

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Ecole doctorale BioSE(Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention:"Sciences de la vie et de la santé"

Par Junsong-YE

**Ingénierie tissulaire hépatique à partir du foie décellularisé et
de cellules souches mésenchymateuses de la gelée de
wharton**

Soutenue le 30 octobre 2015

Membres du Jury

Rapporteurs:

Mme. Nadia BENKIRANE-JESSEL DR, Faculté de Médecine, UMR1109, Strasbourg, France

Mme. Magali CUCCHIARINI Professeur, Saarland University Medical Center, Allemagne

Examineurs:

M. Jean-François STOLTZ PU-PHE, UMR CNRS 7365-UL, Nancy, France

Mme. Natalia DE ISLA MCU, UMR CNRS 7365 -UL, Nancy, France

Mme. Lei ZHANG Professeur, Hôpital Calmette de Kunming, Chine

**UMR 7365-CNRS-Université de Lorraine. Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et
Physiopathologie Articulaires (IMoPA)**

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration scientifique entre le laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), UMR 7365 CNRS – Université de Lorraine au sein de la Faculté de Médecine de Nancy, France et le Centre de Recherche Biomédicale à l'Hôpital Calmette de la Faculté de Médecine de Kun Ming, Yun nan, Chine.

Pendant le déroulement de ma thèse, j'ai rencontré beaucoup de personnes agréables, j'ai appris beaucoup dans ce laboratoire, scientifiquement et humainement. Cette thèse restera dans ma mémoire comme le souvenir d'une période riche en événements. Je tiens avant tout à adresser mes remerciements les plus chaleureux à tous ceux qui m'ont aidé au cours de sa réalisation.

Je souhaiterais tout d'abord remercier Monsieur le Professeur **Jean-Yves Jouzeau**, directeur de l'UMR 7365, pour m'avoir accepté dans son unité de recherche, pour sa gentillesse, et pour son soutien.

Je souhaite aussi remercier Monsieur le Professeur **Patrick Menu**, le directeur de notre équipe "Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Vectorisation", pour m'avoir accepté dans son équipe et confié cette thèse.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur **Jean-François Stoltz**, pour ses encouragements, pour sa gentillesse, et pour son aide tout au long de ces 2 années.

Je tiens à remercier Madame le Docteur **Natalia De Isla**, ma directrice de thèse, pour son implication, son aide, son soutien, et sa patience au cours de ces 2 années. Pour ses nombreux conseils scientifiques. Je la remercie plus spécialement pour la patience et le courage dont elle a témoigné lors de la correction de ce manuscrit.

Je souhaite surtout remercier Madame le Docteur **Lei Zhang**, mon mentor, pour m'avoir donné la chance de participer à cette collaboration scientifique et de réaliser cette thèse, ainsi que pour sa disponibilité et ses encouragements au long de ces années. Je lui suis très reconnaissant pour sa confiance, sa patience, ses remarques, et son soutien financier et scientifique dans mes recherches en Chine.

Je voudrais remercier mes camarades **Laila** et **Yueying** pour m'ont enseigné des manipulations scientifiques sur ce travail et pour leur contribution.

Je tiens à remercier également Mesdames **Ghislaine Cauchois**, **Monique Gentils**, Monsieur **Naceur Charif** pour leur gentillesse à mon égard et leur soutien constant. Je leur exprime ma profonde reconnaissance et notamment je voudrais remercier **Ghislaine Cauchois** plus spécialement pour sa patience et son courage lors de la correction de ce manuscrit.

Mes remerciements vont également vers mes chers collègues et amis du laboratoire pour m'avoir encouragé et supporté durant ces années : **Yueying-LI**, **Chaohua-DENG**, **Pan-DAN**, **Yong-HU**, **Ze-XIE**, **Xu-YANG**, **Hao-YU**, **Ganggang-ZHANG**, **Chaojie-WEI**, **Mathilde**, **Caroline**, **Julie**, **Laurie**, **Léonore**, **Lina**, **Melisa**.

Enfin, je tiens à remercier ma famille pour m'avoir permis de faire des études universitaires à l'étranger, et qui a toujours été là pour moi dans les moments de la

vie les plus durs, ma famille pour son soutien et surtout **ma femme, Jinyan-JIANG**, son soutien quotidien au cours de ces années qui n'ont pas été toujours du repos.

Publications et communications

Publications internationales avec comité de lecture (PI)

1. **Jun-Song Ye**, Xiao-san Su, Jean-François Stoltz, Natalia de Isla, Lei Zhang. Signalling pathways involved in the process of mesenchymal stem cells differentiating into hepatocytes. *Cell Prolif.* 2015 Apr;48(2):157-65.
2. **Jun-Song Ye**, Jean-François Stoltz, Natalia De Isla, Liu Yang, Yan-Feng Yin, Lei Zhang. An approach to preparing decellularized whole liver organ scaffold in rat. *Biomed Mater Eng.* 2015 Jan 1;25(0):159-66.
3. Lei Zhang, YongHeng Zhao, Zheng Guan, **Jun-Song Ye**, Natalia de Isla, Jean-François Stoltz. Application potential of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly in liver tissue engineering. *Biomed Mater Eng.* 2015;25(1 Suppl):137-43.

Communication dans des congrès internationaux avec acte publié

Junsong-Ye, Natalia De Isla, Stoltz Jean-François, Lei-Zhang. A New Approach for Liver Replacement via Induction of BMSC into Hepatocytes on Decellularized Whole Liver Organ Scaffold. The 5th China-France International Symposium of stem cell, 13, 12, 2013.

Sommaire

Remerciements	1
Publications et communications	5
Sommaire	6
Listes des abréviations	8
Liste des Figures	15
Liste des Tableaux.....	17
Introduction générale.....	18
Chapitre 1: Etudes Bibliographiques	20
1 Le foie humain et les pathologies associées	20
1.1 Introduction.....	20
1.2 Généralités anatomiques du foie	20
1.3 Fonctions physiologiques du foie	25
1.4 Les maladies du foie	29
1.5 La transplantation hépatique	37
2. Cellules Souches et intérêt en pathologies hépatiques	40
2.1 Généralités des cellules souches.....	40
2.2 Cellules souches mésenchymateuses.....	50
2.3 Cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton.....	61
2.4 Applications des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton en pathologies hépatiques	69
3 l'ingénierie tissulaire et la reconstruction d'organe	71
3.1 Définition et concepts généraux de l'ingénierie tissulaire	71
3.2 Une nouvelle ingénierie tissulaire innovante: le développement d'organe auto-construit.....	73
3.3 L'importance des scaffolds dans le domaine de l'ingénierie tissulaire	74
3.4 La préparation de scaffold d'organe-complet.....	76
3.5 Un résumé du scaffold de l'organe-complet du foie décellularisé.....	83
Chapitre 2: Matériel et Méthodes.....	88
1 Culture cellulaire	88
1.1 Les manipulations de base en culture cellulaire	88
1.2 Obtention de Cellules Souches Mésenchymateuses à partir de la Gelée de Wharton.....	91
2 L'analyse des CSMs-GW par Cytométrie en flux.....	93
2.1 Le principe de cytométrie en flux.....	93
2.2 Marquage des CSMs-GW.....	94
3 Différenciation des CSMs-GW	97
3.1 Différenciation ostéocytaire	97
3.2 Différenciation adipocytaire	99
3.3 Différenciation hépatocytaire	100
4 Transcription inverse et réaction en chaîne de la polymérase (PCR) quantitative en temps réel (RT-PCR)	102
4.1 Principe.....	102
4.2 Extraction d'ARN des cellules par le Trizol	103
4.3 Mesure de la concentration et de la pureté de l'ARN	105

4.4 Rétrotranscription des ARNm (RT)	106
4.5 PCR Semi-Quantitative	106
4.6 Electrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose	108
5 La coloration hématoxyline/éosine (H&E).....	109
5.1 Principe.....	109
5.2 Réactifs	109
5.3 Protocole	110
6 La coloration au trichrome de Masson.....	111
6.1 Principe.....	111
6.2 Réactifs	111
6.3 Protocole	111
7 La microscopie électronique à balayage (MEB).....	112
7.1 Principe.....	112
7.2 La préparation des échantillons	113
8 La préparation du scaffold décellularisé du foie	114
8.1 Matériels et réactifs	114
8.2 La procédure de décellularisation du foie de rat.....	114
9. Caractérisation de la différenciation hépatique.....	116
9.1 L'analyse de la production d'urée.....	116
9.2 Periodic Acid-Schiff staining (PAS Staining)	116
9.3 L'analyse d'absorption de Lipoprotéines de basse densité (LDL)	117
11. Analyse Statistique	118
Chapitre 3 : Résultats et discussion.....	119
1 Isolement et caractérisation des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton.....	119
1.1 Isolement des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton.....	119
1.2 Caractérisation des CSMs-GW utilisées dans cette étude.....	122
1.3 Discussion.....	131
2 Le scaffold du foie décellularisé	134
2.1. Optimisation du protocole pour la préparation du scaffold du foie de rat	134
2.2 La caractérisation du scaffold décellularisé de foie du rat	135
2.3 Discussion.....	138
3 La différenciation de CSM-GW en hépatocytes in vitro	140
3.1 Le changement de la morphologie cellulaire au cours de la différenciation hépatique	141
3.2 Analyse RT-PCR en temps réel de l'expression spécifique de marqueurs hépatocytaires	142
3.3 Caractérisation fonctionnelle des hépatocytes provenant des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton	144
3.4 Discussion.....	148
Conclusion et perspectives.....	152
Résumé.....	157
Abstract	157
Références bibliographiques	158

Listes des abréviations

	Français	English
α-MEM	Alpha Modification Eagle Medium	Alpha Modified Eagle Medium
A		
Ac	Anticorps	Antibody
ADN	Acide désoxyribonucléique	Desoxyribonucleic acid
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire	Complementary desoxyribonucleic acid
ARN	Acide ribonucléique	Ribonucleic acid
B		
BCIP	Bromo chloro indolyl phosphate	5-Bromo-4-chloro-3'-indolyl phosphate p-toluidine salt
bFGF	Facteur de croissance basique de fibroblastes	Basic Fibroblast growth factor
BSA	Sérum d'albumine bovine	Bovin serum albumin
C		
CD	Cluster de différenciation	Cluster of differentiation
CF	Cytométrie en Flux	Flow cytometry
CFU-F	Unités formant	Colony Forming

	colonie-fibroblastes	Unit-Fibroblasts
CHC	Carcinome Hépatocellulaire	Hepatocellular Carcinoma
CS	Cellules souches	Stem cells
CSA	Cellules Souches Adultes	Adult stem cells
CSE	Cellules souches embryonnaires	Embryonic stem cells
CSH	Cellules souches hématopoïétiques	Haematopoietic stem cells
CSM	Cellules souches mésenchymateuses	Mesenchymal stem cells
CSMM	Cellules souches mésenchymateuses médullaires	Bone marrow mesenchymal stem cells
CSMs-G W	Cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton	Wharton's Jelly's mesenchymal stem cells
D		
3-D	Tridimensionnelle	Three-dimension
DAPI	4,6-diamidino-2-phénylindole	4,6-diamidino-2-phenylindole
DEPC	Diéthylépyrocarbonate	Diethyepyrocarbonate

DMSO	Diméthyl sulfoxyde	Dimethylsulfoxide
E		
EDTA	Acide éthylène dinitrilotétra acétique	Ethylene dinitrilo tetra acetic acid
ELISA	Analyse d'immunosorbant liée avec enzyme	Enzyme linked immunosorbant assay
EC	Cellules endothéliales	Endothelial cells
EGF	Facteur de croissance épiderme	Epidermal growth factor
ESLD	Maladie du foie en phase terminale	End stage liver disease
F		
FACS	Fluorescence de cellules	Fluorescence activated cell sorting
FGF	Facteur de croissance fibroblaste	Fibroblast growth factor
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine	Fluorescence of isothiocyanate
FSC	Scatter Avant	Forward Scatter
G		
GADPH	Glycéraldéhyde 3-phosphate	Glyceraldehyde 3-phosphate

	déhydrogénase	dehydrogenase
GFP	Protéine à fluorescence verte	Green fluorescent protein
GW	Gelée de wharton	Wharton's Jelly
GvHD	Maladie du Greffon contre l'Hôte	Graft-versus-Host Disease
H		
HBSS	Hank's Balanced Salts Solution	Hank's Balanced Salts Solution
HGF	Facteur de croissance Hépatique	Hepatocyte growth factor
I		
ICC	Immunocytochimie	Immunocytochemic
Ig	Immunoglobuline	Immunoglobulin
IGF	Facteur de croissance insulinique	Insulin like growth factor
IL	Interleukine	Interleukin
IMF	Intensité moyenne de fluorescence	Intensity of average fluorescence
ITS	Insuline-transferrine-sélénium	Insulin-transferrin-selenium

L		
LDL	Lipoprotéine de basse densité	low density lipoprotein
LG	Low glucose	Low glucose
M		
MEC	Matrice extracellulaire	Extracellulaire matrix
MPC	Cellule progénitrice mésenchymateuse	Mesenchymal progenitor cell
Min	Minute	Minute
mL	Millilitre	Milliliter
MO	Moelle Osseuse	Bone Marrow
N		
NBT	Nitro-Blue tétrazolium chlorique	Nitro-Blue tetrazolium chloride
O		
OSM	Oncostatin M	Oncostatin M
P		
P	Passage	Passage
PAF	paraformaldéhyde	paraformaldehyde
PAS	Periodic Acid Schiff	Periodic acid–Schiff
PBS	Tampon phosphate salin	Phosphate buffer saline

PET	Téréphtalate polyéthylène	de	Polyethylene terephthalate
PG	Protéoglycane		Proteoglycan
PLA	Acide polylactique		Poly lactide acid
PMT	Photomultiplicateur		Photomultiplier
RT-PCR	Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne		Reverse transcription and polymerase chain reaction
S			
SCF	Facteur de croissance de cellule souche		Stem cell growth factor
SEM	Erreur standard de la moyenne		Standard Error of the Mean
SMC	Myocyte de muscle lisse		Smooth muscle cell
SSC	Side Scatter		Side Scatter
SVF	Sérum de veau foetal		Foetal bovine serum
T			
TBE	Tampon de Tris/acide borique/ EDTA		Tris/Boric acid/EDTA buffer
TGF	Facteur de croissance transformant		Transforming growth factor

TH	Transplantation hépatique	Liver transplantation
Tm	Température de fusion	Melting temperature
U		
UV	Ultraviolet	Ultraviolet
V		
VEGF	Facteur de croissance d'endothélium vasculaire	Vascular Endothelial Growth Factor

Liste des Figures

Figure. 1 L'anatomie morphologique du foie humain	21
Figure. 2 La situation du foie dans le corps humain.....	21
Figure. 3 La vascularisation du foie	22
Figure. 4 La représentation de l'architecture hépatique	24
Figure. 5 Le métabolisme énergétique dans le foie	26
Figure. 6 La détoxification hépatique	28
Figure. 7 La formation de la bile.....	29
Figure. 8 Cirrhose du foie	30
Figure. 9 Les causes de cirrhose	31
Figure. 10 Les deux types principaux de stéatose.....	32
Figure. 11 Hépatite.....	34
Figure. 12 La répartition mondiale par pays du Carcinome Hépatocellulaire	36
Figure. 13 La transplantation hépatique.....	39
Figure. 14 La spécification du développement de cellules souches	42
Figure. 15 La génération des cellules souches embryonnaires	43
Figure. 16 Les cellules souches adultes dans les tissus du corps humain	46
Figure. 17 Une présentation de la greffe des cellules souches adultes	46
Figure. 18 La division asymétrique et division symétrique.....	47
Figure. 19 La niche des cellule souches.....	50
Figure. 20 L'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses	53
Figure. 21 La télomère et la télomérase	54
Figure. 22 La migration et l'homing des cellules souches mésenchymateuses	56
Figure. 23 l'immunité adaptative des CSMs.....	59
Figure. 24 l'immunité innée des CSMs.....	61
Figure. 25 Le cordon ombilical humain.....	63
Figure. 26 La schéma illustrant le concept de l'ingénierie tissulaire	72
Figure. 27 Le schéma de l'ingénierie tissulaire à partir du scaffold de l'organe-complet du foie décellularisé et des cellules données	84
Figure. 28 Principe de la cytométrie en flux.....	94
Figure. 29 Principe de l'immuno-fluorescence directe.....	95
Figure. 30 Principe de la technique de PCR.....	102
Figure. 31 Le schéma de principe de la microscopie à balayage	113
Figure. 32 Isolement de la gelée de wharton issue du cordon ombilical.	120
Figure. 33 Morphologie des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton	121
Figure. 34 La capacité de prolifération cellulaire	122
Figure. 35 La présentation des CFU-F.....	123
Figure. 36 Sénescence de CSM-GW lors de la culture	124
Figure. 37 Expression des marqueurs négatifs des CSMs-GW par cytométrie en flux	126

Figure. 38	Le présence des marqueurs surfaciques par cytométrie en flux des CSMs-GW	127
Figure. 39	Evaluation des dépôts de minéralisation calcique après 14 jours de différenciation ostéocytaire, après coloration par le Rouge Alizarine	129
Figure. 40	Evaluation de la coloration Oild Red après 21 jours de différenciation adipocytaire des CSMs-GW	130
Figure. 41	La procédure chirurgicale de la préparation du scaffold du foie du rat	135
Figure. 42	Le Foie décellularisé avec aspect translucide et blanc.	136
Figure. 43	Les colorations de foie décellularisé.	136
Figure. 44	Images de microscopie électronique à balayage (MEB).	137
Figure. 45	Quantification de l'ADN.	138
Figure. 46	Schéma du protocole différenciation hépatique	141
Figure. 47	Le changement morphologique des cellules au cours de la différenciation hépatique	142
Figure. 48	Expression d'ARN des gènes associés au développement du foie.....	144
Figure. 49	Coloration à l'acide périodique de Schiff.....	145
Figure. 50	L'analyse de l'absorption de LDL par les CSMs-GW.	146
Figure. 51	Concentration d'urée au cours de la différenciation hépatique.....	147

Liste des Tableaux

Tableau. 1 Le résumé des techniques et caractérisations de la décellularisation du foie	85
Tableau. 2 anticorps utilisés pour la phénotypage des CSMs-GW	95
Tableau. 3 Les compositions de rétrotranscription des ARNm	106
Tableau. 4 Amorces des gènes de PCR.....	106
Tableau. 5 Liste des réactifs utilisés pour le mélange d'amplification	107
Tableau. 6 Liste des réactifs utilisés pour la coloration H&E	109
Tableau. 7 La programme de la coloration de l'H&E	110
Tableau. 8 Liste des réactifs de la coloration du trichrome de Masson	111
Tableau. 9 Liste des matériels et réactifs pour préparer le scaffold décellularisé du foie	114
Tableau. 10 Concentration d'urée	147

Introduction générale

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme humain. Il appartient au système digestif et assure de nombreuses fonctions vitales pour l'organisme. Mais, malheureusement, jusqu'à présent, il existe plus de 100 formes de maladie du foie causées par divers facteurs et la fréquence des maladies du foie en phase terminale (end stage liver disease, ESLD) augmente dans le monde (Yang and Roberts 2010). Le traitement optimal actuel pour ESLD est la transplantation de foie. Cependant, cette option est limitée par une pénurie de donneurs d'organes et des complications chirurgicales, risques de rejet de la transplantation et des coûts élevés (Soltys, Soto-Gutierrez et al. 2010; Lucey, Terrault et al. 2013). Par ailleurs, d'autres aspects, comme l'obligation à long terme de prise de médicaments immunosuppresseurs (Matsumoto and Fujino 2014; Salisbury, Game et al. 2014) et la nécessité d'une régulation de l'unité de soins intensifs s'ajoutent. Et la transplantation d'hépatocytes matures n'est pas encore une solution efficace dans l'application thérapeutique. Ceci en raison de la difficulté de faire intégrer et de maintenir dans les travées hépatocytaires un nombre suffisant d'hépatocytes fonctionnels. Ainsi, la poursuite de la recherche thérapeutique alternative des maladies du foie en phase terminale est devenue particulièrement importante et urgente.

Depuis quelques années une alternative thérapeutique prometteuse pour lesquelles ces maladies variées a été mise en évidence : c'est l'ingénierie tissulaire. Elle a pour objectif de développer un nouveau tissu ou un organe qui sera implanté au niveau de la blessure. Cette forme de thérapie diffère de celle des traitements standards qui reposent sur le remplacement définitif du tissu ou de l'organe défectueux par une prothèse ou une greffe. Elle propose alors une solution durable à une multitude de problèmes cliniques. Récemment, des travaux ont montré qu'il était possible par l'utilisation de détergents doux de décellulariser complètement le squelette vasculaire hépatique tout en maintenant un réseau vasculaire intègre et une matrice extra cellulaire spécifique (Uygun, Soto-Gutierrez et al. 2010; Arenas-Herrera, Ko et al. 2013; Pan, Hu et al. 2014). L'ensemencement d'hépatocytes et/ou d'autres populations cellulaires permet d'obtenir un organe fonctionnel.

En outre, depuis le premier prélèvement de cellules souches embryonnaires humaines à partir de tissus embryonnaires et leur culture par l'équipe de James A. Thomson (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998) l'ingénierie cellulaire, particulièrement, l'ingénierie de cellules souches, a suscité l'intérêt des scientifiques. La cellule souche est une cellule indifférenciée se caractérisant par la capacité à engendrer des cellules spécialisées par différenciation cellulaire et une capacité à se maintenir par prolifération dans l'organisme (auto-renouvellement) ou, indéfiniment, en culture. Elle joue en effet un rôle très important dans le développement des organismes ainsi que dans le maintien de leur intégrité au cours de la vie. En

particulier, les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) ont attiré l'attention comme outils thérapeutiques, car elles peuvent être obtenues relativement facilement et multipliées en culture. Mais, l'inconvénient de leur utilisation réside dans leur mode d'obtention parce que celles-ci sont invasives pour les patients. De plus, il a été prouvé que les CSMs issues de tissus adultes pouvaient entrer en sénescence et commencer à perdre leurs caractéristiques de cellules souches à partir du moment où elles sont cultivées *in vitro* (Ksiazek 2009; Okunieff and Vidyasagar 2013; Sepulveda, Tome et al. 2014). Les CSMs de tissus foetaux (sang placentaire et gelée de Wharton du cordon ombilical), à l'origine d'épiblaste embryonnaire, sont considérées comme plus primitives que les CSMs provenant de sources adultes. Les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton (CSMs-GW) sont une source des cellules souches mésenchymateuses facilement prélevables, non-invasives et possèdent quelques supériorités comme un phénotype hypo-immunogène (Troyer and Weiss 2008; Nagamura-Inoue and He 2014), la capacité forte de prolifération *in vitro*, le potentiel de différenciation et la multipotence de la fonction de support trophique. Les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton (CSM-GW) sont considérées comme bénéfiques pour le traitement des maladies variées telles que l'accident vasculaire cérébral, le diabète, la maladie de Parkinson, et la maladie du foie.

Outre les formidables possibilités d'investigation qu'offrent des modèles de foie auto-construits par l'association de l'ingénierie tissulaire et de la thérapie cellulaire (Yagi, Fukumitsu et al. 2013; Pan, Hu et al. 2014), la construction des foies qui s'effectue chez l'homme à partir de squelettes exogènes et de cellules allogéniques ou autologues permet de remplacer la transplantation hépatique conventionnelle dans de nombreux cas de maladies hépatiques.

L'objectif de ce travail de thèse est de développer un foie artificiel par ingénierie tissulaire à partir de cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton et du foie décellularisé qui a préservé son réseau vasculaire et sa matrice extracellulaire.

La première étape de ce travail de thèse concerne le prélèvement des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton par la technique «mécanique», l'observation de la morphologie, la caractérisation des cellules, et leur potentiel de différenciation vers des hépatocytes ont été réalisées.

Dans la seconde partie du travail, nous allons mettre au point un protocole de décellularisation du foie. Nous avons utilisé des foies de rat. Le foie a été décellularisé par perfusion continue avec du SDS 1% et triton-X100 1%, via la veine porte et la veine cave inférieure du foie. Après la décellularisation, l'absence de cellules a été confirmée par la diminution de la quantité d'ADN. La coloration H&E montre l'absence de cellules et la coloration de Masson montre le réseau de collagène et des glycosaminoglycanes restantes. Par microscope électronique à balayage (MEB), nous pouvons observer les cellules dans le foie non-décellularisé et l'absence de cellules dans le foie décellularisé. De plus, nous pouvons observer la présence de la structure vasculaire intégrale dans le foie décellularisé.

