2003,10:9-16.
26. Han J, Cao S, Jin H, *et al.* **Localization of putative stem cells and four cell populations with different differentiation degree in mouse mammary anlagen.** *Histochem Cell Biol* 2006,126:35-43.
27. Oh SK, Kim HS, Ahn HJ, *et al.* **Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines: SNUhES1, SNUhES2, and SNUhES3.** *Stem Cells* 2005,23:211-219.
28. Johkura K, Cui L, Asanuma K, Okouchi Y, Ogiwara N, Sasaki K. **Cytochemical and ultrastructural characterization of growing colonies of human embryonic stem cells.** *J Anat* 2004,205:247-255.
29. Jouvion G, Rouger K, Fornasari B, *et al.* **Functional properties of muscle-derived cells related to morphological characteristics.** *Histochem Cell Biol* 2006,126:603-616.
30. Baharvand H, Matthaei KI. **The ultrastructure of mouse embryonic stem cells.** *Reprod Biomed Online* 2003,7:330-335.
31. Stewart R, Stojkovic M, Lako M. **Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells.** *Eur J Cancer* 2006,42:1257-1272.
32. Akala OO, Clarke MF. **Hematopoietic stem cell self-renewal.** *Curr Opin Genet Dev* 2006,16:496-501.
33. Molofsky AV, Pardal R, Morrison SJ. **Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal.** *Curr Opin Cell Biol* 2004,16:700-707.
34. Zwaka TP, Thomson JA. **Differentiation of human embryonic stem cells occurs through symmetric cell division.** *Stem Cells* 2005,23:146-149.
35. Karpowicz P, Morshead C, Kam A, *et al.* **Support for the immortal strand hypothesis: neural stem cells partition DNA asymmetrically in vitro.** *J Cell Biol* 2005,170:721-732.
36. Shinin V, Gayraud-Morel B, Gomes D, Tajbakhsh S. **Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells.** *Nat Cell Biol* 2006,8:677-687.
37. Conboy IM, Rando TA. **The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis.** *Dev Cell* 2002,3:397-409.
38. Potten CS, Owen G, Booth D. **Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands.** *J Cell Sci* 2002,115:2381-2388.
39. Smith GH. **Label-retaining epithelial cells in mouse mammary gland divide asymmetrically and retain their template DNA strands.** *Development* 2005,132:681-687.
40. Liu TM, Martina M, Hutmacher DW, *et al.* **Identification of Common Pathways Mediating Differentiation of Bone Marrow and Adipose Tissues Derived Human**

- Mesenchymal Stem Cells (MSCs) into Three Mesenchymal Lineages.** *Stem Cells* 2006.
41. Song L, Webb NE, Song Y, Tuan RS. **Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency.** *Stem Cells* 2006,24:1707-1718.
 42. Lee HK, Lee BH, Park SA, Kim CW. **The proteomic analysis of an adipocyte differentiated from human mesenchymal stem cells using two-dimensional gel electrophoresis.** *Proteomics* 2006,6:1223-1229.
 43. Wang D, Park JS, Chu JS, *et al.* **Proteomic profiling of bone marrow mesenchymal stem cells upon transforming growth factor beta1 stimulation.** *J Biol Chem* 2004,279:43725-43734.
 44. Ema H, Nakauchi H. **Self-renewal and lineage restriction of hematopoietic stem cells.** *Curr Opin Genet Dev* 2003,13:508-512.
 45. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. **Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model.** *J Cell Sci* 2000,113 (Pt 7):1161-1166.
 46. Dani C, Casteilla L. **[Adipose tissue: Mr Hyde obesity and Dr Jekyll regenerative medicine].** *Med Sci (Paris)* 2006,22:928-929.
 47. Gotherstrom C, West A, Liden J, Uzunel M, Lahesmaa R, Le Blanc K. **Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells.** *Haematologica* 2005,90:1017-1026.
 48. Guillot PV, Gotherstrom C, Chan J, Kurata H, Fisk NM. **Human first trimester fetal mesenchymal stem cells (MSC) express pluripotency markers, grow faster, and have longer telomeres compared to adult MSC.** *Stem Cells* 2006.
 49. Chan J, O'Donoghue K, Gavina M, *et al.* **Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration.** *Stem Cells* 2006,24:1879-1891.
 50. O'Donoghue K, Chan J, de la Fuente J, *et al.* **Microchimerism in female bone marrow and bone decades after fetal mesenchymal stem-cell trafficking in pregnancy.** *Lancet* 2004,364:179-182.
 51. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. **Stem cells: hype and reality.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002:369-391.
 52. Peault B. **[Stem cells: a vast descent...of theories].** *Pathol Biol (Paris)* 2004,52:123-126.
 53. Song L, Tuan RS. **Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow.** *Faseb J* 2004,18:980-982.
 54. de la Fuente R, Abad JL, Garcia-Castro J, *et al.* **Dedifferentiated adult articular chondrocytes: a population of human multipotent primitive cells.** *Exp Cell Res* 2004,297:313-328.
 55. Real C, Glavieux-Pardanaud C, Le Douarin NM, Dupin E. **Clonally cultured differentiated pigment cells can dedifferentiate and generate multipotent progenitors with self-renewing potential.** *Dev Biol* 2006,300:656-669.
 56. Ishikawa F, Shimazu H, Shultz LD, *et al.* **Purified human hematopoietic stem cells contribute to the generation of cardiomyocytes through cell fusion.** *Faseb J* 2006,20:950-952.
 57. Garbade J, Schubert A, Rastan AJ, *et al.* **Fusion of bone marrow-derived stem cells with cardiomyocytes in a heterologous in vitro model.** *Eur J Cardiothorac Surg* 2005,28:685-691.

58. Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, *et al.* **Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003,100:2397-2402.
59. Terada N, Hamazaki T, Oka M, *et al.* **Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion.** *Nature* 2002,416:542-545.
60. Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. **Changing potency by spontaneous fusion.** *Nature* 2002,416:545-548.
61. Lassalle B, Bastos H, Louis JP, *et al.* **'Side Population' cells in adult mouse testis express Bcrp1 gene and are enriched in spermatogonia and germinal stem cells.** *Development* 2004,131:479-487.
62. Larderet G, Fortunel NO, Vaigot P, *et al.* **Human side population keratinocytes exhibit long-term proliferative potential and a specific gene expression profile and can form a pluristratified epidermis.** *Stem Cells* 2006,24:965-974.
63. Kondo T, Setoguchi T, Taga T. **Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004,101:781-786.
64. Kato K, Yoshimoto M, Adachi S, *et al.* **Characterization of side-population cells in human normal endometrium.** *Hum Reprod* 2007.
65. Redvers RP, Li A, Kaur P. **Side population in adult murine epidermis exhibits phenotypic and functional characteristics of keratinocyte stem cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006,103:13168-13173.
66. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, *et al.* **The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype.** *Nat Med* 2001,7:1028-1034.
67. Mouthon MA, Fouchet P, Mathieu C, *et al.* **Neural stem cells from mouse forebrain are contained in a population distinct from the 'side population'.** *J Neurochem* 2006,99:807-817.
68. Charriere GM, Cousin B, Arnaud E, *et al.* **Macrophage characteristics of stem cells revealed by transcriptome profiling.** *Exp Cell Res* 2006,312:3205-3214.
69. Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, *et al.* **Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse.** *J Exp Med* 2005,201:1397-1405.
70. Le Blanc K, Ringden O. **Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation.** *Biol Blood Marrow Transplant* 2005,11:321-334.
71. Rasmusson I. **Immune modulation by mesenchymal stem cells.** *Exp Cell Res* 2006,312:2169-2179.
72. Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F, *et al.* **Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004,315:255-263.
73. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, *et al.* **Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep.** *Nat Med* 2000,6:1282-1286.
74. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, *et al.* **Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells.** *Stem Cells* 2006,24:386-398.
75. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, *et al.* **Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy.** *Blood* 2005,106:1755-1761.
76. Aggarwal S, Pittenger MF. **Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses.** *Blood* 2005,105:1815-1822.

77. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, *et al.* **T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression.** *J Biomed Sci* 2005,12:47-57.
78. Batten P, Sarathchandra P, Antoniw JW, *et al.* **Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: relevance to tissue engineering human heart valves.** *Tissue Eng* 2006,12:2263-2273.
79. Groh ME, Maitra B, Szekely E, Koc ON. **Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells.** *Exp Hematol* 2005,33:928-934.
80. Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E. **Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months.** *Curr Opin Immunol* 2000,12:731-737.
81. Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J, Colmenero I, Ramirez M, Bueren JA. **Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease.** *Stem Cells* 2006,24:2582-2591.
82. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, *et al.* **Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction.** *N Engl J Med* 2001,344:1750-1757.
83. Smith RR, Barile L, Cho HC, *et al.* **Regenerative Potential of Cardiosphere-Derived Cells Expanded From Percutaneous Endomyocardial Biopsy Specimens.** *Circulation* 2007.
84. Meckert PC, Rivello HG, Vigliano C, Gonzalez P, Favalaro R, Laguens R. **Endomitosis and polyploidization of myocardial cells in the periphery of human acute myocardial infarction.** *Cardiovasc Res* 2005,67:116-123.
85. Luo J, Daniels SB, Lennington JB, Notti RQ, Conover JC. **The aging neurogenic subventricular zone.** *Aging Cell* 2006,5:139-152.
86. Conde JR, Streit WJ. **Microglia in the aging brain.** *J Neuropathol Exp Neurol* 2006,65:199-203.
87. Carlson BM. **Some principles of regeneration in mammalian systems.** *Anat Rec B New Anat* 2005,287:4-13.
88. Borisov AB. **Regeneration of skeletal and cardiac muscle in mammals: do nonprimate models resemble human pathology?** *Wound Repair Regen* 1999,7:26-35.
89. Slack JM. **Amphibian muscle regeneration--dedifferentiation or satellite cells?** *Trends Cell Biol* 2006,16:273-275.
90. Bryant SV, Endo T, Gardiner DM. **Vertebrate limb regeneration and the origin of limb stem cells.** *Int J Dev Biol* 2002,46:887-896.
91. Odelberg SJ, Kollhoff A, Keating MT. **Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by *msx1*.** *Cell* 2000,103:1099-1109.
92. Kocafee YC, Israeli D, Ozguc M, Danos O, Garcia L. **Myogenic program induction in mature fat tissue (with MyoD expression).** *Exp Cell Res* 2005,308:300-308.
93. Rosania GR, Chang YT, Perez O, *et al.* **Myoseverin, a microtubule-binding molecule with novel cellular effects.** *Nat Biotechnol* 2000,18:304-308.
94. Chen S, Zhang Q, Wu X, Schultz PG, Ding S. **Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule.** *J Am Chem Soc* 2004,126:410-411.
95. Hayflick L, Moorhead PS. **The serial cultivation of human diploid cell strains.** *Exp Cell Res* 1961,25:585-621.
96. Hayflick L. **The cell biology of aging.** *Clin Geriatr Med* 1985,1:15-27.
97. Stanley JF, Pye D, MacGregor A. **Comparison of doubling numbers attained by cultured animal cells with life span of species.** *Nature* 1975,255:158-159.

98. Soldstein S. **Aging in vitro. Growth of cultured cells from the Galapagos tortoise.** *Exp Cell Res* 1974,83:297-302.
99. Rohme D. **Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981,78:5009-5013.
100. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, *et al.* **Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells.** *Nature* 1988,336:684-687.
101. Gough NM, Williams RL, Hilton DJ, *et al.* **LIF: a molecule with divergent actions on myeloid leukaemic cells and embryonic stem cells.** *Reprod Fertil Dev* 1989,1:281-288.
102. Zaragosi LE, Ailhaud G, Dani C. **Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells.** *Stem Cells* 2006,24:2412-2419.
103. Zeng X, Rao MS. **Human embryonic stem cells: long term stability, absence of senescence and a potential cell source for neural replacement.** *Neuroscience* 2006.
104. Sherwood SW, Rush D, Ellsworth JL, Schimke RT. **Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988,85:9086-9090.
105. Goldstein S. **Replicative senescence: the human fibroblast comes of age.** *Science* 1990,249:1129-1133.
106. Cristofalo VJ, Pignolo RJ. **Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture.** *Physiol Rev* 1993,73:617-638.
107. Bayreuther K, Rodemann HP, Hommel R, Dittmann K, Albiez M, Franz PI. **Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988,85:5112-5116.
108. Dimri GP, Lee X, Basile G, *et al.* **A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995,92:9363-9367.
109. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. **Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells.** *J Cell Sci* 2000,113 (Pt 20):3613-3622.
110. Gerland LM, Peyrol S, Lallemand C, Branche R, Magaud JP, Ffrench M. **Association of increased autophagic inclusions labeled for beta-galactosidase with fibroblastic aging.** *Exp Gerontol* 2003,38:887-895.
111. Gonos ES, Derventzi A, Kveiborg M, *et al.* **Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence.** *Exp Cell Res* 1998,240:66-74.
112. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. **Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.** *Nature* 1990,345:458-460.
113. Houtgraaf JH, Versmissen J, van der Giessen WJ. **A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells.** *Cardiovasc Revasc Med* 2006,7:165-172.
114. Itahana K, Dimri G, Campisi J. **Regulation of cellular senescence by p53.** *Eur J Biochem* 2001,268:2784-2791.
115. Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE. **A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence.** *Exp Cell Res* 1991,196:33-39.
116. Martindale JL, Holbrook NJ. **Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival.** *J Cell Physiol* 2002,192:1-15.
117. Shay JW, Wright WE. **Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase.** *Carcinogenesis* 2005,26:867-874.
118. Green H, Kehinde O. **Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells.** *Cell* 1976,7:105-113.

119. Yaffe D, Saxel O. **Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle.** *Nature* 1977,270:725-727.
120. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, *et al.* **Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage.** *J Cell Biol* 1994,127:1755-1766.
121. Grimaldi PA, Teboul L, Inadera H, Gaillard D, Amri EZ. **Trans-differentiation of myoblasts to adipoblasts: triggering effects of fatty acids and thiazolidinediones.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997,57:71-75.
122. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. **Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line.** *J Cell Biol* 1988,106:761-771.
123. Allen-Hoffmann BL, Schlosser SJ, Ivarie CA, Sattler CA, Meisner LF, O'Connor SL. **Normal growth and differentiation in a spontaneously immortalized near-diploid human keratinocyte cell line, NIKS.** *J Invest Dermatol* 2000,114:444-455.
124. Rosler ES, Fisk GJ, Ares X, *et al.* **Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions.** *Dev Dyn* 2004,229:259-274.
125. Kolquist KA, Ellisen LW, Counter CM, *et al.* **Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues.** *Nat Genet* 1998,19:182-186.
126. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, *et al.* **Spontaneous human adult stem cell transformation.** *Cancer Res* 2005,65:3035-3039.
127. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. **Aging of mesenchymal stem cell in vitro.** *BMC Cell Biol* 2006,7:14.
128. Rajaraman R, Guernsey DL, Rajaraman MM, Rajaraman SR. **Stem cells, senescence, neosis and self-renewal in cancer.** *Cancer Cell Int* 2006,6:25.
129. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. **Osteogenesis in transplants of bone marrow cells.** *J Embryol Exp Morphol* 1966,16:381-390.
130. Caplan AI. **Mesenchymal stem cells.** *J Orthop Res* 1991,9:641-650.
131. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. **Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers.** *Cell Tissue Kinet* 1987,20:263-272.
132. Halleux C, Sottile V, Gasser JA, Seuwen K. **Multi-lineage potential of human mesenchymal stem cells following clonal expansion.** *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2001,2:71-76.
133. Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, Seuwen K. **Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells.** *Bone* 2002,30:699-704.
134. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. **Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle.** *Cell Tissue Res* 2006.
135. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. **Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues.** *J Cell Sci* 2006,119:2204-2213.
136. Seo BM, Miura M, Gronthos S, *et al.* **Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament.** *Lancet* 2004,364:149-155.
137. De Coppi P, Pozzobon M, Piccoli M, *et al.* **Isolation of mesenchymal stem cells from human vermiform appendix.** *J Surg Res* 2006,135:85-91.
138. Seeberger KL, Dufour JM, Shapiro AM, Lakey JR, Rajotte RV, Korbitt GS. **Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium.** *Lab Invest* 2006,86:141-153.

139. Sabatini F, Petecchia L, Tavian M, Jodon de Villeroche V, Rossi GA, Brouty-Boye D. **Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities.** *Lab Invest* 2005,85:962-971.
140. Phipps RP, Borrello MA, Blieden TM. **Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues.** *J Periodontal Res* 1997,32:159-165.
141. Fries KM, Blieden T, Looney RJ, *et al.* **Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis.** *Clin Immunol Immunopathol* 1994,72:283-292.
142. Chang HY, Chi JT, Dudoit S, *et al.* **Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002,99:12877-12882.
143. Ko SD, Page RC, Narayanan AS. **Fibroblast heterogeneity and prostaglandin regulation of subpopulations.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977,74:3429-3432.
144. Korn JH, Torres D, Downie E. **Clonal heterogeneity in the fibroblast response to mononuclear cell derived mediators.** *Arthritis Rheum* 1984,27:174-179.
145. Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, *et al.* **Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells.** 2007,advanced online publication.
146. Tavian M, Zheng B, Oberlin E, *et al.* **The vascular wall as a source of stem cells.** *Ann N Y Acad Sci* 2005,1044:41-50.
147. Hirschi KK, D'Amore PA. **Pericytes in the microvasculature.** *Cardiovasc Res* 1996,32:687-698.
148. Shepro D, Morel NM. **Pericyte physiology.** *Faseb J* 1993,7:1031-1038.
149. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. **Endothelial/pericyte interactions.** *Circ Res* 2005,97:512-523.
150. Nayak RC, Berman AB, George KL, Eisenbarth GS, King GL. **A monoclonal antibody (3G5)-defined ganglioside antigen is expressed on the cell surface of microvascular pericytes.** *J Exp Med* 1988,167:1003-1015.
151. Helmbold P, Nayak RC, Marsch WC, Herman IM. **Isolation and in vitro characterization of human dermal microvascular pericytes.** *Microvasc Res* 2001,61:160-165.
152. Helmbold P, Wohlrab J, Marsch WC, Nayak RC. **Human dermal pericytes express 3G5 ganglioside--a new approach for microvessel histology in the skin.** *J Cutan Pathol* 2001,28:206-210.
153. Herman IM, D'Amore PA. **Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins.** *J Cell Biol* 1985,101:43-52.
154. Nehls V, Drenckhahn D. **Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin.** *J Cell Biol* 1991,113:147-154.
155. Schor AM, Allen TD, Canfield AE, Sloan P, Schor SL. **Pericytes derived from the retinal microvasculature undergo calcification in vitro.** *J Cell Sci* 1990,97 (Pt 3):449-461.
156. Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ, Ashton BA, Griffin-Jones C, Canfield AE. **Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes.** *Circulation* 2004,110:2226-2232.
157. Wosnitza M, Hemmrich K, Groger A, Graber S, Pallua N. **Plasticity of human adipose stem cells to perform adipogenic and endothelial differentiation.** *Differentiation* 2007,75:12-23.
158. Wu X, Huang L, Zhou Q, *et al.* **Mesenchymal stem cells participating in ex vivo endothelium repair and its effect on vascular smooth muscle cells growth.** *Int J Cardiol* 2005,105:274-282.

159. Tang J, Xie Q, Pan G, Wang J, Wang M. **Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion.** *Eur J Cardiothorac Surg* 2006,30:353-361.
160. Wang JA, Fan YQ, Li CL, He H, Sun Y, Lv BJ. **Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplanted into damaged rabbit heart to improve heart function.** *J Zhejiang Univ Sci B* 2005,6:242-248.
161. Galmiche MC, Koteliansky VE, Briere J, Herve P, Charbord P. **Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway.** *Blood* 1993,82:66-76.
162. Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, *et al.* **Sphingosylphosphorylcholine induces differentiation of human mesenchymal stem cells into smooth-muscle-like cells through a TGF-beta-dependent mechanism.** *J Cell Sci* 2006,119:4994-5005.
163. Rodriguez LV, Alfonso Z, Zhang R, Leung J, Wu B, Ignarro LJ. **Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006,103:12167-12172.
164. Ross JJ, Hong Z, Willenbring B, *et al.* **Cytokine-induced differentiation of multipotent adult progenitor cells into functional smooth muscle cells.** *J Clin Invest* 2006,116:3139-3149.
165. Hegner B, Weber M, Dragun D, Schulze-Lohoff E. **Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.** *J Hypertens* 2005,23:1191-1202.
166. Urbich C, Dimmeler S. **Endothelial progenitor cells functional characterization.** *Trends Cardiovasc Med* 2004,14:318-322.
167. Ogawa M, LaRue AC, Drake CJ. **Hematopoietic origin of fibroblasts/myofibroblasts: Its pathophysiologic implications.** *Blood* 2006,108:2893-2896.
168. LaRue AC, Masuya M, Ebihara Y, *et al.* **Hematopoietic origins of fibroblasts: I. In vivo studies of fibroblasts associated with solid tumors.** *Exp Hematol* 2006,34:208-218.
169. Ebihara Y, Masuya M, Larue AC, *et al.* **Hematopoietic origins of fibroblasts: II. In vitro studies of fibroblasts, CFU-F, and fibrocytes.** *Exp Hematol* 2006,34:219-229.
170. Mauro A. **Satellite cell of skeletal muscle fibers.** *J Biophys Biochem Cytol* 1961,9:493-495.
171. Ogawa T, Ohmura M, Ohbo K. **The niche for spermatogonial stem cells in the mammalian testis.** *Int J Hematol* 2005,82:381-388.
172. Osawa T. **Regeneration of the epidermis and mucosal epithelium on the basement membranes.** *Med Electron Microsc* 2003,36:193-203.
173. Wilson A, Trumpp A. **Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches.** *Nat Rev Immunol* 2006,6:93-106.
174. Yin T, Li L. **The stem cell niches in bone.** *J Clin Invest* 2006,116:1195-1201.
175. Jenniskens GJ, Veerkamp JH, van Kuppevelt TH. **Heparan sulfates in skeletal muscle development and physiology.** *J Cell Physiol* 2006,206:283-294.
176. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. **Socializing with the neighbors: stem cells and their niche.** *Cell* 2004,116:769-778.
177. Boya J. **An ultrastructural study of the relationship between pericytes and cerebral macrophages.** *Acta Anat (Basel)* 1976,95:598-608.
178. Lafarga M, Palacios G. **Ultrastructural study of pericytes in the rat supraoptic nucleus.** *J Anat* 1975,120:433-438.
179. Thomas WE. **Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells.** *Brain Res Brain Res Rev* 1999,31:42-57.

180. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, *et al.* **Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement.** *Cytotherapy* 2005,7:393-395.
181. Keating A. **Mesenchymal stromal cells.** *Curr Opin Hematol* 2006,13:419-425.
182. Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC. **SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow.** *Blood* 2006.
183. Cinti S. **The adipose organ.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005,73:9-15.
184. Nakajima I, Yamaguchi T, Ozutsumi K, Aso H. **Adipose tissue extracellular matrix: newly organized by adipocytes during differentiation.** *Differentiation* 1998,63:193-200.
185. Ailhaud G. **Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome.** *C R Biol* 2006,329:570-577; discussion 653-575.
186. Chudek J, Adamczak M, Nieszporek T, Wiecek A. **The adipose tissue as an endocrine organ--a nephrologists' perspective.** *Contrib Nephrol* 2006,151:70-90.
187. Corre J, Planat-Benard V, Corberand JX, Penicaud L, Casteilla L, Laharrague P. **Human bone marrow adipocytes support complete myeloid and lymphoid differentiation from human CD34 cells.** *Br J Haematol* 2004,127:344-347.
188. Cheng L, Qasba P, Vanguri P, Thiede MA. **Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34(+) hematopoietic progenitor cells.** *J Cell Physiol* 2000,184:58-69.
189. Mbalaviele G, Jaiswal N, Meng A, Cheng L, Van Den Bos C, Thiede M. **Human mesenchymal stem cells promote human osteoclast differentiation from CD34+ bone marrow hematopoietic progenitors.** *Endocrinology* 1999,140:3736-3743.
190. Sell H, Deshaies Y, Richard D. **The brown adipocyte: update on its metabolic role.** *Int J Biochem Cell Biol* 2004,36:2098-2104.
191. Le Lievre CS, Le Douarin NM. **Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos.** *J Embryol Exp Morphol* 1975,34:125-154.
192. Brooke MH, Kaiser KK. **Muscle fiber types: how many and what kind?** *Arch Neurol* 1970,23:369-379.
193. Ashmore CR, Doerr L. **Comparative aspects of muscle fiber types in different species.** *Exp Neurol* 1971,31:408-418.
194. Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE. **Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits.** *Biochemistry* 1972,11:2627-2633.
195. Franch HA, Price SR. **Molecular signaling pathways regulating muscle proteolysis during atrophy.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005,8:271-275.
196. Wanek LJ, Snow MH. **Activity-induced fiber regeneration in rat soleus muscle.** *Anat Rec* 2000,258:176-185.
197. Dupont-Versteegden EE. **Apoptosis in skeletal muscle and its relevance to atrophy.** *World J Gastroenterol* 2006,12:7463-7466.
198. Nader GA. **Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together.** *Int J Biochem Cell Biol* 2005,37:1985-1996.
199. Appell HJ, Forsberg S, Hollmann W. **Satellite cell activation in human skeletal muscle after training: evidence for muscle fiber neof ormation.** *Int J Sports Med* 1988,9:297-299.
200. Ussing HH, Zerahn K. **Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. Reprinted from Acta. Physiol. Scand. 23: 110-127, 1951.** *J Am Soc Nephrol* 1999,10:2056-2065.

201. Carson JA, Nettleton D, Reecy JM. **Differential gene expression in the rat soleus muscle during early work overload-induced hypertrophy.** *Faseb J* 2002,16:207-209.
202. Kjaer M, Magnusson P, Krogsgaard M, *et al.* **Extracellular matrix adaptation of tendon and skeletal muscle to exercise.** *J Anat* 2006,208:445-450.
203. Bloor CM. **Angiogenesis during exercise and training.** *Angiogenesis* 2005,8:263-271.
204. Stauber WT, Smith CA. **Cellular responses in exertion-induced skeletal muscle injury.** *Mol Cell Biochem* 1998,179:189-196.
205. McGeachie JK, Grounds MD. **The timing between skeletal muscle myoblast replication and fusion into myotubes, and the stability of regenerated dystrophic myofibres: an autoradiographic study in mdx mice.** *J Anat* 1999,194 (Pt 2):287-295.
206. Childers MK, Okamura CS, Bogan DJ, Bogan JR, Sullivan MJ, Kornegay JN. **Myofiber injury and regeneration in a canine homologue of Duchenne muscular dystrophy.** *Am J Phys Med Rehabil* 2001,80:175-181.
207. Plant DR, Colarossi FE, Lynch GS. **Notexin causes greater myotoxic damage and slower functional repair in mouse skeletal muscles than bupivacaine.** *Muscle Nerve* 2006,34:577-585.
208. Toyota N, Shimada Y. **Isoforms of troponin during regeneration of chicken skeletal muscle fibers after cold injury.** *Cell Tissue Res* 1984,236:549-554.
209. Lefaucheur JP, Sebille A. **The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury.** *Neuromuscul Disord* 1995,5:501-509.
210. Schmalbruch H, Lewis DM. **Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles.** *Muscle Nerve* 2000,23:617-626.
211. Collins CA, Olsen I, Zammit PS, *et al.* **Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche.** *Cell* 2005,122:289-301.
212. Charge SB, Rudnicki MA. **Cellular and molecular regulation of muscle regeneration.** *Physiol Rev* 2004,84:209-238.
213. Dhawan J, Rando TA. **Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment.** *Trends Cell Biol* 2005,15:666-673.
214. Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, *et al.* **Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth.** *J Cell Biol* 2003,163:1133-1143.
215. Sonnet C, Lafuste P, Arnold L, *et al.* **Human macrophages rescue myoblasts and myotubes from apoptosis through a set of adhesion molecular systems.** *J Cell Sci* 2006,119:2497-2507.
216. Collins CA. **Satellite cell self-renewal.** *Curr Opin Pharmacol* 2006,6:301-306.
217. Tiainen M, Pajalunga D, Ferrantelli F, *et al.* **Terminally differentiated skeletal myotubes are not confined to G0 but can enter G1 upon growth factor stimulation.** *Cell Growth Differ* 1996,7:1039-1050.
218. Vracko R, Benditt EP. **Basal lamina: the scaffold for orderly cell replacement. Observations on regeneration of injured skeletal muscle fibers and capillaries.** *J Cell Biol* 1972,55:406-419.
219. Wada MR, Inagawa-Ogashiwa M, Shimizu S, Yasumoto S, Hashimoto N. **Generation of different fates from multipotent muscle stem cells.** *Development* 2002,129:2987-2995.
220. Shefer G, Wleklinski-Lee M, Yablonka-Reuveni Z. **Skeletal muscle satellite cells can spontaneously enter an alternative mesenchymal pathway.** *J Cell Sci* 2004,117:5393-5404.

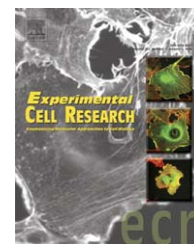
221. De Coppi P, Milan G, Scarda A, *et al.* **Rosiglitazone modifies the adipogenic potential of human muscle satellite cells.** *Diabetologia* 2006,49:1962-1973.
222. Yamanouchi K, Hosoyama T, Murakami Y, Nishihara M. **Myogenic and Adipogenic Properties of Goat Skeletal Muscle Stem Cells.** *J Reprod Dev* 2006.
223. Yada E, Yamanouchi K, Nishihara M. **Adipogenic potential of satellite cells from distinct skeletal muscle origins in the rat.** *J Vet Med Sci* 2006,68:479-486.
224. Yamanouchi K, Yada E, Ishiguro N, Hosoyama T, Nishihara M. **Increased adipogenicity of cells from regenerating skeletal muscle.** *Exp Cell Res* 2006,312:2701-2711.
225. Rosenblatt JD, Lunt AI, Parry DJ, Partridge TA. **Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants.** *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1995,31:773-779.
226. Bonavaud S, Agbulut O, D'Honneur G, Nizard R, Mouly V, Butler-Browne G. **Preparation of isolated human muscle fibers: a technical report.** *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2002,38:66-72.
227. Sekiguchi M. **The role of dystrophin in the central nervous system: a mini review.** *Acta Myol* 2005,24:93-97.
228. Aartsma-Rus A, Van Deutekom JC, Fokkema IF, Van Ommen GJ, Den Dunnen JT. **Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule.** *Muscle Nerve* 2006,34:135-144.
229. Matsumura K, Tome FM, Ionasescu V, *et al.* **Deficiency of dystrophin-associated proteins in Duchenne muscular dystrophy patients lacking COOH-terminal domains of dystrophin.** *J Clin Invest* 1993,92:866-871.
230. Ohlendieck K, Matsumura K, Ionasescu VV, *et al.* **Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma.** *Neurology* 1993,43:795-800.
231. Cooper RN, Butler-Browne GS, Mouly V. **Human muscle stem cells.** *Curr Opin Pharmacol* 2006,6:295-300.
232. Price FD, Kuroda K, Rudnicki MA. **Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy.** *Biochim Biophys Acta* 2007,1772:272-283.
233. Quenneville SP, Chapdelaine P, Skuk D, *et al.* **Autologous transplantation of muscle precursor cells modified with a lentivirus for muscular dystrophy: human cells and primate models.** *Mol Ther* 2007,15:431-438.
234. Quenneville SP, Chapdelaine P, Rousseau J, Tremblay JP. **Dystrophin expression in host muscle following transplantation of muscle precursor cells modified with the phiC31 integrase.** *Gene Ther* 2006.
235. Li S, Kimura E, Fall BM, *et al.* **Stable transduction of myogenic cells with lentiviral vectors expressing a minidystrophin.** *Gene Ther* 2005,12:1099-1108.
236. Roberts ML, Wells DJ, Graham IR, *et al.* **Stable micro-dystrophin gene transfer using an integrating adeno-retroviral hybrid vector ameliorates the dystrophic pathology in mdx mouse muscle.** *Hum Mol Genet* 2002,11:1719-1730.
237. Murakami T, Nishi T, Kimura E, *et al.* **Full-length dystrophin cDNA transfer into skeletal muscle of adult mdx mice by electroporation.** *Muscle Nerve* 2003,27:237-241.
238. Zhang G, Ludtke JJ, Thioudellet C, *et al.* **Intraarterial delivery of naked plasmid DNA expressing full-length mouse dystrophin in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy.** *Hum Gene Ther* 2004,15:770-782.
239. Judge LM, Chamberlain JS. **Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy: AAV leads the way.** *Acta Myol* 2005,24:184-193.

240. Athanasopoulos T, Graham IR, Foster H, Dickson G. **Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors as therapeutic tools for Duchenne muscular dystrophy (DMD).** *Gene Ther* 2004,11 Suppl 1:S109-121.
241. Braun S. **Naked plasmid DNA for the treatment of muscular dystrophy.** *Curr Opin Mol Ther* 2004,6:499-505.
242. Goyenvalle A, Vulin A, Fougereuse F, *et al.* **Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping.** *Science* 2004,306:1796-1799.
243. Lu QL, Mann CJ, Lou F, *et al.* **Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse.** *Nat Med* 2003,9:1009-1014.
244. Cooper BJ. **Animal models of Duchenne and Becker muscular dystrophy.** *Br Med Bull* 1989,45:703-718.
245. Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, *et al.* **Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of mdx mice.** *J Biochem (Tokyo)* 2003,134:751-758.
246. Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL. **Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice.** *J Clin Invest* 1999,104:375-381.
247. Aurino S, Nigro V. **Readthrough strategies for stop codons in Duchenne muscular dystrophy.** *Acta Myol* 2006,25:5-12.
248. Howard MT, Anderson CB, Fass U, *et al.* **Readthrough of dystrophin stop codon mutations induced by aminoglycosides.** *Ann Neurol* 2004,55:422-426.
249. Howard MT, Shirts BH, Petros LM, Flanigan KM, Gesteland RF, Atkins JF. **Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop codon readthrough: potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy.** *Ann Neurol* 2000,48:164-169.
250. Kimura S, Ito K, Miyagi T, *et al.* **A novel approach to identify Duchenne muscular dystrophy patients for aminoglycoside antibiotics therapy.** *Brain Dev* 2005,27:400-405.
251. Politano L, Nigro G, Nigro V, *et al.* **Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results.** *Acta Myol* 2003,22:15-21.
252. Bonuccelli G, Sotgia F, Schubert W, *et al.* **Proteasome inhibitor (MG-132) treatment of mdx mice rescues the expression and membrane localization of dystrophin and dystrophin-associated proteins.** *Am J Pathol* 2003,163:1663-1675.
253. Assereto S, Stringara S, Sotgia F, *et al.* **Pharmacological rescue of the dystrophin-glycoprotein complex in Duchenne and Becker skeletal muscle explants by proteasome inhibitor treatment.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2006,290:C577-582.
254. Loewen N, Poeschla EM. **Lentiviral vectors.** *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005,99:169-191.
255. Chevalier-Mariette C, Henry I, Montfort L, *et al.* **CpG content affects gene silencing in mice: evidence from novel transgenes.** *Genome Biol* 2003,4:R53.
256. Zhang XY, La Russa VF, Bao L, Kolls J, Schwarzenberger P, Reiser J. **Lentiviral vectors for sustained transgene expression in human bone marrow-derived stromal cells.** *Mol Ther* 2002,5:555-565.
257. Piersanti S, Sacchetti B, Funari A, *et al.* **Lentiviral transduction of human postnatal skeletal (stromal, mesenchymal) stem cells: in vivo transplantation and gene silencing.** *Calcif Tissue Int* 2006,78:372-384.
258. Van Damme A, Thorrez L, Ma L, *et al.* **Efficient lentiviral transduction and improved engraftment of human bone marrow mesenchymal cells.** *Stem Cells* 2006,24:896-907.

259. Zaragosi LE, Billon N, Ailhaud G, Dani C. **Nucleofection is a valuable transfection method for transient and stable transgene expression in adipose tissue-derived stem cells.** *Stem Cells* 2006.
260. Rochat A, Fernandez A, Vandromme M, *et al.* **Insulin and wnt1 pathways cooperate to induce reserve cell activation in differentiation and myotube hypertrophy.** *Mol Biol Cell* 2004,15:4544-4555.
261. Ridgeway AG, Petropoulos H, Wilton S, Skerjanc IS. **Wnt signaling regulates the function of MyoD and myogenin.** *J Biol Chem* 2000,275:32398-32405.
262. Russo S, Tomatis D, Collo G, Tarone G, Tato F. **Myogenic conversion of NIH3T3 cells by exogenous MyoD family members: dissociation of terminal differentiation from myotube formation.** *J Cell Sci* 1998,111 (Pt 6):691-700.
263. Ohkawa Y, Marfella CG, Imbalzano AN. **Skeletal muscle specification by myogenin and Mef2D via the SWI/SNF ATPase Brg1.** *Embo J* 2006,25:490-501.
264. Balana B, Nicoletti C, Zahanich I, *et al.* **5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells.** *Cell Res* 2006,16:949-960.
265. Chan J, O'Donoghue K, Gavina M, *et al.* **Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration.** *Stem Cells* 2006.
266. Wakitani S, Saito T, Caplan AI. **Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine.** *Muscle Nerve* 1995,18:1417-1426.
267. Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EK. **Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes.** *Ann Thorac Surg* 2003,75:775-779.
268. Hirayama E, Udaka Y, Kawai T, Kim J. **Characterization of heterokaryons between skeletal myoblasts and somatic cells formed by fusion with HVJ (Sendai virus); effects on myogenic differentiation.** *Cell Struct Funct* 2001,26:37-47.
269. Terranova R, Pereira CF, Du Roure C, Merckenschlager M, Fisher AG. **Acquisition and extinction of gene expression programs are separable events in heterokaryon reprogramming.** *J Cell Sci* 2006,119:2065-2072.
270. Morris GE. **The role of the nuclear envelope in Emery-Dreifuss muscular dystrophy.** *Trends Mol Med* 2001,7:572-577.
271. Frock RL, Kudlow BA, Evans AM, Jameson SA, Hauschka SD, Kennedy BK. **Lamin A/C and emerin are critical for skeletal muscle satellite cell differentiation.** *Genes Dev* 2006,20:486-500.
272. Melcon G, Kozlov S, Cutler DA, *et al.* **Loss of emerin at the nuclear envelope disrupts the Rb1/E2F and MyoD pathways during muscle regeneration.** *Hum Mol Genet* 2006,15:637-651.
273. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. **Osteoclast differentiation and activation.** *Nature* 2003,423:337-342.
274. Potgens AJ, Schmitz U, Bose P, Versmold A, Kaufmann P, Frank HG. **Mechanisms of syncytial fusion: a review.** *Placenta* 2002,23 Suppl A:S107-113.
275. Kaji K, Kudo A. **The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals.** *Reproduction* 2004,127:423-429.
276. Cachaco AS, Pereira CS, Pardal RG, Bajanca F, Thorsteinsdottir S. **Integrin repertoire on myogenic cells changes during the course of primary myogenesis in the mouse.** *Dev Dyn* 2005,232:1069-1078.
277. Lafuste P, Sonnet C, Chazaud B, *et al.* **ADAM12 and alpha9beta1 integrin are instrumental in human myogenic cell differentiation.** *Mol Biol Cell* 2005,16:861-870.

278. Brzoska E, Bello V, Darribere T, Moraczewski J. **Integrin alpha3 subunit participates in myoblast adhesion and fusion in vitro.** *Differentiation* 2006,74:105-118.
279. Schwander M, Leu M, Stumm M, *et al.* **Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly.** *Dev Cell* 2003,4:673-685.
280. Hirsch E, Lohikangas L, Gullberg D, Johansson S, Fassler R. **Mouse myoblasts can fuse and form a normal sarcomere in the absence of beta1 integrin expression.** *J Cell Sci* 1998,111 (Pt 16):2397-2409.
281. Proulx A, Merrifield PA, Naus CC. **Blocking gap junctional intercellular communication in myoblasts inhibits myogenin and MRF4 expression.** *Dev Genet* 1997,20:133-144.
282. Gorbe A, Becker DL, Dux L, *et al.* **Transient upregulation of connexin43 gap junctions and synchronized cell cycle control precede myoblast fusion in regenerating skeletal muscle in vivo.** *Histochem Cell Biol* 2005,123:573-583.
283. Araya R, Eckardt D, Riquelme MA, Willecke K, Saez JC. **Presence and importance of connexin43 during myogenesis.** *Cell Commun Adhes* 2003,10:451-456.
284. Gorbe A, Becker DL, Dux L, Krenacs L, Krenacs T. **In differentiating prefusion myoblasts connexin43 gap junction coupling is upregulated before myoblast alignment then reduced in post-mitotic cells.** *Histochem Cell Biol* 2006,125:705-716.
285. Hollnagel A, Grund C, Franke WW, Arnold HH. **The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration.** *Mol Cell Biol* 2002,22:4760-4770.
286. Kaufmann U, Kirsch J, Irintchev A, Wernig A, Starzinski-Powitz A. **The M-cadherin catenin complex interacts with microtubules in skeletal muscle cells: implications for the fusion of myoblasts.** *J Cell Sci* 1999,112 (Pt 1):55-68.
287. Charlton CA, Mohler WA, Radice GL, Hynes RO, Blau HM. **Fusion competence of myoblasts rendered genetically null for N-cadherin in culture.** *J Cell Biol* 1997,138:331-336.
288. Goichberg P, Geiger B. **Direct involvement of N-cadherin-mediated signaling in muscle differentiation.** *Mol Biol Cell* 1998,9:3119-3131.
289. Tanio Y, Yamazaki H, Kunisada T, Miyake K, Hayashi SI. **CD9 molecule expressed on stromal cells is involved in osteoclastogenesis.** *Exp Hematol* 1999,27:853-859.
290. Yutzey KE, Rhodes SJ, Konieczny SF. **Differential trans activation associated with the muscle regulatory factors MyoD1, myogenin, and MRF4.** *Mol Cell Biol* 1990,10:3934-3944.
291. Bois PR, Grosveld GC. **FKHR (FOXO1a) is required for myotube fusion of primary mouse myoblasts.** *Embo J* 2003,22:1147-1157.
292. Bois PR, Brochard VF, Salin-Cantegrel AV, Cleveland JL, Grosveld GC. **FoxO1a-cyclic GMP-dependent kinase I interactions orchestrate myoblast fusion.** *Mol Cell Biol* 2005,25:7645-7656.

ANNEXES

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/yexcr

Research Article

Macrophage characteristics of stem cells revealed by transcriptome profiling

Guillaume M. Charrière^{a,1}, Béatrice Cousin^a, Emmanuelle Arnaud^a,
Corinne Saillan-Barreau^a, Mireille André^a, Ali Massoudi^b, Christian Dani^b,
Luc Pénicaud^a, Louis Casteilla^{a,*}

^aUMR 5018 CNRS-UPS, IFR31, Bat L1, CHU Rangueil, 31059 Toulouse Cedex 9, France

^bUMR 6543 CNRS, Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté des Sciences, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:

Received 12 April 2006

Revised version received

30 May 2006

Accepted 1 June 2006

Available online 7 July 2006

Keywords:

Stem cell

Progenitor

Macrophage

Microarray analysis

ES

Phagocytosis

Preadipocyte

ABSTRACT

We previously showed that the phenotypes of adipocyte progenitors and macrophages were close. Using functional analyses and microarray technology, we first tested whether this intriguing relationship was specific to adipocyte progenitors or could be shared with other progenitors. Measurements of phagocytic activity and gene profiling analysis of different progenitor cells revealed that the latter hypothesis should be retained. These results encouraged us to pursue and to confirm our analysis with a gold-standard stem cell population, embryonic stem cells or ESC. The transcriptomic profiles of ESC and macrophages were clustered together, unlike differentiated ESC. In addition, undifferentiated ESC displayed higher phagocytic activity than other progenitors, and they could phagocytose apoptotic bodies. These data suggest that progenitors and stem cells share some characteristics of macrophages. This opens new perspectives on understanding stem cell phenotype and functionalities such as a putative role of stem cells in tissue remodeling by discarding dead cells but also their immunomodulation or fusion properties.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Adult tissue development results in part from recruitment, proliferation and differentiation of progenitors located in tissues stroma fraction. Similar events participate to the considerable enlargement and intense tissue remodeling of adipose tissue in physiological and physiopathological situations. Last tissue to develop, it is extensively investigated for its involvement in obesity but also represents a suitable model for investigating tissue plasticity and a putative source of

regenerative cells. Indeed, some studies proposed that adipocyte progenitors are multipotent and display strong angiogenic properties [1–3]. We have also already demonstrated that these cells have certain ability to phagocytose microbes but also apoptotic bodies, as do specialized phagocytic cells such as macrophages [4,5]. These properties declined after commitment of preadipocytes into adipocytes, thus appearing to be specific to the progenitor state of adipose cell lineage [4,6]. The comparison between adipocyte progenitors and macrophages was further emphasized on a larger scale using

* Corresponding author. Fax: +33 5 62 17 09 05.

E-mail address: casteil@toulouse.inserm.fr (L. Casteilla).

¹ Present address: Laboratory of Developmental Immunology, Massachussets General Hospital, 55 Fruit Street, GRJ 1402, Boston, MA 02114, USA.

gene profiling analysis to compare preadipocytes, adipocytes and macrophages [7]. Macrophages are at the crossroad of innate and adaptive immunity and can be viewed as key partners to maintain tissue homeostasis. They direct the immune response according to the nature of the internalized molecules or foreign body [8]. They can display a high mobility, many different phenotypes and play a crucial role in regeneration by recycling apoptotic cells and non-functional extracellular components. By analogy, we proposed that adipocyte progenitors could directly participate to tissue remodeling [5]. As several publications claimed that pluripotent stem cells can be isolated using various macrophage surface antigens [9–11], we postulated that the similarities between macrophages and adipocyte progenitors would not be a specific feature of this latter and could be extended to other progenitors.

Here we used functional and gene profiling analysis to address this issue. Our study revealed that macrophage-like properties were not specific to preadipocytes and could be associated with many cultured progenitor/stem cell status including embryonic stem cells (ESC).

Materials and methods

Reagents and cell lines

All components for cell culture were purchased from Life Technologies (Cergy-Pontoise, France). The fluorescent nuclear marker 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was purchased from Sigma Aldrich Chimie (St. Quentin Fallavier, France). Collagenase (Roche Diagnostics) was purchased from Boehringer Mannheim (Meylan, France). J774.2 and RAW 264.7 cell lines were purchased from ECACC (United Kingdom).

Animals and cell culture

Five- to six-week-old male C57Bl/6J mice (Harlan, France) were housed in microisolator cages in a conventional animal quarter. All animals had free access to food and water and were sacrificed with CO₂.

Peritoneal macrophage cells were obtained by washing the peritoneal cavity of the mice with 5 ml sterile PBS and were grown in DMEM:F12 containing 10% heat-inactivated newborn calf serum (NCS). Stroma-vascular fraction cells (SVF) and mature adipocytes were obtained from inguinal fat depots as previously described [12]. Briefly, adipose tissue was digested with 2 mg/ml collagenase in 2% albumin-containing DMEM:F12 medium for 30 min at 37°C. After filtration through a 25- μ m nylon membrane to eliminate undigested fragments, cells were centrifuged at 600 \times g for 10 min to separate mature adipocytes from pellets of SVF cells. SVF cells were counted (Coulter Z2) and plated (30 000 cells/cm²) in DMEM:F12 10% NCS medium. Six hours after plating, cells were washed to remove all non-adherent cells.

All cell lines except ES cells (ESC) were maintained before confluence in DMEM containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and glutamine (2 mM). 3T3-F442A adipose differentiation was performed by adding rosiglitazone (100 nM) at the first confluence day, then cells were fed

every 2 days with the same medium. C2C12 myotube differentiation was induced with 2% horse serum containing medium at the first day of confluence. 3T3-F442A and C2C12 differentiated cells were stopped 7 days after the beginning of differentiation.

ZIN40 ES cells are feeder-independent. They were cultivated in the pluripotent state on gelatin-coated plates as previously described [13]. Glasgow MEM/BHK21 medium containing 1 \times MEM non-essential amino acids, 2 mM glutamine, 1 mM pyruvate, 100 μ M 2-mercaptoethanol, 10% FCS (StemCell Technologies, Canada), 100 U/ml of leukemia inhibitory factor (ESGRO, Chemicon, Euromedex, France) was added to maintain the pluripotent and undifferentiated state. To obtain differentiated ES cells, ZIN40 cells were cultivated at low density without LIF for at least 1 week.

Measurement of phagocytic activity

Yeast phagocytosis: yeasts (*Candida parapsilosis*) were washed in PBS and suspended at 4.10⁷ yeasts/ml in DMEM:F12+4%NCS without antibiotic. After culture for 24 h on Lab-Tek slides, cells were incubated 45 min in 1 ml of yeast suspension at 37°C in a CO₂ chamber [14]. Slides were then washed three times with PBS and mounted. Slides were observed with phased lights. Phagocytic activity was calculated as the percentage of phagocytizing cells.

Apoptotic thymocyte phagocytosis: thymuses of C57Bl/6 mice were triturated in DMEM medium and filtered on a 25- μ m filter and the thymocytes were washed by centrifugation for 10 min at 600 \times g. Thymocytes were seeded at 5.10⁶ cells/ml into the culture flask. 30 μ M C2-ceramide was added to induce apoptosis. Four hours later, apoptotic thymocytes were washed twice in PBS. 5.10⁶ apoptotic thymocytes/ml were added to ESC cultured on Lab-Tek slides. After 1 h, the culture was washed twice with PBS and fixed with 3.7% paraformaldehyde. Cells were stained with 0.1 μ g/ml DAPI. After 10 min, slides were washed with PBS and mounted with specific mounting medium.

Confocal microscopy analysis of phagocytosis

ESC cultured on Lab-Tek slides were incubated for 45 min with zymosan-FITC (200 μ g) (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands), fixed with 3.7% paraformaldehyde, permeabilized, and stained with 0.1% Triton X-100 containing 2 μ g/ml propidium iodide. Confocal analysis was performed using a Zeiss LSM 510 microscope equipped with an argon laser (458, 488 and 514 nm) and two helium-neon lasers (543 and 633 nm). FITC and propidium iodide fluorescence emission were separated using a dichroic mirror and measured with adequate isolation bandpass filters (530 nm for FITC and 605 nm for propidium iodide). One-micrometer sections were automatically captured along the Z-axis from the top to the bottom of the cells at magnification \times 100.

mRNA extraction

RNA were isolated from cell culture, isolated cells or cold powdered tissue samples using Tripur reagent (Boehringer Mannheim, Germany) according to the manufacturer's

instructions. Total RNA was treated for 30 min at 37°C with DNase to eliminate potential DNA residues. RNA were then purified by phenol/chloroform extraction [15]. RNA quality was checked by agarose gel electrophoresis and spectrophotometric analysis ($OD_{260/280}$).

Probe preparation and cDNA microarray hybridization

All RNA samples were purified from murine cells to avoid mismatch recognition between the labeled probe derived from these samples and the cDNA spotted onto the membrane. Ten micrograms of total RNA (denatured at 70°C for 10 min) was reverse-transcribed for 2 h at 42°C with 1 μ l (200 U) of Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies), 4 μ g of 25 mer/oligo(dT), 80 μ Ci [α - 32 P] dCTP (10 mCi/ml, 2500 mCi/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France), 1 mmol each of dATP, dGTP, dTTP, 3.3 mmol DTT, 2 μ l H₂O and 6 μ l 5 \times first strand buffer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) in a final volume of 30 μ l. After 1 h, 1 μ l of Superscript II reverse transcriptase was added to the reaction mixture. The resulting 32 P-cDNA probes were purified with ProbeQuant G-50 Micro columns (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France) following the manufacturer's instructions. After counting, only probes with a total activity higher than 2.10⁶ cpm were hybridized. Mouse Genefilters (GF400 from ResGen, Invitrogen), which contained 5185 genes (75% are ESTs) were used for gene profiling expression analysis. The membranes were pre-treated with boiled 0.5% SDS for 10 min. Prehybridization was performed for 4 h at 42°C in MicroHyb hybridization solution (ResGen, Invitrogen) with 5 μ g denatured mouse Cot-1 and 4 μ g poly(dA) as blocking reagents. The column-purified and denatured probes were then added and hybridized at 42°C for 16 h. After hybridization, the membranes were successively washed twice for 10 min at 50°C in roller tubes containing 2 \times standard saline citrate solution (SSC) and 1% SDS. The last two washes were carried out in a plastic box with horizontal shaking: 2 \times SSC and 1% SDS for 20 min at 50°C and 0.5 \times SSC and 1% SDS for 15 min at 55°C. The membranes were then exposed to low energy phosphor image screens for 2 days. Images were acquired using Phosphorimager 445 SI (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA, USA), and analyzed with IMAGEGENE 4.0 (Biodiscovery, Marina del Rey, CA, USA) and Excel (Microsoft) software. Hybridizations were performed with independent RNA samples (cell preparation and RNA extraction).