Chapitre 1: Etudes Bibliographiques

1 Le foie humain et les pathologies associées

1.1 Introduction

Le foie (ou glande hépatique) est un organe des vertébrés, vital pour l'organisme, situé en haut et à droite de l'abdomen, et annexé au système digestif. Il assure trois fonctions vitales : une fonction d'épuration de tout ce que les intestins ont pu absorber comme nutriments, une fonction de synthèse et une fonction de stockage pour les transformations en combustible utilisable par toutes les cellules de l'organisme. Il collabore aussi avec le système immunitaire, participe au métabolisme de nombreux médicaments et contribue à l'équilibre hormonal. Chez l'humain, il est unique et asymétrique. Il est logé dans l'hypocondre droit, le loge sous-phrénique droite, la partie supérieure du creux épigastrique puis atteint l'hypocondre gauche. C'est le plus volumineux des viscères humains (deux pour cent du poids corporel, soit une moyenne de 1500 grammes) et l'organe du corps humain qui effectue le plus grand nombre de transformations chimiques.

Certains malades du foie pourront mener une vie normale grâce à des traitements appropriés, alors que pour d'autres, les lésions irréversibles et leur gravité conduiront à une intervention chirurgicale : la greffe hépatique. Cette opération permettra aux patients de mener une vie comparable à celle d'un individu sain.

C'est depuis les années 1980 et l'avènement des immunosuppresseurs, que la transplantation hépatique est devenue un traitement curatif de choix pour les maladies du foie en phase terminale. Cependant, cette thérapie est limitée par une pénurie de donneurs d'organes et des complications chirurgicales, risques de rejet de la transplantation et des coûts élevés (Soltys, Soto-Gutierrez et al. 2010; Lucey, Terrault et al. 2013).

1.2 Généralités anatomiques du foie

1.2.1 Anatomie morphologique du foie humain

C'est un organe de forme triangulaire. Il est composé de deux grands lobes, le droit (deux tiers du volume du foie) et le gauche séparés (un tiers du volume du foie) par l'insertion du ligament falciforme vers l'avant et le ligament hépatogastrique et le sillon du ligament rond vers l'arrière. Entre ces deux lobes majeurs, on distingue le lobe carré et le lobe caudé. Ces deux petits lobes sont séparés par le hile du foie, endroit où pénètrent la veine porte, l'artère hépatique et où passent les canaux

biliaires principaux (Lafortune 2007). La vésicule biliaire est quant à elle attachée au foie à la limite du lobe carré et du lobe hépatique droit (Figure.1). Le foie est situé dans l'hypochondre droit, c'est-à-dire la partie supérieure droite de l'abdomen. Il se prolonge jusque dans l'épigastre, devant l'estomac, pour atteindre la rate dans l'hypochondre gauche. Il est partiellement protégé par les côtes (Figure.2). Il se trouve séparé des poumons et du cœur par le diaphragme (Guenard 2009).

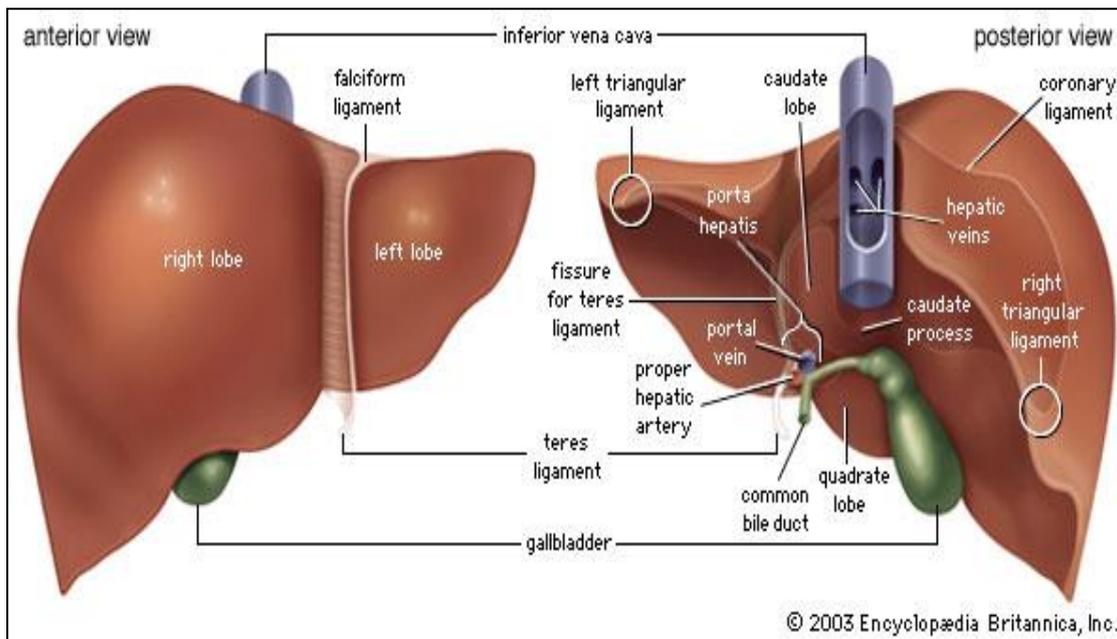


Figure. 1 L'anatomie morphologique du foie humain

une vision antérieure et postérieure de l'anatomie du foie humain sont présentées ici (<http://global.britannica.com/EBchecked/topic/344579/liver>).

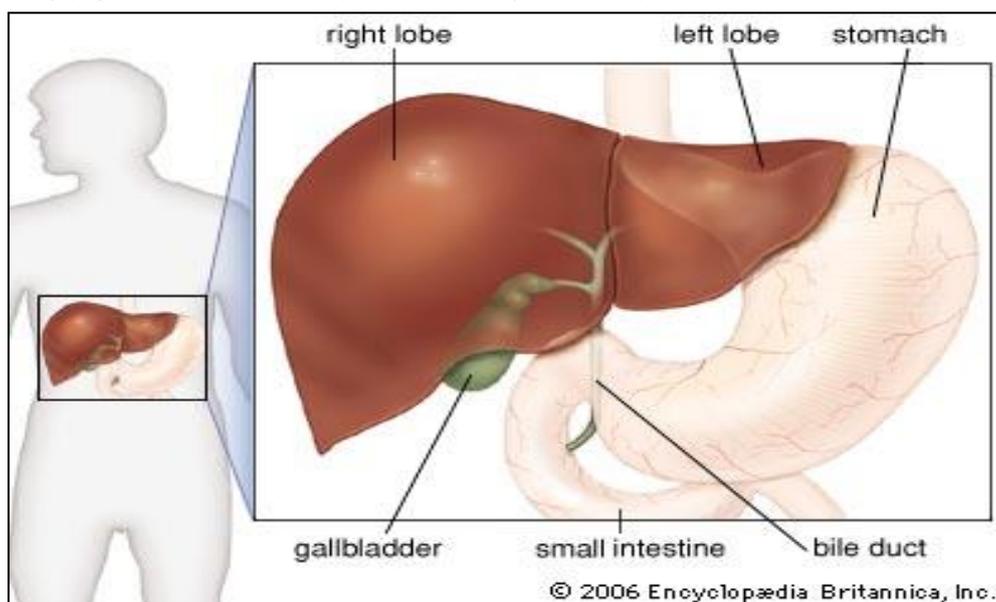


Figure. 2 La situation du foie dans le corps humain.

Le foie humain est situé dans la partie supérieure droite de l'abdomen. Il se prolonge jusque dans l'épigastre, devant l'estomac, pour atteindre la rate dans l'hypochondre gauche

(<http://global.britannica.com/EBchecked/topic/344579/liver>).

1.2.2 Vascularisation du foie

La vascularisation hépatique est dite mixte (Benhamou 2000). Le foie reçoit le sang de deux vaisseaux majeurs : l'artère hépatique et la veine porte. L'artère hépatique propre amène le sang oxygéné et le sang de la veine porte apporte des substances provenant de l'estomac et des intestins, de la rate, et du pancréas, qui seront transformées au cours de leur passage dans le foie. Le retour veineux du foie s'effectue par les veines hépatiques, également appelées veines sus-hépatiques, qui se jettent dans la veine cave inférieure. La vascularisation du foie est très importante, elle représente 25% du débit cardiaque. De plus, le foie est le lieu de passage de la plupart des médicaments administrés par voie orale qu'il va ensuite métaboliser, c'est ce que l'on appelle l'effet de premier passage hépatique. La vascularisation se fait au niveau du hile hépatique essentiellement par la veine porte (75% du débit sanguin soit 1500mL/min) qui est la réunion de la veine splénique et de la mésentérique supérieure, le reste étant apporté par l'artère hépatique (25%). Le sang venant de la veine porte et de l'artère porte est ensuite mélangé dans les sinusoides, puis dans les veinules hépatiques (Figure 3).

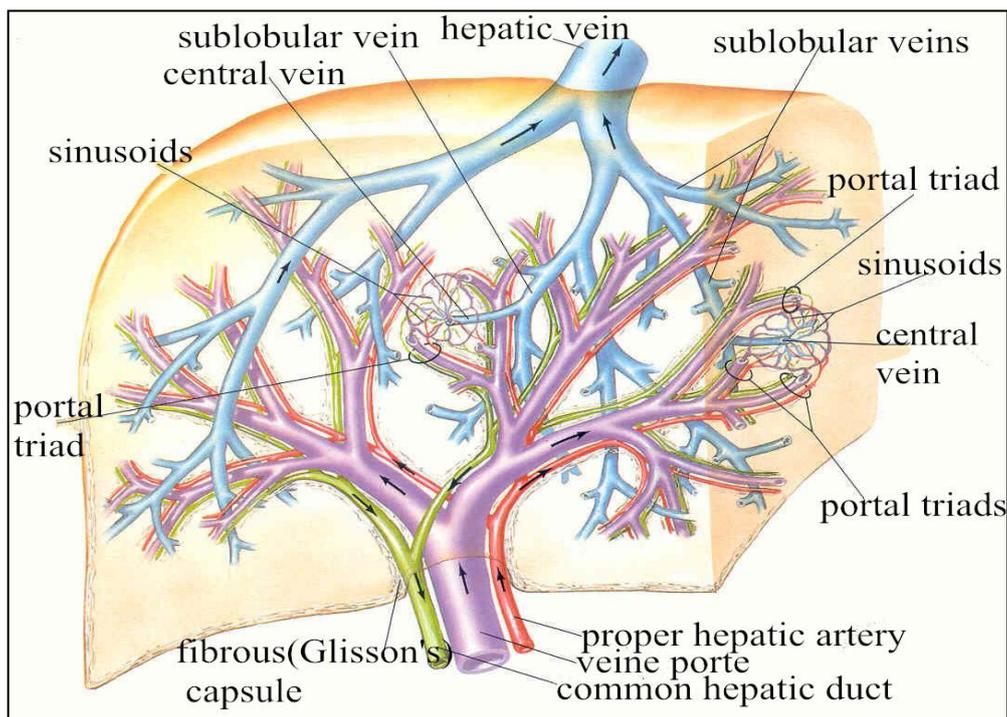


Figure. 3 La vascularisation du foie

La vascularisation hépatique est dite mixte. Le foie reçoit le sang de deux vaisseaux maj-eurs: l'artère hépatique et la veine porte, et les veines hépatiques effectuent le retour vers les vaisseaux qui déchargent des déchets dans le foie(<http://pedicardiology-bala.blogspot.fr/2011/01/anatomy-hepatic-veins.html>).

1.2.3 Types Cellulaires dans le foie

Il existe principalement 5 types cellulaires (Figure.4) :

Les hépatocytes qui représentent 80% des cellules du foie ont un rôle prépondérant. Elles comportent parfois plusieurs noyaux, alors que la plupart des cellules eucaryotes n'en ont qu'un. Ce sont des cellules polarisées : elles possèdent une face exposées au sang dont elles ne sont séparées que par un endothélium, et sur la face opposée, elles constituent un réseau de canalicules biliaires par accollement de leurs membranes. En effet, elles participent au maintien de l'homéostasie et permettent de détoxifier une grande majorité des xénobiotiques. De plus elles ont une fonction exocrine en synthétisant et en sécrétant la bile mais également une fonction endocrine par la synthèse et la sécrétion des protéines plasmatiques (Laperche 2003; Laperche 2007; Sokal 2009).

Les cellules endothéliales qui contrairement aux autres endothéliums ne présentent pas de lame basale mais possèdent en revanche de nombreuses fenêtres permettant le passage des différents nutriments et autres molécules (Maurice, Rajho Meerson et al. 1998). Elles représentent environ 20% de la totalité des cellules. Elles bordent la paroi d'un vaisseau sanguin (capillaire sinusoidal) et favorisent les échanges entre le secteur sanguin et les cellules hépatiques.

Les cellules fusiformes de Kupffer, qui sont des macrophages se trouvent dans les sinusoides. Elles sont fixées aux structures sous-endothéliales par leurs pseudopodes. La phagocytose peut commencer par une phase d'opsonisation avec la fixation d'opsonine autour de l'agent cytotoxique, ensuite grâce au chimiotactisme, les cellules de Kupffer sont attirées vers l'agent qui se fixe ensuite à ces cellules. Les cellules de Kupffer produisent des cytokines pro- et anti-inflammatoires et d'autres molécules biologiquement importantes sur l'engagement des récepteurs de reconnaissance des formes telles que des récepteurs Toll-like et pourront ensuite détruire les particules étrangères permettant l'élimination des différentes toxines et la modulation de la réponse immunitaire grâce à la libération de médiateurs et d'agents cytotoxiques (Gendrault, Bingen et al. 1977; Tsutsui and Nishiguchi 2014; Wenfeng, Yakun et al. 2014).

Les cellules étoilées également appelées lipocytes. Ces cellules sont dans des espaces compris entre les cellules sinusoidales et les cellules hépatiques appelé «espaces de Disse». Elles sont activées par des cytokines lors de lésions hépatiques et deviennent fibreuses en perdant leurs lipides. Ces cellules sont alors prolifératives, elles interviennent dans la fibrogénèse hépatiques. Elles sont par conséquent la cible des traitements anti-fibrotiques (Blanc, Bioulac-Sage et al. 1997). Elles stockent des graisses mais aussi particulièrement de la vitamine A et ont une fonction physiopathologique. Quand elles sont activées par un processus inflammatoire, elles fabriquent du tissu fibreux (fibrose) qui au niveau du foie est un indicateur de lésion. Sa progression se traduit par une aggravation de maladie du foie où le stade ultime est la cirrhose hépatique.

Les cellules ovales présentent de nombreuses caractéristiques des hépatoblastes,

qui sont des précurseurs hépatiques foetaux. Elles ont aussi la capacité de se différencier en hépatocytes ou en cellules biliaires et peuvent constituer une voie de secours pour la régénération du foie qui se met en place quand la capacité proliférative des hépatocytes est altérée (Ding, Ding et al. 2014).

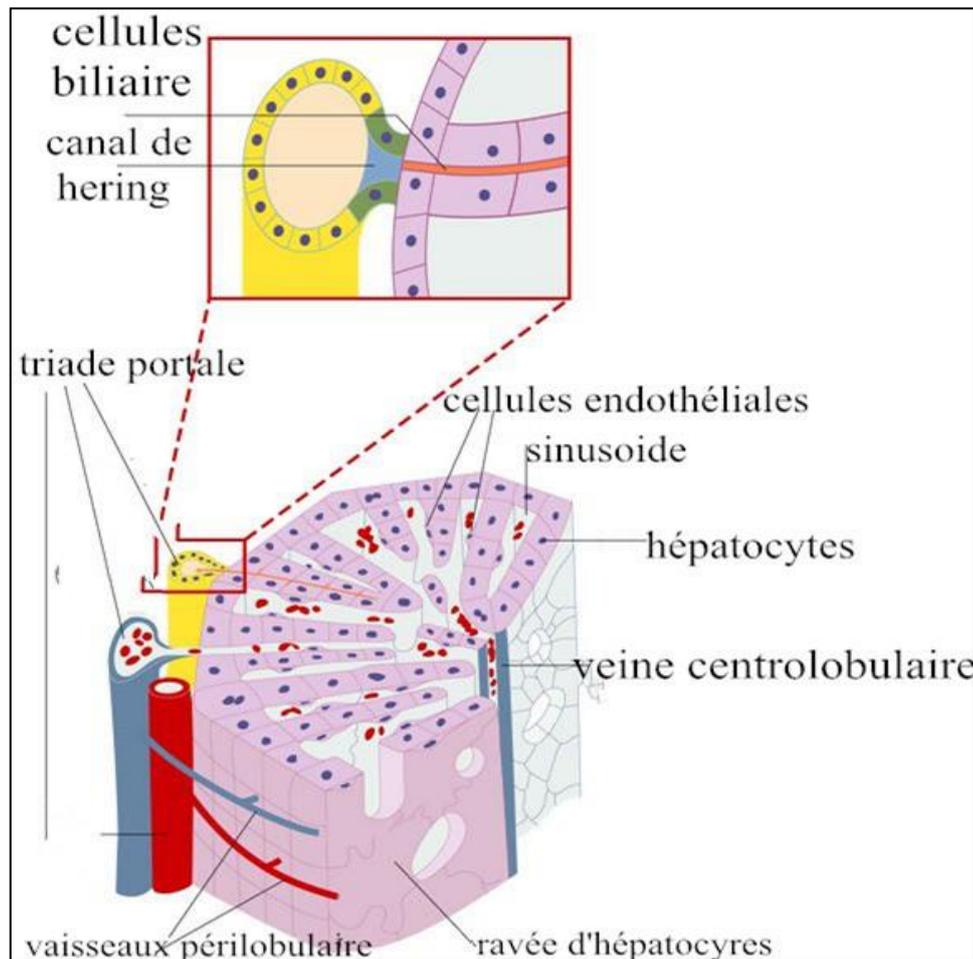


Figure. 4 La représentation de l'architecture hépatique

Les hépatocytes sont empilés et forment des travées comprenant une seule épaisseur de cellules. Chaque hépatocyte est au contact de capillaires sinusoides contenant les cellules de Kupffer. Les canalicules biliaires (orange) délimitent l'espace entre deux hépatocytes adjacents. La vascularisation est également indiquée : le sang pénètre par une branche de la veine porte et de l'artère hépatique, se répartit dans les sinusoides qui se jettent dans la veine centrolobulaire. Les cellules (vert) faisant la jonction entre les hépatocytes (violet) situés à l'extrémité des travées et les cholangiocytes (jaune) sont peut-être les cellules souches quiescentes à l'origine des cellules ovals (Laperche 2003).

Toutes les cellules du foie contrôlent la composition du sang qui quitte les hépatocytes, la captation des nutriments qui sont prélevés, stockés ou utilisés par les hépatocytes. Suite au processus de détoxification, de dégradation, certaines substances qui arrivent au foie sont toxiques pour l'organisme : le rôle du foie est de dégrader ces substances en produits non-toxiques. Les produits lipo-solubles sont ensuite reversés dans la bile, puis dans l'intestin, et éliminés dans les selles. Les produits hydro-solubles sont reversés dans le sang, qui les mène jusqu'aux reins : ils

sont éliminés par les urines. Ainsi, l'ammoniaque, qui est naturellement produite par le colon lors de la décomposition du contenu digestif, possède une forte toxicité neurologique. Menée au foie par la veine porte, celle-ci est dégradée par les cellules hépatiques en urée, puis éliminée dans les urines.

Le foie joue aussi un rôle essentiel dans le cycle de décomposition de l'hémoglobine. Les globules rouges ont une durée de vie d'environ 120 jours. À l'issue de cette période, ils sont détruits dans la rate, où la dégradation de l'hémoglobine produit de la bilirubine libre. La bilirubine libre est toxique et peut être nocive; elle possède une couleur jaune caractéristique. Elle parvient au foie par voie sanguine et y est transformée en bilirubine conjuguée, non toxique. Celle-ci est ensuite déversée dans la bile, dont elle est un des composants majeurs : c'est elle qui est responsable de la couleur jaunâtre de la bile et, lors de son évacuation par l'intestin, donne la couleur jaune / marron des selles.

Les cellules du foie secrètent de la bile de façon continue. Liquide jaunâtre, la bile contient de la bilirubine, des acides biliaires, du cholestérol, de la lécithine et de nombreux autres composants. Les acides biliaires et d'autres composants de la bile interviennent dans la digestion des graisses qui se déroule dans l'intestin grêle. La bile a aussi pour fonction de transporter jusqu'à l'intestin les produits liposolubles à éliminer après leur passage dans le foie. Donc, c'est nécessaire de rappeler des généralités des fonctions physiologiques du foie.

1.3 Fonctions physiologiques du foie

Le foie détient un rôle primordial au sein de la digestion puisqu'il est le premier organe qui rencontre les nutriments après leur absorption. Ceux-ci sont ainsi stockés et libérés selon les besoins des organes périphériques. Il a de nombreuses fonctions : il sert à métaboliser les glucides, les protéines et les lipides; il a une fonction d'épuration en détruisant certaines toxines et éliminant certains médicaments; il a également un rôle de stockage notamment du fer, du cuivre et d'une partie du glucose. Il sécrète aussi la bile, qui va être déversée dans l'appareil digestif. En résumé, ces modifications effectuées par le foie sont vitales pour l'organisme; elles ont pour objectifs principaux :

- le stockage et la répartition des nutriments issus de la digestion
- la dégradation des substances toxiques
- la synthèse de la plupart des protéines du sang
- la production de la bile.

1.3.1 Fonction du stockage et la répartition

Le foie emmagasine les vitamines liposolubles (A, D, K E) et le glycogène. Il stocke ainsi l'énergie sous forme de sucre et le met à la disposition de l'organisme en cas de besoin.

Le foie est le principal organe de contrôle dans l'homéostasie du cholestérol. En effet, il est capable de synthétiser le cholestérol qui pour rappel est essentiel à la vie des cellules (constituant principal des membranes). Le cholestérol peut être stocké dans le foie tel quel ou sous forme estérifiée. Il peut être éliminé si sa concentration devient trop importante. Son transport dans l'organisme est assuré par les lipoprotéines (high density lipoproteins, very low density lipoproteins, low density lipoproteins). En ce qui concerne les acides gras circulants, ils sont en majorités d'apport exogène. Mais les hépatocytes peuvent synthétiser eux-mêmes des acides gras qui sont dits endogènes. Leur catabolisme (oxydation) permettra de fournir l'énergie nécessaire à l'organisme.

Après une prise alimentaire, le taux de sucre augmente dans le sang. Or les sucres qui parviennent au foie n'ont pas tous besoin d'être envoyés immédiatement aux autres organes. Le foie profitera de ce moment pour faire des réserves. D'où l'intérêt qu'ils soient stockés sous forme de glycogène, sorte de sucre géant et compacté. C'est la célèbre fonction glycogénique du foie découverte au XIXème siècle par Claude Bernard. Une fois stockés, ces sucres ont besoin d'être mis à disposition de l'organisme à la demande. Le foie relâchera alors du glucose. Il est donc le régulateur de la glycémie et du métabolisme des glucides (Figure 5).

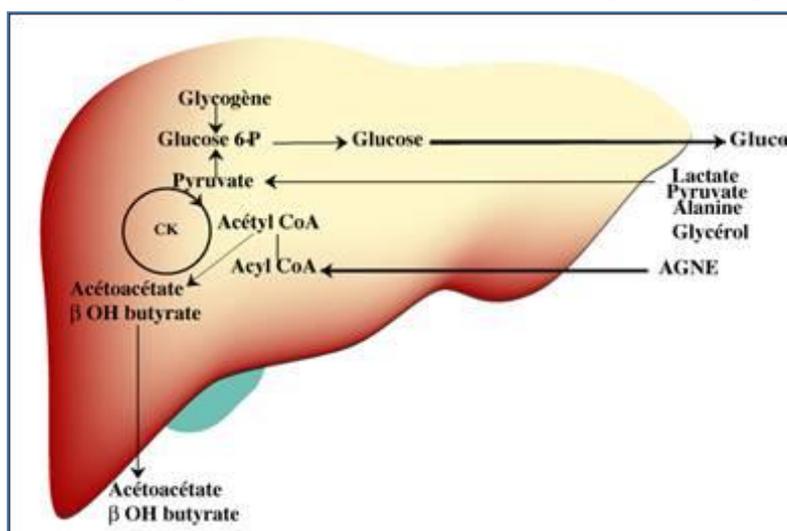


Figure. 5 Le métabolisme énergétique dans le foie

La présentation des voies biochimiques de synthèse et de dégradation de glucose principal qu'est le glycogène au sein de la cellule du foie. Il stocke ou exporte l'énergie sous forme de sucre et le met à la disposition de l'organisme en cas de besoin (http://aristote.datacenter.dsi.upmc.fr/disc/PCEM1/Cours/JC_PF_metab_2005_fichiers/frame.htm).