Microarray data analysis

For each hybridization, the mean of local background incremented with two standard deviations was subtracted from each spot's intensity. After this correction, all positive values were considered as significant and transformed into log₂ values. We divided the intensity of each spot by the mean of the control spots intensities to normalized hybridizations. Control spots corresponded to total genomic (Tg) DNA spotted by the manufacturer onto the all membrane's surface (192 spots on each membrane). To compare phenotypes, profiles were constructed. Each profile resulted from at least 3

Table 1 – Experimental design of profiles

Profiles	cDNAs source
Preadipocyte line	3T3-L1, 3T3-F442A, Ob17, Hgfu
SVF	SVF cells in primary culture
Myoblast line	C2C12
C3 MSC	C3H10T1/2
ESC+LIF	ZIN40 cultured with LIF
ESC-LIF	ZIN40 cultured without LIF
Adipocyte line	Differentiated 3T3-F442A
Adipocyte	Isolated adipocytes
Macrophage line	RAW 264.7, J774.2
Peritoneal macrophage	Peritoneal exudated cells
Myotube line	Differentiated C2C12
Muscle	Muscle samples
Liver	Liver samples

independent hybridizations (Table 1). The means of their values were calculated and retained. The final dataset resulted from 45 hybridizations and contained 4260 genes. Profiles were clustered with a hierarchical classification algorithm based on Euclidian distance ($d=1-r$) and average linkage (Microsoft Excel and Genesis software [16]).

Data meaning

We first used SOURCE web interface on the Stanford university website (<http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceBatchSearch>) to find updated database annotations about the clones that were spotted on the Research genetics membranes. Then we loaded the updated list of uniprot IDs in Gominer software to analyze Gene Ontology (GO) classification of the subset of genes shared by ESC and macrophages. This subset of gene was compared to the full list of clones spotted on the membranes and then search for significantly enriched GO categories. Then we used the ven diagram plugin to obtain a graphic representation of GO categories over-represented in our subset of genes of interest.

Cell phenotyping

Isolated cells were analyzed by flow cytometry (FACS) using standard protocol. Cells were stained in staining buffer (SB) consisting of phosphate-buffered saline containing 0.2% of fetal calf serum, and Fc Block reagent (Becton Dickinson, Mountain View, CA). They were incubated with anti-mouse monoclonal antibodies (mAb) or rat immunoglobulins (isotypes) conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), peridinin chlorophyll protein (PerCP) or allophycocyanin (APC) for 30 min at 4°C. Cells were washed in SB and then analyzed on a fluorescence-activated cell sorter (FACS) (FACS Calibur, Becton Dickinson, Mountain View, CA). Data acquisition and analysis were then performed (Cell Quest software, Becton Dickinson). All the antibodies and their IgG isotypes were purchased from BD Biosciences (Heidelberg, Germany).

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SE. Statistical significance of differences between means was evaluated using one-way

ANOVA or unpaired *t* test. The correlation values were statistically tested using Fisher's test.

Results

Functional similarities between progenitors and macrophages

As phagocytic activity is a major function of macrophages and is shared with adipocyte precursors, we decided to evaluate the phagocytic activity of other progenitor cell types. We performed phagocytosis experiments on different well-characterized progenitor cell lines: myoblasts C2C12, preadipocytes 3T3-F442A and multipotent mesenchymal stem cells C3H-10T1/2 (C3-MSC). Skin fibroblasts and peritoneal macrophages were used as negative and positive controls respectively (Fig. 1). All progenitors showed a significantly higher phagocytic activity than skin fibroblasts. A slight but not significant decrease in phagocytic activity was observed between C3-MSC, 3T3-F442A and C2C12. As already shown for preadipocytes [7], the phagocytic index of progenitor cells was about 2 yeasts per cell, which was significantly lower than macrophages (about 15 yeasts per cell, data not shown). No significant activity was displayed when different precursors were differentiated (3T3-F442A and C2C12 towards adipocyte and muscle differentiation respectively) (data not shown). Altogether these results suggested that phagocytic activity was not specific to preadipocytes but can be shared with some other cultured mesenchymal progenitors.

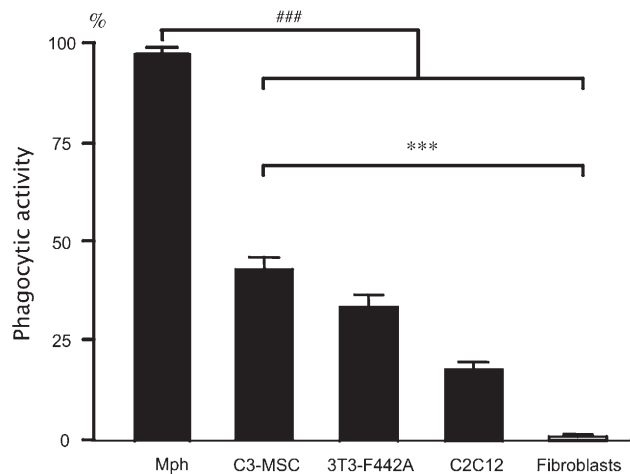


Fig. 1 – Phagocytic activity of progenitors. Phagocytic activity of immortalized mesenchymal stem cells (C3-MSC), preadipocytes (3T3-F442A), myoblasts (C2C12), peritoneal macrophages (Mph) and skin fibroblasts was measured. Phagocytic activity represents the percentage of phagocytizing cells per total cells. Results are means \pm SEM of seven independent experiments. All results differed significantly (ANOVA, $n=7$, $*p<0.001$). Phagocytic activity of cell lines was significantly lower than that of peritoneal macrophages (Newman-Keuls post test, $###p<0.001$) and higher than that of skin fibroblasts.**

Transcriptome comparison of stem cells, progenitors and macrophages

To extend our comparison between macrophage phenotype and different progenitor cell phenotypes, we decided to use the larger approach offered by the use of cDNA microarrays. Mouse Genefilters arrays from Research Genetics were used since they offer a large set of targets (nearly 5000) that have been randomly chosen as most of them were non-identified ESTs at the moment of the generation of these membranes. We used this technology previously and revealed a great similarity of transcriptomic profile between macrophages and preadipocytes [7]. We performed a comparison of transcriptomic profiles from preadipocytes, macrophages, mesodermal progenitor cells committed to different stages (C2C12 myoblasts, C3H-10T1/2) and mesodermal differentiated cells (myotubes, adipocytes). We decided to include in this analysis a gold standard pluripotent stem cell population, i.e., embryonic stem cells (ESC). These cells are known for being able to differentiate into many different cell types across embryonic layers [17,18]. Leukemia inhibitory factor (LIF) has to be constantly present in the culture media to maintain the pluripotency of the murine ESC otherwise they lose their pluripotency and differentiate (ESC-LIF) [19–21]. Two microarray profiles, ESC+LIF and ESC-LIF, were constructed and added to our analysis. The ESC-LIF profile was obtained by culturing ESC for a week at least without LIF to induce the loss of their stem cell properties. The measure of Oct4 transcript level, a transcription factor that plays a critical role in pluripotency maintenance, was used as a marker of ESC stem cell state (data not shown). Whole liver cDNAs were also included as a control of clustering relevance. Data from immortalized or non-immortalized cells were separately considered to build 13 representative profiles (Table 1).

To build these profiles, all hybridizations concerning cell models for one phenotype were considered together (raw data are available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>, samples from GSM 26306 to GSM 26345). Genes were first filtered to retain only those whose expression was detected in more than 50% of hybridizations. Then the means of their respective values among the hybridizations were used as the definitive values in the definitive profile (supplementary Table S1).

After computing, the clustering algorithm separated the 13 profiles into two main distinct clusters A and B (Fig. 2). Clusters A contained differentiated cells and whole tissues, and cluster B contained undifferentiated cells and macrophages. It is noteworthy that robustness of this analysis was reinforced by the separation of the two ESC derived profiles, cultured with or without LIF, that were clustered in the two different main clusters.

Genomic comparison between embryonic stem cells and macrophages

As our profiling analysis showed a striking proximity between the profiles of peritoneal macrophages and embryonic stem cells, we then decided to extend and refine our comparison of these two phenotypes.

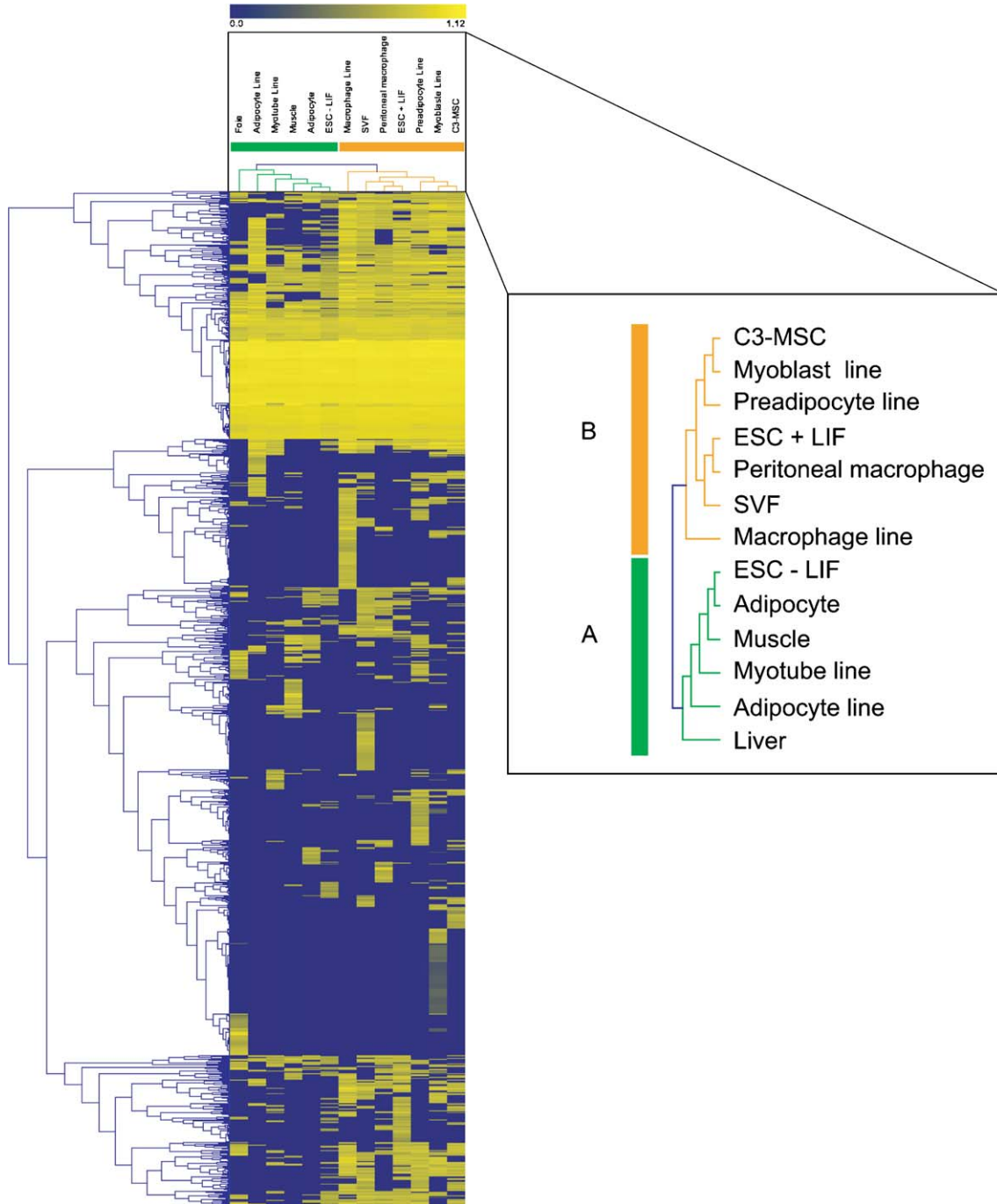


Fig. 2 – Profile comparison with hierarchical clustering algorithm. The clustered total heat-map of genes expressed in one profile at least is represented on the left. The clustering of the profiles is zoomed on the right. Euclidian distance and average k link were used as parameters for the clustering algorithm.

We then measured the correlation factor between ESC+LIF and peritoneal macrophage. The r^2 value was 0.53 and was significantly higher ($p < 0.01$, Fig. 3A) than the value measured between ESC+LIF and liver, 0.29 (Fig. 3B), as comparison. 567 genes were expressed by both ESC+LIF and peritoneal macrophage (Fig. 3C; supplementary data Table S2). This high number of share genes by both phenotypes was consistent with the good r^2 value and the clustering result. Gene Ontology classification was performed with the Gominer

software to further decipher the common features of ESC and peritoneal macrophages. In the GO classes identified by Gominer as significantly enriched, four main GO subcategories of biological processes were clearly identified: actin filament organization, endocytosis, actin cytoskeleton organization and biogenesis, and JNK cascade (Fig. 3D). These GO subcategories were linked through the sharing of few genes, and are often related to endocytosis/phagocytosis and inflammation/stress response processes.

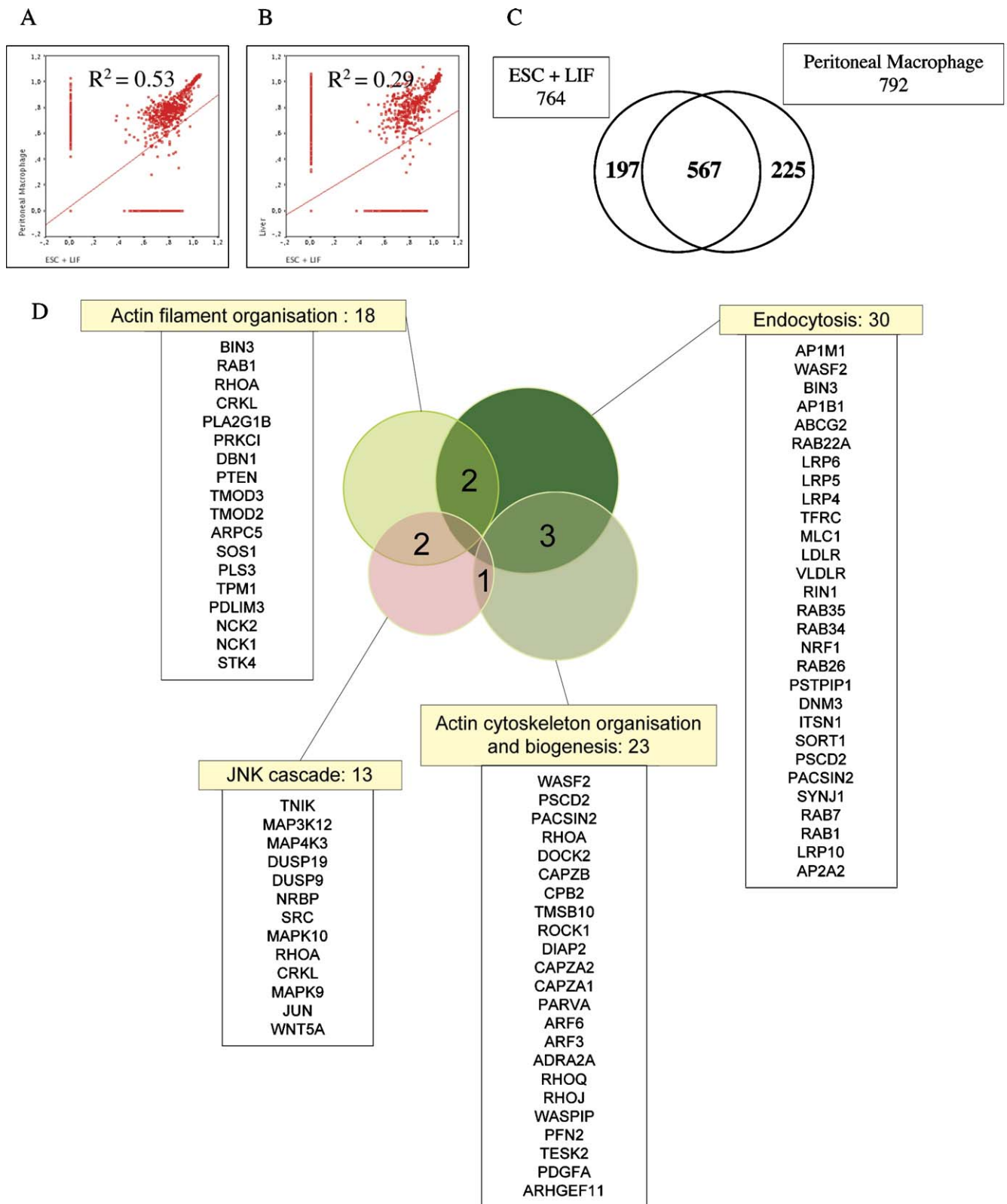


Fig. 3 – Refine comparison of ESC and peritoneal macrophage profiles. (A) Correlation of gene expression between ESC+LIF (x axis) and peritoneal macrophage (y axis). (B) Correlation of gene expression between ESC+LIF (x axis) and liver (y axis). (C) Total number of genes expressed by ESC + LIF and peritoneal macrophage. Total numbers of genes expressed by each profile are indicated below each name. The number in the overlap region of both circles indicates the total number of expressed genes shared by both profiles. (D) Ven diagram of significantly enriched GO categories in the genes shared between ESC and peritoneal macrophages.

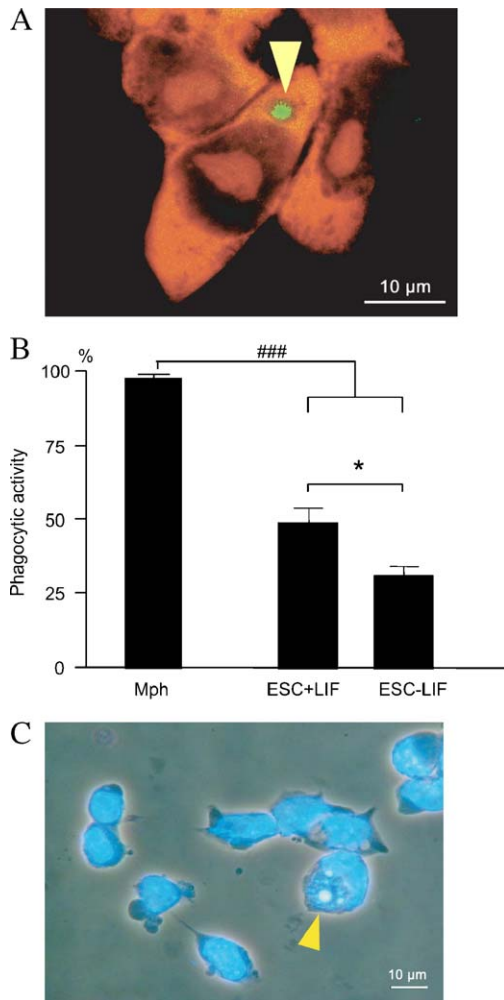


Fig. 4 – Phagocytic activity of ESC. (A) Confocal microscopic analysis of ESC phagocytic activity. FITC-zymosan was phagocytized by ESC (green). ESC were stained with propidium iodide (red). Along the z-axis, 1- μ m sections were obtained from the top to the bottom of the cells. FITC-zymosan particles were observed in the same plane as ESC nuclei. The yellow arrowhead shows a phagocytized FITC-zymosan particle. **(B) Phagocytic activity of ESC+LIF and ESC-LIF was measured.** Phagocytic activity represents the percentage of phagocytizing cells per total cells. Results are means \pm SEM of at least three independent experiments. The phagocytic activity of ESC+LIF was significantly higher than that of ESC-LIF (*t*-test, * $p < 0.05$) and lower than that of peritoneal macrophages (*t*-test, ### $p < 0.001$). **(C) Phagocytosis of apoptotic thymocytes.** ESC were incubated for 1 h with apoptotic thymocytes. Cells were fixed and stained with DAPI (blue light). Slides were observed with contrast phase light and UV light. The yellow arrowhead shows phagocytized apoptotic thymocytes.

Comparison between embryonic stem cells and macrophages

As the Gominer classification highlighted GO categories shared by ESC and peritoneal macrophages related to phagocytosis in some extent, we measured the phagocytic

activity of ESC+LIF and ESC-LIF. Zymosan particle internalization by ESC was first confirmed by confocal analysis (Fig. 4A). Quantification demonstrated that ESC+LIF had the highest phagocytic activity of all the tested progenitors ($49.7 \pm 4.7\%$, Fig. 4B), and had a significantly higher phagocytic activity than ESC-LIF ($31.1 \pm 3.6\%$, $p < 0.05$, Fig. 4B). As for the progenitor cells, the phagocytic index of ESC+LIF and ESC-LIF was low, about 1–2 yeasts per cell and they did not display significant cytotoxic activity (data not shown). Furthermore, in order to evaluate whether ESC+LIF could eliminate apoptotic cells, as macrophages did, we performed phagocytic assays using apoptotic thymocytes. Microscopic analysis demonstrated that about 30% of ESC ingested apoptotic thymocytes (Fig. 4C).

The expression of surface proteins expressed by macrophages was also investigated by FACS analysis using peritoneal macrophages as control (Fig. 5). ESC+LIF expressed CD13, CD31 and low TLR4 (Fig. 5A) as peritoneal macrophages did (Fig. 5B), but not the classical CD11b, CD16/32 or CD45 (supplementary Fig. S1).

Discussion

In this work, using combined transcriptome profiling and functional strategies, we demonstrate that some macrophage features are shared with many cultured progenitors/stem cells. This leads us to hypothesize that progenitor cells display macrophage facets and that these macrophage-like properties might be part of the functional hallmark of stem cell populations.

Macrophages are at the crossroad of innate and adaptive immunity [22]. They can display mobility, many different phenotypes and play a crucial role in regeneration by removing apoptotic cells and extracellular debris. They can orientate the immune response according to the nature of the internalized cargo. Thus, macrophages can be viewed as key partners to maintain tissue homeostasis. Our profiling analysis with a high value of the correlation factor between undifferentiated ESC and peritoneal macrophages and the total number of genes shared by both cell types highlights surprising similarities between macrophage and progenitor/stem cell including ES cells. Moreover, gene ontology classification of these genes reveals that numbers of them are mostly related to endocytosis, actin remodeling and vesicle trafficking that are critical aspects of the phagocytosis process [8]. In addition, our functional analysis is consistent and reinforces this view by revealing a relationship between phagocytic activity and the immature state of cells irrespective of their lineage. The less-engaged progenitor cells, i.e., C3-MS-C, have a higher phagocytic activity than the others, and pluripotent ESC have the highest phagocytic activity of all the progenitors tested. By contrast, ESC cultured in absence of LIF and thus engaged in the differentiation process, have a significantly lower phagocytic activity than the pluripotent ESC. The reminiscent phagocytic activity of ES-LIF can be explained by either the maintenance of some contaminating undifferentiated cells or the trophoblastic phenotype acquired by ESC-LIF known to display some phagocytic

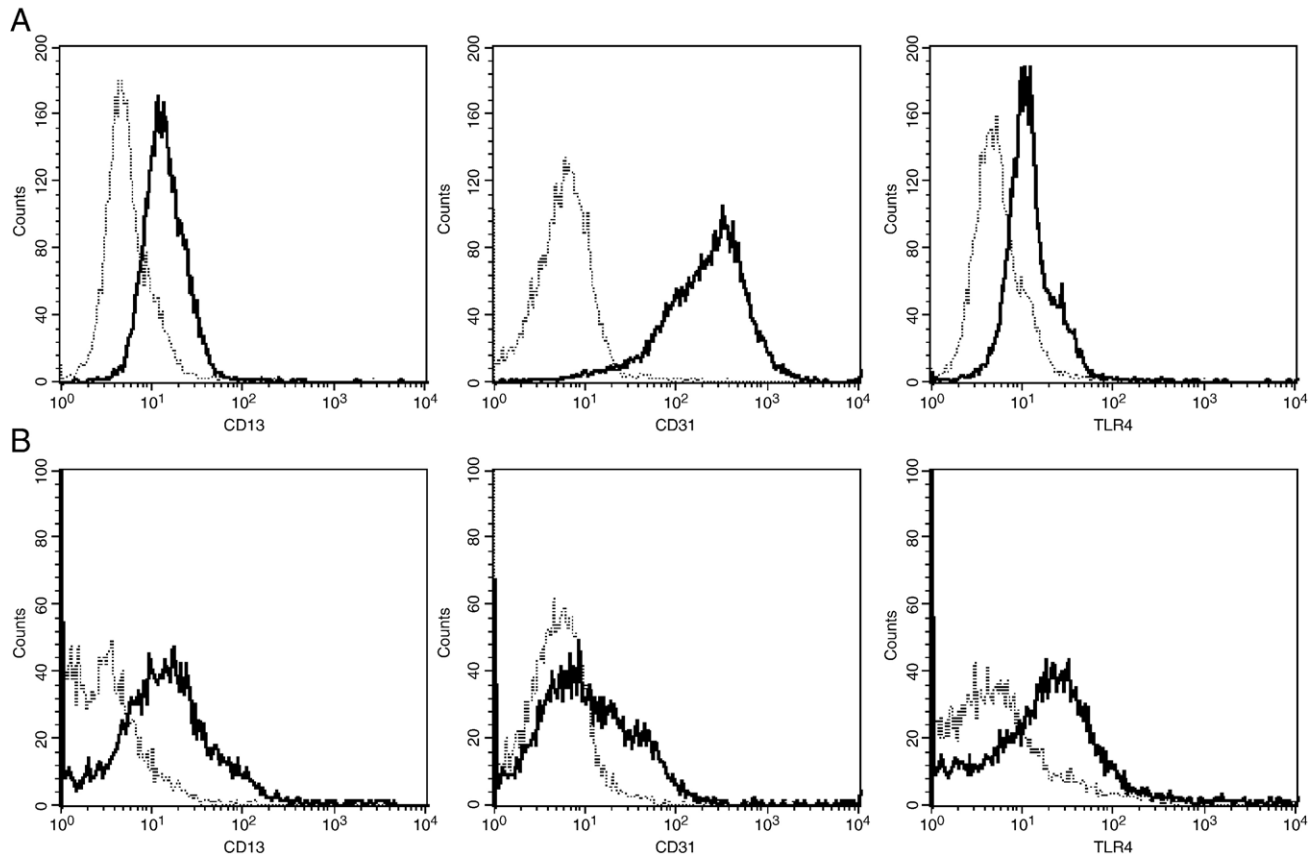


Fig. 5 – FACS analysis of macrophages antigens shared by undifferentiated ESC. Representative plots of the expression of macrophage markers on ESC (A) and peritoneal macrophages (B). Peritoneal macrophages were isolated as indicated in Materials and methods. ESC were cultured in with LIF to maintain multipotency.

activity [23]. Since we have studied mostly cultured cells in this work, we acknowledge that the phagocytic activity displayed by progenitor/stem cells could be due to culture adaptation. Although this could not be excluded, several arguments are not consistent with this hypothesis. First, this activity is not similar in all cell lines with the highest activity associated to ESC. Second, SVF cells, which correspond to primary culture and are only cultured for few days, have a strong phagocytic activity and are considered as multipotent [1–4].

Although 50% of the genes present in our dataset are unknown genes (ESTs) and prevented us from identifying all functional clusters of genes (see supplementary data table S1), GO classification of the genes reveals that numbers of common genes between macrophages and ESC are related to endocytosis and vesicle trafficking and support our previous view. However, beside these genes, many genes involved in metabolism of lipoproteins, like LDL and VLDL receptors or some LRP for instance are also identified as common to macrophages and ESC. LRPs are involved in Wnt signaling pathways that are critical in regulating cell fate, and have recently been implicated in apoptotic cells clearance [24,25]. Thus expression of LRPs and CD31 (shown by FACS) by stem cells may be involved in the regulation of their apoptotic bodies clearance activity [26]. However, the

expression of genes involved in lipoprotein metabolism also reveals a crucial role for cholesterol metabolism in stem cell biology.

The physiological relevance of the phagocytic activity is an opened question but although we cannot exclude a direct involvement of progenitor cells in host defence, their involvement in tissue remodeling during development or regeneration reasonably prevails. Progenitor cells could act as non-professional phagocytic cells and could replace professional phagocytes, i.e., macrophages, in the clearance of apoptotic bodies during development and wound healing as it was observed in PU-1 KO mice [27,28]. Moreover, in accordance with the already identified genes and the large number of unidentified genes, we can reasonably hypothesize that other functions such as chemotaxis, immunomodulation or cell fusion could also be shared between progenitor/stem cells and macrophages [22,29–31]. However, a direct parallel between macrophages and stem cells cannot be drawn because all classical macrophage markers are not expressed by stem cells as confirmed by our FACS analyses. Thus, other functional characteristics of macrophages have to be estimated before such statement but the knowledge of macrophage biology should strongly help to decipher stem cell biology. From this point of view, these data open numerous perspectives and should help to

understand progenitor/stem cell biology. So, this intriguing similarity has to be further explored and particularly its precise physiological relevance for stem cells but also for macrophages.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Génopôle de Toulouse, Région Midi-Pyrénées, AFM/Inserm (no. 4CS01F) and the Association de Biothérapies and Etablissement Français du Sang (EFS, no. 2004-08). The authors would like to thank the Zootechnical Service of IFR31, Sergei Sokol for helpful discussions and Nina Crowte for manuscript revision. Guillaume Charrière holds fellowships from the Ministry of National Education, Research and Technology and the “Fondation de la Recherche Médicale”.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.yexcr.2006.06.034.

REFERENCES

- [1] P.A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian, D.A. De Ugarte, J.I. Huang, H. Mizuno, Z.C. Alfonso, J.K. Fraser, P. Benhaim, M.H. Hedrick, Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells, *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 4279–4295.
- [2] J.M. Gimble, F. Guilak, Differentiation potential of adipose derived adult stem (ADAS) cells, *Curr. Top Dev. Biol.* 58 (2003) 137–160.
- [3] V. Planat-Benard, J.S. Silvestre, B. Cousin, M. Andre, M. Nibelink, R. Tamarat, M. Clergue, C. Manneville, C. Saillan-Barreau, M. Duriez, A. Tedgui, B. Levy, L. Penicaud, L. Casteilla, Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives, *Circulation* 109 (2004) 656–663.
- [4] B. Cousin, O. Munoz, M. Andre, A.M. Fontanilles, C. Dani, J.L. Cousin, P. Laharrague, L. Casteilla, L. Penicaud, A role for preadipocytes as macrophage-like cells, *FASEB J.* 13 (1999) 305–312.
- [5] C. Saillan-Barreau, B. Cousin, M. Andre, P. Villena, L. Casteilla, L. Penicaud, Human adipose cells as candidates in defense and tissue remodeling phenomena, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309 (2003) 502–505.
- [6] R. Menghini, V. Marchetti, M. Cardellini, M.L. Hribal, A. Mauriello, D. Lauro, P. Sbraccia, R. Lauro, M. Federici, Phosphorylation of GATA2 by Akt increases adipose tissue differentiation and reduces adipose tissue-related inflammation: a novel pathway linking obesity to atherosclerosis, *Circulation* 111 (2005) 1946–1953.
- [7] G. Charriere, B. Cousin, E. Arnaud, M. Andre, F. Bacou, L. Penicaud, L. Casteilla, Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 9850–9855.
- [8] L.M. Stuart, R. Ezekowitz, Phagocytosis: Elegant complexity, *Immunity* 22 (2005) 539–550.
- [9] G.H. Danet, J.L. Luongo, G. Butler, M.M. Lu, A.J. Tenner, M.C. Simon, D.A. Bonnet, C1qRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 10441–10445.
- [10] A. Ishida, H. Zeng, M. Ogawa, Expression of lineage markers by CD34+ hematopoietic stem cells of adult mice, *Exp. Hematol.* 30 (2002) 361–365.
- [11] Y. Zhao, D. Glesne, E. Huberman, A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 2426–2431.
- [12] P. Bjornorp, M. Karlsson, H. Pertoft, P. Pettersson, L. Sjoström, U. Smith, Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes, *Journal of Lipid Research* 19 (1978) 316–324.
- [13] P. Mountford, B. Zevnik, A. Duwel, J. Nichols, M. Li, C. Dani, M. Robertson, I. Chambers, A. Smith, Dicistronic targeting constructs: reporters and modifiers of mammalian gene expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 4303–4307.
- [14] S. Takao, E.H. Smith, D. Wang, C.K. Chan, G.B. Bulkley, A.S. Klein, Role of reactive oxygen metabolites in murine peritoneal macrophage phagocytosis and phagocytic killing, *Am. J. Physiol.* 271 (1996) C1278–C1284.
- [15] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156–159.
- [16] A. Sturn, J. Quackenbush, Z. Trajanoski, Genesis: cluster analysis of microarray data, *Bioinformatics* 18 (2002) 207–208.
- [17] A. Bradley, M. Evans, M.H. Kaufman, E. Robertson, Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines, *Nature* 309 (1984) 255–256.
- [18] R.S. Beddington, E.J. Robertson, An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo, *Development* 105 (1989) 733–737.
- [19] A.G. Smith, J.K. Heath, D.D. Donaldson, G.G. Wong, J. Moreau, M. Stahl, D. Rogers, Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides, *Nature* 336 (1988) 688–690.
- [20] R.L. Williams, D.J. Hilton, S. Pease, T.A. Willson, C.L. Stewart, D.P. Gearing, E.F. Wagner, D. Metcalf, N.A. Nicola, N.M. Gough, Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells, *Nature* 336 (1988) 684–687.
- [21] C.L. Stewart, P. Kaspar, L.J. Brunet, H. Bhatt, I. Gadi, F. Kontgen, S.J. Abbondanzo, Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor, *Nature* 359 (1992) 76–79.
- [22] D.A. Hume, The mononuclear phagocyte system, *Curr. Opin. Immunol.* 18 (2006) 49–53.
- [23] L. Guilbert, S.A. Robertson, T.G. Wegmann, The trophoblast as an integral component of a macrophage-cytokine network, *Immunol. Cell Biol.* 71 (Pt. 1) (1993) 49–57.
- [24] X. He, M. Semenov, K. Tamai, X. Zeng, LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: Arrows point the way, *Development* 131 (2004) 1663–1677.
- [25] S.J. Gardai, K.A. MCPPhillips, S.C. Frasch, W.J. Janssen, A. Starefeldt, J.E. Murphy-Ullrich, D.L. Bratton, P.-A. Oldenborg, M. Michalak, P.M. Henson, Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte, *Cell* 123 (2005) 321–334.
- [26] S. Brown, I. Heinisch, E. Ross, K. Shaw, C.D. Buckley, J. Savill, CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment, *Nature* 418 (2002) 200–203.
- [27] W. Wood, M. Turmaine, R. Weber, V. Camp, R.A. Maki, S.R. McKercher, P. Martin, Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos, *Development* 127 (2000) 5245–5252.
- [28] P. Martin, D. D'Souza, J. Martin, R. Grose, L. Cooper, R. Maki,

- S.R. McKercher, Wound healing in the PU.1 null mouse-tissue repair is not dependent on inflammatory cells, *Curr. Biol.* 13 (2003) 1122–1128.
- [29] J.M. Pawelek, Melanoma as a macrophage/melanocyte hybrid and the symbiotic nature of eukaryotic cells, *Melanoma Res.* 3 (1993) 75–76.
- [30] M. Munzarova, D. Zemanova, Transformation of blood monocytes to multinucleated giant cells in vitro: are there any differences between malignant and nonmalignant states? *Physiol. Res.* 41 (1992) 221–226.
- [31] A.K. Chakraborty, S. Sodi, M. Rachkovsky, N. Kolesnikova, J.T. Platt, J.L. Bologna, J.M. Pawelek, A spontaneous murine melanoma lung metastasis comprised of host x tumor hybrids, *Cancer Res.* 60 (2000) 2512–2519.

Human adipose tissue-derived multipotent stem cells differentiate *in vitro* and *in vivo* into functional osteocyte-like cells

Christian Elabd[#], Chiara Chiellini[#], Ali Massoudi[#], Olivia Cochet[#], Laure-Emmanuelle Zaragosi[#], Christophe Trojani[¶], Jean-François Michiels^{*}, Pierre Weiss[‡], Georges Carle[¶], Nathalie Rochet[¶], Claude A. Dechesne[#], Gérard Ailhaud[#], Christian Dani[#] and Ez-Zoubir Amri^{#§}

[#]UMR 6543 CNRS, Université Nice-Sophia Antipolis, Institute of Signaling Developmental Biology and Cancer Research, Centre de Biochimie, Parc Valrose, 06108 Nice, France; [¶]CNRS/UNSA FRE 2943, IFR50, Faculté de Médecine, Avenue de Valombrose, 06107 Nice, France; ^{*}Service d'Anatomopathologie, CHU de Nice, 30 avenue de la Voie Romaine, 06002 Nice, France; [‡]Inserm, U791, LIOAD, Laboratoire d'ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire; Université Nantes 1 place A. Ricordeau, Faculté de chirurgie dentaire, BP 84215 Nantes, F-44042, France

[§] Correspondence should be addressed to:

Dr. Ez-Zoubir Amri, Centre de Biochimie UMR 6543 CNRS Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté des Sciences, Parc Valrose, 06108 Nice cedex 2, France.

Phone: +33 492 07 64 29, Fax: +33 492 07 64 04; e-mail: amri@unice.fr

Running title: osteogenic differentiation of hMADS cells

Abbreviations used: AP, alkaline phosphatase; BMP, bone morphogenetic protein; EGF, epidermal growth factor; hBMSC, human bone marrow mesenchymal stem cells; HIBS, hardening injectable bone substitute; hMADS cells, human multipotent adipose-derived stem cells; ODM, osteoblastic differentiation medium.

Key words: Stem cells, osteoblast, osteocyte, differentiation, injectable biomaterial

Abstract

Cell-based therapies are used to treat bone defects. Adipose tissue contains, among other cell types, osteoblast progenitors. We recently described that human multipotent adipose-derived stem (hMADS) cells, which exhibit a normal karyotype, an FGF2-dependent self renewal and the maintenance of their differentiation properties with *in vitro* expansion, are able to differentiate into different lineages. In this study, we show that hMADS cells can differentiate into osteocyte-like cells *in vitro* at a very high yield within two weeks. In the presence of a low amount of serum and EGF, hMADS cells express specific molecular markers, among which alkaline phosphatase, CBFA-1, osteocalcin, DMP1, PHEX and Pdpn. These cells display patchy membrane staining for connexin 43 and develop functional gap junctions for cell communication. Finally, hMADS cells loaded on HIBS biomaterial and injected subcutaneously into nude mice develop mineralized woven bone 4 weeks after implantation. Thus osteocyte-like cells derived from hMADS cells represent a valuable tool for pharmacological and biological studies of osteoblast differentiation *in vitro* and bone tissue development *in vivo*.

Introduction

Bone diseases, such as osteopenia and osteoporosis, affect several millions of patients throughout the world. Ongoing studies for repairing bone defects are performed in different fields such as pharmacology, gene and cell therapies. Ideal cells needed for tissue engineering must be immunocompatible and possess a self-regenerative potential. Mesenchymal stem cells have recently received widespread interest due to their potential use in tissue-engineering applications. Multipotent mesenchymal stem cells have been mainly isolated from adult marrow. However other tissues such as adipose tissue, muscle, periosteum and synovial tissue also contain cells now defined [19] as multipotent mesenchymal stromal cells [4, 7, 33, 41, 49]. These stromal cells are able to differentiate into multiple cell types, such as osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, myoblasts, cardiomyocytes, endothelial and neuronal cells [3, 12, 25, 30, 33, 34]. Recently, we described the isolation of mesenchymal stem cell populations from human adipose tissue that are able, at a clonal level, to differentiate into various mesodermal lineages *in vitro* including adipocytes and osteoblasts [35, 36]. These cells promote long-term expression of human dystrophin when transplanted into the tibialis anterior muscle of immunocompetent mdx mice [36]. Furthermore, hMADS cells exhibit high self-renewal ability in the presence of FGF2 whereas they maintain both clonogenicity and their high differentiation properties with *in vitro* expansion [47]. Taken together, these observations allow to conclude that hMADS cells are representative of stem cell populations.

Osteoblast differentiation represents a crucial event during skeletal tissue formation, bone repair and bone remodelling. Analysis of osteoblastic differentiation has been made available by the use of different cell models [23]. This process is modulated by a number of regulatory molecules such as members of the transforming growth factor beta

superfamily, including the bone morphogenetic proteins (BMPs). Osteoblast differentiation depends on the expression of cell-specific transcription factors such as CBFA-1 and osterix [29]. Once differentiated, osteoblasts produce most of the proteins present in the extracellular matrix (ECM) and thus control their mineralization. Osteocytes are terminally differentiated cells of osteoblast lineage that have become trapped within the bone matrix and are responsible for its maintenance. The regulation of osteoblast and osteocyte differentiation and functions is poorly understood and a few specific osteoblast transcripts have been identified [23, 39]. So far, however, no appropriate human cell model exhibiting a normal karyotype has been available for *in vitro* and *in vivo* studies.

In the present study, we have characterized at the cellular and molecular level the differentiation of hMADS cells into functional osteocyte-like cells in the presence of a low concentration of serum and EGF. Importantly, hMADS cells are able to induce woven bone formation *in vivo* when injected in combination with a biomaterial into nude mice, favoring their potential use for bone repair.

Materials and Methods

Materials. Cell culture media were purchased from Cambrex and fetal calf serum (FCS) from Dutscher S.A. (Brumath, France). EGF was a product of Euromedex (Souffelweyersheim, France). Reverse transcriptase was from Promega (Charbonnières-les-Bains, France), Nylon membranes were from Amersham Biosciences and all the other products were purchased from Sigma–Aldrich Chimie.

Cell culture. The establishment and characterization of the multipotency and self renewal of hMADS cells have already been described [35, 36, 47]. In the experiments reported herein, hMADS-2 cells, established from the pubic region fat pad of a 5-year-old male donor, were used at passages between 16 and 35 corresponding to 35 to 100 population doublings. Cells were seeded at a density of 4500 cells/cm² in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FCS, 2.5 ng/ml hFGF2, 60 µg/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin. The medium was changed every other day and hFGF2 was removed when cells reached confluence. At day 2 post-confluence (designated as day 0), cells were then induced to differentiate in the presence of α MEM medium containing 10% FCS (termed standard medium) supplemented with a hormonal cocktail containing: 10 nM 1,25-dihydroxyvitamin D₃, 100 nM dexamethasone, 50 µg/ml L-ascorbic acid phosphate and 10 mM β -glycerophosphate. Different amounts of serum were assayed in presence of various concentrations of BMPs (1- 20 nM), EGF and FGF2 (1-20 ng/ml). The media were then changed every other day and cells were used at the indicated days. Alkaline phosphatase and Alizarin red staining were performed as previously described [15]. Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, were purchased from Cambrex and used as recommended by the manufacturer and were termed hBMSC and correspond to mesenchymal stromal cells according to the new nomenclature [19].

Isolation and analysis of RNA. Total RNA was extracted using TRI-Reagent kit (Euromedex, France) according to manufacturer's instructions. Reverse transcriptase reactions and semi-quantitative PCR assays were performed as already described [1, 35]. Optimal annealing temperatures were determined by gradient PCR (48–60°C, supplemental Table 1). An aliquot of PCR products was analyzed on 1.5% ethidium bromide stained agarose gel. Quantitative RT-PCR assays were run on an ABI Prism 7000 real-time PCR machine (PerkinElmer Life Sciences). Reactions were performed according to the manufacturer's instructions using SYBR green PCR Master Mix. The expression of selected genes was in all cases normalized to the expression of the TATA-binding protein (TBP) encoding gene. Gene expression was quantified using the comparative- Δ Ct method. The oligonucleotides for each target of interest, designed using Primer Express software (PerkinElmer Life Sciences) are described (forward and reverse) in Table 1.

Immunostaining. hMADS cells were maintained on poly-D-lysine coated-coverslips. At the indicated day, cells were rinsed twice with PBS at 4°C, and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature. Free aldehydes were quenched with 100 mM Tris-pH 8.5, 150 mM NaCl for 5 min. Fixed cells were permeabilized with 0.005% digitonin for 15 min, and unspecific reactions were blocked with 1% normal goat serum, 1% bovine serum albumin in PBS for 30 min. Cells were then incubated with primary antibodies diluted in 0.1 % carrageenan in PBS, followed by Alexa Fluor conjugated secondary antibodies in the presence of 0.5 μ g/ml Hoescht (Invitrogen, France) for nuclei counterstaining. Coverslips were mounted on slides in Mowiol 4-88 solution (Sigma, France). Images were taken on an LSM510 META confocal microscope (Zeiss).

Determination of functional gap-junctions. Scrape-loading was performed as previously described [9, 32]. Briefly, the cell layer was washed twice with HBSS supplemented with calcium and magnesium (HBSS+). Then, 37°C prewarmed dye solution (0.05% (w/v) Lucifer Yellow (MW: 457 Da), and 0.1% (w/v) RITC-dextran (MW: 10 000 Da) dissolved in HBSS+) was added to the layer. A 27-gauge needle was used to create multiple scrapes. After 3.5 minutes, the dye solution was removed, cells were rinsed 3 times with HBSS+, fixed in 4% paraformaldehyde (5 min). The levels of gap-junctional intercellular communication were determined under a fluorescent confocal microscope. Excitation/emission filters used were: ex 570, em 595 for RITC-dextran, ex 435, em 530 for Lucifer Yellow. When indicated, cells were exposed to 100 μ M 18- α -glycyrrhetic acid, an inhibitor of functional gap-junction, for 15 hours before scrape-loading, cell viability was not affected under these conditions.

Implantation of hMADS cells into nude mice. These experiments were conducted according to the guidelines of the local animal care and experimentation committee and carried out as described by Trojani et al [40, 43]. Six-week-old CD-1 nude mice (female, homozygote nu/nu) from Charles River (L'Arbresle, France) were anesthetized with a mixture containing ketamin (90 mg/kg) and xylazin (4.5 mg/kg). The hardening injectable bone substitute, HIBS, composed of biphasic calcium phosphate granules (MBCP®, Biomatlante, Vigneux, France) sieved between 40 to 80 μ m in diameter, in suspension in a Si-HPMC hydrogel [5, 45], was loaded or not with hMADS cells (10^6 cells per implant) and injected percutaneously. hMADS cells were induced to differentiate for three days before injection to mice. Two subcutaneous injections of 80 μ l were performed for each mouse. Four and eight weeks after implantation, four animals of each group were sacrificed with carbon dioxide and the implants were retrieved. Histological analysis was carried out after fixation and paraffin embedding

using Haematoxylin erythrosin and safran (HES) and Goldner staining as described previously [40]. For immunostaining assays, 8 weeks implants were removed, covered with Tissue-Tek OCT-compound (Bayer Diagnostics, Puteaux, France), then snap-frozen by immersion in 2-methylbutane cooled by liquid nitrogen. The tissue samples were cryo-sectioned at 10 μm , placed on coverslips and stored at -80°C . Cryo-sections from cell-free and hMADS cells containing HIBS implants were immunostained as described above with rabbit anti-human (Biogenesis Ltd, UK) or anti-mouse osteocalcin antibodies (Takara, Japan). These anti-osteocalcin antibodies are species specific. Preparations were analyzed by confocal microscopy.

Results

Osteoblastic differentiation of hMADS-2 cells.

The osteoblastic potential of hMADS-2 cells was examined under standard cell culture conditions, i.e. in the presence of 10% FCS and the hormonal cocktail as described in the Material and Methods section. hMADS-2 cells that have been maintained for 24 days in this medium were intensely stained with Alizarin red. This indicates the formation of a mineralized extracellular matrix (Fig. 1A) which was not detectable for the first twenty days under these culture conditions, whereas more than 90% of cells expressed alkaline phosphatase (data not shown). In parallel, as shown by quantitative RT-PCR, the cells expressed osteoblastic marker genes, CBFA-1 and osteonectin followed by alkaline phosphatase (AP) during the differentiation process (Fig. 1B). These observations are comparable to reported expression pattern of hBMSC [21]. Similar results were also obtained with hMADS-1 and 3 cells, which were isolated from the umbilical fat pad of a 31-month-old female donor and the prepubic fat pad of a 4-month-old male donor, respectively (data not shown).

Compared to the interstitial fluid surrounding the majority of cells *in vivo*, serum supplementation represents *in vitro* ill-defined, non-physiological conditions. Therefore, we tested whether osteogenic differentiation of hMADS cells could take place under serum-free conditions in order to set-up a chemically defined medium that might provide better insights into molecular mechanisms of differentiation. For that purpose, we induced osteoblastic differentiation of hMADS-2 cells in α MEM medium containing different amounts of serum in the presence of the hormonal cocktail with or without additional growth factors. In the absence of serum, BMP-2, BPM-6, FGF2 or EGF alone or a combination of EGF and BMP-2, BPM-6 or FGF2 were unable to induce any osteoblastic differentiation of hMADS-2 cells (data not shown). Indeed, supplementation

with a low amount of FCS, i.e. 1%, is still required. Among all the growth factors tested, EGF only was able to induce the formation of a mineralized extracellular matrix (Fig. 2A). Under these conditions, the differentiation process became faster as it occurred within two weeks of culture, even in the presence of 10% FCS (Fig. 2A) compared to more than 3 weeks in the presence of 10% FCS in the absence of EGF (Fig. 1A). Thus these results show that EGF (10 ng/ml) in the presence of both 1% serum and the hormonal cocktail was able to commit and accelerate the osteogenic differentiation process of hMADS cells. Consequently, this medium was selected for all subsequent studies described herein and was termed osteoblastic differentiation medium (ODM). The absence of BMP effect on hMADS cells osteogenesis could be explained by the fact that these cells express some endogenous BMPs and their cognate receptors. Using quantitative RT-PCR, we observed that BMP1, 2 and 6 mRNA as well as BMP receptors mRNA were expressed and increased transiently (Fig. 2B). By contrast, BMP3-5 and BMP7-10 mRNA expression was not detectable (data not shown). EGF treatment affected positively the expression of BMP2 and BMPR1B mRNA (Fig. 2C). These data suggest that endogenous BMPs could play a role in synergy with EGF and/or some serum component(s), thus explaining the lack of effect of exogenous BMP on hMADS cells osteogenesis.

Osteogenic marker genes expression.

We searched whether the EGF-induced osteogenic differentiation of hMADS cells was associated with the expression of specific markers. As shown in Fig. 3A and C, expression of early markers CBFA-1 and AP mRNA increased during osteogenesis. The same pattern of expression was observed using differentiating human

mesenchymal stem cells from bone marrow (hBMSC) in the presence of ODM (Fig. 3B and D), showing that hMADS cells have similar osteogenic potential.

Osteocytes represent the most abundant cell type in bone [22, 24]. A few osteocyte-specific markers have been described among which Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) expressed in dentin and bone [11], Phosphate-regulating gene with Homology to Endopeptidase genes present on the X chromosome (PHEX) [14] and E11/gp38 also called podoplanin (Pdpn) [48]. Terminal differentiation of an osteoblast to a mature osteocyte is demarcated in vitro by the up-regulation of osteocalcin and some genes such as Pdpn expression.

We analysed the expression of osteocalcin protein and the levels of osteocalcin, DMP1, PHEX and Pdpn mRNA in differentiating hMADS cells. Figure 4A showed that more than 90% of hMADS cells expressed osteocalcin protein. Furthermore, hMADS cells expressed osteocalcin, DMP1, PHEX and Pdpn mRNA at late stages of the differentiation process (Fig. 4B and C). Altogether, these results indicate that hMADS cells differentiated into osteoblasts and matured to osteocyte-like cells.

Gap-junctional communications in hMADS cells.

Gap-junctional communications are known to be required for the osteoblast maturation process in culture [8]. The expression of connexin 43, one of the gap-junction proteins was investigated by immunostaining in differentiating hMADS cells. As shown in Fig. 5A b, hMADS cells expressed connexin 43 protein at day 0, mainly within intracellular membrane compartments, whereas no signal was observed in the absence of the primary antibody (Fig. 5A a). During differentiation, the specific signal became organized as punctuated and typical staining of gap-junction at the plasma membrane level was visible at day 6 (Fig. 5A c) and increased at later days (Fig. 5A d).

We then checked whether these gap-junctions were functional. For this purpose, we used the dye-transfer method to assess gap-junctional communications between hMADS cells. When Fluorescent Lucifer Yellow and Rhodamin-Dextran were scrape-loaded into hMADS cells, no fluorescence was seen in the adjacent confluent hMADS cells at day 0 (Fig. 5B a). The low molecular weight yellow dye was rapidly transferred to the neighbouring cells at day 6 (Fig. 5B b), whereas the high molecular weight, non diffusible red dye, remained only visible in the vicinity of the scrape. The diffusion of the yellow dye to the adjacent cells was completely blocked in the presence of 18- α -glycyrrhetic acid, an inhibitor of gap-junctions, as shown in Fig. 5B c. These observations show that differentiating hMADS cells communicate with each other through gap-junctions.

***In vivo* ectopic bone formation by hMADS cells incorporated into an injectable biomaterial.**

We determined whether these cells were also able to support bone tissue formation *in vivo*. For this purpose, hMADS cells were induced to differentiate into osteoblasts for 3 days in ODM. These cells were then harvested and loaded into an injectable biphasic calcium phosphate/Si-HPMC hydrogel composite (HIBS) and subcutaneously injected into nude mice. Four weeks after injection, 8 out of 8 of the hMADS cell/HIBS implants exhibited a hard consistency. Histological analysis showed that all the implants were fully colonized with woven bone within the ceramic in the intergranular spaces. Several cuboidal-shaped osteoblasts were present on the surface of the biphasic calcium phosphate particles associated with numerous osteocytes (Fig. 6C and D). In addition, numerous vessels that might support bone formation and multinucleated cells (osteoclast cells) were widely distributed. Similar results were obtained in 8 week

implants (data not shown). hMADS cell/HIBS implants were positive for Goldner staining at 4 and 8 weeks after injection, indicating that the newly formed tissue was indeed mineralized (Fig. 6E). Cell-free/HIBS implants revealed after 4 and 8 weeks an elastic consistency and the absence of tissue formation (Fig. 6A and B).