On y trouve également du fer, du cuivre, de la vitamine B12 et des vitamines liposolubles (vitamine A, vitamine D, vitamine E, vitamine K). Concernant les vitamines, certaines seront activées dans le foie. C'est le cas par exemple de la vitamine D, importante pour l'absorption intestinale du calcium (Ca^{2+}) et sa fixation sur les os, elle nécessite une activation hépatique pour être fonctionnelle.

1.3.2 Fonction de la détoxification

Certaines substances qui arrivent au foie sont toxiques pour l'organisme : le rôle du foie est de dégrader ces substances en produits non-toxiques. Les produits lipo-solubles sont ensuite reversés dans la bile, puis dans l'intestin, et éliminés dans les selles. Les produits hydro-solubles sont reversés dans le sang, qui les mène jusqu'aux reins : ils sont éliminés par les urines.

Ainsi, l'ammoniaque, qui est naturellement produite par le colon lors de la décomposition du contenu digestif, possède une forte toxicité neurologique. Menée au foie par la veine porte, celle-ci est dégradée par les cellules hépatiques en urée, puis éliminée dans les urines.

Le foie joue aussi un rôle essentiel dans le cycle de décomposition de l'hémoglobine. Les globules rouges ont une durée de vie d'environ 120 jours. À l'issue de cette période, ils sont détruits dans la rate, où la dégradation de l'hémoglobine produit de la bilirubine libre. La bilirubine libre est toxique et peut être nocive; elle possède une couleur jaune caractéristique. Elle parvient au foie par voie sanguine et y est transformée en bilirubine conjuguée, non toxique. Celle-ci est ensuite déversée dans la bile, dont elle est un des composants majeurs : c'est elle qui est responsable de la couleur jaunâtre de la bile et, lors de son évacuation par l'intestin, donne la couleur jaune / marron des selles (Figure 6).

L'alcool (éthanol) ingéré parvient aussi pour l'essentiel jusqu'au foie. Absorbé par les cellules hépatiques, il est transformé en acétaldéhyde puis en acétate. Ces substances sont reversées dans le sang et éliminées par voie rénale. Mais l'éthanol et l'acétaldéhyde ont un effet toxique sur les cellules hépatiques : elles possèdent des propriétés chimiques qui perturbent gravement leur fonctionnement, et entraînent la stéatose hépatique.

Les médicaments pris par voie orale parviennent de la même façon au foie : celui-ci absorbe et élimine une partie des substances actives du médicament. Les médicaments peuvent provoquer une modification des mitochondries responsables d'hépatites cytolitiques et de stéatoses. Les dosages des médicaments prennent en compte cette intervention du foie, qu'on appelle « effet de premier passage ».

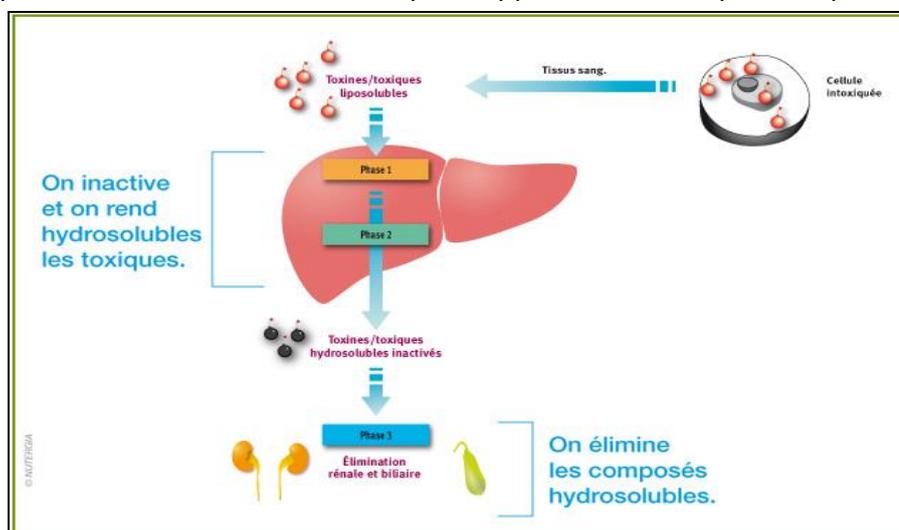


Figure. 6 La détoxification hépatique

Le foie a un rôle vital pour l'organisme, puisque grâce à un système enzymatique spécifique, il est capable de neutraliser puis rendre hydrosolubles les toxines. Ces processus d'épuration du foie est de dégrader ces substances en produits non-toxiques(<http://www.nutergia.com/fr/nutergia-votre-expert-conseil/dossiers-bien-etre/drainage-et-detox-sante.php>).

1.3.3 Fonction de la synthèse des protéines sanguines

A partir des protéines et acides aminés issus de la digestion, les cellules du foie synthétisent la majorité des protéines sanguines. En cas de dysfonctionnement hépatique, on observe donc un déficit de ces protéines dans le sang. Le manque d'albumine entraîne notamment l'ascite. Les troubles de la coagulation donnent lieu à des hémorragies.

Le foie permet également la synthèse de nombreuses protéines essentielles à l'organisme. Elles auront un rôle majeur dans le transport de molécules, dans la coagulation et dans la défense de l'organisme.

Ce sont les acides aminés acheminés au foie grâce à la veine porte qui permettront la synthèse de ces protéines :

- L'albumine, qui est responsable en partie de la pression oncotique.
- La plupart des facteurs de la coagulation.
- La transferrine et la céruloplasmine qui transfèrent respectivement le fer et le cuivre.
- Des protéines de l'inflammation, telles que la protéine C réactive utilisée comme marqueur biologique.
- Des facteurs de croissance, permettant la régénération du foie.

1.3.4 Production de la bile

Les cellules du foie secrètent de la bile de façon continue. Liquide jaunâtre, la bile contient de la bilirubine, des acides biliaires, du cholestérol, de la lécithine et de nombreux autres composants. Les acides biliaires et d'autres composants de la bile interviennent dans la digestion des graisses qui se déroule dans l'intestin grêle. La bile a aussi pour fonction de transporter jusqu'à l'intestin les produits liposolubles à éliminer après leur passage dans le foie. La bile est constituée majoritairement d'eau, elle est iso-osmotique au plasma et contient moins de 5% de solides. Les principaux solutés sont les sels biliaires qui sont formés à partir du cholestérol. Le foie secrète les différentes molécules produites dans les canalicules. La bile est sécrétée à raison de 500 mL par jour et permet l'élimination des principaux métabolites toxiques y compris les médicaments transformés ainsi que le cholestérol et des produits de dégradation des lipides (Figure 7).

Elle permet également la digestion de certaines graisses alimentaires et vitamines liposolubles. La bile est ensuite stockée dans la vésicule biliaire lors des

périodes de jeûne. Lors d'un repas il y a libération de cholécystokinine par l'intestin grêle ce qui déclenche une contraction de la vésicule biliaire et le relâchement du sphincter d'Oddi qui permet la sortie de la bile dans le duodénum par l'ampoule de Vater.

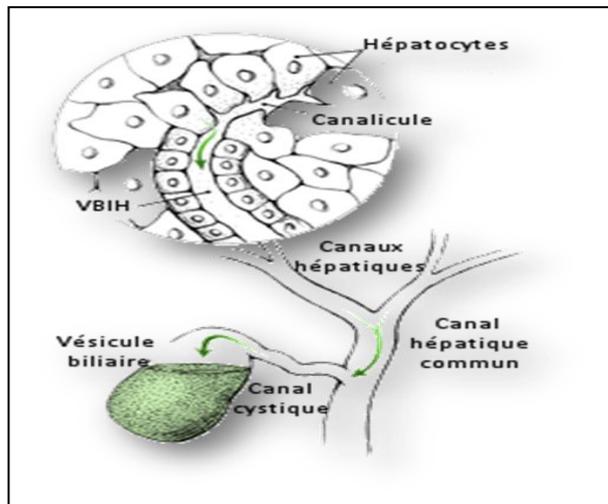


Figure. 7 La formation de la bile

La bile est sécrétée de façon continue par le foie et est stockée dans la vésicule biliaire qui normalement l'envoie dans le duodénum de façon intermittente et pendant la digestion. La commande de la vésicule biliaire est nerveuse et humorale(<http://angiocholite.blogspot.fr/2009/05/physiologie-hepatique.html>).

1.4 Les maladies du foie

Le foie joue un rôle important dans de nombreuses fonctions de l'organisme à partir de la production de protéine et le cholestérol, la coagulation du sang, le métabolisme du glucose et le fer. Une Variété de facteurs peut affecter la fonction du foie, par exemple : la cirrhose se produit lorsque les cellules hépatiques normales sont remplacées par du tissu cicatriciel à la suite d'une maladie hépatique chronique, ou la stéatose est de la conséquence de la consommation chronique d'alcool, dépôt de graisses à l'intérieur des cellules hépatiques. Jusqu'à présent, Il y a plus de 100 maladies différentes du foie qui touchent la population humaines. Ici, nous rappelons quelques maladies typiques du foie.

1.4.1 Cirrhose

La cirrhose est une maladie résultant d'une atteinte hépatique permanente ou du développement de cicatrices dans le foie. Ces problèmes entraînent une obstruction de la circulation sanguine dans le foie et préviennent le déroulement normal des fonctions de métabolisme et de régulation de l'organe. En effet, Les hépatocytes détruits conduisent à la formation de nouveaux hépatocytes qui se développent en amas sans avoir de connexions vasculaires et biliaires normales. Ces amas constituent les nodules de régénération qui forment des lobules anormaux. Suivant la taille des nodules de régénération on distingue les cirrhoses micronodulaires avec des nodules majoritairement inférieurs à 3 mm de diamètre, les cirrhoses macronodulaires avec des nodules supérieurs à 3 mm de diamètre et les

cirrhoses mixtes avec autant de micronodules et macronodules (Figure 8)



Figure. 8 Cirrhose du foie

Le tissu cicatriciel entoure des amas de cellules hépatiques qui se régénèrent; ces amas constituent des nodules de régénération(http://hepatoweb.com/gros_plans.php).

Aux stades plus avancés de la cirrhose, une jaunisse se développe et les calculs biliaires sont plus fréquents parce qu'il n'y a pas suffisamment de bile dans la vésicule biliaire. Un foie atteint de cirrhose n'élimine plus les toxines de façon efficace et on note donc une accumulation des toxines dans le sang, ce qui peut toucher la fonction mentale et entraîner des changements de personnalité et parfois le coma. Les premiers signes d'accumulation de toxines dans le cerveau peuvent inclure un aspect physique négligé, une absence de réaction, un manque de mémoire, des problèmes de concentration ou des changements dans les habitudes de sommeil. Comme le processus normal de nettoyage assuré par le foie est atteint en cas de cirrhose, les médicaments ne sont plus filtrés correctement, ce qui se traduit par une plus grande sensibilité aux médicaments et à leurs effets secondaires.

Normalement, le sang venant des intestins et de la rate parvient au foie par la veine porte. En cas de cirrhose toutefois, la circulation sanguine normale dans le foie se trouve bloquée, ce qui peut entraîner le gonflement du foie et parfois de la rate. Le sang venant des intestins est alors forcé de trouver un nouveau chemin autour du foie et emprunte de nouveaux vaisseaux. Certains de ces vaisseaux sanguins, appelés « varices gastro-oesophagiennes » parce qu'ils se forment essentiellement au niveau de l'estomac et de l'oesophage, deviennent ainsi très gros et peuvent éclater en raison d'hypertension (hypertension portale) et de la minceur des parois vasculaires, entraînant des hémorragies dans la partie supérieure de l'estomac ou de l'oesophage.

Les principales causes de la cirrhose sont (Figure 9) :

- l'alcoolisme chronique.
- les infections virales causées par les virus de l'hépatite chronique (types B, C et D).
- les troubles métaboliques, comme le déficit en alpha1-antitrypsine, la

galactosémie et la glycoséose.

- des maladies héréditaires, comme la maladie de Wilson et l'hémochromatose.
- la cirrhose biliaire due à des maladies comme la cirrhose biliaire primitive (CBP) et la cholangite sclérosante primitive (CSP).

l'hépatite toxique causée par des réactions graves à certains médicaments remis sur ordonnance ou par une exposition prolongée à des toxines environnementales des accès répétés d'insuffisance cardiaque avec congestion du foie.

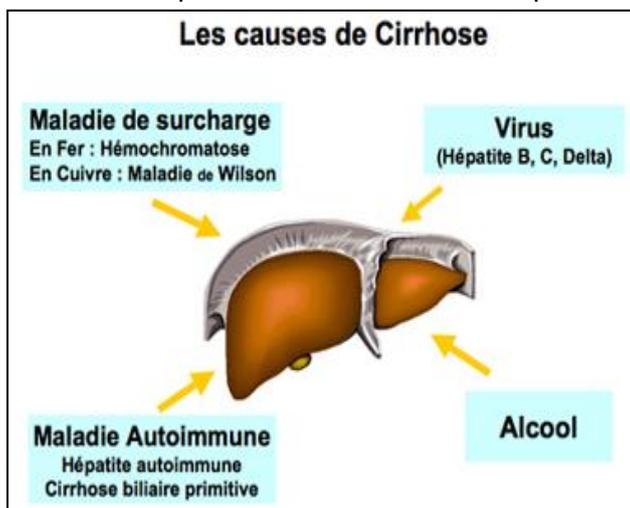


Figure. 9 Les causes de cirrhose

Même si l'alcool reste, la cause la plus fréquente de cirrhose, il existe d'autres causes parmi les quelles les plus fréquentes sont : l'hémochromatose génétique, surcharge en fer de l'organisme; les hépatites chroniques dues au virus B ou au virus C.etc. (<http://www.centre-hepato-biliaire.org/maladies-foie/cirrhose.html>).

Les traitements de la cirrhose visent à arrêter ou à retarder la progression de la maladie, limitant le plus possible l'atteinte des cellules hépatiques et les complications. Quand la cirrhose est due à la consommation d'alcool, il est essentiel que le patient arrête de boire de l'alcool pour arrêter la progression de la maladie. La cirrhose causée par une hépatite virale peut être traitée avec des agents antiviraux pour réduire l'atteinte des cellules hépatiques. Certains médicaments permettent de contrôler les symptômes de la cirrhose. On utilise ainsi des agents appelés « diurétiques » pour éliminer l'excédent de liquide et prévenir la récurrence de l'oedème et de l'ascite. L'association de mesures diététiques et d'un traitement médicamenteux peut améliorer la fonction mentale. Une baisse de l'apport de protéines alimentaires limite ainsi la formation de toxines dans les voies digestives. Le médecin peut également recommander la prise de laxatifs, comme le lactulose, qui aideront à absorber les toxines et à accélérer leur élimination des intestins. L'hémorragie liée à l'hypertension portale représente une conséquence grave de la cirrhose. On peut prescrire des médicaments, comme les bêta-bloquants, pour réduire l'hypertension portale. Dans les cas critiques, la greffe du foie ou une anastomose portosystémique, qui permet de soulager la pression au niveau de la veine porte et des varices, peut se révéler nécessaire.

1.4.2 Stéatose

La stéatose hépatique est une lésion du foie dont, pour l'Homme, la gravité est variable. La stéatose hépatique se définit comme l'infiltration c'est-à-dire la

pénétration, de manière diffuse à l'intérieur de la glande hépatique, de gouttelettes de lipides (corps gras) constituées surtout de triglycérides. Elle est consécutive à la zugunruhe chez les oiseaux migrateurs et peut être provoquée en élevage avicole pour la production de foie gras par gavage.

Dans la population générale, l'incidence de la stéatose estimée par échographie atteint 20 à 25%, et elle est probablement sous-évaluée car l'échographie ne détecte que les stéatoses importantes (il faut qu'il y ait au moins 20% de stéatose à l'histologie pour qu'elle soit visible à l'échographie). Il existe 2 types de stéatose selon la taille des vésicules de graisse dans les cellules hépatiques (hépatocytes) :

Stéatose macrovacuolaire : les vacuoles ont une taille supérieure à celle du noyau cellulaire et il est déplacé vers la périphérie cellulaire.

Stéatose microvacuolaire : les vacuoles ont une taille inférieure à celle du noyau cellulaire et ne le déplacent pas en périphérie (Figure 10).

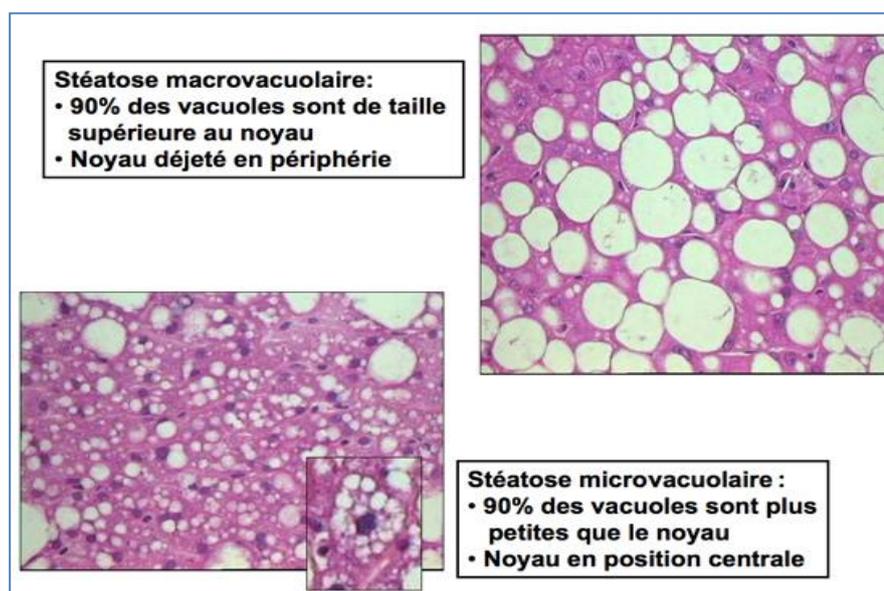


Figure. 10 Les deux types principaux de stéatose

La stéatose est caractérisée par la présence de graisse dans les hépatocytes. Il en existe deux types : la stéatose macrovésiculaire, la plus fréquente, bénigne, majoritairement associée à la consommation excessive d'alcool, et la stéatose microvésiculaire, liée à un dysfonctionnement mitochondrial, plus sévère (<http://www.centre-hepato-biliaire.org/maladies-foie/steatose.html>).

Déterminer de manière précise et concise la stéatose hépatique semble compliqué. En effet, il n'existe pas de facteurs particuliers responsables d'un foie trop gras. Cependant, les experts évoquent un large éventail de raisons. Parmi elles, nous pouvons citer :

- Une consommation excessive de lipides dans l'alimentation. Le foie ne peut alors plus métaboliser correctement les lipides et les accumule.
- Le foie trop gras est l'une des conséquences les plus fréquentes de l'obésité, c'est pourquoi les personnes en excès de poids ont un risque important d'être touchés (Thuluvath 2009).
- Le foie trop gras est aussi une conséquence de problèmes comme un taux de cholestérol trop élevé, un taux de triglycérides élevé ou une hypertension, c'est

pourquoi les patients qui en souffrent doivent faire surveiller régulièrement leur santé hépatique.

- Les personnes qui souffrent d'hyperinsulinisme ont, en raison de leur résistance à l'insuline, une forte tendance à développer un foie trop gras.
- Les personnes alcooliques ont aussi tendance à souffrir du foie trop gras.
- La prédisposition génétique est aussi un facteur dans la possibilité de développer un foie trop gras. De récentes recherches ont révélé que des variations dans les gènes GCKR et PNPLA3 pourraient rendre certaines personnes plus sujettes à développer une stéatose hépatique (Ridker, Pare et al. 2008; Hernaez, McLean et al. 2013; Lin, Chang et al. 2014; Tracz, Madzio et al. 2014).

Il n'existe aucun traitement standard pour la maladie de stéatose. A titre préventif, il est possible de traiter les facteurs de risque qui contribuent aux stéatoses. Par exemple, en cas d'obésité, perdre du poids grâce à une alimentation équilibrée et de l'exercice et, dans certains cas avec des médicaments et la chirurgie. Si un médicament provoque des stéatoses, il doit être modifié pour interrompre ou remplacé par l'équivalent.

Afin de réduire le risque de stéatose on peut prendre les mesures suivantes: choisir une alimentation saine à base de légumes, fruits, grains entiers et graisses saines, maintenir un poids idéal, et utiliser des produits chimiques avec prudence. Si vous travaillez avec des produits chimiques, suivez les mesures de sécurité exigées par les instructions du fabricant (Kasuya, Oshiro et al. 2012).

1.4.3 Hépatite

L'hépatite est une inflammation du foie, le plus souvent causée par une infection virale. A ce jour, 5 virus provoquant une infection ciblée et une inflammation du foie ont été identifiés. Ces virus, désignés par les lettres A, B, C, D, et E, diffèrent par leur mode de transmission (féco-orale pour les virus A et E, parentérale pour les virus B et C) et leur agressivité. L'hépatite virale est beaucoup plus fréquente dans les pays non industrialisés. L'hépatite A est endémique en Afrique, dans certains pays d'Amérique du Sud et en Asie (Corouge and Pol 2013). Il en va de même pour l'hépatite B. En effet, dans la plupart des pays d'Afrique subsaharienne et d'Asie, où de 8% à 10% de la population est porteuse de l'hépatite B (Zarski 2006), elle représente l'une des principales causes de mortalité des adultes (par cancer du foie ou cirrhose). Près de 3% de la population mondiale est infectée par le virus de l'hépatite C (Poupon 2005). En Afrique, la prévalence de cette infection est la plus élevée du monde: elle dépasse 5% (Bronowicki, Barraud et al. 2005; Deltenre, Mathurin et al. 2005; Antona, Couturier et al. 2011). Elle est parfois due à l'alcoolisme, ou à une intoxication par un médicament ou par un produit chimique (Figure 11).

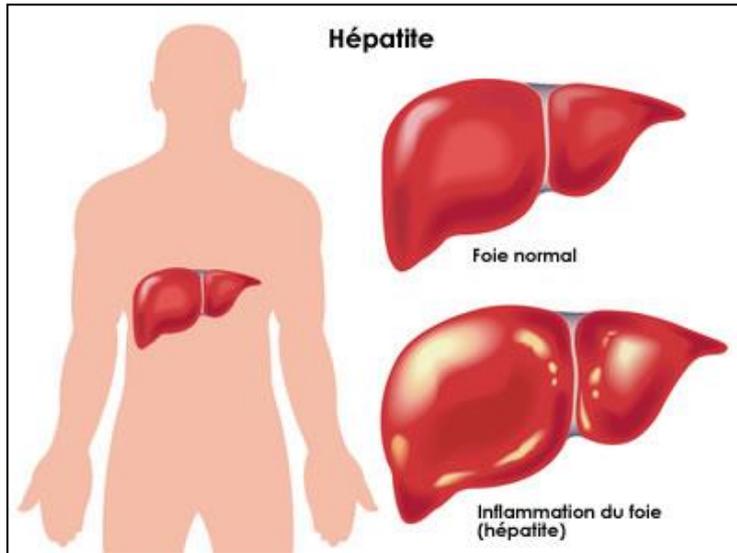


Figure. 11 Hépatite

Une hépatite est une inflammation cellulaire du foie, plus souvent causée par des virus. On l'appelle alors une hépatite virale. Une personne peut être infectée par plusieurs de ces virus, en même temps ou à des moments différents (<http://alcs.ma/?Hepatites-virales&lang=fr>).

Dès que les virus atteignent le foie, ils pénètrent dans ses cellules, les hépatocytes, et s'y multiplient. Le système immunitaire qui assure les défenses de l'organisme détruit alors les cellules infectées, ce qui provoque l'inflammation du foie. Des symptômes caractéristiques de l'inflammation aiguë du foie sont éventuellement observés lors de la contamination par ces virus et peuvent durer plusieurs semaines : jaunissement de la peau et des yeux (jaunisse ou ictère), urines foncées, selles décolorées, fatigue extrême, nausées, vomissements et douleurs abdominales. Il est impossible de distinguer les différentes formes d'hépatites sur la base des symptômes de la phase aiguë de la maladie. Au contraire des virus de l'hépatite A et de l'hépatite E, les virus de l'hépatite B et de l'hépatite C peuvent conduire à un état de portage chronique, signifiant que le sujet ne se débarrasse pas du virus et peut développer de nombreuses années plus tard les complications graves d'une hépatite chronique : cirrhose et cancer du foie.

Les symptômes varient beaucoup d'une personne à l'autre et dépendent de la cause de l'hépatite. Certains types d'hépatite provoquent carrément la destruction d'une partie du foie. La majorité des hépatites se résorbent spontanément, sans laisser de séquelles. Parfois, la maladie persiste plusieurs mois. Quand elle dure plus de 6 mois, elle est considérée comme chronique. Le traitement d'une hépatite nécessite un suivi médical. Les approches complémentaires suivantes peuvent contribuer à la guérison si on les associe aux traitements médicaux classiques. Certaines peuvent aider à inhiber la multiplication du virus (en cas d'hépatite virale), à renforcer le système immunitaire ou à stimuler la régénérescence des cellules du foie. Lorsque le foie est gravement atteint, une greffe de cet organe peut être la seule solution.