To evaluate whether hMADS cells had differentiated into osteoblasts, we stained 8-week implants with an anti-human osteocalcin antibody that did not cross react with the mouse antigen. A fairly small proportion of cells in the hMADS cell/HIBS implants were stained for human osteocalcin (Fig. 6G) whereas no signal was observed using either control implants with mouse cells or cell-free/HIBS implants (data not shown). These observations demonstrate that implants were colonized by injected cells that differentiated into osteoblasts and contributed to woven bone formation. Consistent with this hypothesis, a proportion of cells in the hMADS cell/HIBS implants, similar to that of osteocalcin-positive cells could be stained with human specific anti β 1-integrin and α 5-integrin antibodies (data not shown). Of note, a fairly large proportion of cells identified by nuclei counterstaining appeared unstained for human osteocalcin but stained for mouse osteocalcin antigen (Fig. 6H). This suggests that some proportion of injected cells underwent osteoblast differentiation and that the implants were colonized by non-human, i.e. mouse cells. Altogether, these data indicate that, in the presence of hMADS cells, mouse cells had invaded the implants and have likely participated to woven bone formation.

Discussion

Although bone marrow provides a universal source of mesenchymal stem cells, adipose tissue is more abundant and more convenient to isolate. Several studies have shown the presence of a fibroblast-like cell population isolated from adipose tissue that is able to differentiate into adipogenic, osteogenic, myogenic and chondrogenic cells under appropriate medium conditions [12]. However, the limited life span and amount of cells as well as their heterogeneity associated with the inability to support successive freezing/thawing steps, limit the use of these cells. Multipotent stem cells derived from human adipose tissue (hMADS cells), exhibiting a normal karyotype, multipotency at the clonal level and high self renewal, have been recently isolated in our laboratory [36, 47]. We described herein *in vitro* and *in vivo* osteoblastic differentiation of hMADS cells. These cells were able to mineralize the matrix within 3 to 4 weeks in the presence of a standard medium containing 10 % FCS and to express typical osteoblastic molecular markers. Interestingly, osteoblastic differentiation was optimal and required only 2 weeks in a medium containing 1% FCS and EGF. EGF might exert its effects through EGF receptor which was expressed in hMADS cells and its levels did not change during differentiation (data not shown). Furthermore, this differentiation was associated with the expression of osteocyte specific markers, PHEX, DMP1 and Pdpn, thus suggesting an osteocyte-like phenotype. In addition, hMADS cells expressed BMP-1, 2 and 6 as well as their cognate receptors BMPR1A, BMPR1B and BMPR2 during osteogenesis (Fig 2B) demonstrating that hMADS cells were equipped with components of BMP signalling pathway. Although, BMP-6 had been shown to be a potent regulator of osteoblastic differentiation of hBMSC in a medium without serum [10], osteoblastic differentiation of hMADS cells did not occur in a serum-free medium supplemented with either BMP-6, BMP-2, EGF or insulin or a combination of EGF and BMP-6 or BMP-2

(data not shown). The lack of BMP-6 effect on osteogenic differentiation of hMADS cells could be due to the different origin of the cells but, of note, both cell models differentiated in the presence of 1% FCS and EGF and expressed specific markers in a similar manner (Fig. 3). Moreover, EGF exerted a positive effect on BMPR1B mRNA levels (Fig. 2C). Interestingly, as BMPR1B, BMP2 and BMP6, have been shown to play an important role during osteogenesis and bone formation [6, 27, 44], our data suggested that EGF may favor the expression of these genes and thus may play an important role in the differentiation process.

Both EGF signalling and the presence of a low percentage of serum are required for complete osteoblastic differentiation of hMADS and hBMSC cells. Previous reports showed that EGF, but not PDGF, induced osteogenic differentiation of immortalized hBMSC cells and that the PI3K pathway played a pivotal role that determines the differential effect of EGF versus PDGF [26, 46]. EGF is acting through its receptor (EGFR), a well-known and versatile signal transducer that functions in a wide range of cellular processes, including cell fate determination, cell migration, apoptosis and proliferation [38]. A limited cell proliferation of hMADS cells was observed during the first days of induction of differentiation in ODM (data not shown). Thus it is tempting to postulate that EGF acts in combination with one or more components of serum to induce proliferation in addition to differentiation. This in turn could modulate different pathways among which the RhoA and Wnt signalling pathways reported to be involved in osteoblastic cell fate [2, 31].

Gap-junction communications are required for the development and the maintenance of a differentiated osteoblast phenotype, and inhibition of these communications is associated with reduced osteoblast differentiation potential [8, 28, 37]. hMADS cells express connexin 43, one of the protein components of gap-junctions, and form

functional gap-junctions upon osteoblastic differentiation (Fig. 5), implying that hMADS cells communicate with each other. Moreover, it has been reported that EGF modulates gap-junction communications [42], suggesting that EGF might also enhance gap-junction formation during osteoblastic differentiation of the cells.

Finally we demonstrated that hMADS cells injected subcutaneously into nude mice, in the presence of HIBS biomaterial, are able to induce the formation of a highly vascularised mineralized woven bone displaying numerous osteoblasts, osteocytes and osteoclasts, whereas cell-free/HIBS leads to empty implants (Fig. 6A-D). Furthermore, immunostaining of 8-week implants with human specific anti-osteocalcin antibody (Fig. 6G) showed that the implanted hMADS cells had differentiated into osteoblasts and had promoted bone formation in nude mice. It appears that a low proportion of the cells present in the 8-week implants are positive for human antigens. The remaining cells are mouse osteoblasts and/or osteocytes (Fig. 6H). Thus, it is tempting to postulate that hMADS cells once committed to the osteogenic lineage acquire the ability to induce the invasion of the implant by host cells via an unknown endocrine/paracrine mechanism which then co-participates in tissue formation. These data are in agreement with previous observations showing that when quail marrow cells subcutaneously implanted with a biomaterial into nude mice, osteogenesis was observed as a two step phenomenon; a first step in which donor cells are largely responsible for the observed osteogenesis, and a second one in which host cells predominate [13]. A few reports have described the ability of “ill-defined” heterogeneous populations of human adipose tissue-derived stromal cells to form bone when implanted in the presence of different scaffolds [16-18, 20]. In contrast, hMADS cells, which are cell populations exhibiting a normal karyotype, self-renewal and plasticity with *in vitro* expansion, are able to form bone *in vivo* thus representing an improved potential tool for regenerative medicine.

In conclusion, we describe herein the osteogenic differentiation of stem cells derived from human adipose tissue in the presence of low concentrations of serum and EGF. These cells are able to express *in vitro* osteocyte markers and induce *in vivo* woven bone formation when loaded with an injectable biomaterial.

Acknowledgments

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and by a grant from: «Equipe FRM, soutenue par la Fondation Recherche Médicale».

We are grateful to Pr. K. Kristiansen, Dr. P. Peraldi and Dr. N. Billon for critical review of the manuscript. We thank all the staff of the anatomo-pathology department for excellent technical assistance. CC is a recipient of an FRM fellowship.

References

1. Abderrahim-Ferkoune, A., Bezy, O., Astri-Roques, S., Elabd, C., Ailhaud, G., and Amri, E. Z. Transdifferentiation of preadipose cells into smooth muscle-like cells: role of aortic carboxypeptidase-like protein. *Exp Cell Res* 293:219-28; 2004.
2. Baron, R., Rawadi, G., and Roman-Roman, S. Wnt signaling: a key regulator of bone mass. *Curr Top Dev Biol* 76:103-27; 2006.
3. Bianco, P., and Gehron Robey, P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 105:1663-8; 2000.
4. Bosch, P., Musgrave, D. S., Lee, J. Y., Cummins, J., Shuler, T., Ghivizzani, T. C., Evans, T., Robbins, T. D., and Huard Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J Orthop Res* 18:933-44; 2000.
5. Bourges, X., Weiss, P., Daculsi, G., and Legeay, G. Synthesis and general properties of silylated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Adv Colloid Interface Sci* 99:215-28; 2002.
6. Chen, D., Ji, X., Harris, M. A., Feng, J. Q., Karsenty, G., Celeste, A. J., Rosen, V., Mundy, G. R., and Harris, S. E. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol* 142:295-305; 1998.
7. De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., and Luyten, F. P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44:1928-42; 2001.

8. Donahue, H. J. Gap junctions and biophysical regulation of bone cell differentiation. *Bone* 26:417-22; 2000.
9. el-Fouly, M. H., Trosko, J. E., and Chang, C. C. Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. *Exp Cell Res* 168:422-30; 1987.
10. Friedman, M. S., Long, M. W., and Hankenson, K. D. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J Cell Biochem* 98:538-554; 2005.
11. George, A., Sabsay, B., Simonian, P. A., and Veis, A. Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization. *J Biol Chem* 268:12624-30; 1993.
12. Gimble, J., and Guilak, F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 5:362-9; 2003.
13. Goshima, J., Goldberg, V. M., and Caplan, A. I. The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. *Clin Orthop Relat Res*:274-83; 1991.
14. Guo, R., and Quarles, L. D. Cloning and sequencing of human PEX from a bone cDNA library: evidence for its developmental stage-specific regulation in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 12:1009-17; 1997.
15. Halvorsen, Y. D., Franklin, D., Bond, A. L., Hitt, D. C., Auchter, C., Boskey, A. L., Paschalis, E. P., Wilkison, W. O., and Gimble, J. M. Extracellular matrix

- mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* 7:729-41.; 2001.
16. Hattori, H., Ishihara, M., Fukuda, T., Suda, T., and Katagiri, T. Establishment of a novel method for enriching osteoblast progenitors from adipose tissues using a difference in cell adhesive properties. *Biochem Biophys Res Commun* 343:1118-23; 2006.
 17. Hattori, H., Masuoka, K., Sato, M., Ishihara, M., Asazuma, T., Takase, B., Kikuchi, M., Nemoto, K., and Ishihara, M. Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 76:230-9; 2006.
 18. Hicok, K. C., Du Laney, T. V., Zhou, Y. S., Halvorsen, Y. D., Hitt, D. C., Cooper, L. F., and Gimble, J. M. Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng* 10:371-80; 2004.
 19. Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Deans, R. J., Krause, D. S., and Keating, A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7:393-5; 2005.
 20. Im, G. I., Shin, Y. W., and Lee, K. B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* 13:845-53; 2005.

21. Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I., and Bruder, S. P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64:295-312; 1997.
22. Jande, S. S., and Belanger, L. F. The life cycle of the osteocyte. *Clin Orthop Relat Res*:281-305; 1973.
23. Kartsogiannis, V., and Ng, K. W. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Mol Cell Endocrinol* 228:79-102; 2004.
24. Knothe Tate, M. L., Adamson, J. R., Tami, A. E., and Bauer, T. W. The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1-8; 2004.
25. Kohyama, J., Abe, H., Shimazaki, T., Koizumi, A., Nakashima, K., Gojo, S., Taga, T., Okano, H., Hata, J., and Umezawa, A. Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* 68:235-44; 2001.
26. Kratchmarova, I., Blagoev, B., Haack-Sorensen, M., Kassem, M., and Mann, M. Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 308:1472-7; 2005.
27. Kugimiya, F., Kawaguchi, H., Kamekura, S., Chikuda, H., Ohba, S., Yano, F., Ogata, N., Katagiri, T., Harada, Y., Azuma, Y., Nakamura, K., and Chung, U. I. Involvement of endogenous bone morphogenetic protein (BMP) 2 and BMP6 in bone formation. *J Biol Chem* 280:35704-12; 2005.

28. Lecanda, F., Towler, D. A., Ziambaras, K., Cheng, S. L., Koval, M., Steinberg, T. H., and Civitelli, R. Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Mol Biol Cell* 9:2249-58; 1998.
29. Lian, J. B., Stein, G. S., Javed, A., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Montecino, M., Hassan, M. Q., Gaur, T., Lengner, C. J., and Young, D. W. Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord*; 2006.
30. Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., Abe, H., Hata, J., Umezawa, A., and Ogawa, S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 103:697-705; 1999.
31. McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K., and Chen, C. S. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* 6:483-95; 2004.
32. McNeil, P. L., Murphy, R. F., Lanni, F., and Taylor, D. L. A method for incorporating macromolecules into adherent cells. *J Cell Biol* 98:1556-64; 1984.
33. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-7; 1999.
34. Planat-Benard, V., Silvestre, J. S., Cousin, B., Andre, M., Nibbelink, M., Tamarat, R., Clergue, M., Manneville, C., Saillan-Barreau, C., Duriez, M., Tedgui, A., Levy, B., Penicaud, L., and Casteilla, L. Plasticity of human adipose lineage cells toward

- endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109:656-63; 2004.
35. Rodriguez, A. M., Elabd, C., Delteil, F., Astier, J., Vernochet, C., Saint-Marc, P., Guesnet, J., Guezennec, A., Amri, E. Z., Dani, C., and Ailhaud, G. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 315:255-63; 2004.
 36. Rodriguez, A. M., Pisani, D., Dechesne, C. A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J. Y., Wdziekonski, B., Villageois, A., Bagnis, C., Breitmayer, J. P., Groux, H., Ailhaud, G., and Dani, C. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* 201:1397-405; 2005.
 37. Schiller, P. C., D'Ippolito, G., Brambilla, R., Roos, B. A., and Howard, G. A. Inhibition of gap-junctional communication induces the trans-differentiation of osteoblasts to an adipocytic phenotype in vitro. *J Biol Chem* 276:14133-8; 2001.
 38. Singh, A. B., and Harris, R. C. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal* 17:1183-93; 2005.
 39. Takeda, S., and Karsenty, G. Central control of bone formation. *J Bone Miner Metab* 19:195-8; 2001.
 40. Trojani, C., Boukhechba, F., Scimeca, J. C., Vandebos, F., Michiels, J. F., Daculsi, G., Boileau, P., Weiss, P., Carle, G. F., and Rochet, N. Ectopic bone formation using an injectable biphasic calcium phosphate/Si-HPMC hydrogel

- composite loaded with undifferentiated bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 27:3256-64; 2006.
41. Verfaillie, C. M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* 12:502-8; 2002.
 42. Vikhamar, G., Rivedal, E., Mollerup, S., and Sanner, T. Role of Cx43 phosphorylation and MAP kinase activation in EGF induced enhancement of cell communication in human kidney epithelial cells. *Cell Adhes Commun* 5:451-60; 1998.
 43. Vinatier, C., Magne, D., Weiss, P., Trojani, C., Rochet, N., Carle, G. F., Vignes-Colombeix, C., Chadjichristos, C., Galera, P., Daculsi, G., and Guicheux, J. A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials* 26:6643-51; 2005.
 44. Wan, D. C., Shi, Y. Y., Nacamuli, R. P., Quarto, N., Lyons, K. M., and Longaker, M. T. Osteogenic differentiation of mouse adipose-derived adult stromal cells requires retinoic acid and bone morphogenetic protein receptor type IB signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12335-40; 2006.
 45. Weiss, P., Vinatier, C., Guicheux, J., Grimandi, G., and Daculsi, G. A self setting hydrogel as an extracellular synthetic matrix for tissue engineering. *Key Engineering Material* 254-256:1107-10; 2004.
 46. Yarram, S. J., Tasman, C., Gidley, J., Clare, M., Sandy, J. R., and Mansell, J. P. Epidermal growth factor and calcitriol synergistically induce osteoblast maturation. *Mol Cell Endocrinol* 220:9-20; 2004.

47. Zaragosi, L. E., Ailhaud, G., and Dani, C. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells* 24:2412-9; 2006.
48. Zhang, K., Barragan-Adjemian, C., Ye, L., Kotha, S., Dallas, M., Lu, Y., Zhao, S., Harris, M., Harris, S. E., Feng, J. Q., and Bonewald, L. F. E11/gp38 selective expression in osteocytes: regulation by mechanical strain and role in dendrite elongation. *Mol Cell Biol* 26:4539-52; 2006.
49. Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., and Hedrick, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211-28.; 2001.

Legend to tables and figures

Table 1. Sequences of primers used for gene expression analysis.

Figure 1. Osteoblastic differentiation of hMADS-2 cells. Seeding and proliferation were performed as described in the “Materials and Methods” section. Two days post-confluence (designated day 0), cells were induced to differentiate in the presence of α MEM medium supplemented with 10% FCS and the hormonal cocktail. Cells were fixed and Alizarin red stained at the indicated times (A). RNA was analysed for the expression of CBFA-1, Osteonectin and alkaline phosphatase by quantitative RT-PCR at the indicated times (B). Results are representative of three independent experiments performed on different series of cells.

Figure 2. EGF-induced osteogenic differentiation of hMADS-2 cells. hMADS-2 cells were induced to differentiate at day 0, in the presence of different concentrations of serum, the hormonal cocktail and the indicated amounts of EGF. At day 15, cells were fixed and Alizarin red stained (A). RNA was analysed by quantitative RT-PCR for the expression of BMPs and BMP receptors in the presence of α MEM, 1%FCS, hormonal cocktail and 10 ng/ml of EGF (ODM) (B), levels are relative to day 0 set as 1. As described in (B), RNA was analysed at day 17 in the absence (-) or presence (+) of 10 ng/ml of EGF (C). Results are representative of two independent experiments performed on different series of cells.

Figure 3. Expression of molecular markers in differentiating hMADS and hBMSC cells. hMADS-2 (A, C) and hBMSC (B, D) cells were induced to differentiate at day 0 in

the presence of ODM. RNA was extracted at the indicated times and analysed for the expression of CBFA-1 (A, B) and alkaline phosphatase (C, D) by quantitative RT-PCR. The results are representative of two independent experiments performed on different series of cells.

Figure 4. Expression of late osteoblast and osteocyte markers. hMADS-2 cells were induced to differentiate at day 0 in the presence of ODM. (A) immunostaining of hMADS cells after 17 days in ODM, without the primary antibody (a) or with anti-human-osteocalcin antibody (b). Nuclei in blue were stained with Hoescht; bar, 20 μ m. RNA was analysed for the expression of osteocalcin, DMP-1 and PHEX by RT-PCR (NC: negative control) (B) and Pdpn by quantitative RT-PCR (C) at the indicated times. Results are representative of two independent experiments performed on different series of cells.

Figure 5. Differentiating hMADS cells form functional gap-junctions. hMADS cells maintained on coverslips were induced to differentiate into osteoblasts in ODM. (A) hMADS cells immunostaining without the primary antibody at day 0 (a) or with anti-connexin 43 antibody at day 0 (b), day 6 (c) and day 13 (d). Nuclei are stained with Hoescht (blue). Bar, 20 μ m. (B) hMADS cells were scrape-loaded with Lucifer Yellow and RITC-dextran at day 0 (a) and at day 6 in the absence (b) or the presence of a 15 h pre-treatment with 100 μ M 18- α -glycyrrhetic acid (c). Dotted lines indicate the site of the scrape, the arrow shows the direction of dye diffusion. Cells were photographed under fluorescent confocal microscope for the two fluorophores and merged images are shown. Bar, 100 μ m.

Figure 6. In vivo ectopic bone formation induced by hMADS cells. hMDAS-2 cells were cultured in ODM for 3 days before incorporation into HIBS and implantation into nude mice as described in the “Materials and Methods” section. HES staining of cross-sections of cell-free/HIBS (A and B) or hMADS-2 containing implants (C and D). Goldner staining of hMADS cell/HIBS implants (E) 4 weeks after implantation, showing mineralized bone tissue in green. Immunostaining without the primary antibody (F) or with anti-human-osteocalcin antibody (G) or anti-mouse osteocalcin (H) in hMADS-2 cell/HIBS implants 8 weeks after implantation and counterstaining with Hoescht for DNA visualization. Black, white and blue arrows indicate osteoblasts, osteocytes and osteoclasts, respectively. Black arrowhead show blood vessels. Bars: A and C: 1 mm; B, D and E: 80 μ m; F-H: 50 μ m. Each microphotograph is representative of eight implants stained with HES or Goldner, and of three implants for anti-human and mouse osteocalcin immunostaining.

Table 1

gene	forward primer (5'-3')	reverse primer (5'-3')	annealing temperature (°C)	size (bp)	Accession N°
(A) RT-PCR					
β -actin	AGCCATGTACGTTGCTA	AGTCCGGCCTAGAAGCA	55	743	M10277
PHEX	GTCCCCCTGATGACAAAGCAT	TCGAACTGGGGAATCATAG	56	315	NM_000444
DMP1	AGTGCCCAAGATACCACCAG	GGAGTTTCCCCTTTCACCTCC	56	222	NM_004407
osteocalcin	CACACTCCTCGCCCTATTGG	GATGTGGTCAGCCCAACTCGT	60	250	NM_199173
(B) Quantitative RT-PCR					
TBP	CACGAACCACGGCACTGATT	TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC	60	88	NM_003194
CBFA1	AGTGGACGAGGCAAGAGTTTCA	GGGTTCCCAGGTCATCTA	60	111	AF001450
AP	GCGCAAGAGACACTGAAATATGC	TGGTGGAGCTGACCCCTTGAG	60	140	NM_000478
Osteonectin	CCCATTGGCGAGTTTGAGAA	TTGCAAGGCCCGATGTAGTC	60	140	NM_003118
Pdpn	TTACTAGCCATCGGCTTTCATTG	GGCGAGTACCTTCCCAGACAT	60	70	NM_006474
BMP1	AGCAGCAATTGGTTGGAAAG	GGCGATTGAATGTGGCCATA	60	92	NM_006132
BMP2	TGTGGACGCTCTTTCAATGGA	GGGAAAGCAGCAACGCTAGAAG	60	113	NM_001200
BMP6	GCGATTGTGCAGACCTTGGT	CCGAGATGGCATTTAGCTTAGTTG	60	88	NM_001718
BMPR1A	GTGGGCACCAACGCTACA	TTCCACGATCCCCTCCTGTGA	60	151	NM_004329
BMPR1B	CCTCCCCTCTGCTGGTCCAA	CTTTTCGCCACGCCACTTT	60	109	NM_001203
BMPR2	AAACCTGCAATTTCCCACCGA	GGCGCACCAAGTCTATTTCCA	60	121	NM_001204