1.4.4 Carcinome Hépatocellulaire (CHC)

Souvent qualifié par son abréviation CHC, le carcinome hépatocellulaire

correspond à un cancer se développant au niveau du foie. On parle de cancer primitif du foie. Également dénommé hépatocarcinome, Le CHC est le sixième cancer le plus fréquent au niveau mondial. Il est le cinquième cancer chez l'homme et le huitième chez la femme. Il représente la troisième cause de mortalité par cancer après le cancer du poumon et le cancer de l'estomac. Le CHC représente l'affection maligne la plus fréquente dans plusieurs régions d'Afrique et d'Asie. Au moins 300,000 des 600,000 morts dans le monde surviennent en Chine uniquement, et la majorité des 300,000 morts restants surviennent dans les pays à ressources faibles de l'Afrique sub-saharienne. En Europe, aux Etats-Unis et en Amérique latine l'hépatite C est la cause la plus fréquente de CHC. Chez les patients avec une hépatite C chronique et une cirrhose constituée, l'incidence de CHC est de 2-8% par an. Au Japon, la mortalité due au CHC a plus que triplé depuis le milieu des années 70. Une infection par HCV est à l'origine de 75–80% des cas de CHC alors que le virus de l'hépatite B (HBV) est responsable de 10-15% des cas. En Asie, en Afrique et dans certains pays de l'Europe de l'Est, l'hépatite B est à l'origine de la plupart des cas de CHC, dépassant de loin l'impact de l'hépatite C chronique C (Figure. 12). Trois cent millions de personnes dans le monde sont infectés par HBV, parmi lesquels 120 millions de chinois. En Chine et en Afrique, l'hépatite B est la cause principale de CHC; environ 75% des patients avec un CHC souffrent d'une hépatite B (Kansagara, Papak et al. 2014; Menon, Hakeem et al. 2014; Raza and Sood 2014; Tsoulfas, Agorastou et al. 2014; Zhou, Lei et al. 2014).

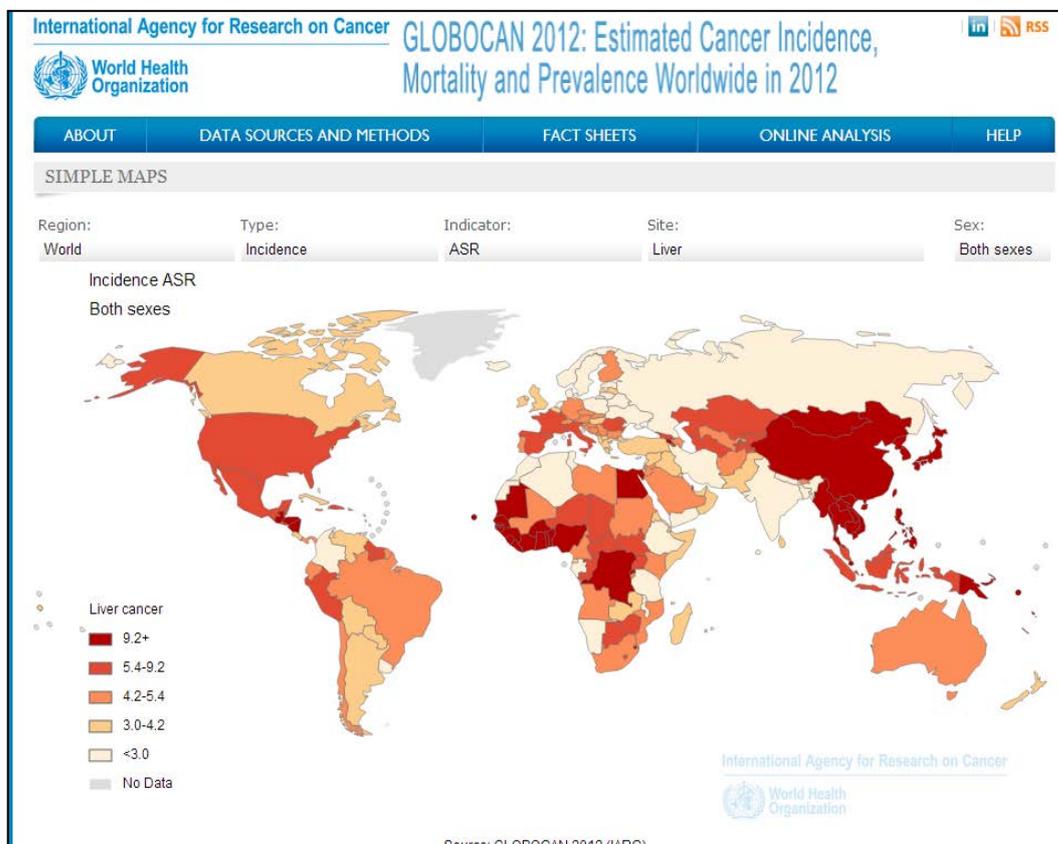


Figure. 12 La répartition mondiale par pays du Carcinome Hépatocellulaire

C'est le sixième cancer dans le monde par ordre de fréquence et le plus fréquent des cancers primitifs du foie. L'incidence annuelle mondiale est d'environ 500,000 nouveaux cas/an. La troisième cause de mortalité par cancer après le cancer du poumon et le cancer de l'estomac. Le CHC représente l'affection maligne la plus fréquente dans plusieurs régions d'Afrique et d'Asie(<http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx>).

Ces chiffres accablants sont le plus probablement dus à:

- Une incapacité à identifier les personnes à risque (avec une hépatite B et/ou C).
- Une forte prévalence de facteurs de risque dans la population.
- Un manque de compétences médicales et de moyens de diagnostic précoce.
- Un manque de traitements efficaces après diagnostic.
- une participation insuffisante ou absente dans les programmes de screening.

Le carcinome hépatocellulaire ne survient généralement que dans le cadre d'une pathologie hépatique déjà existante telle que la cirrhose, l'hépatite B ou encore l'hépatite C. les facteurs de risque pour CHC sont associés aux maladies hépatiques indépendamment de la cause spécifique de la maladie :

- Causes infectieuses: hépatite B ou C chronique(Ridruejo 2014).
- Causes nutritionnelles/toxiques: alcool, obésité (stéato-hépatite non alcoolique)(Gerlach, Herpertz et al. 2015; Partridge, Juan et al. 2015), aflatoxine (rôle de HBV comme co-facteur), tabac.
- Affections génétiques: tyrosinose, hémochromatose (surcharge en fer). Une surcharge en fer comme cause per se et résultant d'un apport de fer par l'alimentation (cuisson dans des ustensiles en fer) reste controversée.
- Déficit en α 1-Antitrypsine.
- Causes immunologiques: hépatite chronique active auto-immune, cirrhose biliaire primitive.

Les facteurs de risque majeurs de CHC sont:

- Hépatite virale B ou C chronique(Ridruejo 2014).
- Cirrhose alcoolique(Zhang and Huang 2014).
- Stéato-hépatite non alcoolique(Port, Oliveira et al. 2014).
- Diabète (le syndrome métabolique représente probablement le facteur de risque)(Ali Kamkar, Ahmad et al. 2014).
- Cirrhose, hépatique, quelle qu'en soit l'étiologie.

En Europe, en Amérique du Nord et au Japon, le CHC touche principalement des patients avec une cirrhose hépatique établie (Soubrane, Goumard et al. 2014; Tanaka, Shimada et al. 2014).

Les symptômes apparaissent tardivement à titre de douleurs sous les côtes à droite et une jaunisse. Sa survenue est surveillée chez tous les patients présentant une maladie chronique du foie. Lorsque l'on découvre une lésion focale hépatique en imagerie, la première étape consiste à établir avec certitude le diagnostic de cirrhose. En effet, la démarche diagnostique dépend de l'état du foie non tumoral : en cas de cirrhose ou de fibrose mutilante, la découverte d'un nodule hépatique rend le diagnostic de CHC très vraisemblable; à l'inverse, en l'absence de cirrhose, la probabilité qu'il s'agisse d'un CHC diminue fortement quels que soient les caractères

radiologiques de la lésion(Kew 2014). La confirmation du diagnostic de cirrhose repose principalement sur la réalisation d'une ponction-biopsie hépatique, quasiment toujours réalisable par voie transpariétale ou transjugulaire. La recherche de critères non invasifs de cirrhose est actuellement une voie de recherche importante(Trevisani, Garuti et al. 2015). En particulier, si la biopsie ne permet pas d'établir le diagnostic avec certitude, l'existence d'une dysmorphie hépatique et de signes d'hypertension portale lors des examens d'imagerie permettent d'ores et déjà d'établir le diagnostic de cirrhose avec un degré raisonnable de certitude(Zhou, Lei et al. 2014).

Le traitement du CHC est en train de changer. Dans les pays développés, les patients avec CHC sont de plus en plus évalués et traités dans des centres spécialisés par des équipes multidisciplinaires d'hépatologues, d'oncologues, de radiologues, de chirurgiens et de pathologues. Les options thérapeutiques dépendent en grande partie de la fonction hépatique, de la grandeur de la tumeur, de la présence ou de l'absence de lésions métastatiques ou d'une invasion vasculaire. Dans la plupart des cas, les traitements curatifs tels résection, ablation par radiofréquence ou transplantation hépatique ne sont pas possibles et l'on doit se limiter à une palliation (Zhou, Lei et al. 2014; Njei, Rotman et al. 2015; Tian and Singal 2015). La surveillance des populations à risque est donc le seul moyen de détection de tumeurs à un stade où un traitement est envisageable. Dans les pays en voie de développement, les options thérapeutiques les plus susceptibles d'être utilisées chez les patients avec un CHC identifié pendant une surveillance sont la résection et l'ablation locale. La résection et l'ablation peuvent toutes les deux permettre de guérir de petites tumeurs (Zhong, Ke et al. 2014; Zhong, Li et al. 2014; Zhong, Ma et al. 2014; Zhong, Wu et al. 2014). Cependant, la majorité des patients atteints d'un carcinome hépatocellulaire ne peuvent pas bénéficier des traitements chirurgicaux. La chimio-embolisation intra-artérielle hépatique est le gold-standard des formes multifocales intrahépatiques et le sorafénib des carcinomes hépatocellulaires avec extension veineuse portale ou métastatique à distance, amenant des gains modestes mais significatifs de la survie (Zheng, Shao et al. 2014; Zheng, Xu et al. 2014). La radiothérapie de conformation, la radioembolisation sont des méthodes en évaluation qui pour l'instant ne sont pas encore inclus dans les algorithmes thérapeutiques(Chung 2015).

Malgré le grand nombre de traitements du carcinome hépatocellulaire (CHC) proposés, la survie globale des malades atteints de CHC reste faible. En effet, de nombreux malades ont déjà une tumeur évoluée au moment du diagnostic, situation pour laquelle les possibilités thérapeutiques restent très limitées.

1.5 La transplantation hépatique

La transplantation hépatique(TH) est le remplacement du foie malade par un foie sain provenant d'un donneur humain (allogreffe) vivant ou décédé. La technique la plus couramment utilisée est la transplantation orthotopique, dans laquelle le foie

natif est enlevé et l'organe du donneur transplanté dans le même emplacement anatomique. La transplantation hépatique (TH) est devenue, au cours de ces deux dernières décennies, un traitement reconnu efficace des hépatopathies en phase terminales irréversibles (Saidi 2012). L'hépatite chronique C est une cause majeure de cirrhose et de cancer primitif du foie. La cirrhose décompensée ou le CHC liés au virus de l'hépatite C (VHC) constituent la prime cause de transplantation hépatique aux Etats-Unis et en Europe. Le nombre actuel des TH en France est voisin de 900 par an (5 000 TH par an en Europe) (Jones, Hayashi et al. 2013; Calmus 2014). Parmi les indications de 1^{re} greffe, les maladies chroniques du foie sont majoritaires (69 % des indications) : 58 % de cirrhoses et 11 % de cholestases chroniques. Les cirrhoses liées à l'alcool, au virus C et au virus B représentent 18 %, 14 % et 3 % des indications de TH. Les cancers représentent 12 % (90 % de CHC) et les retransplantations représentent environ 9 % (Zhang, Chen et al. 2012; Martin, DiMartini et al. 2014; Njei, Rotman et al. 2015). Grâce à l'expérience accumulée, aux nouveaux médicaments immunosuppresseurs et aux progrès de la réanimation, des résultats de l'ordre de 80-90% de survie à un an et de 70-80% de survie à cinq ans ont pu être obtenus chez les adultes, alors que chez l'enfant environ 90% survivent à cinq et dix ans (Kulik and Chokeyachaisakul 2015; Lafaro, Demirjian et al. 2015; Njei, Rotman et al. 2015).

La transplantation hépatique est potentiellement applicable à toute situation aiguë ou chronique entraînant un dysfonctionnement hépatique irréversible, à condition que le bénéficiaire ne présente pas d'autres problèmes de santé qui s'opposeraient à une transplantation réussie (O'Leary, Lepe et al. 2008). Le cancer du foie disséminé (métastatique), l'abus d'alcool actif, la présence d'infections opportunistes actives sont des contre-indications absolues. De nos jours, l'infection par le Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH) n'est plus considérée comme une contre-indication absolue (Castells, Rimola et al. 2015). L'âge avancé, ainsi que les maladies cardiaques ou pulmonaires graves, sont des contre-indications relatives à la transplantation (Eguchi, Takatsuki et al. 2014)(Eguchi, Takatsuki et al. 2014). Les maladies chroniques du foie, induisant une cicatrisation excessive et irréversible du foie (cirrhose), sont la principale indication de la plupart des transplantations hépatiques. En cas de tumeur du foie non métastatique, les critères de Milan sont utilisés pour savoir quels patients pourront bénéficier d'une greffe de foie. En cas d'insuffisance hépatique majeure, il n'existe actuellement pas d'alternative à la transplantation. Néanmoins, des thérapies de soutien à la fonction hépatique peuvent éventuellement être entreprises (en attendant qu'un organe soit disponible), cependant ces supports externes au métabolisme du foie (dialyse par un foie bioartificiel) sont encore en cours d'évaluation préclinique et clinique (Oniscu, Diaz et al. 2014).

En général, la transplantation hépatique est effectuée de façon orthotopique. En d'autres termes, le foie malade est alors retiré et le foie du donneur (nouveau foie) est placé dans le même site anatomique. La transplantation est composée de quatre étapes : l'hépatectomie (ablation du foie malade), la phase anhépatique (sans foie), la phase d'implantation (mise en place du nouveau foie) et la phase post-implantation (Moorehead, Burton et al. 2015).

L'opération se fait par une grande incision au niveau de l'abdomen supérieur, sous les côtes et s'étendant principalement du côté droit. L'hépatectomie implique la dissection de toutes les attaches ligamentaires du foie, ainsi que de la voie biliaire principale, l'artère hépatique, les veines sus-hépatiques et la veine porte (Zhijun, Wei et al. 2014). Habituellement, la partie rétrohépatique de la veine cave inférieure est retirée avec le foie, bien qu'une autre technique puisse la préserver (Figure 13). La grande majorité des greffes de foie utilisent le foie entier d'un donneur non-vivant, en particulier pour les receveurs adultes. Une avancée majeure en transplantation hépatique pédiatrique a été le développement d'une technique permettant de réduire la taille du greffon, dans laquelle seule une partie du foie d'un adulte est utilisée pour un bébé ou un petit enfant. On utilise donc la technique dite du «split» (Loss, Obed et al. 2008), où le foie est séparé en deux, la partie gauche (plus petite) permettant de greffer un enfant, et la partie droite (plus volumineuse) permettant de greffer un adulte (Ruth, Kelly et al. 2014). La transplantation hépatique peut également être réalisée à partir d'un donneur vivant. Une partie du foie d'une personne en bonne santé est ainsi retirée et utilisée comme greffe pour un enfant (en général, un lien familial lie le donneur adulte au receveur pédiatrique). On procède à l'ablation d'environ 20% du foie du donneur adulte (partie gauche) (Sass and Reich 2011).

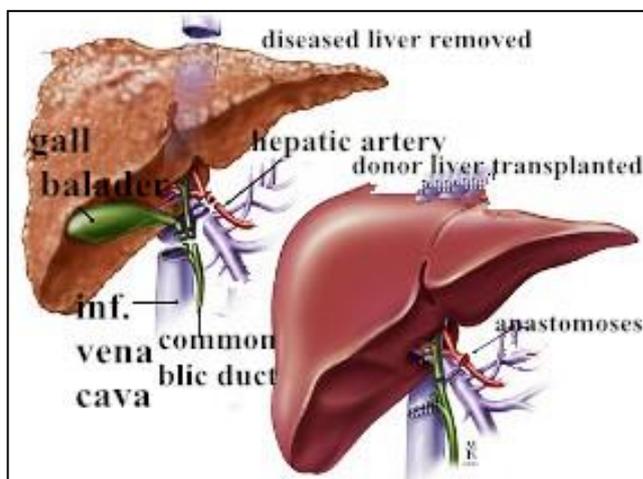


Figure. 13 La transplantation hépatique

La Greffe de foie, ou plus exactement la Transplantation Hépatique, est une intervention chirurgicale lourde permettant de remplacer, d'une manière irréversible, un foie malade par un autre foie sain (<http://www.apef.com.pt/?d=73>)

Le sang du donneur présent dans le foie sera vidé et remplacé par une solution de stockage réfrigérée spécialement conçue pour la préservation d'organes (Busuttill 2002). L'implantation de ce nouveau foie implique des anastomoses (connexions) de la veine cave inférieure, la veine porte et l'artère hépatique. Une fois que le flux sanguin est rétabli dans le nouveau foie, les voies biliaires (canal cholédoque) sont anastomosées (connectées) à l'intestin grêle. L'intervention dure habituellement entre cinq et six heures, mais peut être plus ou moins longue en raison de la difficulté de l'opération et l'expérience du chirurgien (Zaky and Bendjelid 2014).

Après une greffe du foie, trois types de rejet peuvent se produire : le rejet hyperaigu, le rejet aigu et le rejet chronique (Foschi, Zavaglia et al. 2014; McCaughan, Sze et al. 2015). Le rejet hyperaigu est causé par des anticorps anti-donneurs préformés, c'est-à-dire que le receveur a été exposé au préalable à des antigènes

(protéines) similaires à celles du donneur. Le rejet hyperaigu se passe dans les minutes ou heures après la procédure de transplantation. Il est actuellement rarissime en raison des tests effectués avant la greffe (crossmatch). Le rejet aigu est le plus fréquent et la principale cible des agents immunosuppresseurs. Le rejet aigu est généralement observé dans les jours ou semaines qui suivent la transplantation. Le rejet chronique est la présence de tout signe et symptôme de rejet, un an après la transplantation (Norvell 2015). La cause du rejet chronique est encore inconnue, cependant un rejet aigu augmente le risque de survenue d'un rejet chronique (Miro, Stock et al. 2014). Le rejet du foie peut survenir à tout moment après la greffe, c'est pourquoi les valeurs des enzymes hépatiques doivent être contrôlées régulièrement. Les signes du rejet comprennent également, l'encéphalopathie, une jaunisse, des ecchymoses et une tendance aux saignements (Cockbain, Goldsmith et al. 2010). Il existe également des présentations non spécifiques comme des malaises, une anorexie, des douleurs musculaires, une fièvre et une légère augmentation du nombre de globules blancs (Norvell 2015). Comme la plupart des allogreffes d'autres organes, une greffe du foie sera rejetée par le bénéficiaire à moins que des médicaments immunosuppresseurs ne soient utilisés. Les traitements immunosuppresseurs pour les différentes transplantations d'organes sont relativement similaires, plusieurs médicaments anti-rejets sont maintenant disponibles (Soltys, Soto-Gutierrez et al. 2010).

Le pronostic est assez bon. Toutefois, il dépend du type de maladie qui a conduit à la transplantation. Il n'existe pas de modèle exact pour prédire les taux de survie, ceux qui bénéficient d'une greffe ont une chance de survie de 58% à 15 ans (Sullivan, Radosevich et al. 2014). Une défaillance du nouveau foie survient chez 10% à 15% des patients. L'échec de la greffe est parfois dû à une maladie préexistante dans l'organe donné (par exemple en cas d'hépatite C). D'autres problèmes sont les complications survenant pendant l'opération (problème dans la connexion des différents vaisseaux), elles peuvent conduire à une greffe non fonctionnelle (Yi, Zhang et al. 2014; Yoon and Seong 2014).

2. Cellules Souches et intérêt en pathologies hépatiques

2.1 Généralités des cellules souches

2.1.1 Définition des cellules souches

Le terme de « stem cell », traduit de l'anglais par celui de « cellule souche » (CS), est apparu dès 1883 (Rey 2003). Les cellules souches sont issues soit de l'embryon, soit du fœtus, soit de tissus adultes avec ou sans transformation, elles peuvent aussi être obtenues par transfert de noyau (Coulombel 2007). Elles sont caractérisées par leur capacité d'autorenouvellement (multiplication à l'identique), leur différenciation

dans certaines conditions (pour engendrer les cellules spécialisées qui constituent différents tissus), et leur prolifération en culture. Les cellules souches peuvent être classées selon leur potentiel de différenciation ou leur origine (Loeffler and Roeder 2002; Shah and Allegrucci 2013).

2.1.2 Les différentes des cellules souches

On distingue quatre types de cellules souches classées selon leur potentiel de différenciation (Figure 14) :

Totipotentes : Lorsque le spermatozoïde fusionne avec l'ovule, il se forme un oeuf à 2N chromosomes. Les cellules issues des trois feuilletts embryonnaires : ectoderme, mésoderme et endoderme ainsi que des annexes extra-embryonnaires, sont appelées totipotentes ce terme pourrait se traduire par "de toute puissance" en latin. Cela s'explique par le fait que ces cellules sont à leur stade indéfini et ont donc la capacité de se différencier en tout type de cellules pour l'organisme par la suite. C'est aussi les seules cellules capables de créer un individu complet, à condition d'être dans un environnement *in vivo* (c'est-à-dire à l'intérieur du corps par opposition à *in vitro*) pour permettre de se diriger vers l'embryon. Donc une cellule souche totipotente peut conduire à développement d'un organisme entier.

Pluripotentes : Après le stade des huit cellules de départ, les cellules engendrées ne sont plus capables de tout créer, leur capacité de différenciation diminue. On appelle ce moment le blastocyste aux alentours des 5 à 7 jours après la fécondation (environ 40 cellules). Comme leur nom l'indique en latin "qui à plusieurs pouvoirs", sont toujours capables de créer un certain nombre des tissus ou organes. A ce stade les cellules sont aussi appelées embryonnaires ou cellules ES. Ces cellules ne sont pas capables de produire un organisme à elles seules mais en revanche peuvent se différencier en une multitude de types cellulaires différents tel que les trois feuilletts embryonnaires qui sont : l'ectoderme qui s'occupe de produire l'épiderme de la peau ainsi que le système nerveux, l'endoderme produisant le tube digestif et ses glandes annexes telles que le foie ou le pancréas, et finalement le mésoderme qui s'occupera des vaisseaux sanguins, des muscles et du squelette en général. Ces cellules sont codées pour pouvoir former tous les différents tissus de l'organisme mais ne pourraient pas d'elles-mêmes créer un être humain à part entière telles les cellules totipotentes. Ainsi à ce stade là le clonage reproductif n'est plus possible.

Multipotentes : Les cellules multipotentes sont présentes dans tout organisme adulte. Elles sont caractérisées par la multiplication et la maturation cellulaire, on peut les identifier morphologiquement. On les retrouve dans le sang du cordon ombilical et sont également présentes dans les tissus adultes mais en faible nombre. Elles peuvent se différencier en plusieurs lignées cellulaires différentes (cellules souches hématopoïétiques(CSHs), cellules souches mésenchymateuses(CSMs)).

Unipotentes : Ces cellules ne peuvent former qu'une seule sorte de cellules différenciée, c'est le cas des hépatocytes, des kératinocytes, des myoblastes, par exemple des spermatogonies qui vont ne pouvoir donner que des spermatozoïdes.

Ces cellules là une fois différenciées gardent la capacité de s'auto-renouveler.