Figure 1

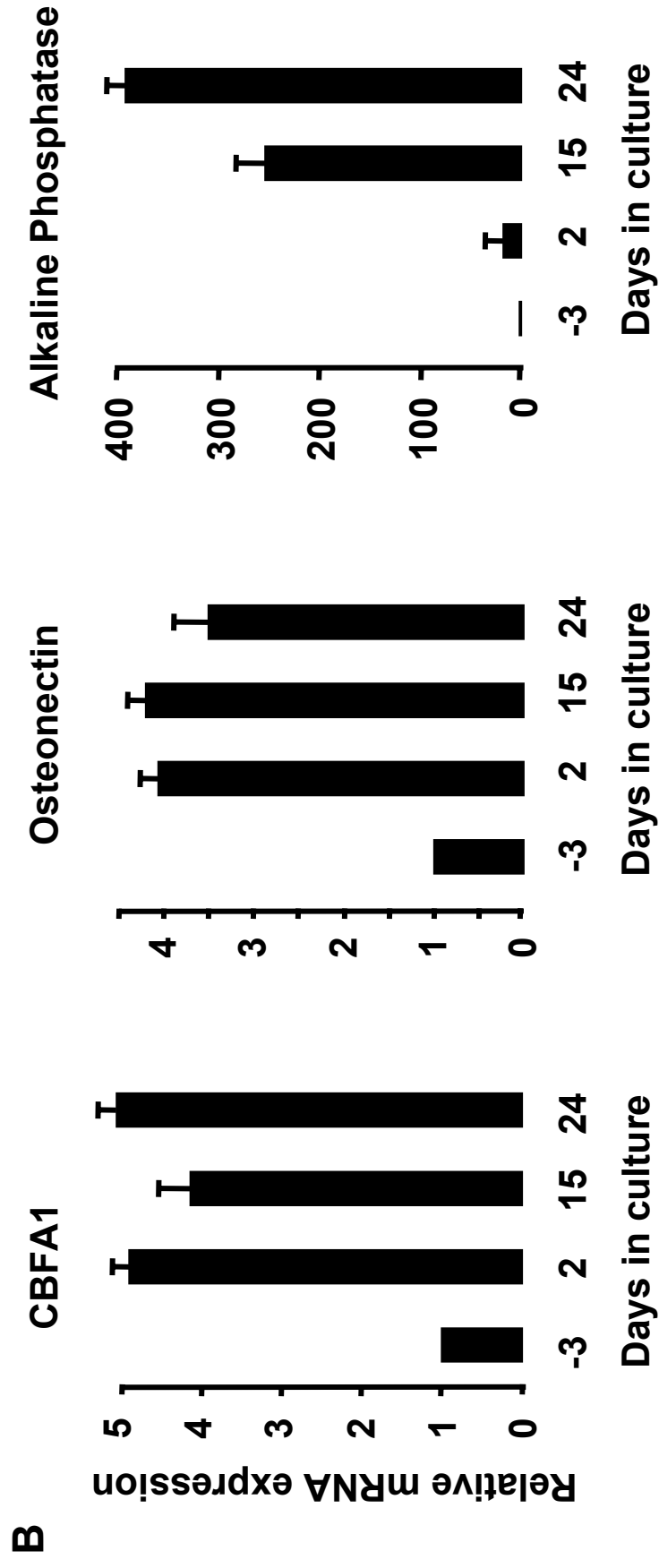
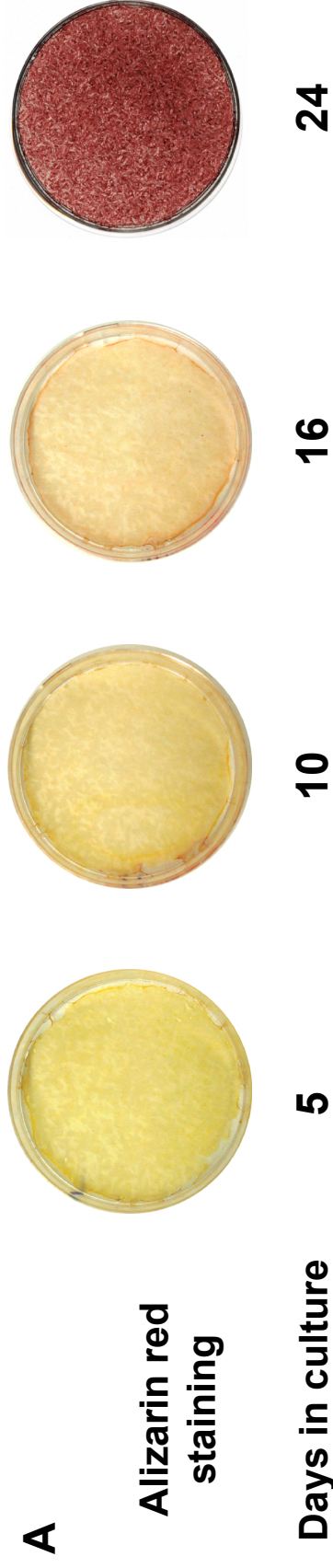
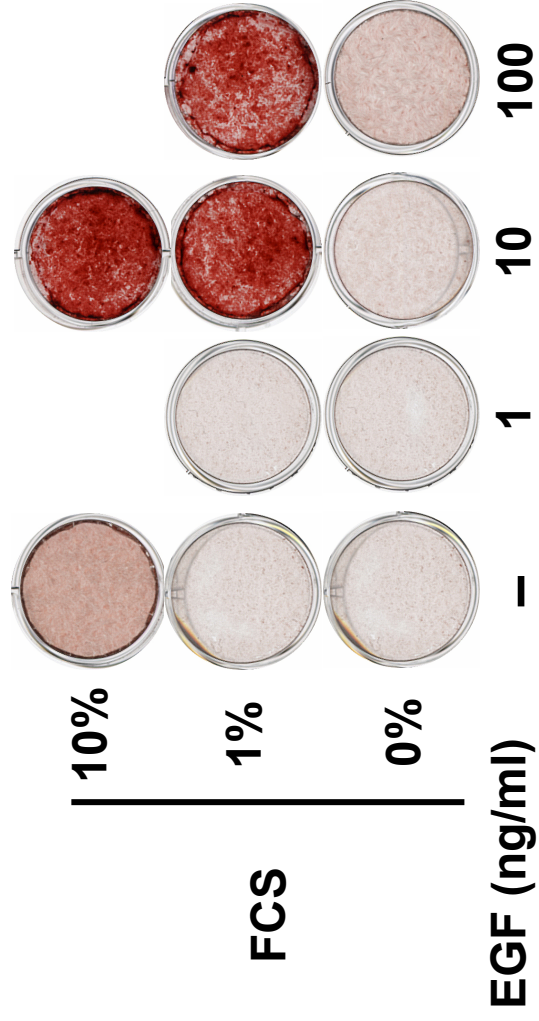
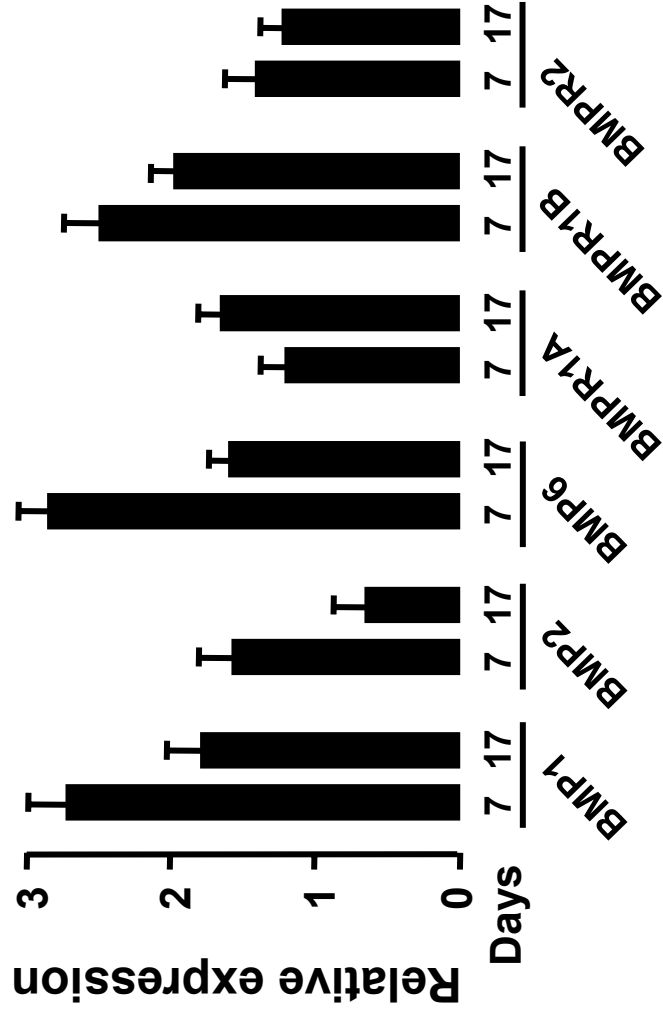


Figure 2

A



B



C

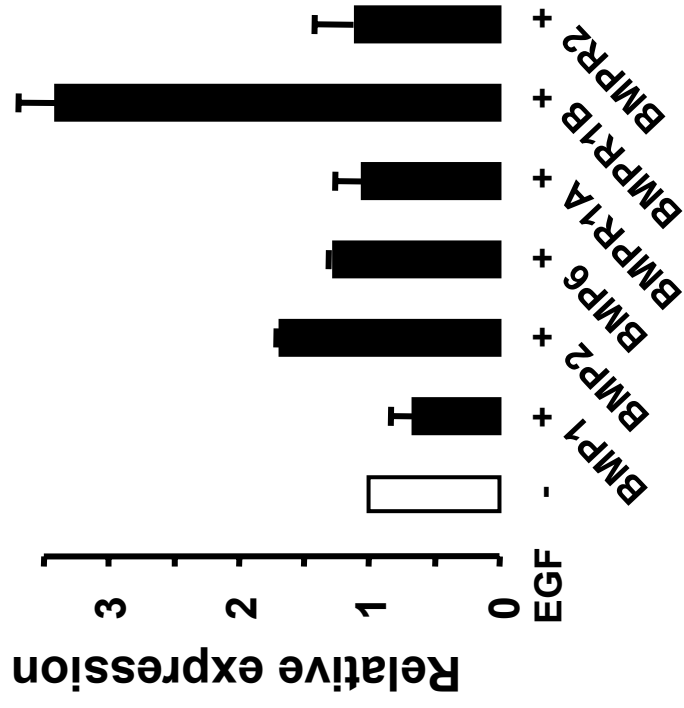


Figure 3

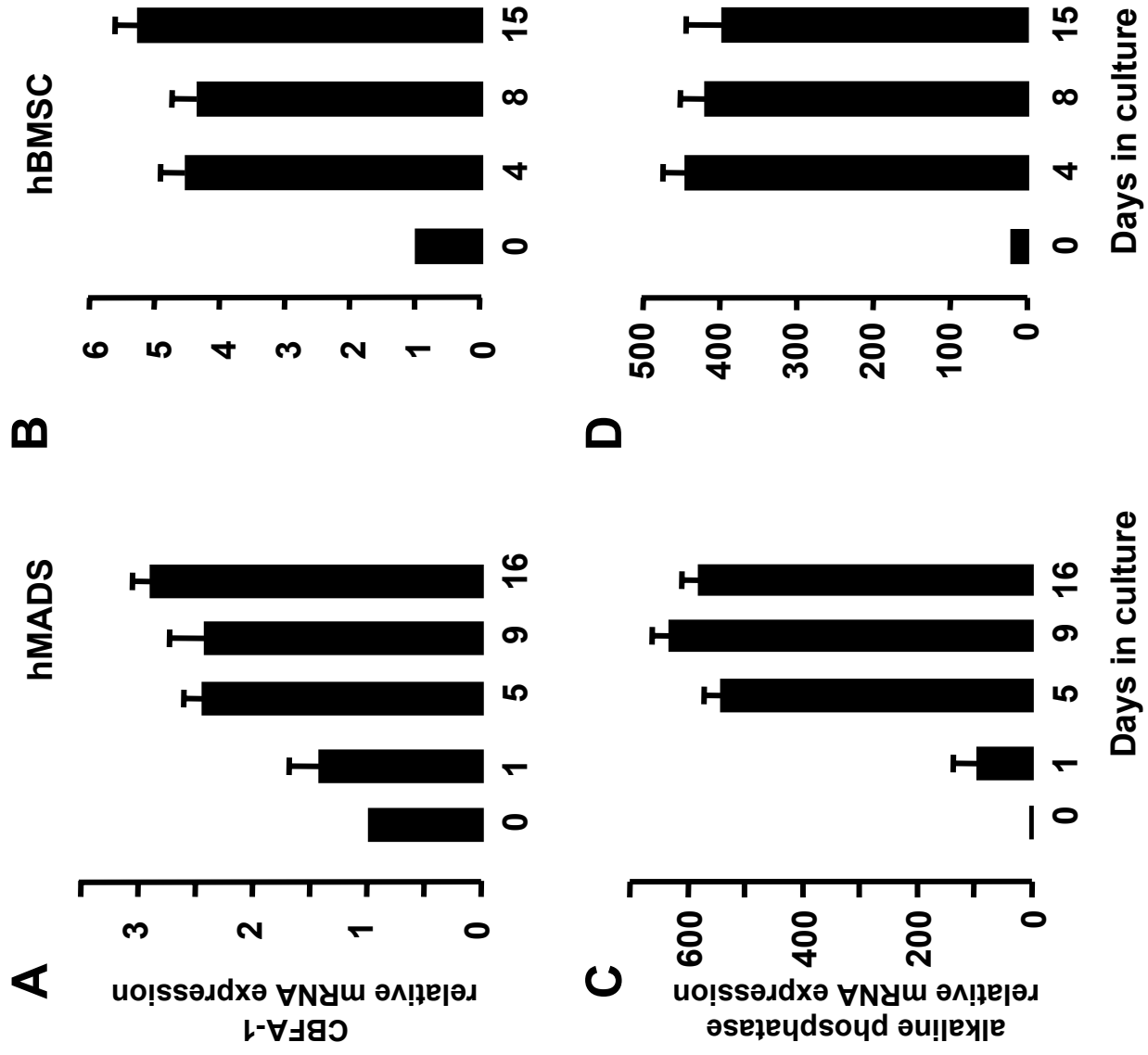


Figure 4

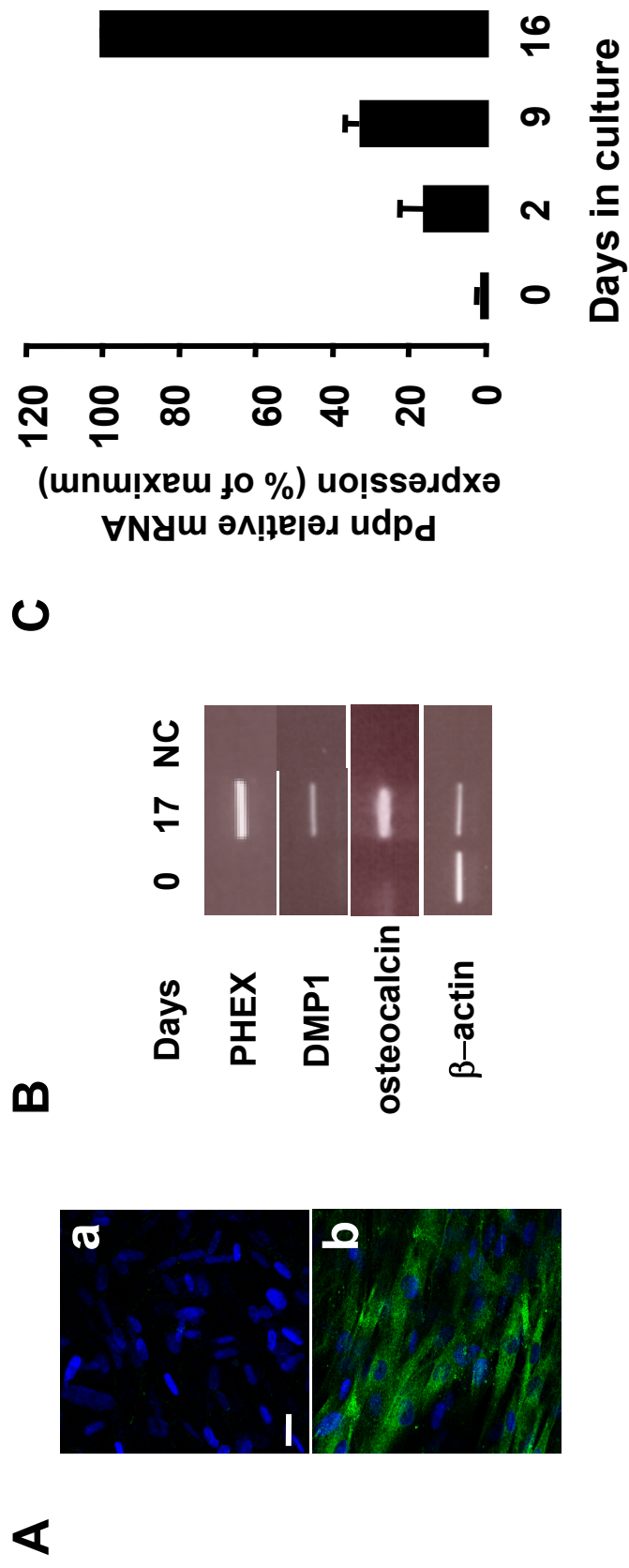


Figure 5

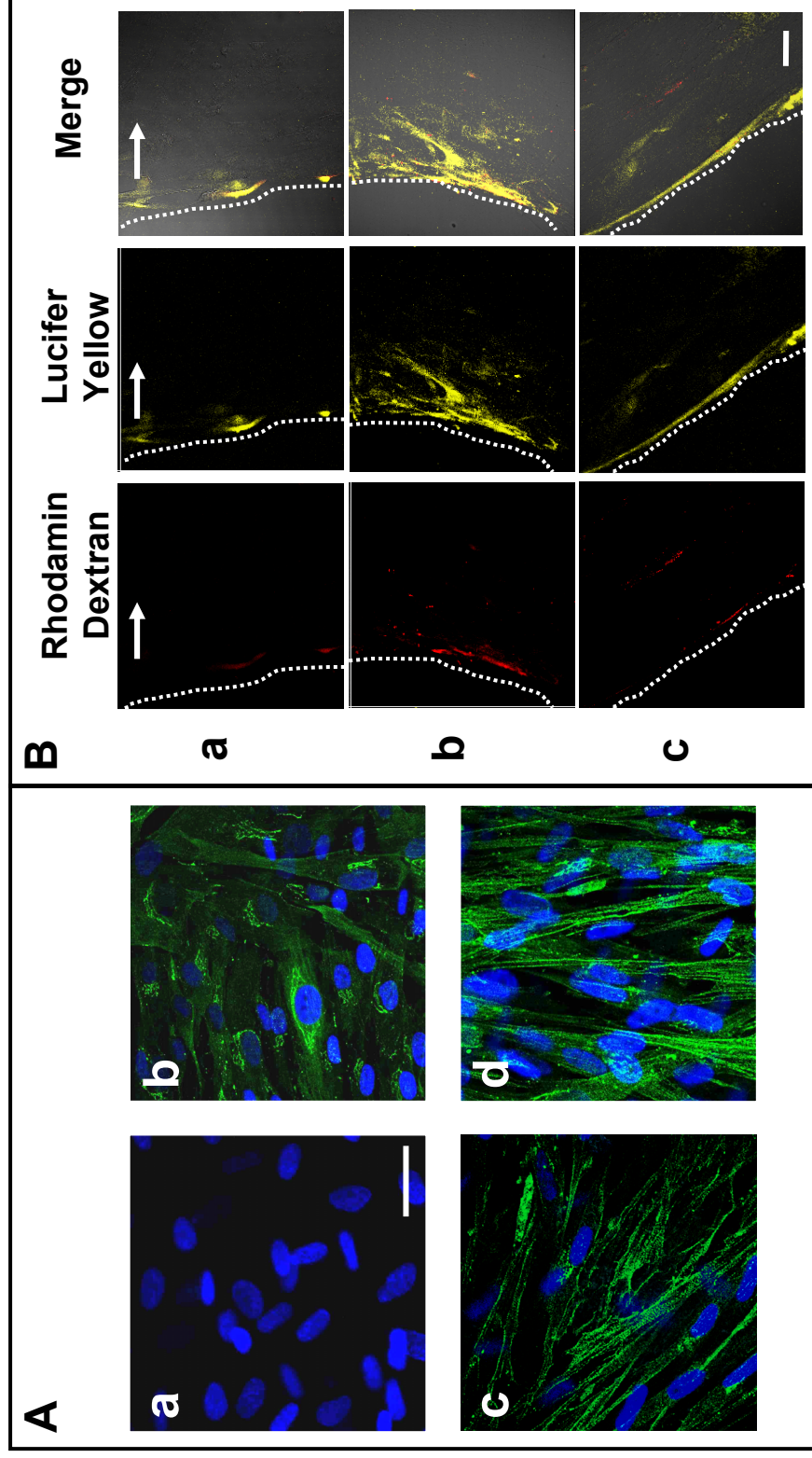
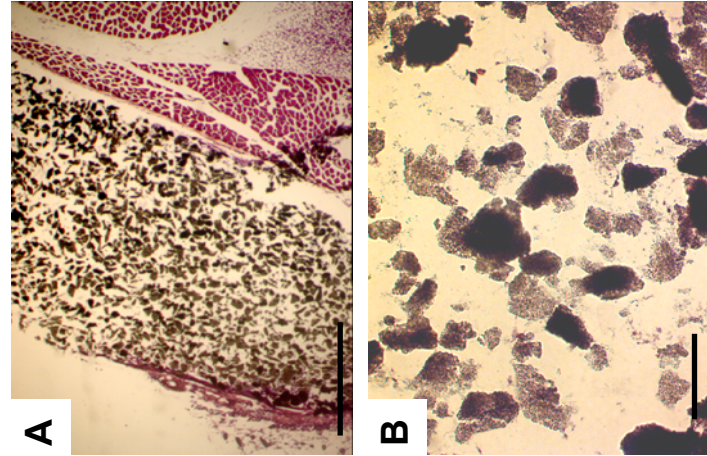
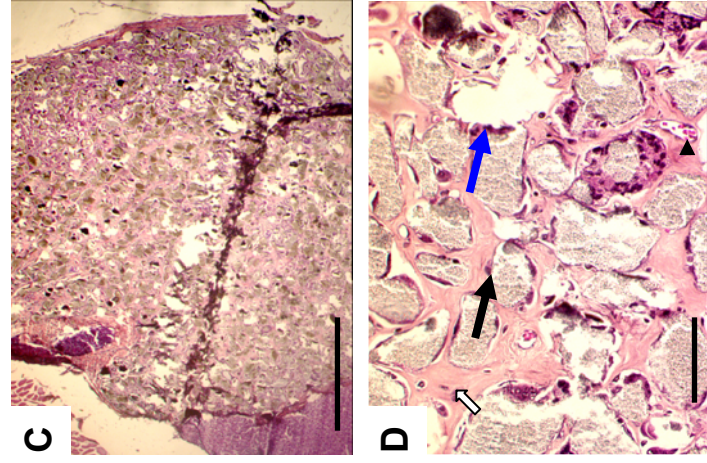
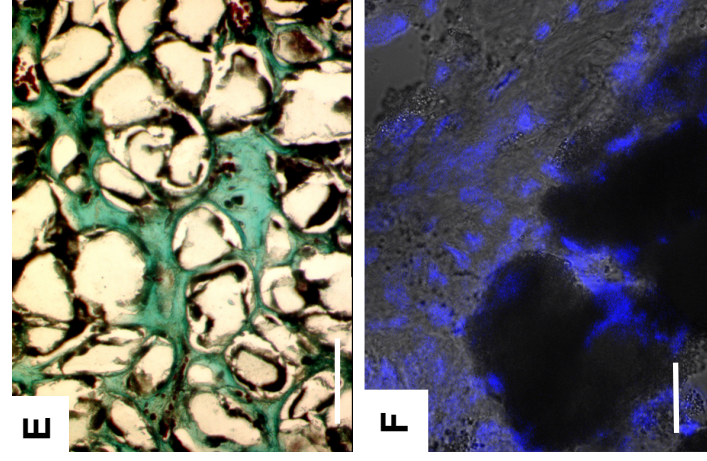
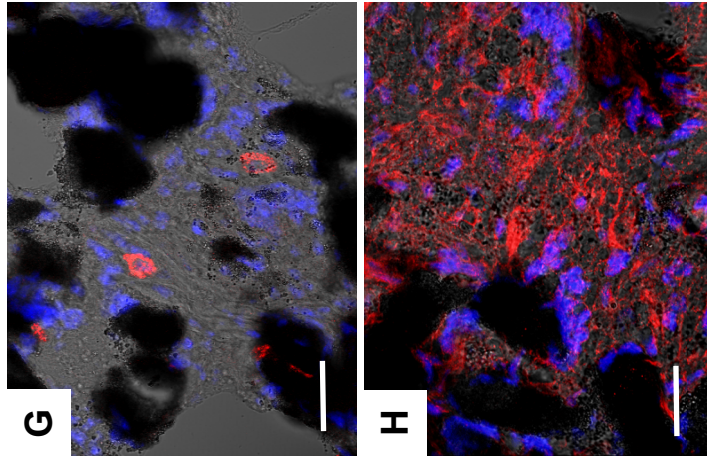
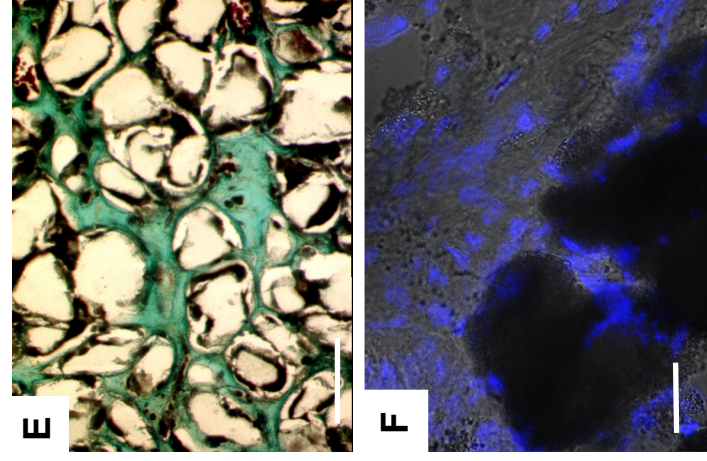
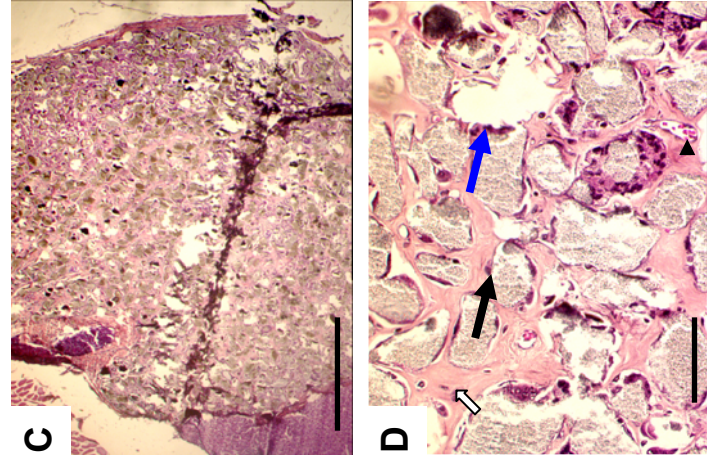
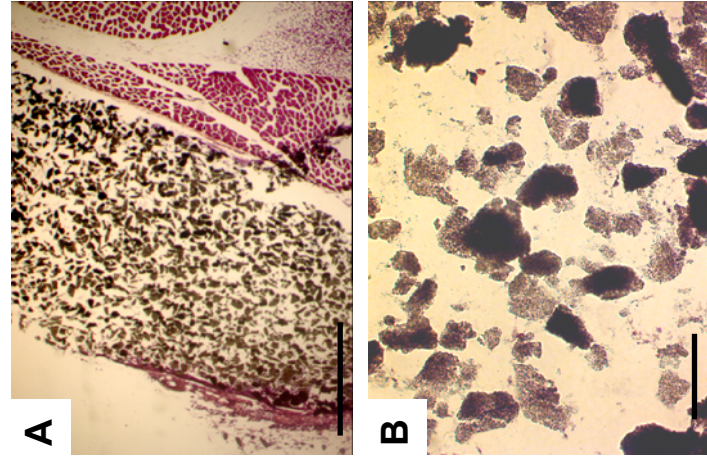


Figure 6



Myodulin is a novel potential angiogenic factor in skeletal muscle

Didier F. Pisani, Patricia M. Pierson, Ali Massoudi, Lilian Leclerc, Angèle Chopard, Jean-François Marini, and Claude A. Dechesne*

CNRS UMR 6548, Faculté des Sciences, Parc Valrose, 06108 Nice cedex 2, France

Received 19 May 2003, revised version received 7 August 2003

Abstract

We examined the expression and function of a gene we previously cloned from its downregulation in a muscle atrophy model. The encoded protein was named myodulin because of sequence homologies with the cartilage-specific chondromodulin-I (ChM-I) protein, its restricted expression in skeletal muscle tissue, and its modulating properties on vascular endothelial cells described here. We investigated the expression of myodulin in muscle fibers and cultured muscle cells. Myodulin RNA messengers were found in muscle fibers and their tendon extensions. Overexpression of myodulin fused to a FLAG peptide showed evidence of a muscle cell surface protein. Myodulin functions were assessed from similarities with chondromodulin-I. Coculture experiments using C₂C₁₂ mouse myoblasts or myotubes, which stably overexpress myodulin, with H5V mouse cardiac vascular endothelial cells revealed that myodulin had a very active role in the invasive action of endothelial cells, without any evidence of extracellular myodulin secretion. Our results suggest that myodulin may be a muscle angiogenic factor operating through direct cell-to-cell interactions. This role is consistent with the correlation between modulations in myodulin expression and modifications in muscle microvascularization associated with activity-dependent muscle mass variations.

© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Skeletal muscle; Microvasculature; Atrophy; Hypertrophy

Introduction

Skeletal muscle plasticity allows adaptation to a broad range of changes in muscle functional demand. In particular, the well-known muscle mass variations related with physical activity are mainly because of alterations in muscle fiber size, which in turn are associated with changes in muscle microvasculature. In 1973, Reitsma [1] had already described growth of the capillary network in an experimental model of muscle hypertrophy. In contrast, the amount of capillaries per fiber can be decreased by about 50% in experimental models of muscle atrophy. In muscle, mechanical stress has been identified as one factor regulating capillary growth, but little is known about the mechanisms that generally determine vascular bed characteristics and specifically coordinate tissue mass, metabolism, activity, and capillarization control [2,3].

To identify novel proteins involved in muscle adaptations to muscle loading variations, we investigated the expression and function of a novel gene that we recently demonstrated to be 2-fold downregulated in muscle atrophy (clone 08F01) [4]. This cDNA was used to clone the full-length cDNA by screening a rat skeletal muscle library (GenBank accession number AF191769). Mouse (GenBank accession number: AF191768) and human (GenBank accession number: 191770) orthologs were cloned through RT-PCR experiments using rat sequence oligonucleotides as primers and mouse and human skeletal muscle RNAs as templates. Although the nucleotide sequence does not share any significant homologies with other sequences, the amino acid sequence has 49% homology—including 33% identity—with chondromodulin-I (ChM-I), which is a chondrocyte-specific protein with a dual effect on cellular growth. ChM-I promotes chondrocyte growth but inhibits vascular endothelial cell growth [5]. We proposed to name the novel gene myodulin because of its homology with ChM-I, its main expression in skeletal muscle, and its modulating properties on vascular endothelial cells described here. Bioinformatic analysis of the myodulin sequence through SWISS-PROT database software revealed a content of 317

* Corresponding author. Current address: CNRS UMR 6543, Faculté des Sciences, Parc Valrose, 06108 Nice cedex 2, France. Fax: +33-4-92-07-64-04.

E-mail address: dechesne@unice.fr (C.A. Dechesne).

amino acid residues, a short N-terminal cytoplasmic domain (residues 1–30), a transmembrane domain (residues 31–50), and a cysteine-rich C-terminal extracellular domain (residues 51–317). Since our first analysis with partial myodulin cDNA [4], we submitted the myodulin sequence to GenBank and while it was being studied, other groups cloned the same gene and named it ChM-I-like [6], tenomodulin [7], and tendin [8]. Myodulin expression was clearly found to be restricted to skeletal muscle on Northern blots [4]. ChM-I-like was found to be expressed in skeletal muscle, eye, and whole rib by RT-PCR. Tenomodulin was found to be expressed in skeletal muscle on Northern blots, but only in the muscle epimysium envelope and tendon with in situ hybridization. Tendin was found to be expressed in skeletal muscle and eye on Northern blots but in muscle tendons and ligaments, thymus, and brain with in situ hybridization. Localization of the encoded protein is therefore somewhat controversial, and no precise function has been found to date for this protein.

The aim of the current study was to clarify myodulin expression in muscle and assess the role of myodulin on cellular growth from its homology with chondrocyte-specific ChM-I. We investigated muscle fiber expression of myodulin at mRNA and protein levels in muscle and in cultured muscle cells. We propose that myodulin has a muscle angiogenic role on the basis of: (i) the in vitro stimulation of vascular endothelial cell invasive properties by myodulin, and (ii) the positive correlation between in vivo myodulin expression modulations and muscle microvascularization modifications associated with activity-dependent muscle mass variations.

Materials and methods

Animals and tissues

All procedures were approved by the local Centre National de la Recherche Scientifique ethics committee. Ten-week-old female Sprague–Dawley rats were used for soleus muscle compensatory hypertrophy, induced by bilateral gastrocnemius muscle ablation [9]. After 6 weeks, soleus muscles from nine operated and age-matched nonoperated animals were taken, weighed, and pooled. Rat soleus muscle atrophied by 2 weeks of hindlimb suspension were issued from a previous study [4,10]. Ten-week-old Ico:OF1 (Caw) animals (Charles Rivers Laboratories) were used for mouse muscle RNA preparations. To remove tendons and their internal extensions, excised muscles were held at the tendon end and thoroughly scraped with a scalpel. All tissues were immediately frozen in liquid nitrogen.

Cell culture

The H5V murine heart capillary endothelial cell line [11] and bovine aortic endothelial cells [12] were kindly donated

by Dr. Ellen Van Obberghen-Schilling. The C₂C₁₂ mouse muscle cell line and CCL-39 hamster lung fibroblast cell line were obtained from the American Type Culture Collection. These cell lines were grown alone or in cocultures in Dulbecco's modified Eagle's medium with 4.5 g/l glucose and 10% fetal calf serum. Myotube C₂C₁₂ differentiation was induced by withdrawing fetal calf serum and adding 10 µg/ml insulin, 5 µg/ml transferrin, and 2% horse serum. Plasmid transfections were performed with 20 µg of plasmids precipitated with the calcium phosphate procedure. Transient plasmid expression was assessed 24 h after transfection. For stable plasmid expression, C₂C₁₂ cells were diluted about 10³-fold the day after transfection and grown in 0.8 µg/ml of G418 until selection was complete. The human myoblast clone was a generous gift from Dr. L. Bernheim and prepared from single satellite cells as described by Baroffio et al. [13].

RNA analysis

Total RNA was prepared with the RNAInstaPure kit (Eurogentec). Approximately 50 µg of total RNA was separated and transferred onto nylon membranes according to usual procedures. Hybridizations were performed at 42 °C in the presence of 50% formamide as previously described [4] with a mouse full-length myodulin cDNA and an 18S rRNA probe ³²P-labeled by the Prime-a-gene labeling system (Promega).

Reverse transcription was carried out with M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) and oligodT on 1 µg of total RNA. Advantage Klen Taq polymerase (Clontech) was used for PCR amplification of full coding myodulin cDNA with the forward primer 5'-CTCCGGCTCTGG TATGACA-3' and the reverse primer 5'-TCTGGAGGATAGGCTACTTGG-3'. The 18S rRNA cDNA fragment was amplified with the forward primer 5'-AGTTGGTGGAGCGATTTGTC-3' and the reverse primer 5'-GGCCTCACTAAACCATCCAA-3'. Routine PCR amplifications were analyzed after 30 cycles and samples were taken at cycles 15, 20, 25, 30, and 35 for semiquantitative cDNA amplification. Agarose electrophoretic bands were quantified with PCBas software in the linear amplification range. PCR-amplified fragment sequences were checked with several restriction enzymes.

FLAG-myodulin fusion protein

A cDNA fragment encoding myodulin appended with a FLAG tag at its N- or C-terminus was generated by PCR using the mouse myodulin full-length cDNA as template. For the myodulin-FLAG C-terminus construct, forward and reverse primer sequences were, respectively, 5'-GAGAGGGATCCTGGGAGACCATGGCAA-GAATCCTCCAGAGAAGTGTGAGGGC-3', 5'-CTCTCGCGCCGTTAGTTAGTTATTTGTCAT-CATCGTCCCTTATAGTCGACTCTCCCAAG-CATGCGGGCCACCCACCA-3'. For the myodulin-FLAG N-terminus construct, forward primer and reverse primer

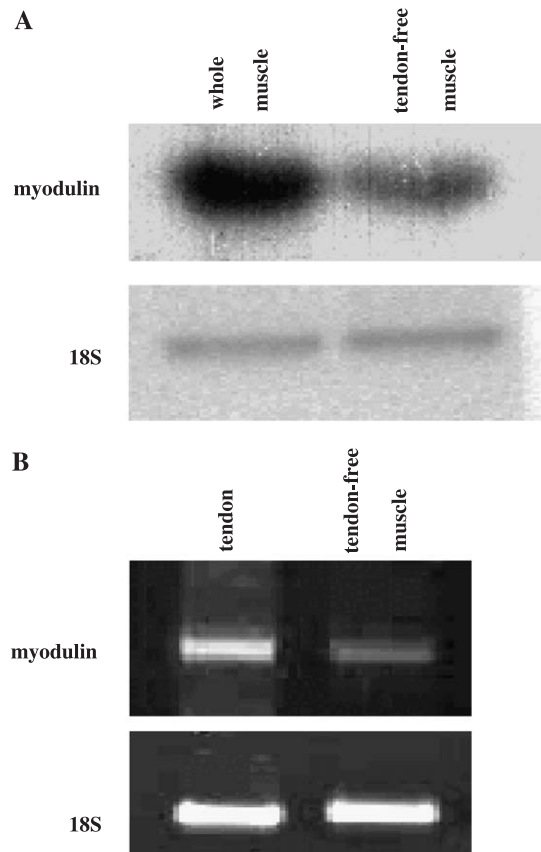


Fig. 1. Differences between tendon and skeletal-muscle myodulin expression. (A) RNAs of whole and tendon-free mouse gastrocnemius muscles were electrophoretically resolved, transferred onto nylon membrane, and probed with ^{32}P -dCTP-labeled mouse myodulin full-length cDNA. Removal of tendon material induced a lower level of myodulin expression (1.3 kb) but did not completely suppress myodulin expression according to 18S rRNA standardization (1.8 kb). (B) Myodulin expression was screened in tendon and tendon-free mouse soleus muscles by RT-PCR. After 30-cycle amplification, significant levels of myodulin were detected in tendon and tendon-free muscle RNAs as a specific 1200-bp myodulin fragment using a 350-bp 18S rRNA fragment as amplification control.

sequences were, respectively, 5'-GAGAGGGATCCATGGACTATAAGGACGATGATGACAAAGCAAAAATCCTCCAGAGAAGTGTGAGGGC-3', 5'-CTCTCGGGCCGTTAGTTAGTTAGACTCTCCCAAGCATGCGGGCCACCCACCA-3'. The PCR products were gel-purified and cloned into pGEM-T Easy vector (Promega). Inserts were excised with *Bam*HI and *Not*I endonucleases and subcloned into *Bam*HI and *Not*I sites of pcDNA3.1 vector (Invitrogen). Plasmid construction accuracies were checked by automatic sequencing (Genome Express SA, Grenoble, France).

Protein analysis

For immunofluorescence analysis, cells were grown on 22-mm glass coverslips. Coverslips were rinsed once in sterile phosphate-buffered saline (PBS), and the cells

were fixed for 15 min at -20°C in methanol/acetone (70:30 v/v). All the following steps were performed at room temperature unless specified otherwise. Cells were washed in three 10-min PBS baths. Nonspecific blocking was performed for 30 min in PBS 3% BSA. The cells were incubated for 1 h at 37°C with mouse anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma) at a 1:1000 dilution in PBS 3% BSA. After three rinses with PBS, bound antibodies were detected with 1:100 FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Dako) for 30 min at 37°C . The coverslips were then washed and mounted in Mowiol (Calbiochem) for visualization via epifluorescence or confocal microscopy.

For immunoblotting analysis, total soluble and membrane proteins were prepared from wild-type C_2C_{12} cells or C_2C_{12} cells expressing myodulin with a N- or C-terminus fused FLAG, as previously described [14,15]. To concentrate C_2C_{12} cell culture media, 0.5 ml of $5\times$ Laemmli's buffer was added to 2 ml of culture medium, which was immediately denatured at 100°C for 5 min and dialyzed against Laemmli's buffer. Before concentration with Cen-

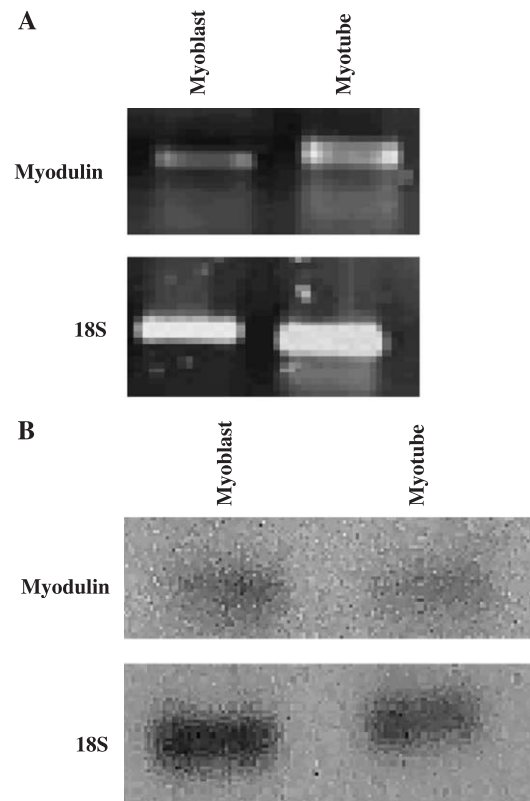


Fig. 2. Myodulin expression in cultured skeletal muscle cells. (A) Myodulin was specifically amplified as a 1200-bp fragment from human clonal primary myoblast and myotube RNAs by RT-PCR using a 350-bp 18S rRNA fragment as amplification control. (B) Total RNA Northern blots from mouse C_2C_{12} cells were hybridized with ^{32}P -dCTP-labeled mouse myodulin full-length cDNA. Myodulin RNA (1.3 kb) was detected at myoblast and myotube stages with no significant differences in expression levels according to 18S rRNA (1.8 kb) standardization.

tricon-3000 centrifugal filters (Amicon), solutions were filtered through Centricon-50000 filters on which high molecular weight components were held back. Equal amounts of proteins were separated by SDS-PAGE on 15% acrylamide gels. Proteins were transferred to Hybond-C extra membranes (Amersham) and stained with ponceau red to verify even transfers. Blots were then incubated for 4 h at room temperature in TBS (0.05 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4) with 0.1% Tween-20 and 5% nonfat powdered milk. Membranes were probed overnight at 4°C with anti-FLAG M2 monoclonal antibody, at 1:5000 dilution in TBS, 0.1% Tween-20, 3% BSA, and then for 1 h at room temperature with an HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Dako) used at 1:5000 dilution in TBS, 0.1% Tween-20, and 3% BSA. After each incubation, membranes were washed three times in TBS, 0.1% Tween-20, for 5

min per wash. Proteins were then visualized using the Amersham ECL system.

Results

Muscle expression of myodulin transcripts

From our previous results and the other group's results on the same gene, myodulin was found to be very preferentially expressed in skeletal muscle. Shukunami et al. [7] and Brandau et al. [8] noted tenomodulin and tendin expression in muscle tendons and ligaments. To clarify myodulin expression within skeletal muscle structures, rat gastrocnemius muscles were excised and carefully cleared of terminal tendons and internal tendon extensions. Myo-

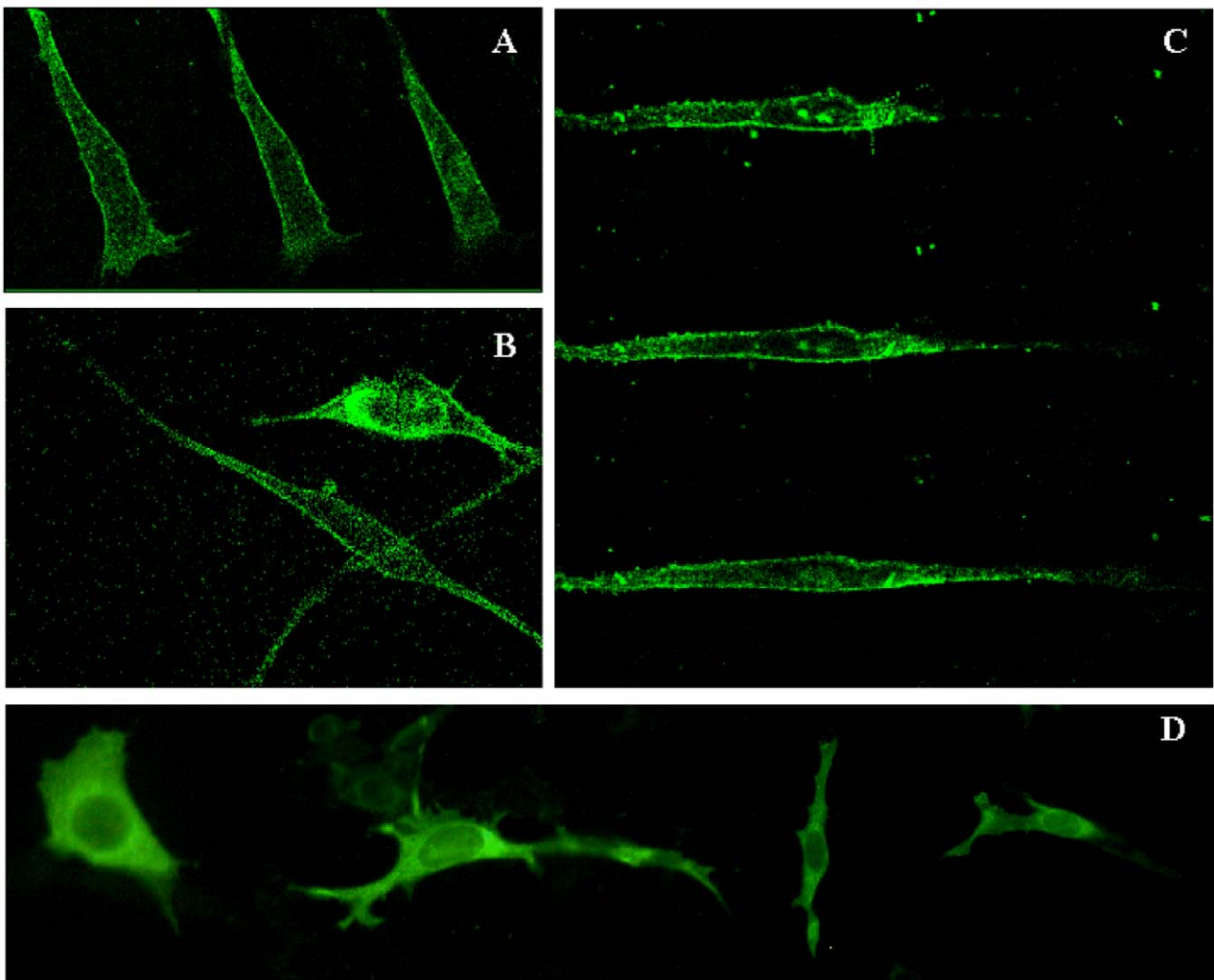


Fig. 3. Membrane subcellular localization of myodulin. Cells were stained with a FITC-anti-FLAG antibody. (A and B) Stable expression of myodulin-FLAG in C_2C_{12} myoblasts. (C) Transient expression of myodulin-FLAG in multinucleated C_2C_{12} myotubes. A and C contain three serial cell views separated by 3 μ m. (D) Stable expression of myodulin-FLAG in CCL-39 fibroblasts. Note the cellular membrane labeling observed in C_2C_{12} muscle cells but not in CCL-39 fibroblasts. The same results were obtained with the FLAG in the N- or C-terminus. Confocal microscopy for A, B, and C. Optical microscopy for D. Original magnification: 1000 \times for A, B, and D, 400 \times for C.

myodulin expression was first compared in whole gastrocnemius and tendon-free gastrocnemius muscle specimens in Northern blot experiments. As shown in Fig. 1A, expression was lowered when tendon material was removed but still remained significant. Furthermore, RT-PCR experiments indicated significant expression in both tendons separated from soleus muscles and tendon-free soleus muscles after a routine 30-cycle amplification (Fig. 1B). This confirmed the high myodulin expression level in tendons but also suggested weaker expression in muscle fibers. Muscle expression was further tested *in vitro* with two types of muscle cells not contaminated by any tendinous material. These experiments involved myodulin-specific RT-PCR in clonal primary human muscle cells derived from single satellite cells (Fig. 2A) and quantitative Northern blot analysis of the C₂C₁₂ mouse muscle cell line (Fig. 2B). Myodulin transcripts were found to be expressed in clonal primary human muscle cells at the myoblast proliferating stage and at the myotube differentiated stage. Myodulin transcripts were also found in C₂C₁₂ cells, without any significant difference in expression levels between proliferating and differentiated stages. Taken together, these results showed that myodulin is also expressed in muscle fibers.

Myodulin is a muscle cell surface protein

Myodulin was transiently and stably expressed as a FLAG-fusion protein under the control of the strong CMV promoter in C₂C₁₂ cells. The stable lines are hereafter designated as myodulin-FLAG C₂C₁₂ cells. The FLAG peptide was fused at the myodulin N- or C-terminus. The same results were obtained with these two constructions.

A cellular membrane localization was clearly observed in myodulin-FLAG C₂C₁₂ myoblasts by immunofluorescence analysis using an anti-FLAG monoclonal antibody (Figs. 3A and B). Transient transfections were also associated with expression in internal cytoplasmic structures, likely endoplasmic reticulum and due to overexpression induced by the CMV promoter in a high number of plasmid copies. This cytoplasmic localization was rarely noted with the many stable cell lines tested. The commonly known very low efficiency of myotube transfections hampered the detection of myodulin localization in differentiated myotubes. This problem was overcome by adding C₂C₁₂ myoblasts transiently transfected to fresh C₂C₁₂ myotubes. A significant number of transfected myoblasts could fuse to myotubes and myodulin was also found to be localized at the membrane of differentiated myotubes (Fig. 3C). This indicated that myodulin is located at the cell surface of muscle myoblasts and differentiated myotubes. Conversely, myodulin-FLAG protein was found to be homogeneously diffuse in CCL-39 fibroblasts (Fig. 3D), which suggests that muscle cells provide the cellular setting necessary to restrict myodulin expression at the cell membrane.

The membrane anchorage of myodulin was investigated by fractionating proteins extracted from the same C₂C₁₂ stable lines as above. A specific myodulin band was identified on whole cell extract Western blots with the anti-FLAG monoclonal antibody (Fig. 4A). The apparent mass of the myodulin-FLAG fusion protein was 44 kDa. Since the FLAG peptide mass was approximately 1 kDa, the apparent mass of myodulin was 43 kDa. The theoretical calculated mass is 37.047 kDa, suggesting possible post-translational modifications such as glycosylation, as shown for the ChM-I-like protein [6]. It has also been reported that the migration of membrane proteins may deviate from the pattern observed for water-soluble protein markers [16]. Cellular membrane proteins were extracted, solubilized, separated on SDS-PAGE, and transferred to Western blots. The myodulin-FLAG band was found to be specifically enhanced in this enriched membrane protein fraction extracted from myodulin-FLAG C₂C₁₂ myoblasts or differentiated myotubes (Fig. 4B). These results confirmed that myodulin is anchored to muscle cell membranes.

Does myodulin have functions similar to chondromodulin-I functions?

ChM-I has two described functions, which interestingly concern cell growth. ChM-I was first isolated from cartilage

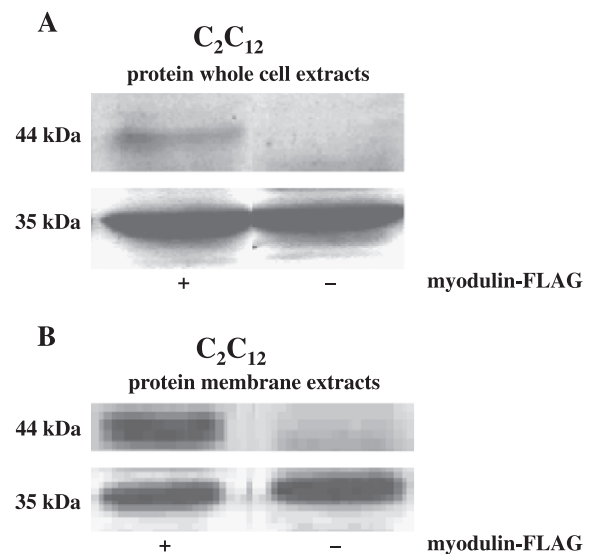


Fig. 4. Association of myodulin with cellular membranes. C₂C₁₂ proteins were analyzed on Western blots. (A) Whole cell proteins were extracted from myodulin-FLAG (lane +) and wild-type (lane -) C₂C₁₂ myoblasts. (B) Proteins were extracted from purified membranes of myodulin-FLAG (lane +) and wild-type (lane -) C₂C₁₂ myoblasts. A specific 44-kDa myodulin-FLAG band was visualized with the anti-FLAG antibody in protein whole cell extracts and this band was enhanced in protein membrane-enriched extracts. A 35-kDa nonspecific band stained with amido black on the nitrocellulose membrane is shown as an even lane loading control. The same results were obtained with the FLAG in N- or C-terminus.

as a growth-promoting factor for chondrocytes [17], but then an endothelial cell growth inhibitor effect was demonstrated, suggesting a regulatory role in vascular invasion during endochondral bone formation [18]. We therefore tested similar roles for myodulin by using myodulin-FLAG

C₂C₁₂ cells, which express the entire myodulin molecules in their natural membrane environment.

Muscle cell growth was compared in wild-type and myodulin-FLAG C₂C₁₂ cells. Three independent stable lines expressing the FLAG peptide at the N-terminus of

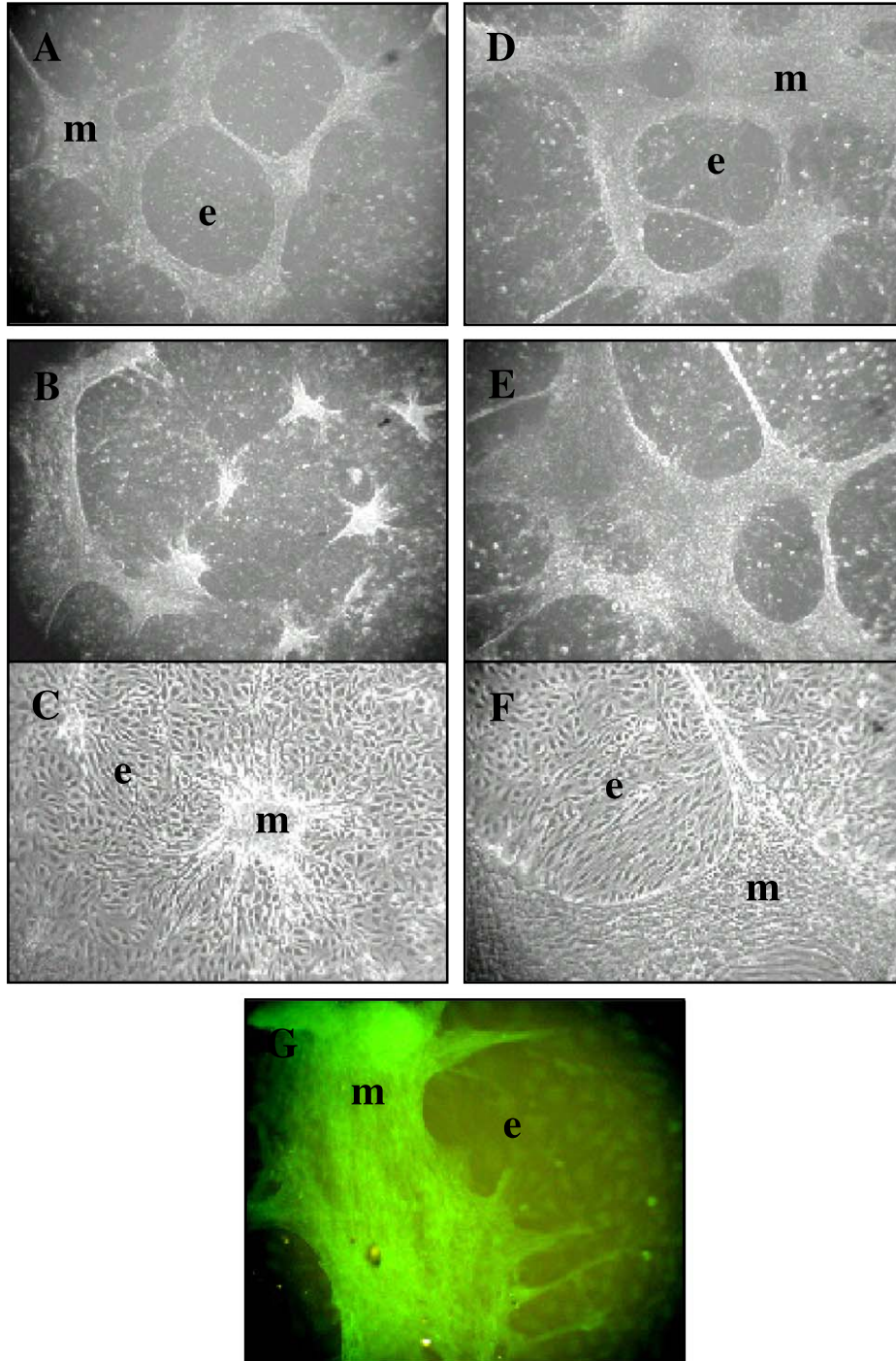


Fig. 5. Myodulin involvement in myoblast vascular-endothelial cell interactions. H5V endothelial cells (e) and C₂C₁₂ myoblasts (m) were observed 4 and 6 days after starting homogeneous cocultures. (A–F) Phase contrast pictures and C and F are higher magnification views of B and E, respectively. In 4-day-old cocultures, the same pattern was noted with myodulin-FLAG (A) and wild-type (D) C₂C₁₂ cells, characterized by circular areas of H5V cells surrounded by C₂C₁₂ myoblasts. In 6-day-old cocultures, H5V cells had invaded previous myodulin-FLAG C₂C₁₂ myoblast areas (B and C) but not wild-type C₂C₁₂ myoblast areas (E and F). (G) Staining of myodulin-FLAG by FITC-anti-FLAG antibody in a 4-day-old coculture clearly discriminates myodulin-FLAG C₂C₁₂ myoblasts from H5V endothelial cells. Original magnification: 40× for A, B, D, and E; 100× for C, F, and G.

myodulin and three independent stable lines expressing the FLAG peptide at the C-terminus of myodulin were used for this experiment. Five thousand cells of each C_2C_{12} line were distributed in several 35-mm-diameter culture dishes. Cells were harvested from duplicate dishes and counted every 24 h for 5 days. No differences were found, and all tested lines had the same doubling time of approximately 18 h 20 min. Since the effect of ChM-I on chondrocyte growth was increased in the presence of FGF-2, we repeated the same experiment after adding 2 ng/ml of FGF-2 in the culture medium [19]. No difference was noted in the doubling time when comparing wild-type and myodulin-FLAG C_2C_{12} lines. The doubling time was lowered to approximately 16 h 15 min for all lines. Thus, myodulin did not show a growth-promoting effect on C_2C_{12} muscle cells in these assays.