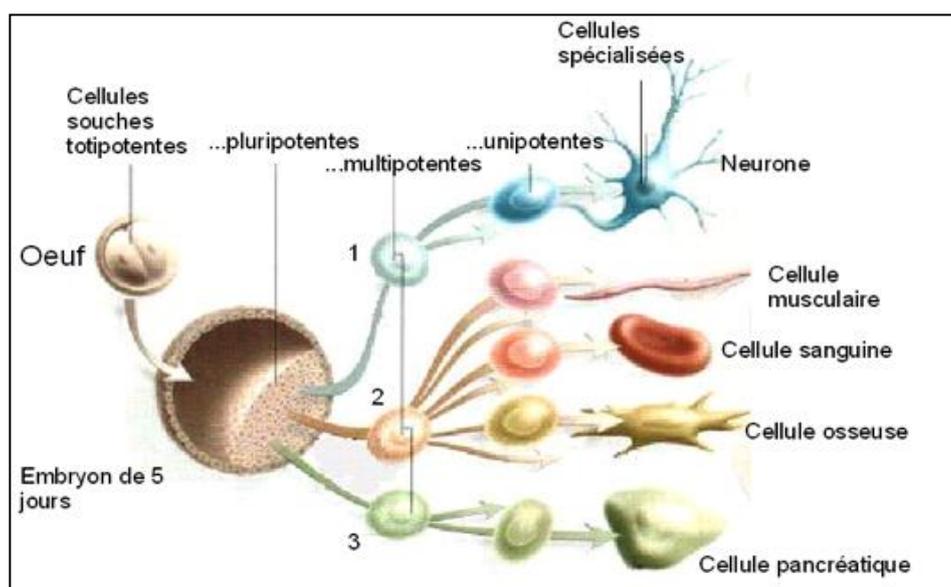


Figure. 14 La spécification du développement de cellules souches

Nous pouvons classer les cellules souches en trois groupes spécifiques, selon leur capacité de différenciation qui, on le verra, dépend de leur temps d'apparition. 1. Ectoderme (la peau, le système nerveux, etc.); 2. Mésoderme (le sang, le squelette, les reins, etc.); 3. Endoderme (appareil digestif, respiratoire, etc.) (<http://superonlinefr.wordpress.com/regeneration-cellulaire>).

Selon l'origine des CS, les cellules souches peuvent être classées en cellules souches embryonnaires, foetales, et adultes.

- ◆ Cellules souches embryonnaires : Les cellules souches embryonnaires ont été pour la première fois mises en évidence en 1981 chez la souris, grâce aux travaux de Martin Evans (Evans and Kaufman 1981) et Matthew Kaufman, ainsi que ceux de Gail Martin. Chez l'Homme, ces mêmes cellules ont été repérées en 1998 par James Alexander Thomson, accompagné de Joseph Itskovitz-Eldor et de Benjamin Reubinoff (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998). Les cellules souches embryonnaires sont extraites de la masse interne du blastocyste, qui représente au quatrième jour suivant la fertilisation, le premier stade de l'embryon. *In vivo*, lors de l'implantation intra-utérine de l'oeuf à partir du septième jour, les cellules souches embryonnaires vont s'engager dans la formation du tissu germinal et de trois feuillets embryonnaires somatiques : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme (Trousseau, Daley et al. 2013). Parmi les trois feuillets embryonnaires, l'endoderme est entre autre à l'origine de l'épithélium intestinal, du pancréas et du foie (Yamazoe, Shiraki et al. 2013); le mésoderme est à titre indicatif à l'origine des éléments sanguins, des muscles, des reins, des os et l'ectoderme est quant à lui précurseur de l'épiderme et du système nerveux (Yabut and Bernstein 2011) (Figure 15). Elles sont donc pluripotentes. Elles conservent aussi leur état indifférencié lors d'une culture prolongée *in vitro*, ce qui leur permet de s'autorenouveler.

Ce sont ces propriétés particulières qui intéressent également les

scientifiques car avec elles, ils espèrent reconstituer des tissus ou des organes défaillants et ainsi soigner certaines pathologies ou repousser davantage les limites de la vie, par exemple la régénération des neurones lésés en dopamine dans la maladie de Parkinson après réintroduction dans le cerveau (Liu, Ma et al. 2013; Toivonen, Ojala et al. 2013), la réparation du tissu musculaire cardiaque endommagé après un infarctus (Simpson, Boyd et al. 2012; Ting, Lecina et al. 2012; Hazeltine, Badur et al. 2014), etc.. Mais le principe soulève des problèmes. D'une part, il faut prendre le temps de maîtriser les techniques car l'introduction dans un organisme n'est pas sans risque. Les premiers essais entamés chez l'Homme semblent prometteurs. D'autre part, le prélèvement de ces cellules souches entraîne la destruction de l'embryon, ce qui pose des problèmes vis-à-vis de l'éthique (Tondeur, Assou et al. 2008). Les lois d'éthique de 2004 et 2011 interdisent les activités de recherche sur l'embryon humain, ce qui limite l'utilisation de ces cellules en ingénierie tissulaire.

En 2013, une équipe de chercheurs américains est parvenue pour la première fois à cloner des cellules adultes humaines pour créer des cellules souches embryonnaires correspondant à l'ADN du donneur. Les chercheurs ont utilisé le noyau des cellules de la peau des deux hommes qu'ils ont transféré dans des ovocytes humains de donneurs, dont ils avaient retiré le noyau. Les ovocytes ont ensuite généré des embryons primitifs. C'est à partir de ces derniers que des cellules souches embryonnaires à ADN similaire à celui des donneurs, ont été produites. Cette approche présente l'avantage de ne pas utiliser d'embryons fertilisés pour obtenir des cellules souches (Tachibana, Amato et al. 2013). Mais les détracteurs de cette technique, estiment qu'elles présentent le risque de dérapage et de mener au clonage d'êtres humains, ce que contestent des scientifiques.

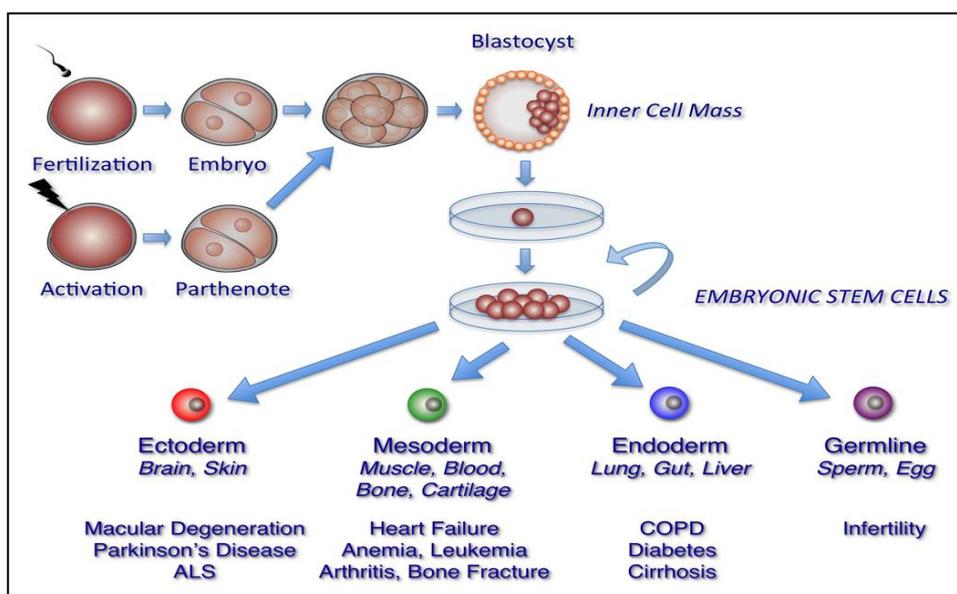


Figure. 15 La génération des cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires sont à l'origine de tous les tissus de l'organisme adulte et sont ainsi pluripotentes. Elles peuvent être isolées et cultivées in vitro à l'état indifférencié. Dans des

conditions de cultures précises (mise en suspension, facteurs de croissance particuliers...), on peut orienter leur différenciation vers un type cellulaire donné (neurones, hépatocytes, cellules musculaires, cellules sanguines...)(<https://www.pinterest.com/pin/504684701965210409/>)

- ◆ Cellules souches fœtales : Les cellules souches multipotentes peuvent être extraites du tissu foetal, recueilli après interruption de grossesse. Ainsi, des cellules souches neurales peuvent être isolées à partir du tissu neural foetal puis multipliées en culture, bien qu'elles aient une durée de vie limitée. D'autre part des cellules germinales primitives pluripotentes peuvent être obtenues à partir des foetus avortés. Le prélèvement de cellules souches sur des foetus issus d'avortements soulève lui aussi des problèmes éthiques et légaux. En effet l'isolement et la culture de cellules germinales embryonnaires semblent plus difficiles et moins reproductibles que ceux des cellules souches embryonnaires. De plus, elles présentent une forte tendance à la différenciation spontanée (Turnpenny, Brickwood et al. 2003). Par contre, les cellules souches d'origine foetale peuvent être extraites de la gelée de Warthon issue du cordon ombilical, ou du sang ombilical. En effet, ces tissus sont facilement accessibles et disponibles en grande quantité pour la recherche. Depuis quelques années, quelques équipes ont montré le caractère multipotent de ces cellules. Les cellules souches fœtales et du sang de cordon ont déjà été utilisées dans des protocoles de thérapie cellulaire de la maladie de Parkinson (Evans, Mason et al. 2012; Abbott 2014), des déficits immunitaires congénitaux et des hémopathies (Pardal and Lopez-Barneo 2012).

Les tissus foetaux contiennent des quantités proportionnellement plus importantes de cellules souches. A l'inverse des cellules ES, les cellules souches fœtales sont déjà engagées dans un programme de différenciation. Deux de ces tissus sont particulièrement importants dans une perspective thérapeutique : (i) les cellules souches des zones germinatives du système nerveux central, dans le traitement de certaines pathologies neurodégénératives (maladie de Parkinson ou de Huntington). En effet, l'allogreffe de neurones foetaux a prouvé son efficacité. Pour être efficace, les cellules implantées doivent être différenciées en neurones, mais ne doivent pas encore avoir établi leur connections neuronales. (ii) les hépatocytes foetaux qui font l'objet d'une recherche active en vue de transplantation.

- ◆ Cellules souches adultes : les cellules souches adultes, se différencient de façon spécifique contrairement aux cellules souches embryonnaires (Miyanishi, Mori et al. 2013). Elles se trouvent dans plusieurs tissus différents de l'individu adulte, toutefois en quantité minime (Kassmer and Krause 2013). Elles sont responsables du renouvellement et de la guérison. Un exemple concret avec la peau : la couche supérieure de la peau se renouvelle toutes les deux semaines. Les anciennes cellules meurent et seront remplacées par de nouvelles cellules issues des couches inférieures. Les cellules souches cutanées situées un peu plus profondément dans la peau en sont responsables. Les cellules se divisent et assurent le ravitaillement. En se divisant, elles vont non seulement rester en vie mais également former de nouvelles cellules spécialisées. Les chercheurs ont

également trouvé des cellules souches adultes dans d'autres tissus (Figure 16) : cerveau, moelle épinière, sang, muscles, peau, foie (Ratajczak, Liu et al. 2011). Les cellules souches adultes sont pluripotentes, elles peuvent développer tous les types de cellules à l'intérieur de ce tissu seulement. Une cellule souche sanguine située dans la moelle épinière peut former des globules rouges, des globules blancs, des plaquettes sanguines, etc. et non des cellules nerveuses (Martin and Kaufman 2005). Certaines cellules souches adultes peuvent rester inactives durant une longue période; elles se diviseront seulement au moment où elles sont indispensables comme par exemple lors d'une blessure. Il est plus facile éthiquement de conserver les cellules souches adultes à des fins expérimentales que les cellules souches embryonnaires (Ramos-Zuniga, Gonzalez-Perez et al. 2012). Seul, l'accord de la personne mettant à disposition ses propres cellules souches est nécessaire.

D'importants progrès ont été réalisés ces dernières années dans la recherche sur les cellules souches adultes. Les scientifiques réussissent de mieux en mieux à identifier les cellules souches adultes dans l'organisme, à les isoler à partir de différents tissus et même, dans certains cas, à les cultiver. Les cellules souches adultes sont par contre plus difficiles à cultiver que les cellules souches embryonnaires (Rooney, Nistor et al. 2010). Les deux types de cellules se différencient non seulement par leur culture mais également par leur potentiel médical (Graf and Stadtfeld 2008). Si le potentiel des cellules souches embryonnaires est généralement qualifié de plus important, bien des choses s'avèrent encore difficiles à mettre en pratique (Devereaux 2007; Ott, Matthiesen et al. 2007). Les études pré-cliniques ou cliniques utilisant la greffe de cellules souches adultes sont de plus en plus fréquentes (Figure 17), du fait que l'utilisation des cellules souches embryonnaires est très délicate d'un point de vue éthique mais aussi du fait de leur pouvoir tumorigène et immunogène (Bifari, Pacelli et al. 2010). En effet, même si leur capacité de différenciation est plus restreinte par rapport aux cellules souches embryonnaires, les cellules souches adultes présentent de nombreux avantages : elles peuvent provenir du patient lui-même, évitant ainsi les rejets d'ordre immunologique (greffe autologue, greffon contre l'hôte ou GvHD), leur utilisation génère moins de problèmes éthiques et elles ont déjà donné de nombreux résultats très concluants (Snykers, De Kock et al. 2009).

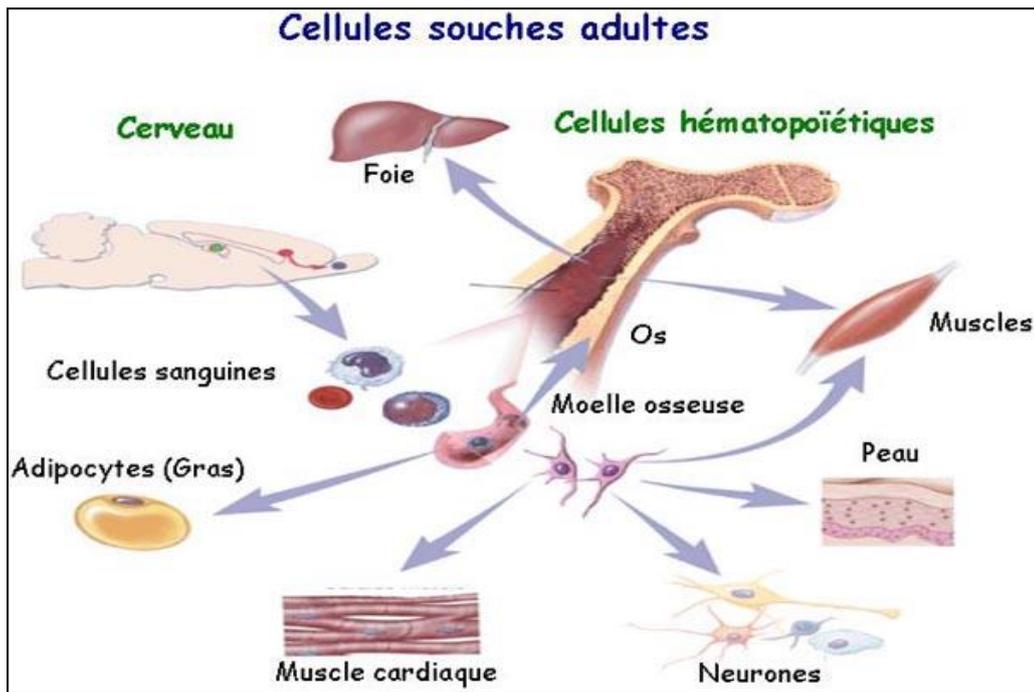


Figure. 16 Les cellules souches adultes dans les tissus du corps humain

(<http://www.alimentationvivante.com/cellules-souches-sante/>)

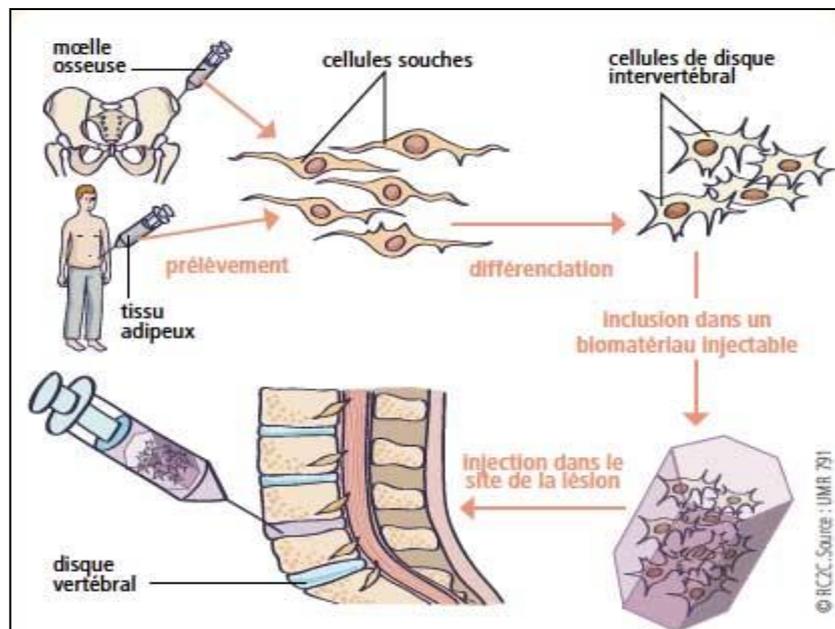


Figure. 17 Une présentation de la greffe des cellules souches adultes

Isolées après ponction, des cellules souches mésenchymateuses adultes sont multipliées puis transformées ou « différenciées » in vitro en cellules de disque intervertébral sous l'action de différents facteurs avant d'être associées à un biomatériau qui sera injecté au niveau de la lésion (<http://www.tetes-chercheuses.fr/magazines/numero-14/dossier/reparer-le-squelette-447/>).

2.1.3 Les propriétés des cellules souches

A. Les divisions des cellules souches

Les cellules souches adultes ont la capacité de s'autorenouveler et de se différencier en différents types cellulaires et présentent un potentiel de prolifération élevé (nombre de divisions possibles très important). Elles se divisent rarement et restent la plupart du temps quiescentes et indifférenciées (Cai, Weiss et al. 2004). Leur division asymétrique produit deux cellules différentes. La première est une cellule souche, qui permet le maintien d'un nombre constant de cellules souches. La seconde est une cellule d'amplification transitoire (AT) qui se divise de façon limitée sur une courte période puis entre dans le processus de différenciation terminale spécifique du tissu dans lequel elle se trouve et finit par mourir (Tomasetti and Levy 2010; Gomez-Lopez, Lerner et al. 2014).

Les cellules souches peuvent aussi augmenter leur nombre par division symétrique classique, donnant naissance à deux cellules filles possédant le même potentiel de développement que la cellule mère (Lu, Casanueva et al. 2012) (Figure 18).

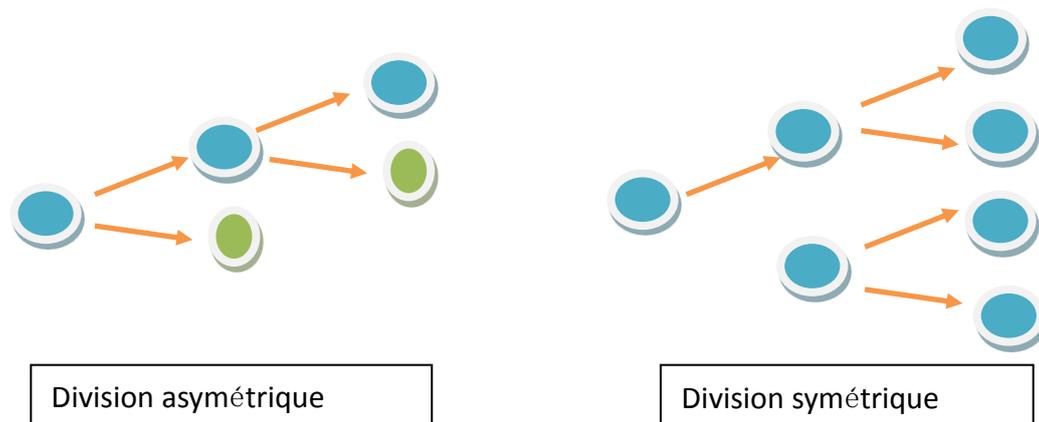


Figure. 18 La division asymétrique et division symétrique

B. La quiescence des cellules souches

Les CS se divisent rarement et sont donc la plupart du temps quiescentes, c'est-à-dire qu'elles se trouvent en phase G0 du cycle cellulaire. Elles entrent en phase de prolifération suite à des stimuli pour repeupler un tissu dont les cellules meurent de façon naturelle (desquamation pour la peau, renouvellement permanent des cellules sanguines...) ou suite à une blessure nécessitant de reconstruire le tissu endommagé (Zhang, Zhao et al. 2007; Tomasetti and Levy 2010).

Les mécanismes par lesquels les cellules quiescentes préservent leur capacité à re-proliférer après des semaines ou des années d'arrêt de cycle cellulaire sont encore mal connus (Shen, Zhong et al. 2002; Giebel 2008; Yan, Huang et al. 2008;

Marciniak-Czochra, Stiehl et al. 2009). Il a été montré récemment que l'expression d'HES1, un facteur de transcription, était nécessaire pour empêcher l'entrée en sénescence et permettre la sortie de quiescence de fibroblastes humains (Tian, Zheng et al. 2013). Cette fonction nouvelle d'HES1 pourrait s'étendre aux cellules souches, puisque HES1 est surexprimé dans les progéniteurs hématopoïétiques quiescents et joue un rôle dans l'inhibition de leur prolifération (Kobayashi and Kageyama 2011; Tian, Zheng et al. 2013).

L'entrée en cycle des cellules souches est sous le contrôle des voies assurant la progression en phase G1 et l'entrée en phase S. Les inhibiteurs de CDK jouent un rôle majeur dans le contrôle de cette dernière étape en empêchant ou en retardant l'entrée en cycle des cellules souches ainsi que l'ont indiqué des expériences d'inactivation génique (Becker, Ghule et al. 2010; Li, Pal et al. 2012; Sun, Pang et al. 2013). Parmi les inhibiteurs de la famille CIP/KIP, p21 contribuerait au maintien du phénotype des cellules souches adultes en limitant leur entrée en cycle et leur prolifération (Rodriguez, Rubio et al. 2009; Santos, Ding et al. 2014), tandis que p27 serait un régulateur spécifique de l'expansion des cellules progénitrices (Bryja, Pachernik et al. 2004; Egozi, Shapira et al. 2007; Gao, Gu et al. 2010). Les inhibiteurs de la famille INK4 participeraient également au contrôle de l'expansion des cellules souches, pour p18 et au maintien de leur fonctionnalité au cours du vieillissement, pour p16. Bmi-1, un membre de la famille de gènes Polycomb, indispensable à l'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques et neurales, agirait en inhibant l'expression de p16 et ARF, en interagissant directement avec le locus Ink4-ARF (Oguro, Iwama et al. 2006; Fujii, Honoki et al. 2007). L'utilisation de l'approche génétique *in vivo* (inactivation génique et surexpression de gènes) a permis de progresser dans la compréhension des mécanismes qui contrôlent le cycle cellulaire des cellules souches, essentiellement dans le modèle des cellules souches hématopoïétiques (Li, Paczesny et al. 2008; Zimdahl, Ito et al. 2014). La voie PI3 kinase, les facteurs de transcription des familles myc, FOXO et HOX sont impliqués dans ce contrôle très complexe de même que la production des ROS, l'hypoxie et plus largement l'environnement créé par la niche (Miyake, Brun et al. 2006; Hsuuw, Kuo et al. 2009; Dong, Rovnaghi et al. 2014; El Alami, Vina-Almunia et al. 2014).

C. La niche des cellules souches

Les CS sont présentes dans les tissus en renouvellement permanent comme le cerveau, la moelle osseuse, la muqueuse intestinale, le système hématopoïétique, la cornée ou encore la peau (Figure 16). Les CS résident dans un microenvironnement particulier appelé « niche » qui comprend les cellules souches elles-mêmes, des cellules de soutien et des facteurs solubles (Fitchev, Chung et al. 2014). Les cellules entourant les CS sont importantes pour leur maintien (Figure 19). Elles font partie de la matrice extracellulaire, nourrissent les CS et contrôlent leur bon fonctionnement (Lu, Casanueva et al. 2012).