The action of myodulin on vascular endothelial cells was tested in coculture experiments with H5V cardiac endothelial cell lines and wild-type or myodulin-FLAG C_2C_{12} cells lines. When both types of C_2C_{12} myoblasts and H5V cells were plated in equal quantities as a homogeneous cell suspension, they formed very characteristic structures within a few days. Figs. 5A and D show the same cell culture pattern after 4 days with myodulin-FLAG and wild-type C_2C_{12} , respectively. H5V cells clustered in circular areas and C_2C_{12} myoblasts were all concentrated between these areas. In cocultures with myodulin-FLAG C_2C_{12} myoblasts, H5V had dramatically expanded over the initial C_2C_{12} space after 6 days of

culture (Figs. 5B and C). C_2C_{12} myoblasts were detached from the plastic bottom of the culture dish, and after 10 days all C_2C_{12} myoblasts were dead, leaving a homogeneous population of H5V. Conversely, the 4-day cell culture organization pattern stayed stable for more than 10 days with wild-type C_2C_{12} myoblasts (Figs. 5E and F). Cell types were easily recognized by their shape and after immunolabeling with anti-FLAG antibody (Fig. 5G). The same kind of experiment was repeated with C_2C_{12} differentiated myotubes. To protect C_2C_{12} cells until differentiation in myotubes, C_2C_{12} cells were first physically separated from H5V cells with a plastic ring (Fig. 6A). After differentiation, the plastic ring was removed to allow contact between the muscular and endothelial cells. Three days later, in the presence of myodulin-FLAG C_2C_{12} myotubes, H5V cells had proliferated and spectacularly expanded to almost fill the whole culture dish (Fig. 6B), while in the presence of wild-type C_2C_{12} myotubes, each kind of cells had not significantly spread beyond its initial area (Fig. 6C). As with myoblasts, myodulin-FLAG C_2C_{12} myotubes were detached from the plastic bottom and very few of them remained attached to the culture dish. Myodulin overexpression in C_2C_{12} myoblasts and myotubes induced very active invasive action of endothelial H5V cells present in the same culture dish. These results were identically reproduced with six independent myodulin-FLAG C_2C_{12} cells with the FLAG peptide fused at the myodulin N- or C-terminus. Interestingly, no effect of myodulin was detected when H5V endothelial cells were

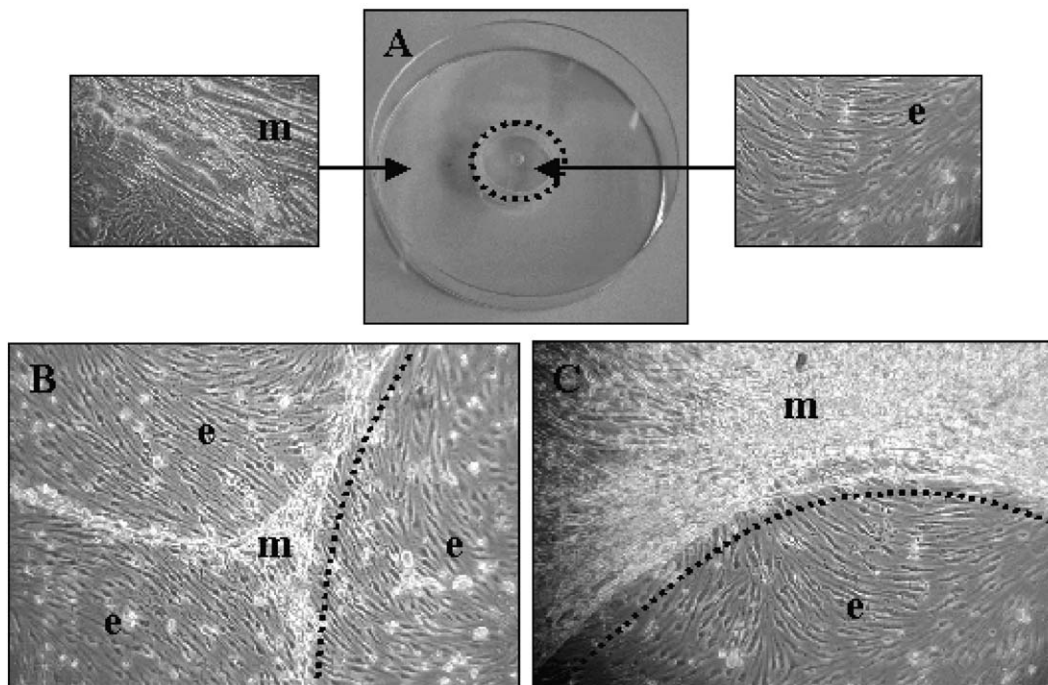


Fig. 6. Myodulin involvement in myotube vascular–endothelial cell interactions. H5V endothelial cells (e) and C_2C_{12} myoblasts (m) were first cocultured in the same culture dish but separated with a plastic ring (broken line) until C_2C_{12} myotube differentiation (A). The plastic ring was then removed and 3 days later H5V cells had invaded previous myodulin-FLAG C_2C_{12} myotube areas (B) but not wild-type C_2C_{12} myotube areas (C). Original magnification: 100 \times .

replaced by non-striated muscle-derived bovine aortic endothelial cells.

Finally, Hiraki et al. [19] demonstrated that mature ChM-I is cleaved from ChM-I transmembrane precursor before being secreted from COS cells expressing recombinant ChM-I. We therefore tested the hypothesis that myodulin could be an autocrine factor like ChM-I, although the cleavage site of ChM-I is not conserved in myodulin. First, as already mentioned above, anti-FLAG antibodies detected the same Western blot and immunofluorescence signals with N- or C-terminus FLAG-fused myodulin expressed by C₂C₁₂ myoblasts or myotubes (Figs. 3 and 4). This suggests that myodulin molecules do not undergo cleavage. Then we tried to detect myodulin in myodulin-FLAG C₂C₁₂ cell culture media. Approximately 15-fold concentrated media from 11 independent positive stable lines were analyzed with immunoblotting using the anti-FLAG monoclonal antibody. Myodulin-FLAG fusion proteins were never detected in culture medium (not shown). We then attempted to detect secreted myodulin in the culture medium from our coculture functional assay. H5V cells were grown in the presence of conditioned culture media taken from myodulin-FLAG C₂C₁₂ myoblast or myotube cultures. After cell quantification at four time points over 6 days, no difference in H5V growth was found with control H5V cells grown in nonconditioned media. The same experiment was performed with H5V cells cocultured with wild-type C₂C₁₂ in conditioned medium from H5V cells cocultured with myodulin-FLAG C₂C₁₂ myoblasts or myotubes. No invasive growth of H5V was observed. Taken together, these results implied that no myodulin cleavage or secretion had occurred, and no *in vitro* autocrine property of this protein was detected.

In vivo myodulin expression variations positively correlate with muscle microvasculature variations

To assess a possible *in vivo* role of myodulin on vascular endothelial cells growth, we investigated myodulin expression in a model of muscle microvasculature chronic alterations. Microvasculature variations, which were associated with muscle mass variations, were performed by modifying soleus muscle loading in rats. Soleus muscle mass was decreased by disuse through hindlimb suspension, and increased by overload through gastrocnemius ablation. The muscle mass was decreased 2-fold after 2 weeks of hindlimb suspension ($n = 18$ soleus muscles), and conversely increased 2-fold 6 weeks after gastrocnemius ablation ($n = 18$ soleus muscles). The corresponding decrease and increase in fiber sizes were checked by histological analysis of soleus muscles. Capillary loss in atrophied soleus muscle has already been shown to occur after hindlimb suspension as in other models of minimized muscle activity [20,21]. Conversely, an increase in capillary density has been well documented as an adaptation to chronic increases in functional demand in models such as

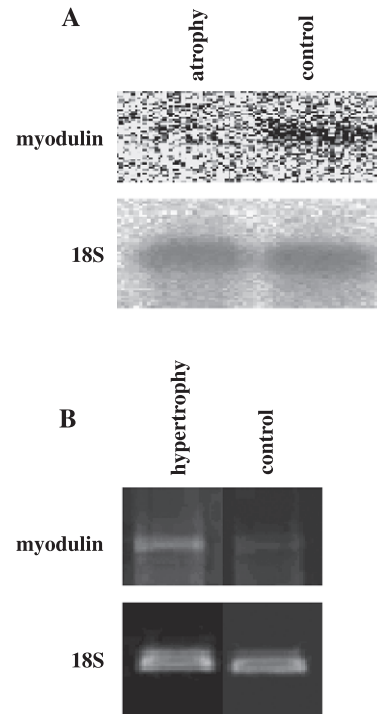


Fig. 7. Quantitative variations in myodulin RNA with muscle chronic loading charges. (A) Total RNA isolated from atrophied or control rat soleus muscle pools were analyzed by Northern blot hybridization. Myodulin (1.3 kb) was found to be downregulated 3-fold in the atrophy situation after normalization with 18S rRNA transcripts. (B) Expression of myodulin was assessed in hypertrophied or control rat soleus muscle pools by semi-quantitative RT-PCR analysis. Amplification of a 1200-bp specific myodulin fragment indicated 2-fold upregulation of myodulin in the hypertrophy situation after normalization with a 350-bp 18S rRNA fragment.

muscle hypertrophy [22,23]. Three-fold myodulin downregulation occurred in soleus muscles under microvasculature reduction and muscle atrophy conditions (Fig. 7A), while 2-fold myodulin upregulation was detected in the opposite situation (Fig. 7B). Myodulin RNA transcript expression levels were thus found to be positively correlated with changes in amounts of capillaries associated with muscle mass changes.

Discussion

We previously identified myodulin as a novel gene downregulated in a model of skeletal muscle atrophy. Here it is furthermore shown that myodulin is expressed in muscle fibers. It was found to be expressed as a cell surface protein without being secreted in the extracellular space. *In vitro*, myodulin promotes vascular endothelial cell invasiveness and *in vivo*, its expression is positively correlated with changes in microvasculature, which are associated with changes in muscle mass. Myodulin therefore could play a key role in muscle angiogenesis adaptations to chronic activity modulations.

Myodulin tissue expression specificities

After we cloned a partial myodulin cDNA [4], and cloned and submitted the full-length myodulin sequence to GenBank, the same gene was cloned by others and given the names tenomodulin, tendin, and ChM-I-like gene [6–8]. In agreement with our initial study and these latter studies, here we documented myodulin expression in skeletal muscle. As shown by Shukunami et al. [7] and Brandau et al. [8], myodulin was found to be clearly expressed in muscle tendinous material. However, the present results demonstrated that it is also expressed within muscle fibers. Myodulin expression was detected in muscle fibers after careful removal of the tendinous compartment. It cannot be ruled out that the expression in muscle fibers was actually restricted to residual tendinous elements or epimysium structures. However, it is unlikely that the very weak proportion of these elements relative to the fiber mass could account for the entire Northern blot hybridization signal shown in Fig. 1. In addition, expression within pure muscle cells was clearly confirmed in vitro with C₂C₁₂ cells and primary human muscle cells.

Myodulin versus chondromodulin-I functions

The function of myodulin in vivo is still unknown. We used cell cultures to characterize myodulin expression and tested functions similar to those described for ChM-I, that is, the protein known to have the highest homology to myodulin. ChM-I is a cartilage-specific growth-modulating factor and an anti-angiogenic factor [5,19]. (i) Unlike ChM-I in mouse chondrogenic cells, which is only expressed after differentiation [24], myodulin was found to be expressed in muscle cells to an equal extent in differentiated and undifferentiated stages. This suggests that myodulin may play its role even in satellite cells, which are myogenic precursors lying between the plasmalemma and basement membrane, at the most external part of muscle fiber. (ii) In agreement with the putative transmembrane domain present in the myodulin sequence, we found that myodulin was localized at the muscle cell surface. A similar membrane localization was found by Yamana et al. [6] through immunoprecipitation experiments for the ChM-I-like protein overexpressed in COS cells. Although ChM-I is secreted after cleavage from a transmembrane precursor [25], we discovered no evidence of any myodulin cleavage or secretion. (iii) Our experiments with muscle myodulin-FLAG C₂C₁₂ cells did not show any interference of myodulin on C₂C₁₂ cell growth, even in the presence of FGF-2, whose action was shown to be potentiated by ChM-I [26]. (iv) In contrast, a clear action of myodulin-FLAG C₂C₁₂ cells was demonstrated on H5V cardiac vascular endothelial cells. Unexpectedly, overexpression of myodulin in C₂C₁₂ cells induced invasive proliferation of contiguous H5V cells. On the basis of

this in vitro assay, myodulin appears to be a potential novel angiogenic factor expressed by muscle cells.

Myodulin has only approximately 50% homology with ChM-I, so it not surprising that the two proteins do not have identical functions and action mechanisms. They may only share related functions. In terms of protein structure, it is striking that seven out of the eight cysteine residues of the myodulin C-terminal domain occupy a conserved position with cysteine residues of the ChM-I C-terminal domain. One hypothesis may be that this cysteine-rich fragment is important, through disulfide bonds, for the three-dimensional structure of domains involved in angiogenic regulation. The cysteine residue environment would have a positive or negative effect on this regulatory function.

Myodulin angiogenic function

The next step to gain further insight into myodulin function will be to identify the mechanisms of endothelial cell invasion triggered by myodulin. Our in vitro data are based on myodulin-FLAG C₂C₁₂ cells that mimic the in vivo myodulin expression. They indicate that myodulin does not act as a soluble secreted protein but through cell-to-cell interactions. At this point, we do not know exactly which proteins interact with myodulin. In vitro, myodulin can interact either directly with endothelial cell surface proteins or with intermediate extracellular matrix components. In vivo, intervention of extracellular matrix components is very likely since muscle fibers and endomysial capillaries are surrounded by basal lamina and other extracellular matrix components. In addition, it is increasingly evident that extracellular matrix components play active roles in development and regenerative processes [27]. Matrix metalloproteinases are very likely involved in endothelial–muscle cell interactions. Metalloproteinases are endopeptidases possessing catalytic activity against extracellular matrix components and capable of degrading capillary basement membrane [28]. Indeed, this degradation is one of the early events in the neoformation of capillaries from preexisting capillaries [29]. Our working hypothesis is that myodulin interactions with endothelial cell partners would favor metalloproteinase secretion. In vitro, the consequences would be digestion of muscle cell extracellular matrix, detachment of muscle cells, and then proliferation of endothelial cells in the empty space. In vivo upregulation of myodulin at the muscle cell surface would thus prompt an increase in matrix metalloproteinase activities, which would pave the way for endothelial cell invasion. Conversely, downregulation of myodulin would favor a decrease in matrix metalloproteinase activity, thus diminishing capillary density.

Changes in myodulin expression with variations in muscle microvasculature and mass induced by variations in muscle loading are a pattern that fits well with an angiogenic function. Chronic increases in functional demand, such as muscle overloading, are associated with increased muscle microvasculature density in response to

metabolic adaptations [23]. In contrast, chronic reductions in functional demand, such as muscle disuse, are associated with a decrease in muscle microvasculature [30]. Muscle microvasculature, like muscle fibers, exhibit remarkable plasticity to meet chronic functional demand. In fact, this adaptation also depends on muscles, the duration of the demand, and the degree of atrophy [3]. In vivo molecular and cellular processes mediating angiogenesis are only beginning to be understood. Several growth factors are involved and the VEGF family plays a pivotal role [30,31]. The coordination of muscle microvasculature and metabolism adaptations with functional demand is largely unknown. Angiogenesis and muscle mass variations should be controlled by common factors and some key molecules are likely involved in intercellular signaling between muscle fibers and muscle microvasculature. An interesting result was recently published by Ferrara et al. [32] and LeCouter et al. [33,34] with the discovery of EG-VEGF. While previously known endothelial mitogens acting on vascular endothelial cells are widely distributed, EG-VEGF action is restricted to capillary endothelial cells from endocrine glands. This indicates the involvement of highly specific local mechanisms regulating angiogenesis. In addition, EG-VEGF contains a cysteine-rich fragment like myodulin, although the primary sequence positions are not well conserved between the two proteins. We speculate that muscle-specific myodulin is involved in angiogenic muscle-specific mechanisms such as the cooperation among capillary density, muscle metabolism, and muscle mass regulations. This would mediate the fine adaptation to functional demand in addition to the ubiquitous VEGF family role. The absence of myodulin action noted with smooth-muscle aortic endothelial cells suggests striated muscle specificity.

In conclusion, myodulin seems to be a novel key factor regulating muscle blood supply through capillary network control, in relation with muscle mass adaptations to chronic variations in activity. Myodulin may thus contribute to the link between microvasculature and muscle fiber size changes. This underlies muscle vascularization auto-control as an important player in the skeletal muscle adaptive response to functional solicitation.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Ellen Van Obberghen-Schilling for helpful suggestions and discussions on angiogenic mechanisms. We also thank Anne Doye for her technical assistance in confocal microscopy and David Manley for the English revision of the manuscript. D.F. Pisani had a fellowship from Association Française contre les Myopathies.

References

- [1] W. Reitsma, Formation of new capillaries in hypertrophic skeletal muscle, *Angiology* 24 (1973) 45–57.
- [2] A.L. Zhou, S. Egginton, M.D. Brown, O. Hudlicka, Capillary growth in overloaded, hypertrophic adult rat skeletal muscle: an ultrastructural study, *Anat. Rec.* 252 (1998) 49–63.
- [3] K. Tysl, O. Mathieu-Costello, L. Cheng, E.G. Noble, Differential microvascular response to disuse in rat hindlimb skeletal muscles, *J. Appl. Physiol.* 87 (1999) 1496–1505.
- [4] N. Cros, A.V. Tkatchenko, D.F. Pisani, L. Leclerc, J.J. Leger, J.F. Marini, C.A. Dechesne, Analysis of altered gene expression in rat soleus muscle atrophied by disuse, *J. Cell. Biochem.* 83 (2001) 508–519.
- [5] Y. Hiraki, C. Shukunami, Chondromodulin-I as a novel cartilage-specific growth-modulating factor, *Pediatr. Nephrol.* 14 (2000) 602–605.
- [6] K. Yamana, H. Wada, Y. Takahashi, H. Sato, Y. Kasahara, M. Kiyoki, Molecular cloning and characterization of CHM1L, a novel membrane molecule similar to chondromodulin-I, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280 (2001) 1101–1106.
- [7] C. Shukunami, Y. Oshima, Y. Hiraki, Molecular cloning of tenomodulin, a novel chondromodulin-I related gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280 (2001) 1323–1327.
- [8] O. Brandau, A. Meindl, R. Fassler, A. Aszodi, A novel gene, *tendin*, is strongly expressed in tendons and ligaments and shows high homology with chondromodulin-I, *Dev. Dyn.* 221 (2001) 72–80.
- [9] R.R. Roy, I.D. Meadows, K.M. Baldwin, V.R. Edgerton, Functional significance of compensatory overloaded rat fast muscle, *J. Appl. Physiol.* 52 (1982) 473–478.
- [10] E.R. Morey, Space flight and bone turnover: correlation with a new rat model of weightlessness, *Bioscience* 29 (1979) 168–172.
- [11] C. Garlanda, C. Parravicini, M. Sironi, M. De Rossi, R. Wainstok de Calmanovici, F. Carozzi, F. Bussolino, F. Colotta, A. Mantovani, A. Vecchi, Progressive growth in immunodeficient mice and host cell recruitment by mouse endothelial cells transformed by polyoma middle-sized T antigen: implications for the pathogenesis of opportunistic vascular tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 7291–7295.
- [12] S.M. Schwartz, Selection and characterization of bovine aortic endothelial cells, *In Vitro* 14 (1978) 966–980.
- [13] A. Baroffio, J.P. Aubry, A. Kaelin, R.M. Krause, M. Hamann, C.R. Bader, Purification of human muscle satellite cells by flow cytometry, *Muscle Nerve* 16 (1993) 498–505.
- [14] L. Counillon, J. Pouyssegur, R.A. Reithmeier, The Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 possesses N- and O-linked glycosylation restricted to the first N-terminal extracellular domain, *Biochemistry* 33 (1994) 10463–10469.
- [15] K. Yeow, C. Cabane, L. Turchi, G. Ponzio, B. Dérijard, Increased MAPK signaling during in vitro muscle wounding, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 (2002) 112–119.
- [16] M. le Maire, P. Champeil, J.V. Moller, Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents, *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000) 86–111.
- [17] Y. Hiraki, H. Tanaka, H. Inoue, J. Kondo, A. Kamizono, F. Suzuki, Molecular cloning of a new class of cartilage-specific matrix, chondromodulin-I, which stimulates growth of cultured chondrocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175 (1991) 971–977.
- [18] Y. Hiraki, T. Kono, M. Sato, C. Shukunami, J. Kondo, Inhibition of DNA synthesis and tube morphogenesis of cultured vascular endothelial cells by chondromodulin-I, *FEBS Lett.* 415 (1997) 321–324.
- [19] Y. Hiraki, H. Inoue, K. Iyama, A. Kamizono, M. Ochiai, C. Shukunami, S. Iijima, F. Suzuki, J. Kondo, Identification of chondromodulin I as a novel endothelial cell growth inhibitor, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 32419–32426.
- [20] D. Desplanches, M.H. Mayet, B. Sempore, R. Flandrois, Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle, *J. Appl. Physiol.* 63 (1987) 558–563.
- [21] Y. Kano, S. Shimegi, H. Takahashi, K. Masuda, S. Katsuta, Changes in capillary luminal diameter in rat soleus muscle after hind-limb suspension, *Acta Physiol. Scand.* 169 (2000) 271–276.
- [22] M.J. Pyley, B.J. Olmstead, E.G. Noble, Time course of changes in

- capillarization in hypertrophied rat plantaris muscle, *J. Appl. Physiol.* 84 (1998) 902–907.
- [23] O. Hudlicka, M. Brown, S. Egginton, Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle, *Physiol. Rev.* 72 (1992) 369–417.
- [24] Y. Mori, Y. Hiraki, C. Shukunami, S. Kakudo, M. Shiokawa, M. Kagoshima, H. Mano, Y. Hakeda, T. Kurokawa, F. Suzuki, M. Kumegawa, Stimulation of osteoblast proliferation by the cartilage-derived growth promoting factors chondromodulin-I and -II, *FEBS Lett.* 406 (1997) 310–314.
- [25] A. Azizan, N. Holaday, P.J. Neame, Post-translational processing of bovine chondromodulin-I, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 23632–23638.
- [26] H. Inoue, J. Kondo, T. Koike, C. Shukunami, Y. Hiraki, Identification of an autocrine chondrocyte colony-stimulating factor: chondromodulin-I stimulates the colony formation of growth plate chondrocytes in agarose culture, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241 (1997) 395–400.
- [27] J.R. Sanes, The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle, *J. Biol. Chem.* (2003) (Epub).
- [28] H. Birkedal-Hansen, Proteolytic remodeling of extracellular matrix, *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 (1995) 728–735.
- [29] D.H. Ausprunk, J. Folkman, Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis, *Microvasc. Res.* 14 (1977) 53–65.
- [30] K. Tysl, O. Mathieu-Costello, Structural and functional changes in the microvasculature of disused skeletal muscle, *Front. Biosci.* 6 (2001) D45–D52.
- [31] D.W. Leung, G. Cachianes, W.J. Kuang, D.V. Goeddel, N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen, *Science* 246 (1989) 1306–1309.
- [32] N. Ferrara, K. Houck, L. Jakeman, D.W. Leung, Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins, *Endocr. Rev.* 13 (1992) 18–32.
- [33] J. LeCouter, J. Kowalski, J. Foster, P. Hass, Z. Zhang, L. Dillard-Telm, G. Frantz, L. Rangell, L. DeGuzman, G.A. Keller, F. Peale, A. Gurney, K.J. Hillan, N. Ferrara, Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium, *Nature* 412 (2001) 877–884.
- [34] J. LeCouter, R. Lin, N. Ferrara, Endocrine gland-derived VEGF and the emerging hypothesis of organ-specific regulation of angiogenesis, *Nat. Med.* 8 (2002) 913–917.