L'ensemble des différentes cytokines fournies par la niche permet de contrôler le taux de prolifération des CS, leur auto renouvellement (Spradling, Drummond-Barbosa et al. 2001), leur division, leur survie, évite l'épuisement du

nombre de CS(Orford and Scadden 2008). Des signaux induisent aussi la migration, la différenciation et l'apoptose des cellules progénitrices (Gotts and Matthay 2012; Tan and Barker 2013; Baumann 2014; Lucas and Frenette 2014). Par exemple, les CS du bulge s'auto-renouvellent pour maintenir un nombre constant et se différencient en cellules progénitrices qui quittent le bulge pour former les follicules pileux, les glandes sébacées ainsi que l'épiderme(Morasso and Tomic-Canic 2005). Le maintien de la niche se base sur une bonne connexion entre les CS et les cellules environnantes. Ce maintien est solide grâce aux molécules d'adhérence (comme les cadhérines) formant les jonctions adhérentes. Jusque là, on ne sait pas encore quelle sous-famille de cadhérine est spécifiquement nécessaire pour le maintien des CS et si une trop grande quantité de protéines n'interfère pas avec le bon fonctionnement du système (Christiano 2004; Baumann 2014). D'autres molécules sont importantes comme les intégrines, notamment l'intégrine $\alpha 6$ hautement exprimée dans les kératinocytes basaux de l'épiderme même si son rôle précis n'a pas encore été trouvé (Kumar and Ponnazhagan 2007; Lathia, Gallagher et al. 2010; Schreiber, Steinl et al. 2010).

Etant donné le nombre de composants et la complexité des interactions entre les CS et la niche, il est difficile d'étudier les mécanismes régissant l'activité des niches (Gotts and Matthay 2012; Tan and Barker 2013; Baumann 2014). C'est un système en quatre dimensions où chaque élément venant de tous les cotés ainsi que son évolution dans le temps sont difficiles à contrôler. Etudier les mécanismes mis en jeu dans la liaison entre les CS et la niche est primordial. Des recherches récentes ont montré qu'un changement dans l'élasticité de la niche peut induire la différenciation des cellules à tout moment (Nishikawa, Osawa et al. 2008). La dérégulation de la niche peut être une cause du développement de nombreuses pathologies associées avec la dégénération tissulaire, le vieillissement ou la tumorigénèse (Iwasaki and Suda 2009; Renstrom, Kroger et al. 2010; Yi, Hao et al. 2013). Etudier ces mécanismes est cependant difficile, car il n'a pas encore été possible de reproduire la niche *in vitro* par manque de connaissances et les CS mises en culture se différencient très vite. Ceci renforce l'importance de la niche pour la biologie des CS (Codega, Silva-Vargas et al. 2014).

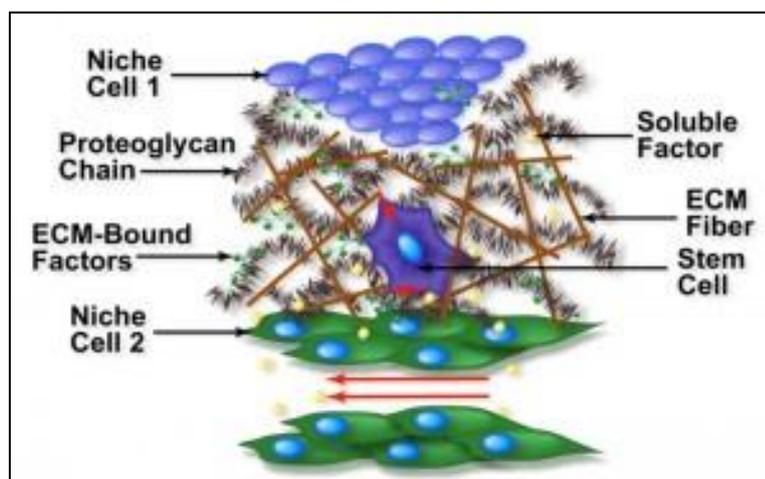


Figure. 19 La niche des cellule souches

Interactions mécaniques et biophysiques dans la niche de cellules souches(Conway and Schaffer 2012).

2.2 Cellules souches mésenchymateuses

2.2.1 Définition des cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont définies comme des progéniteurs non hématopoïétiques caractérisés par leur capacité d'adhérence au plastique, l'expression de marqueurs phénotypiques non spécifiques et leur potentiel de différenciation en cellules de la voie mésodermique.

Les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules souches présentes dans le mésenchyme de l'embryon. Elles sont un exemple de tissus ou de cellules souches "adultes". Elles sont "multipotentes", ce qui signifie qu'elles peuvent produire plus d'un type de cellule spécialisée du corps, mais pas tous les types. Les CSM peuvent fabriquer les différentes cellules spécialisées présentes dans les tissus squelettiques. Par exemple, elles peuvent se différencier ou se spécialiser en cellules cartilagineuses (chondrocytes), cellules osseuses (ostéoblastes) et cellules graisseuses (adipocytes). Ces cellules spécialisées ont chacune leurs propres formes caractéristiques de structures et de fonctions, et chacune appartient à un tissu particulier. Les CSM pourraient aussi se différencier en de nombreux types de cellules qui ne font pas partie des tissus squelettiques, comme les cellules nerveuses, les cellules du muscle cardiaque, les cellules hépatiques (du foie) et les cellules endothéliales, qui forment la couche interne des vaisseaux sanguins. Dans certains cas, il semble que les CSM peuvent fusionner avec des cellules spécialisées existantes, ce qui conduit à des conclusions erronées quant à la capacité des CSM à produire certains types de cellules. Dans d'autres cas, les résultats étaient l'effet d'un artefact provoqué par les produits chimiques utilisés pour cultiver les cellules en laboratoire.

Résidant dans de nombreux tissus, les sources disponibles de cellules souches mésenchymateuses sont multiples et concernent à la fois les tissus adultes et les tissus fœtaux. Après leur administration, les cellules souches mésenchymateuses migrent préférentiellement vers les tissus endommagés. Ces cellules ont un effet bénéfique dans de nombreux modèles animaux de lésions tissulaires par un mécanisme non encore défini. Les mécanismes impliqués dans la réparation semblent être la production de facteurs trophiques, anti-inflammatoires et antiapoptotiques, ainsi que leur capacité de différenciation *in situ*. Les cellules stromales mésenchymateuses ont une action immunosuppressive sur l'immunité innée et adaptative qui a été démontrée à la fois *in vitro* et *in vivo* dans des modèles

animaux d'auto-immunité. Actuellement, leurs propriétés immunosuppressives permettent d'utiliser les cellules souches mésenchymateuses dans un contexte allogénique, bien que cette utilisation éventuelle demande encore davantage d'investigations. Les cellules souches mésenchymateuses peuvent être facilement isolées et amplifiées *in vitro* en conditions de grade clinique. Aussi, leur utilisation chez l'homme est en cours d'évaluation. Ces cellules représentent aujourd'hui un candidat prometteur dans la thérapie cellulaire de pathologies, comme l'infarctus du myocarde, le diabète, la maladie du greffon contre l'hôte ou les pathologies neurodégénératives. Avant une utilisation à large échelle chez l'homme, des points critiques incluant les standards de production et les données de toxicité à long terme devront être résolus.

2.2.2 Histoire d'ouverture

Le terme de cellules souches mésenchymateuses a été donné par Arnold Caplan en 1991 lors de travaux qui ont permis l'identification de cellules présentant les propriétés de cellules souches (Caplan 1991) (capables de se reproduire indéfiniment et de se différencier en plusieurs types cellulaires). Tandis que les exemples de ces études remontent au 19^{ème} siècle (Goujon 1869), le travail de Tavassoli et Crosby a clairement établi la preuve d'un inhérent potentiel ostéogénique associé à la moelle osseuse (bone marrow BM) (Tavassoli and Crosby 1968). Les CSM sont généralement isolées à partir d'une ponction de moelle osseuse de la crête iliaque supérieure. Etant donné que ces expériences ont été effectuées avec des fragments entiers de BM exempts d'os, l'identité exacte de tout le fonctionnement de la cellule en tant que progéniteurs de cellules osseuses dissociés (et donc de non hématopoïétiques, les cellules mésenchymateuses) ne peut pas être délimité. C'est Friedenstein et ses collègues, dans une série d'études séminales dans les années 1960 et 1970 (Friedenstein, Chailakhyan et al. 1987), qui a démontré que le potentiel ostéogénique, tel que révélé par la transplantation hétérotopique de cellules BM, a été associé avec une sous-population mineure de cellules BM. Ces cellules se distinguent de la plupart des cellules hématopoïétiques par leur adhésion rapide en culture et par leur ressemblance avec des fibroblastes - comme l'apparence de leurs descendants dans la culture, en montrant leur origine depuis le compartiment stromal de BM. En plus d'établir BM stroma que la botte de foin dans laquelle pour rechercher la proverbiale aiguille, le travail de Friedenstein et ses collaborateurs a fourni une seconde percée majeure en montrant que l'ensemencement de suspensions cellulaires de BM montre la formation de colonies discrètes initiées par une cellule (fibroblastique l'unité de formation de colonies, CFU-F). Ceci est la preuve de la clonécité de ces cellules. La nature clonale de chaque colonie a été démontrée par la dépendance linéaire de la formation de colonies sur le nombre de cellules explantées, l'utilisation de marqueurs chromosomiques, l'étiquetage 3H-thymidine, par le biais de la photographie, Timelapse, et par les statistiques de distribution de Poisson (Friedenstein, Chailakhyan et al. 1974; Friedenstein 1976;

Friedenstein, Ivanov-Smolenski et al. 1978). *In vivo* la transplantation a conduit à la reconnaissance du fait que de multiples tissus squelettiques (os, cartilage, le tissu adipeux, et le tissu fibreux) peuvent être générés expérimentalement par la descendance d'une seule cellule stromale BM *in vivo*(Friedenstein 1989), Friedenstein et Owen ont appelé cette cellule une cellule souche ostéogénique (Friedenstein, Chailakhyan et al. 1987) ou d'un stroma cellules souches(Owen and Friedenstein 1988). Ces cellules sont des cellules souches d'origine mésodermique présentes dans divers tissus de l'organisme adulte tel que la moelle osseuse ou le tissu adipeux. Elles sont également présentes dans le sang de cordon ombilical.

La concept d'une cellule souche non hématopoïétiques dans la moelle osseuse n'a pas résonné dans le monde entier jusqu'à ce que des travaux similaires supplémentaires aient été publiés en 1999 (Pittenger, Mackay et al. 1999), En combinaison avec le moment de l'isolement des cellules souches embryonnaires humaines (cellules ES), le terme de cellule souches mésenchymateuses (MSC en anglais), proposé auparavant comme une alternative à la cellule souche "stromal"ou "ostéogénique", a acquis une grande popularité. Dans l'esprit de beaucoup de scientifiques, la CSM est devenue une sorte de cellule souche postnatale humaine avec un potentiel de différenciation qui serait plus large que prévu à l'origine ou peut-être même aussi large que celui des cellules ES(Beltrami, Cesselli et al. 2007). Cette hypothèse, reprise dans des études sur la plasticité des cellules souches postnatales, y compris les MSC, a retenu l'attention et a aussi généré la confusion, mais reste très controversée encore.

2.2.3 Les propriétés des cellules souches mésenchymateuses

Malgré le fait qu'actuellement peu d'éléments sont connus quant au devenir *in vivo* des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) après injection systémique, les CSMs ont l'avantage d'être facilement obtenues et d'être facilement amplifiables *in vitro*. Elles présentent également une faible immunogénicité, une faible capacité de mutation et ne sont ni neurotoxiques ni tumorigènes. Ainsi, elles peuvent être facilement greffées chez un patient sans avoir recours à un traitement immunosuppresseur (Parekkadan and Milwid 2010; Yagi, Soto-Gutierrez et al. 2010). Elles ont la propriété de garder leur caractère de « cellule souche » même lorsqu'elles sont modifiées. Elles survivent plus longtemps dans le gliome que dans le tissu sain et migrent spécifiquement vers les tumeurs (Sasportas, Kasmieh et al. 2009; Wang, Chen et al. 2014) L'intérêt majeur des CSMs issues de la moelle osseuse est qu'elles sont déjà utilisées dans le cadre d'essais cliniques (actuellement 79 sites d'essais cliniques sont répertoriés pour l'évaluation de thérapies via les CSMs à travers le monde), notamment pour le traitement des accidents vasculaires cérébraux en vue de reperfuser les zones hypoxiques ou pour de la thérapie tissulaire réparatrice. Ainsi, les critères de sécurité sont bien déterminés et permettent d'envisager un transfert rapide de la recherche vers la clinique humaine

(Parekkadan and Milwid 2010; Kassis, Vaknin-Dembinsky et al. 2011; Glenn and Whartenby 2014).

A. Les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation

Les cellules souches mésenchymateuses sont définies comme ayant une capacité d'auto-renouvellement, c'est-à-dire qu'elles sont capables de subir des divisions symétriques au travers desquelles la population originelle de cellules souches est maintenue. Les divisions symétriques impliquent que les cellules filles conservent les caractéristiques propres d'une cellule souche mère. Cette propriété confère donc à ces cellules un potentiel prolifératif illimité. D'autre part une cellule souche mésenchymateuse peut subir aussi une division en donnant une cellule souche et une cellule progénitrice (division asymétrique). Cette cellule progénitrice produira un nombre défini de cellules qui se différencieront en cellules spécialisées. (Figure 20). Les cellules souches mésenchymateuses sont capables de s'auto-renouveler pendant une très longue période.

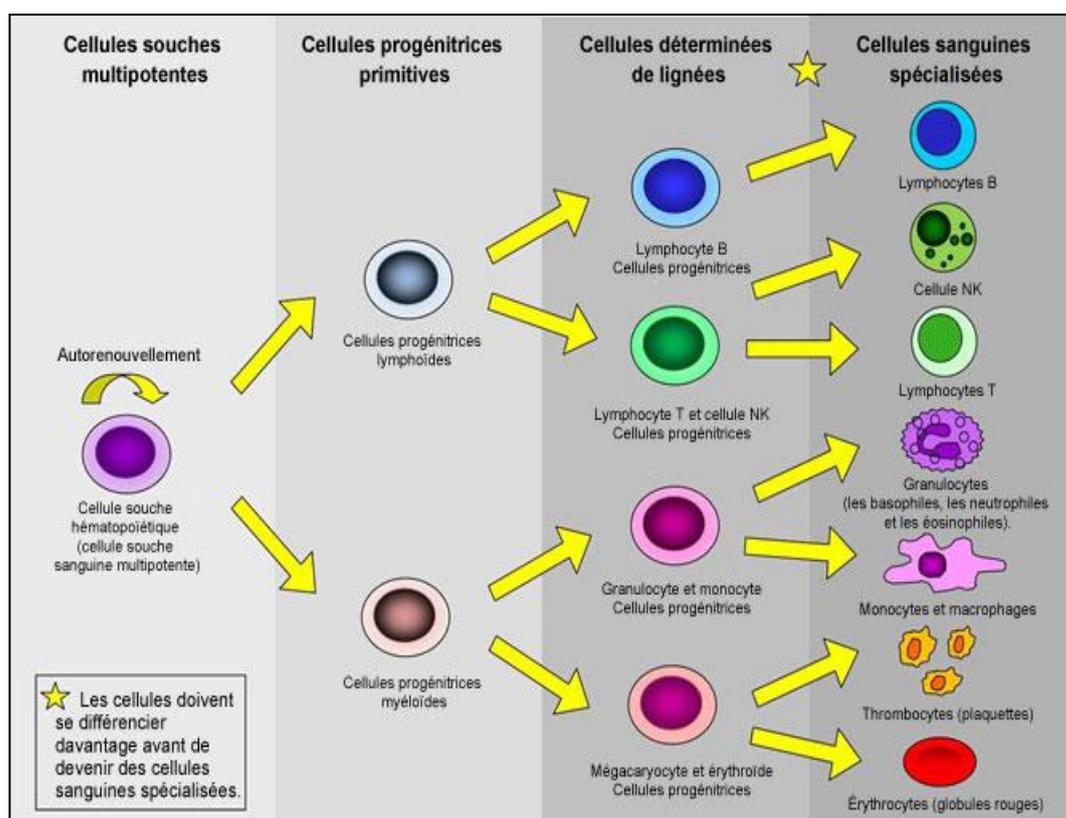


Figure. 20 L'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses sont définies par deux propriétés caractéristiques : la différenciation et l'autorenouvellement. L'autorenouvellement est le processus selon lequel, par l'entremise de la mitose, une cellule souche mésenchymateuse se divise pour produire au moins une cellule fille qui demeure une cellule souche indifférenciée. La différenciation est le processus selon lequel des cellules non spécialisées acquièrent des traits cellulaires spécifiques, qui les

convertissent en types de cellules spécialisées. La capacité pour les cellules souches mésenchymateuses de se différencier en tous les types de cellules spécialisées d'une lignée cellulaire spécifique est une propriété clé des cellules souches (Educationnels 2013).

Il reste encore à comprendre pourquoi elles conservent aussi longtemps leur capacité d'autorenouvellement. En effet, à chaque fois que le génome se réplique, il y a des erreurs dans l'ADN (acide désoxyribonucléique). Les cellules souches mésenchymateuses des mammifères possèdent des mécanismes de surveillance qui détectent les erreurs de réplication et éliminent les cellules dans lesquelles apparaissent ces erreurs. Il y aurait intervention de la protéine p53 bien connue pour son rôle de facteur anti-tumoral et pro-apoptotique, et de la protéine Rb (Wang, Xie et al. 2007; Choi, Curtis et al. 2010; Rubio, Gutierrez-Aranda et al. 2013), elle aussi facteur anti-tumoral. Ce mécanisme éviterait ainsi la formation de tumeur par mutation d'une cellule souche mésenchymateuses et prolifération de cette cellule mutée (Morrison and Spradling 2008). Les cellules souches mésenchymateuses possèdent enfin une capacité unique à protéger les télomères de leurs chromosomes. En effet, toutes les cellules souches expriment le marqueur de la télomérase qui est spécifique de ces cellules (Figure 21). La télomérase est une enzyme qui évite qu'à chaque division cellulaire, le télomère, correspondant à l'extrémité du chromosome ne soit pas répliqué et soit alors perdu. Cela permet donc de maintenir le génome au complet (Blackburn, Greider et al. 2006).

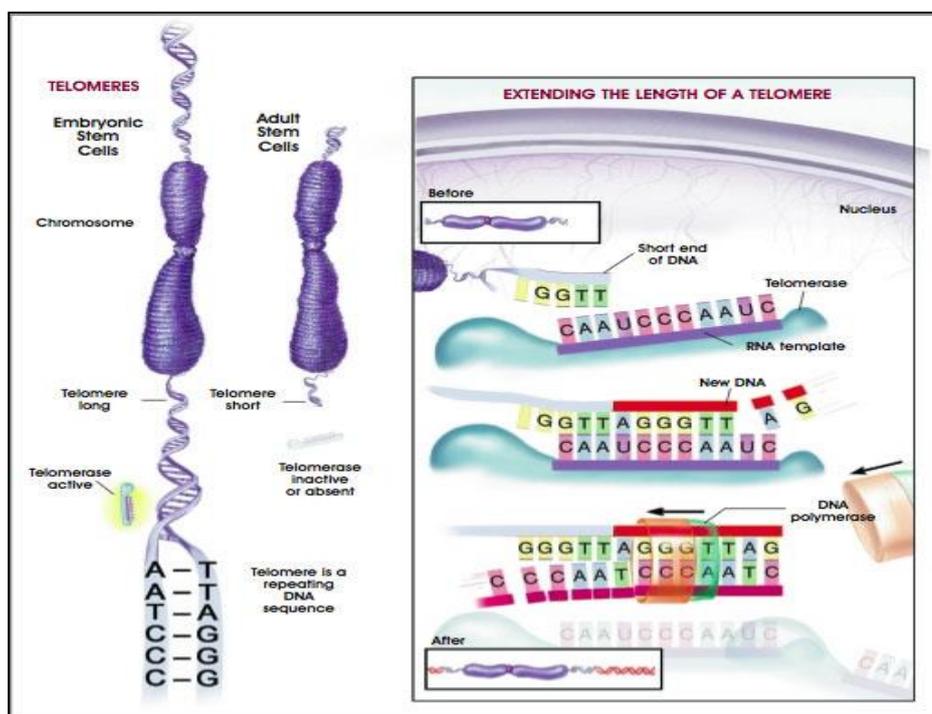


Figure. 21 La télomère et la télomérase

L'ADN des télomères, des espèces de capuchons protecteurs situés à l'extrémité des chromosomes, contrôle le vieillissement des cellules et maintient la stabilité du patrimoine génétique, le génome, jusqu'à leur détérioration et la télomérase qui rallonge les télomères et protège justement les chromosomes de ce vieillissement grâce à sa fonction réparatrice (Szostak and Blackburn 1982; Shampay, Szostak et al. 1984; Blackburn, Greider et al. 2006).

B. La migration et l'homing

Les contacts cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire (MEC) sont connus pour être essentiels au bon fonctionnement des cellules souches mésenchymateuses dans leur niche (Sohni and Verfaillie 2013). Ces contacts physiques sont importants pour l'homing des cellules souches à leur support mais aussi jouent leur rôle dans la migration. Un attachement physique aux cellules stromales ou à la membrane basale est important pour maintenir les cellules souches mésenchymateuses dans leur niche à proximité des signaux qui contrôlent leur quiescence/prolifération et différenciation. Les jonctions adhérentes sont les contacts cellule-cellule qui sont formés par des interactions entre des protéines transmembranaires, les cadhérines (Buitenhuis 2011; Leung, Chan et al. 2011; He, Li et al. 2014). Par exemple, les cadhérines (M-cadhérine) déterminent la position des cellules satellites le long de la fibre musculaire. Un autre moyen pour les cellules souches mésenchymateuses de rester dans leur niche est leur ancrage à lame basale par l'intermédiaire des intégrines. Par exemple l'intégrine $\beta 1$ semble être une caractéristique des cellules souches de plusieurs tissus comme celles du follicule pileux 141, de la moelle osseuse ou encore celles des muscles mais d'autres différentes intégrines (Kanatsu-Shinohara, Takehashi et al. 2008; Taniguchi Ishikawa, Chang et al. 2013), comme l'intégrine $\alpha 6$ qui est le récepteur de la laminine composant majoritaire de la membrane basale, sont impliquées dans l'adhésion des cellules souches mésenchymateuses dans leur niche (Kumar and Ponnazhagan 2007).

Alors que la grande majorité des cellules souches mésenchymateuses est ancrée et retenue dans sa niche, une partie d'entre elles peut être mobilisée. En réponse à des stimuli spécifiques, les cellules souches mésenchymateuses peuvent sortir ou ré-entrer dans leur niche, processus appelés migration et homing, respectivement (Eseonu and De Bari 2014). Ces processus biologiques opposés sont contrôlés par des mécanismes moléculaires similaires qui nécessitent une sécrétion de facteurs chémoattractants, une activation/inhibition des molécules d'adhésion pour l'attachement ou la libération des cellules souches, une transmigration à travers la paroi endothéliale et une migration/invasion dans la MEC impliquant sa dégradation grâce à des protéases. Lors de la mobilisation induite par de nombreuses molécules, telles que des cytokines (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Interleukine-7 (IL-7), IL-3, IL-12, Stem Cell Factor (SCF) et flt-3 ligand), des chémokines (IL-8, Mip-1 α , Gro β et SDF-1) ou des catécholamines (dopamine et noradrénaline) (Lee, Han et al. 2004; Lutz, Rosenberg et al. 2008), les CSMs voient l'expression de leurs molécules d'adhésion (l'intégrine VLA-4 et du récepteur à la cytokine c-kit) diminuée. De manière concomitante, il y a une dégradation de la MEC

et des connexions cellulaires par l'augmentation de la sécrétion des métalloprotéinases (MMP) 2 et 9 et des protéases neutrophiles (élastase et cathepsine G) ainsi que par l'action des ostéoclastes. La migration transendothéliale est la dernière étape pour atteindre la circulation sanguine et rejoindre le site d'accueil. Les mécanismes contrôlant le homing sont assez similaires mais en sens opposé (Alvarez, Carrillo et al. 2013). Un des acteurs essentiels impliqués dans la migration et de l'homing des CSMs en conditions homéostasiques ou en cas de lésion est la chémokine SDF-1 aussi appelé CXCL12 dont le principal récepteur, le CXCR4, est exprimé sur les CSMs (Zhuang, Chen et al. 2009; Gheisari, Azadmanesh et al. 2012). Le SDF-1 est produit par plusieurs types cellulaires dans la moelle osseuse dont les ostéoblastes et les cellules endothéliales. Les effets biologiques de SDF-1 sont médiés par sa capacité à induire la mobilité, le chimiotactisme et l'adhésion aussi bien que la sécrétion des MMP et des facteurs angiogéniques. Elles peuvent migrer notamment grâce au couple SDF-1 (Stromal Derived Factor-1) /CXCR4, en réponse au G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), à MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) et MCP-3, mais aussi en réponse au TGFβ1(Transforming Growth Factor beta 1) sécrété par les ostéoblastes lors de la résorption osseuse (Figure 22)(Zhuang, Chen et al. 2009; Sharma, Afrin et al. 2013). Dans la niche intestinale, la mobilisation des cellules souches est contrôlée par le couple EphrineB2 et son récepteur Eph lorsque les cellules migrent le long de la crypte (Holmberg, Genander et al. 2006).

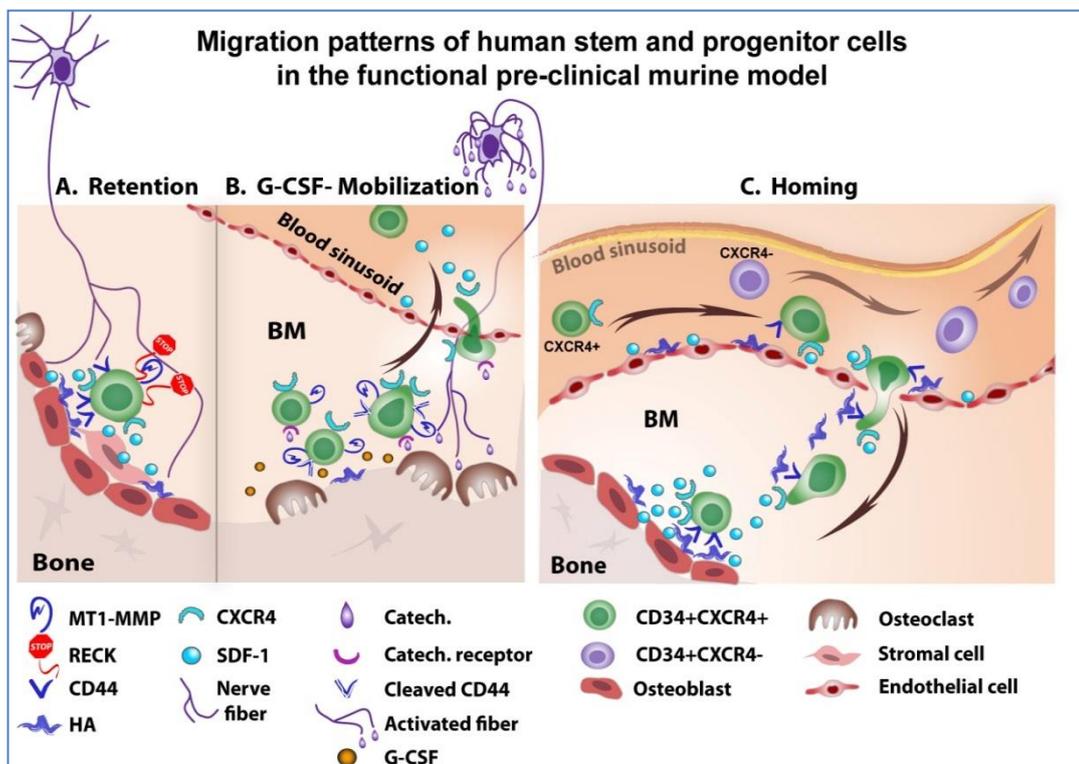


Figure. 22 La migration et l'homing des cellules souches mésenchymateuses

la rétention de cellules via des interactions SDF-1 / CXCR4, l'adhésion CD44 / interactions HA et l'inhibition des enzymes protéolytiques MT1-MMP et MMP2 / 9 par RECK ; (B) La migration des cellules souches sont provoquée par G-CSF via l'activation des ostéoclastes, la suppression des ostéoblastes d'os, des enzymes protéolytiques (y compris la régulation positive de surface MT1-MMP), le clivage de CD44 et SDF-1 et la régulation de CXCR4 ; (C) L'homing des cellules souches est provoqué par l'augmentation des SDF-1 et son principal récepteur CXCR4 dans l'endothélium et la région endoste de la moelle osseuse de souris(Lapidot 2013).

C. Les propriétés immunologiques

Il apparaît aujourd'hui que l'efficacité de l'injection de CSMs dans différents modèles de lésions tissulaires chez l'animal, lésions myocardiques ou neuronales, par exemple, serait essentiellement due à un effet paracrine de type *touch-and-go* au cours duquel les CSMs produiraient pendant une période courte de l'ordre de quelques jours des molécules antiinflammatoires et immunosuppressives favorisant, en lien avec des facteurs trophiques, la régénération du tissu de l'hôte. Cette notion récente est particulièrement importante lorsque l'on considère que, sur la soixantaine d'essais cliniques actuellement en cours utilisant des CSMs, environ la moitié sont des essais de médecine réparatrice, les autres ciblant des maladies dysimmunitaires telles que les maladies auto-immunes sévères, le rejet d'organe ou la maladie aiguë du greffon contre l'hôte (graft versus host disease ou GvHD)(von Bonin, Stolzel et al. 2009). C'est dans cette dernière situation que les CSMs ont fait la preuve de principe de leur efficacité clinique en matière d'immunosuppression.

La GvHD est une complication fréquente et très sévère de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, procédure utilisée régulièrement dans le traitement de nombreuses hémopathies malignes. Elle se caractérise par une destruction des tissus du receveur reconnus comme étrangers par les cellules immunitaires présentes dans le greffon. La principale étude publiée à ce jour chez 55 patients atteints de GvHD sévère corticorésistante et traités par une ou plusieurs injections de CSMs fait état d'un taux exceptionnel de réponses complètes atteignant 43% chez l'adulte et 68% chez l'enfant. Le taux de survie à 2 ans atteignait même 52% contre à peine 10% attendus avec les autres thérapeutiques disponibles (Le Blanc, Frassoni et al. 2008). Des taux de réponse plus faibles ont été rapportés depuis dans d'autres études, ce qu'explique une efficacité probablement supérieure chez l'enfant et chez certains sous-groupes de patients. Cependant, l'efficacité immunosuppressive des CSMs en thérapeutique ne fait aujourd'hui aucun doute et ceci a d'ailleurs conduit, outre le traitement de la GVHD, à la réalisation de premiers essais cliniques prometteurs dans le lupus érythémateux disséminé sévère et corticorésistant (Parekkadan, Tilles et al. 2008; Parekkadan and Milwid 2010; Sun, Wang et al. 2010). L'importance de cette propriété dans des contextes plus larges que ce qui était initialement prévu, des maladies auto-immunes à la réparation tissulaire, rend nécessaire la parfaite compréhension des mécanismes impliqués et donc probablement des études fondamentales, permettant d'envisager un futur extrêmement prometteur.

Pour étudier les propriétés immunologiques des CSMs, il convient de rappeler quelques éléments essentiels (Coulson-Thomas, Gesteira et al. 2014; Lee, Jeong et al.

2014) : (1) les CSMs humaines obtenues à partir de moelle osseuse et de tissu adipeux partagent les mêmes propriétés immunosuppressives; (2) les CSMs qui proviennent de différentes espèces peuvent avoir des mécanismes d'action différents, ce qui complique l'interprétation de certaines données obtenues avec les CSMs murines notamment ; (3) toutes les données disponibles concernent des CSMs obtenues après plusieurs semaines de culture *in vitro* sans qu'il soit possible aujourd'hui de conclure à l'existence même d'un potentiel immunosuppresseur des CSMs natives *in vivo* et encore moins à ses modalités.

CSMs interagissent avec une large gamme de cellules immunitaires et leur interaction avec les lymphocytes T allogéniques a été étudiée par de nombreux groupes. A ce jour, les mécanismes d'action qui régissent l'interaction des CSMs avec les différents effecteurs de l'immunité innée ou adaptative ont commencé à être décryptés(Jiao, Milwid et al. 2011). Tout d'abord, les CSMs ont été démontrées comme étant des stimulateurs médiocres dans des cellules T-*in vitro* allogéniques et ne parviennent pas à induire une activation des cellules T allogéniques(Zhou, Singh et al. 2014). Pour activer de manière adéquate les cellules T, deux signaux sont nécessaires (Van Gool, Vandenberghe et al. 1996). Le premier signal implique la reconnaissance des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) avec un antigène sur la surface d'une cellule présentatrice d'antigène (APC), via le récepteur de cellule T. Par la suite, l'activation des lymphocytes T nécessite un signal de co-stimulation impliquant l'interaction de CD28 sur la cellule T avec CD80 ou CD86 (la superfamille de B7) sur l'APC (Klyushnenkova, Mosca et al. 2005; Engela, Baan et al. 2013). Les CSMs expriment des niveaux faibles de molécules du CMH de classe I à leur surface, mais n'ont pas l'expression du CMH de classe II et des molécules de costimulation CD80, CD86 ou CD40. L'expression à la fois de CMH de classe I et de classe II peut être régulée à la hausse lors de la stimulation par l'interféron (IFN)- γ (Rameshwar 2008). Deuxièmement, il a été montré que les CSMs suppriment l'activation des lymphocytes T naïfs et mémoire et la prolifération induite par les mitogènes et des alloantigènes, CD3 et CD28. Cette suppression est sans restriction du CMH, car elle peut être médiée par des CSMs autologues et allogéniques. Diverses molécules solubles interviennent dans cet effet, dont les prostaglandines E2 (PGE2), les molécules HLA-G5 solubles (sHLA-G), les galectines 1 et 3, certaines cytokines immunosuppressives bien connues comme l'interleukine-10 (IL-10)(Niu, Yue et al. 2014) et le transforming growth factor- β (TGF- β)(Milwid, Ichimura et al. 2012). En particulier figurent dans cette liste des enzymes immunosuppressives parmi lesquelles l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO)(Ling, Zhang et al. 2014) qui dégrade le tryptophane et est généralement exprimée par les CSM humaines, la nitric oxide synthase inductible (iNOS)(Abu-Lubad, Meyer et al. 2014) – présente dans les CSM de souris et l'hème oxygénase (HO-1)(Huang, Chen et al. 2014), décrite notamment dans les CSM de rat. Certaines molécules membranaires sont probablement également impliquées dont Jagged-1, l'un des ligands des récepteurs Notch (Del Papa, Sportoletti et al. 2013) (Figures 23). Un rôle du facteur de croissance transformant β (TGF- β) et du facteur de croissance des hépatocytes (HGF) a été suggéré par Di Nicola et al, qui ont découvert que des

anticorps contre le TGF- β et l'HGF restaurent partiellement la prolifération de cellules T purifiées stimulées avec allogéniques lymphocytes du sang périphérique (Di Nicola, Carlo-Stella et al. 2002; Xu, Yu et al. 2014).

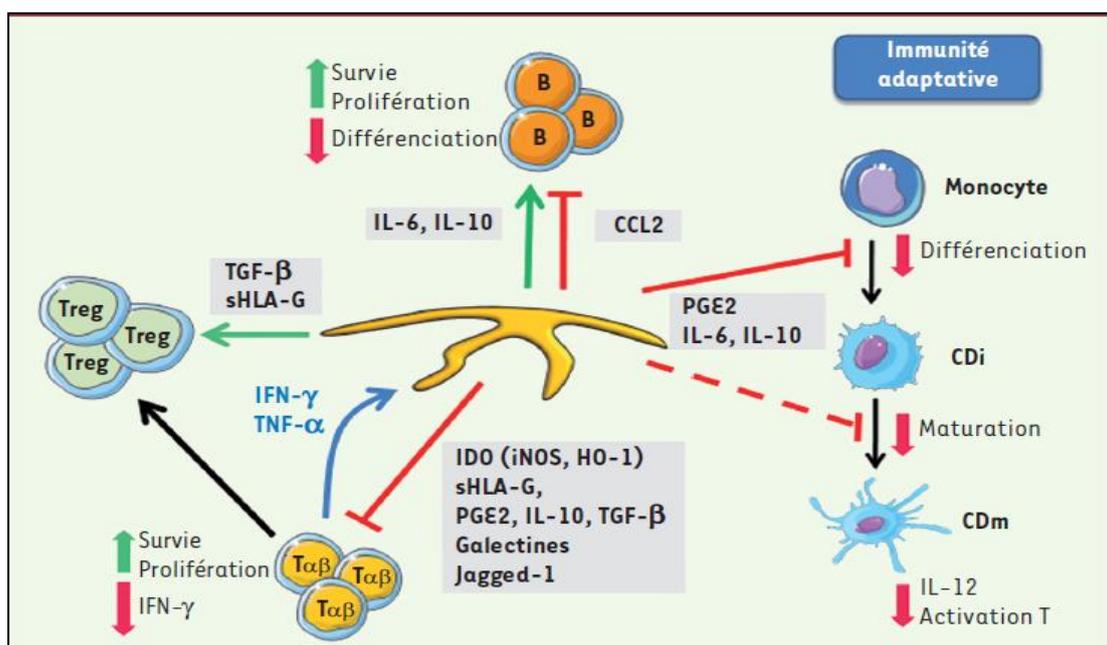


Figure. 23 l'immunité adaptative des CSMs

Les CSMs permettent la survie des lymphocytes $T\alpha\beta$ tout en inhibant leur prolifération et leur synthèse d'IFN - γ via la production d'une combinaison de facteurs solubles et membranaires dont la plupart sont induits par l'IFN- γ et le TNF- α produits par les lymphocytes T activés. Elles favorisent également la différenciation des lymphocytes $T\alpha\beta$ en lymphocytes T régulateurs (Treg) via la synthèse de TGF- β et de HLA-G soluble. Par ailleurs, en l'absence de facteurs inflammatoires, les CSMs permettent la survie et la prolifération des lymphocytes B par la production des facteurs de croissance IL-6 et IL-10, tout en inhibant leur différenciation terminale via des mécanismes mal identifiés (Menard and Tarte 2011).

Toutes les cellules de l'immunité innée sont aussi des cibles potentielles du pouvoir d'immunomodulation des CSMs. Bien que de caractérisation plus récente, ce processus est probablement fondamental pour l'utilisation des CSMs en médecine régénératrice parce que l'inflammation des tissus lésés résulte de l'intervention des différents acteurs de l'immunité innée plus que de celle des cellules B ou T spécifiques. Les cellules NK (sigle de l'anglais Natural Killer, signifiant « tueur naturel ») sont des cellules effectrices importantes de l'immunité innée (Ribeiro, Laranjeira et al. 2013). Ces cellules présentent une activité cytolytique contre les cellules spontanées qui n'ont pas l'expression des molécules de classe I du CMH. En outre, les cellules NK sont aussi des médiateurs importants du greffon contre la leucémie. La fonction des cellules NK est régulée par l'équilibre de l'interaction entre l'activation et l'inhibition des signaux avec leurs récepteurs de surface cellulaire (Kim and Cho 2013). Les CSMs sont connues pour exprimer de faibles niveaux de molécules CMH de classe I, ce qui les rend vulnérables pour NK mort à médiation cellulaire. Néanmoins, les CSMs ne sont pas lysées par les cellules NK inactives fraîchement

isolés, même en dépit d'inadéquation des cellules Ig-like récepteurs entre donneurs de cellules NK et CSMs. D'autre part, les cellules souches mésenchymateuses autologues et allogéniques peuvent être tuées avec succès par les cellules NK activées. Ceci indique que les interactions entre les récepteurs du CMH de classe I inhibitrices spécifiques sur les cellules NK et les cellules souches mésenchymateuses ne sont pas suffisantes pour protéger les cellules souches mésenchymateuses à partir de lyse. Il est également connu que les CSMs expriment des ligands pour les récepteurs activateurs des cellules NK à leur surface, comme MIC-A (CMH de classe I lié chaîne A) et ULBPs (protéine UL16-liaison, le ligand de NKG2D) ainsi que les PVR (récepteur du poliovirus) et Nectin-2 (le ligand de DNAM-1 (molécule accessoire DNAX-1))(Abumaree, Al Jumah et al. 2012).

En outre, les cellules souches mésenchymateuses exercent un effet inhibiteur sur les cellules NK, affectant différents aspects de la fonction des cellules NK telles que la prolifération, l'activité cytotoxique et la production de cytokines. Les CSMs inhibent la cytokine (IL-2 et IL-15) axées sur la prolifération des cellules NK purifiées d'une manière dépendante de la dose (Ben-Ami, Miller et al. 2014). Les cellules NK, à l'instar des $T\alpha\beta$, survivent mieux en présence de CSMs alors que leur prolifération, leur cytotoxicité et leur sécrétion d'IFN- γ sont réduites en réponse à l'action concertée des PGE2, d'IDO et de sHLA-G (Zhao, Liu et al. 2012). Cette inhibition de la cytotoxicité des NK dépendrait également en partie d'une réduction de l'expression de leurs récepteurs activateurs. Les capacités de prolifération, de cytotoxicité et de sécrétion d'IFN- γ des lymphocytes $T\alpha\beta$ - activés en réponse aux phosphoantigènes sont également inhibées par les PGE2 produites par les CSMs (Figure 24). Même si les CSMs n'ont pas inhibé la lyse des cellules NK médiée par des cellules K562, les cellules NK cytokines stimulées cocultivées avec des CSMs présentent une fonction de réduction cytolytique contre les cellules K562(Rasmusson, Ringden et al. 2003). Avec l'activité cytolytique, la production d'IFN- γ par les cellules NK est altérée après co-culture avec des CSMs.

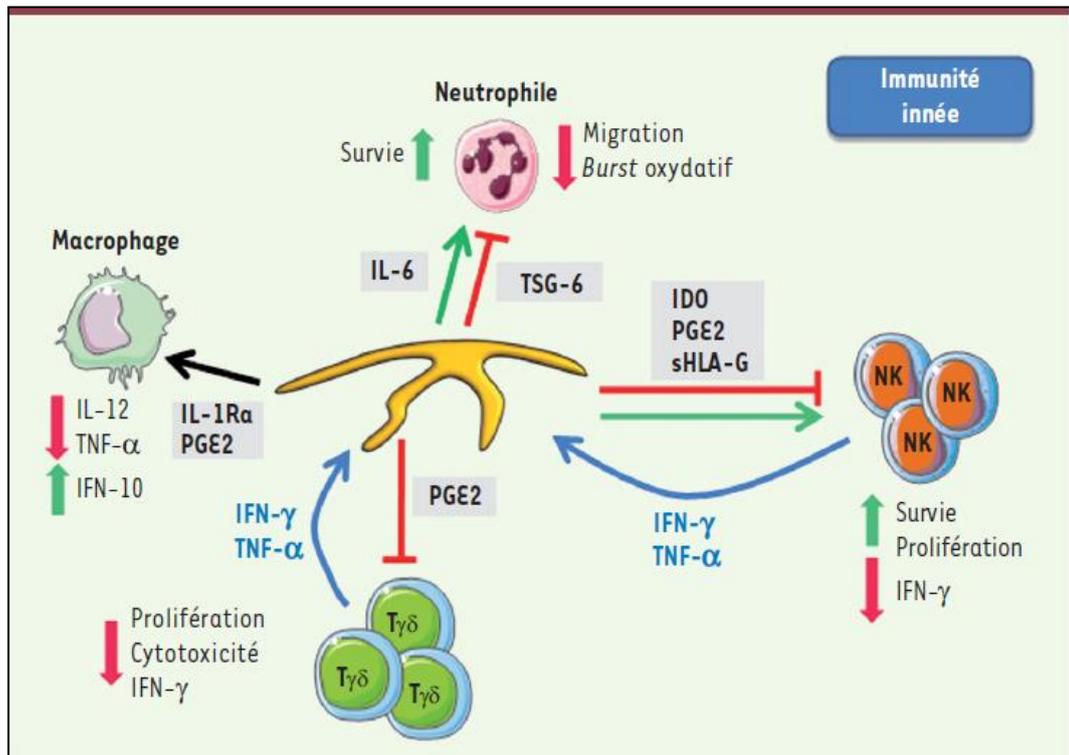


Figure. 24 l'immunité innée des CSMs

Les CSM inhibent la prolifération, la cytotoxicité et la synthèse d'IFN- γ par les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les cellules NK qui produisent l'IFN- γ et le TNF- α indispensables à l'induction de ce phénotype inhibiteur. Par ailleurs, les CSMs modifient le profil d'activation des macrophages qui produisent moins de cytokines pro-inflammatoires et plus d'IL-10 en réponse aux PGE2 et au blocage de l'IL-1 par l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) (Menard and Tarte 2011).

2.3 Cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton

2.3.1 La situation de la gelée de wharton

Les cellules de cordon ombilical sont faciles à prélever et pourraient par le biais de banques cellulaires servir de réserve cellulaire potentielle pour toute la vie d'un individu donné. La gelée de Wharton du cordon ombilical est riche en cellules souches mésenchymateuses et en progéniteurs endothéliaux. Chez les mammifères placentaires, le cordon ombilical est l'organe qui joint le placenta de la mère enceinte au fœtus ou à l'embryon. C'est dans ce cordon que circulent les vaisseaux sanguins (2 artères et 1 veine) qui alimentent l'embryon puis le fœtus pendant la grossesse. Nutriments et oxygène essentiels à la survie du bébé sont ainsi transmis. Chez les humains, le cordon ombilical atteint à terme environ 50 cm de long et 2 cm de diamètre (Chang, Hou et al. 2014). Le développement considérable de la cavité amniotique et du tube neural entraîne la formation du cordon ombilical pendant la quatrième semaine (Christodoulou, Kolisis et al. 2013). Ce cordon contient le canal

vitellin, l'allantoïde et les vaisseaux de pédicule embryonnaire ainsi que le mésenchyme extraembryonnaire. Au cours de la quatrième semaine, le cordon ombilical s'individualise à la suite de la délimitation et se trouve sur la face ventrale de l'embryon. À la fin de la quatrième semaine, le cordon est entouré par l'amnios et formé de : l'allantoïde avec ses vaisseaux (2 artères et 2 veines) ; le mésenchyme extraembryonnaire ; le canal vitellin et les vaisseaux vitellins (2 artères et 2 veines). À partir de troisième mois, le canal vitellin, l'allantoïde, les vaisseaux vitellins et la veine allantoïde droite régressent (Kim, Staples et al. 2013). Il reste les deux artères allantoïdes et la veine allantoïde gauche. À terme le cordon est entouré en périphérie par un tissu conjonctif muqueux appelé gelée de Wharton et il contient les vaisseaux allantoïdes appelés artères ombilicales (anciens artères allantoïdes) et une veine ombilicale (ancienne veine allantoïde gauche) (Figure25). Le cordon est élastique ; il est très difficile de le comprimer et les transports sanguins ne risquent pas d'être perturbés. Il est souple, ce qui permet au bébé de faire tous les mouvements possibles dans l'espace restreint qui l'entoure. Ce cordon, est considéré juridiquement avec le placenta comme un déchet opératoire (McElreavey, Irvine et al. 1991; Mennan, Wright et al. 2013). Le cordon ombilical est une source de cellules souches. De plus en plus aux États-Unis, les hôpitaux proposent de préserver le cordon dans une optique d'éventuelle auto-transplantation, en cas de leucémie de l'enfant par exemple.

La gelée de Wharton tient son nom de son découvreur, Thomas Wharton (Wharton 1656). Elle est un tissu conjonctif embryonnaire, la prédominance de sa substance fondamentale lui donne une matrice extracellulaire très fluide. Son rôle est d'emballer le cordon ombilical. Le tissu conjonctif provenant du mésoblaste extra-embryonnaire du pédicule embryonnaire, le mésenchyme, se transforme en un tissu élastique et résistant protégeant les vaisseaux ombilicaux d'éventuelles pressions. Cette substance est riche en polysaccharides et comporte un peu de collagène. Elle contient des myofibroblastes et des mastocytes, plus nombreux autour des vaisseaux, et quelques macrophages (Troyer and Weiss 2008). On y trouve également des cellules différenciées, des fibroblastes, qui ont une matrice plus riche en fibre (Trivanovic, Kocic et al. 2013).

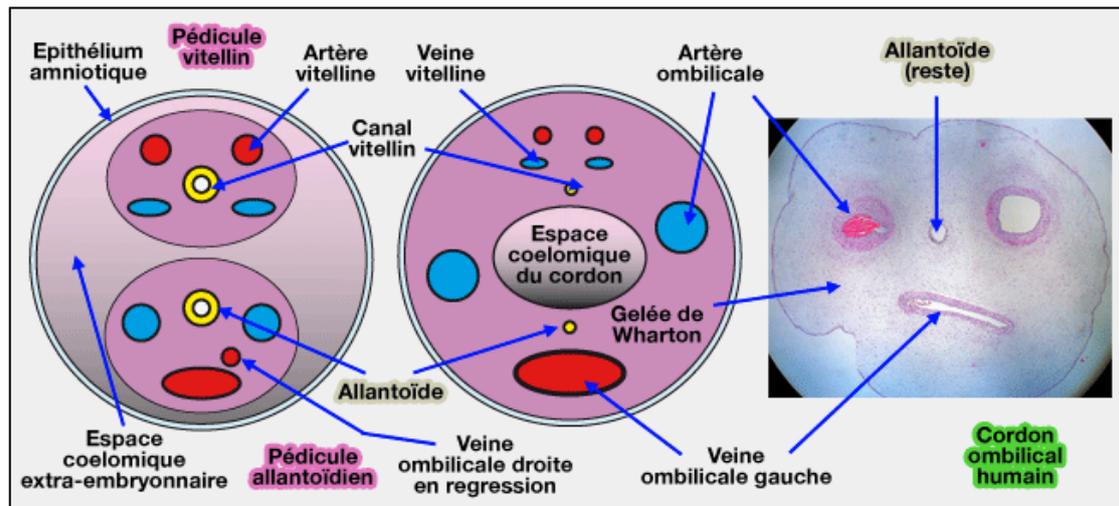


Figure. 25 Le cordon ombilical humain

La gelée de Wharton, tissu gélatineux de cellules myofibroblastiques, de fibres de collagène et de protéoglycanes (acide hyaluronique) qui en fait un tissu de soutien, de remplissage et de protection du cordon ombilical ; la veine ombilicale gauche (la droite a disparu) : elle contient du sang artériel du placenta vers le fœtus ; les deux artères ombilicales qui conduisent le sang veineux du fœtus au placenta (<http://www.vetopsy.fr/reproduction/gestation/amnios-cordon-ombilical-apres-plicature-embryon.php>).

2.3.2 Sources de cellules souches et la supériorité des cellules souches de la gelée de wharton

Différents types de cellules souches ont été isolées à ce jour chez l'homme à partir d'une variété de tissus, y compris les embryons de pré-implantation, des fœtus, des tissus biologiques et d'organes associés à des adultes. Sur la base de marqueurs biochimiques et génomiques, ils peuvent être classés en cellules souches embryonnaires (CSEs), en cellules souches mésenchymateuses (CSMs), et en cellules souches hématopoïétiques (CSHs) (Kim, Staples et al. 2013; Mennan, Wright et al. 2013).

Les CSEs sont des cellules souches pluripotentes qui peuvent théoriquement être différenciées dans presque tous les tissus dans le corps humain. Cependant, les CSEs ont une limite d'utilisation. La principale limitation est un problème éthique. A cause de les CSEs sont dérivées de la masse cellulaire interne d'un blastocyste, un embryon à un stade précoce, l'isolement de l'embryoblaste ou les résultats de masse cellulaire interne dans la destruction de l'embryon humain fécondé, ce qui soulève des questions éthiques (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998). Bien que la source du blastocyste est généralement un matériau jeté dans les cliniques de fécondation in vitro, il n'existe aucun consensus si oui ou non le statut moral d'un être humain d'une vie humaine au stade embryonnaire doit être accordé (Baldwin 2009). D'autres limitations sont les risques d'immunorejection et la tumorigenèse. Pour surmonter

le problème d'immunorejection, des protocoles ont été développés où le tissu peut être personnalisé pour les patients en transfectant des cellules somatiques du patient avec des gènes pluripotentes pour produire des cellules souches pluripotentes humaines induites (hiPSCs) ; malheureusement, des changements épigénétiques dans la forme de duplications chromosomiques et des suppressions ont été signalés dans les hiPSCs (Takahashi and Yamanaka 2006). En outre, les hiPSCs induisent la tumorigenèse dans des souris immunodéficientes et une telle formation de tératome est plus rapide et plus efficace que chez leur homologue de CSEs (Gutierrez-Aranda, Ramos-Mejia et al. 2010; Laurent, Ulitsky et al. 2011). Le risque de tumorigenèse est d'une importance particulière pour l'utilisation de cellules pluripotentes, puisque celles-ci sont caractérisées par l'aptitude à former des tératomes dans des modèles animaux (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998; Takahashi and Yamanaka 2006; Raya, Rodriguez-Piza et al. 2008). Ainsi, l'état des cellules de différenciation transplantées devra être défini avec une grande précision pour éviter la livraison de cellules pluripotentes résiduelles qui peuvent se différencier de façon aberrante *in vivo*.

Les CSHs ont une plasticité limitée dans le sens où elles peuvent seulement se différencier en lignées hématologiques. En outre, le nombre de CSHs dans la moelle osseuse est faible et cela nécessite une expansion *ex vivo* pour le traitement des maladies hématologiques chez les humains adultes (Wang, Chen et al. 2015). Les CSMs fœtales sont controversées car elles sont dérivées de fœtus avortés humains. Depuis que Pittenger et ses collègues ont démontré le succès de l'isolement des cellules souches mésenchymateuses multipotentes à partir de la moelle osseuse, c'est devenu la principale source de CSMs (Pittenger, Mackay et al. 1999). Bien que les CSMs-BM soient les plus étudiées et bien documentées, les CSMs-BM ont une limitation en terme de nombre de cellules et de ce fait exigent l'expansion *in vitro* mais présentent le risque de perte des propriétés stemness, de l'induction de modifications chromosomiques artefacts, et des problèmes de contamination. Le tissu adipeux a récemment émergé comme une source alternative de cellules souches mésenchymateuses. Malgré sa nature abondante, une procédure invasive est toujours nécessaire de recueillir le tissu (Bunnell, Flaat et al. 2008; Ren, Wu et al. 2012).

Les CSMs extra-embryonnaires périnatales récoltées à partir du placenta, membrane fœtale (amnios et chorion), de cordons ombilicaux (UC), de sang de cordon et de liquide amniotique représentent un type cellulaire intermédiaire qui combine partiellement certaines propriétés pluripotentes des cellules souches mésenchymateuses adultes (Barlow, Brooke et al. 2008; Ilancheran, Moodley et al. 2009; Pappa and Anagnou 2009; Semenov, Koestenbauer et al. 2010). Parce qu'elles ont une relation ontogénétique étroite avec les cellules souches embryonnaires, les CSMs extra-embryonnaires ont des caractéristiques immunoprivilégiées, elles possèdent une plasticité multipotentes plus large, et prolifèrent plus rapidement que MSC adultes (Marcus and Woodbury 2008; Roubelakis 2013). En outre, ces cellules pourraient être isolées et utilisées sans problème éthique, car les tissus extra-embryonnaires sont normalement jetés après la naissance (Marcus and

Woodbury 2008; Kmiecik, Niklinska et al. 2013).

2.3.3 Propriété immunomodulatrice des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton

L'utilité pratique de cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton (CSMs–GW) serait dans la transplantation allogénique. Une condition importante pour la transplantation allogénique est la faible immunogénicité. L'utilité thérapeutique des cellules souches provenant de la gelée de wharton peut être attribuée à leur potentiel régénérateur et immunomodulateur de ces cellules (Menard and Tarte 2011; Abumaree, Al Jumah et al. 2012). Un document discute des molécules immunomodulatrices exprimées par les CSMs–GW et aussi analyse leurs activités immunomodulatrices *in vitro* et *in vivo*. Elles expriment le CMH de classe I (HLA-ABC) à des niveaux faibles mais pas de classe II (HLA-DR) et les antigènes de co-stimulation telles que CD80, CD86 impliqués dans l'activation des deux réponses de lymphocytes T et B(Weiss, Anderson et al. 2008; Prasanna, Gopalakrishnan et al. 2010). Les faibles niveaux d'antigènes du CMH de classe I pourraient être un mécanisme pour les protéger de la suicide cellulaire lyse à médiation cellulaire. Bien que l'expression globale des ligands immuno-stimulatrice sur CSMs–GW reste similaire à celui des cellules souches mésenchymateuses dérivées de moelle osseuse (CSMs–BM), leur induction de cytokines pro-inflammatoires pourrait différer. HLA-DR est induite sensiblement chez les BM-MSc avec un traitement par l'IFN- γ , mais l'induction est très négligeable dans CSMs–GW(Prasanna, Gopalakrishnan et al. 2010; Deuse, Stubbendorff et al. 2011). En outre, CSMs–GW produisent de grandes quantités d'IL-10 tolérogène, un niveau plus élevé de TGF- β que les BM-MSc, et expriment HLA-G, qui n'est pas exprimé dans BM-MSc(Weiss, Anderson et al. 2008; Prasanna, Gopalakrishnan et al. 2010). HLA-G semble jouer un rôle dans la tolérance immunitaire pendant la grossesse en éludant une réponse immunitaire de la mère contre le fœtus et induit l'expansion des cellules T régulatrices, ce qui contribuerait à la suppression de réponses effecteurs à alloantigènes(Selmani, Naji et al. 2008; Griffin, Ritter et al. 2010; Hoogduijn, Roemeling-van Rhijn et al. 2011). Des preuves irréfutables ont montré que le taux de rejet faible semble être associé à l'expression de ces antigènes sanguines dans les greffes des le cœur, le foie et le rénal(Zarkhin, Talisetti et al. 2010). En outre, CSMs–GW expriment l'IL-6 et VEGF, qu'ont été récemment montré à pouvoir pivoter dans la capacité des cellules souches mésenchymateuses immunosuppresseur(Djouad, Charbonnier et al. 2007; Ramasamy, Fazekasova et al. 2007). Les CSMs–GW sont moins immunogènes que les BM-MScs ainsi que les CSMs fœtales rendant plus propice à l'allogénie ainsi que la transplantation xénogénique(Jiang, Zhang et al. 2005).

Les CSMs–GW possèdent également des propriétés immunomodulatrices robustes par rapport aux CSMs–BM. CSMs–BM ont été largement rapportés à

atténuer mitogène entraîné ainsi que alloantigène ou de la réponse des cellules T spécifique de l'antigène entraîné d'une manière dépendante de la dose *in vitro* (Di Nicola, Carlo-Stella et al. 2002). Les MSC ont été également montrés pour empêcher sous-ensembles des CD4⁽⁺⁾, CD8⁽⁺⁾, CD2⁽⁺⁾ et CD3⁽⁺⁾ (Aggarwal and Pittenger 2005). Cependant, les CSMs–GW présentent une suppression importante, même à très faible dose de gamme par rapport aux BM-MSCs en termes de mitogénicité induite des réponses cellulaires T de CD3⁽⁺⁾. En outre, les CSMs–GW répriment les cellules T de stimulées allogéniques à une plus grande mesure que soit les CSMs–BM ou de cellules souches mésenchymateuses dérivées de tissu adipeux (Prasanna, Gopalakrishnan et al. 2010). Les Cellules souches mésenchymateuses dérivées du foie fœtal suppriment les réponses lymphoprolifératives aux mitogènes, mais ne diminuent pas les réponses allo-prolifératives (Gotherstrom, Ringden et al. 2003). Dans ce contexte, les CSMs péri-natales, comme les CSMs–GW, semblent non seulement atténuer la lymphoprolifération de façon plus importante que les CSMs–BM, mais aussi régler du stimulus indépendant contrairement aux MSC fœtales. En outre, les CSMs–GW peuvent affecter la maturation et l'activation des cellules précurseurs dendritiques (DC) (Prasanna, Gopalakrishnan et al. 2010). Les CSMs–GW, lorsqu'elles sont cultivées avec des monocytes CD14⁽⁺⁾, leur différenciation en DC matures est inhibée par d'une manière dépendante de contact. Les monocytes en co-culture avec des CSMs–GW ont été présentés à se enfermer dans un phénotype immature DC et la régulation positive de ligands de co-stimulation a été bloquée dans les co-cultures (Prasanna, Gopalakrishnan et al. 2010). Ainsi, les CSMs–GW pourraient affecter indirectement les réponses allogéniques de cellules T à travers l'atténuation des fonctions DC. Il y a un nombre limité d'études des populations purifiées de cellules immunitaires traçant étroitement leurs fonctions d'activation et effectrices en présence des CSMs–GW. Un changement dans le seuil et la cinétique de la sécrétion d'IL-2 a été observé uniquement avec les BM-MSCs et non avec les CSMs–GW. De plus, une activation précoce des ligands de costimulation négatifs sur des lymphocytes de sang périphérique a été observée de façon plus évidente avec des co-cultures des CSMs–GW. Bien que les principaux profils sécrétoires de différentes CSM de tissus dérivés sont similaires, les CSMs–GW et les CSMs de sang de cordon ne sécrètent pas de l'IL-12, IL-15 et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) (Kim, Staples et al. 2013; Kim and Cho 2013; Lee, Jeong et al. 2014). En résumé, les mécanismes putatifs des propriétés immunomodulatrices des CSMs–GW comprennent la régulation positive de ligands de costimulation négatifs, la sécrétion de facteurs solubles immunosuppresseurs, la production de cellules de mémoire, la fusion cellulaire de se échapper reconnaissance, des mécanismes immunitaires spécifiques d'évitement à l'interface materno-fœtale, l'atténuation des fonctions des cellules présentant l'antigène, modifiées migration des cellules immunitaires, et une anergie des cellules T de l'apoptose tolérance.

2.3.4 Caractérisation phénotypique des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton

Les antigènes de surface SH2 (CD105), SH3 (CD73), et Thy-1 (CD90) sont largement utilisés pour l'identification des CSM issues de la gelée de Wharton. Ces marqueurs sont également exprimés par les cellules hématopoïétiques et endothéliales, par conséquent, il est nécessaire de bien exclure les cellules d'origine hématopoïétique ou endothéliale en étudiant l'expression des marqueurs de surface comme CD34, CD45 ou CD31 (Margossian, Reppel et al. 2012). Le récepteur CD44 est également un marqueur communément admis. En effet, chez les mammifères, la matrice extracellulaire du cordon ombilical est un tissu contenant une forte teneur en acide hyaluronique. Les caractéristiques mésenchymateuses de cellules issues de la gelée de wharton ont été confirmées par l'expression de marqueurs cytosquelette spécifiques, tels que SMA et la vimentine (Al-Nbaheen, Vishnubalaji et al. 2013). En outre, les marqueurs ESC, comme CD59, CD146, Oct-4, SSEA4, Nucleostemin, SOX-2 et Nanog, ont également été révélés (Mikaeili Agah, Parivar et al. 2013). CD59 est impliqué dans la régulation du système du complément empêchant ainsi la lyse cellulaire. CD146 est une molécule d'adhésion cellulaire exprimée non seulement sur les cellules endothéliales, mais aussi sur les cellules souches mésenchymateuses (Noort, Oerlemans et al. 2012; Al-Nbaheen, Vishnubalaji et al. 2013). En outre, les cellules human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs) tachent plus fortement que les CSMs-GW pendant pan-cytokératine (Lang, Schweizer et al. 2008). Ce groupe a suggéré que les HUCPVCs sont plus différenciées que les CSMs-GW, ce qui explique pourquoi les cellules HUCPV peuvent ne pas se différencier en cellules neuronales. La caractéristique la plus remarquable des cellules souches mésenchymateuses de la lignée cordon (CSMs-CL) est l'expression de CD14 qui n'est pas exprimée dans les CSMs-GW, CD14 est largement reconnue comme un marqueur commun pour macrophages (Chamberlain, Fox et al. 2007). La fonction et la signification de l'expression de CD14 sur les CSMs-CL ne sont pas encore déterminés, mais il est intéressant de noter que la forme soluble de CD14 peut diminuer l'activation des cellules T (Wang, Ji et al. 2012). La caractéristique la plus frappante des CSMs-GW est leur capacité unique d'exprimer l'isoforme HLA-G6 (Tondreau, Lagneaux et al. 2004). HLA-G6 est impliqué dans la modulation immunitaire (Blaschitz, Juch et al. 2005). Ainsi, les CSMs-GW sont particulièrement appropriées pour une thérapie à base de cellules. Des preuves *in vitro* et *in vivo* indiquent que la gelée de wharton constitue une excellente source de cellules souches mésenchymateuses parce que ses cellules présentent une large gamme d'applications thérapeutiques potentielles. En outre, Conconi et collègues signalent que CD105⁽⁺⁾/CD31⁽⁻⁾/KDR⁽⁻⁾ cellules des la gelée de wharton sont capables non seulement de différencier *in vivo* vers la lignée myogénique, mais aussi contribuent au processus de régénération musculaire (Conconi, Burra et al. 2006). Ce potentiel de différenciation myogénique des cellules CD105⁽⁺⁾ de la gelée de wharton a été confirmé en utilisant des essais *in*

vitro. En résumé, les CSMs du cordon ombilical représentent une population de cellules adhérentes qui partagent un ensemble de marqueurs de surface avec les CSM adultes, y compris CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD51, CD73/SH3, CD90 (Thy-1), CD105/SH2, CD106, le CD117, CD166 et HLA-1/HLA ABC, et sont négatives pour les marqueurs hématopoïétiques (par exemple, CD14, CD34, CD38, CD45 et HLA-DR) et endothéliaux (CD31 négatif)(Paniushin, Domaratskaia et al. 2006; Chamberlain, Fox et al. 2007; Al-Nbaheen, Vishnubalaji et al. 2013).

Fait intéressant, les caractéristiques biologiques des cellules souches mésenchymateuses peuvent être influencées par l'environnement périnatal. Il y a plus de preuves que les perturbations métaboliques intra-utérins produites par l'hyperglycémie durant la grossesse semblent augmenter le risque chez la progéniture de l'obésité et le diabète(Dabelea and Pettitt 2001; Clausen, Mathiesen et al. 2008; Hu, Wang et al. 2014). En outre, des études sur des modèles animaux suggèrent que l'engagement des CSMs en pré-adipocytes commence pendant le développement fœtal et la vie périnatale(Tang, Zeve et al. 2008). Comme le nombre de pré-adipocytes et d'adipocytes matures est inférieur chez les sujets normaux que chez les sujets obèses, les changements dans le processus de maturation prénatale peuvent jouer un rôle dans la pathogenèse de l'obésité et les maladies métaboliques associées(Tchoukalova, Koutsari et al. 2007; Cignarelli, Perrini et al. 2012). Pour cette raison, il serait utile d'étudier comment l'environnement peut affecter périnatale CSMs foetus dérivés, en particulier dans le diabète gestationnel non réglementé(Cignarelli, Perrini et al. 2012). Récemment, Hu et al., ont comparé les CSMs-GW obtenues à partir de cordon ombilical des deux mères en bonne santé et diabétiques, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les maladies métaboliques chez les enfants de mères diabétiques(Hu, Yu et al. 2013). Bien que les mêmes repères ont été exprimés dans les CSMs-GW obtenues à partir de mères saines et diabétiques, leurs niveaux d'expression sont différents, probablement en raison d'une différence dans les caractéristiques fonctionnelles des deux groupes de CSMs-GW(Liu, Chai et al. 2011). Les taux inférieurs de CD90 ont été observés dans la CSMs-GW de mères diabétiques, qui pourrait être le résultat d'une diminution de la plasticité de ces cellules. Il a également été montré que des cellules provenant de mères diabétiques ont présenté une plus grande efficacité dans la différenciation adipocytaire, par rapport aux CSMs-GW obtenues à partir de mères saines, ce qui suggère, par conséquent, un éventuel pré-engagement de ces cellules dans la lignée adipogénique (Hu, Yu et al. 2013; Wang, Li et al. 2014). En outre, la régulation positive de CD44, CD29, CD73, CD166, SSEA4 et TERT dans les CSMs-GW obtenues à partir de mères diabétiques pourrait être liée à la légère augmentation de la capacité de prolifération de ces cellules. Les résultats indiquent que, contrairement aux cellules de mères saines, les CSMs-GW de mères diabétiques affichent une capacité élevée à se différencier vers la lignée adipogénique (Perrini, Cignarelli et al. 2009; Cignarelli, Perrini et al. 2012; Na, Kim et al. 2012). Ceci suggère que l'environnement utérin diabétique peut être responsable d'un «pré-engagement» qui pourrait donner lieu dans la vie post-natale à une altération de la production d'adipocytes sur un style de mauvaise alimentation, qui à son tour produire l'obésité.

2.4 Applications des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton en pathologies hépatiques

Les applications cliniques potentielles des CSMs sont nombreuses. Les cadres physiopathologiques des pathologies ou lésions faisant l'objet d'un essai sont variés, comprenant les séquelles d'ischémie, la prévention ou le traitement de pathologies dysimmunitaires, dont le support de greffes de cellules hématopoïétiques ou de tissus solides, des pathologies dégénératives et dysfonctions d'organes aiguës ou chroniques, ainsi que quelques maladies monogéniques(Nekanti, Mohanty et al. 2010; Taghizadeh, Cetrulo et al. 2011; Batsali, Kastrinaki et al. 2013; Kim, Staples et al. 2013). La grande majorité des essais repose sur l'injection des CSMs amplifiées, et un seul repose sur la modification de leur phénotype sécrétoire avant injection. Les essais ne reposant pas sur la thérapie cellulaire à strictement parler mais plutôt sur l'ingénierie tissulaire ont pour objet principal la réparation osseuse et cartilagineuse(Batsali, Kastrinaki et al. 2013). Les CSMs, ou cellules mononucléées de la moelle osseuse, y sont injectées directement avec des molécules mimant une matrice extracellulaire comme l'acide hyaluronique, ou déposées après culture sur un biomatériau permettant de combler une perte de substance (Taghizadeh, Cetrulo et al. 2011; Kim, Staples et al. 2013).

Les Cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton sont immunologiquement privilégiées. Elles invoquent une activité immunitaire minimale, et en outre, peuvent posséder des propriétés anti-inflammatoires et des effets immunomodulateurs. Ces cellules expriment l'antigène du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) et expriment des niveaux faibles d'antigènes du CMH de classe II, relativement moins que les CSMs de la moelle osseuse (Christodoulou, Kolisis et al. 2013; Kim, Staples et al. 2013; Mennan, Wright et al. 2013). Actuellement plusieurs études suggèrent que les CSMs de la gelée de Wharton ne nécessitent pas une compatibilité envers les tissus, leur permettant ainsi d'être une source de thérapie cellulaire allogénique. La capacité immunosuppressive de ces cellules possède le potentiel pour traiter de nombreux troubles, y compris la réaction du greffon (GvHD) (Caimi, Reese et al. 2010; Bernardo, Pagliara et al. 2012), les maladies du foie(Forbes and Newsome 2012; Moore, Stutchfield et al. 2014), le diabète(Hu, Wang et al. 2014; Wang, Li et al. 2014), et les tumeurs cancéreuses(Nagamura-Inoue and He 2014). Bien qu'il y ait peu d'essais cliniques en cours avec les CSMs de la gelée de Wharton, plusieurs essais pré-cliniques ont été menés pour proposer les avantages cliniques possibles de cette source de cellules. Plusieurs témoignages ont été étudiés chez les animaux, y compris la traitement des maladies du foie, la reconstitution hématopoïétique (Friedman, Betancur et al. 2007), la maladie de Parkinson(Fu, Cheng et al. 2006; Yan, Sun et al. 2013), le diabète(Chao, Chao et al. 2008; Wang, Li et al. 2014), la dégénérescence maculaire (Lund, Wang et al. 2007) et les lésions médullaires(Yang, Shih et al. 2008; Ryu, Kang et al. 2012).

La thérapie cellulaire est également apparue comme une alternative intéressante à la transplantation orthotopique du foie pour le traitement d'une maladie du foie. Les CSMs-GW ont démontré un potentiel à se différencier en lignée endodermique, y compris les cellules hépatocytes-like. L'utilisation des cellules souches mésenchymateuses de cordon ombilical pour la thérapie des cellules hépatiques a été décrite *in vitro* et *in vivo* (Scheers 2011). Les CSMs-GW représentent une source de cellules très attractive pour le traitement d'une maladie du foie car elles présentent plusieurs marqueurs hépatiques caractérisant les étapes successives de développement du foie (Moore, Stutchfield et al. 2014). En outre, des expériences *in vivo* ont montré que, après transplantation de CSMs-GW indifférenciées dans le foie de souris SCID avec une hépatectomie partielle, les greffées cellulaires ont exprimé des marqueurs hépatiques humains comme l'albumine et AFP, après 2, 4 et 6 semaines après la transplantation. Cela suggère fortement que les CSMs-GW pourraient être d'un grand intérêt pour la médecine régénérative dans les maladies du foie (Campard, Lysy et al. 2008). Récemment, Buyl a montré que les cellules souches mésenchymateuses humaines dérivées de la gelée de Wharton représentent une population de cellules souches intéressante pour développer des hépatocytes humains (Buyl, De Kock et al. 2014). Ils ont fait une analyse en profondeur de l'expression de facteurs de transcription spécifiques du foie et d'autres marqueurs hépatiques cruciaux dans les CSMs-GW qui est évaluée à la fois l'ARNm et des protéines. Les résultats révèlent que les facteurs de transcription qui sont obligatoires pour acquérir et maintenir un phénotype adulte hépatique (HNF4A et HNF1A), ainsi que des marqueurs hépatiques adultes (ALB, CX32, CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6 et CYP3A4) ne sont pas exprimés dans les cellules mais à l'exception de K18. Par contre, les facteurs de transcription impliqués dans le développement du foie (GATA4, gata6, SOX9 et Sox17) et les marqueurs de souches du foie (DKK1, DPP4, DSG2, Cx43 et K19) ont été trouvés fortement exprimés dans les CSMs-GW (Buyl, De Kock et al. 2014). Ces résultats fournissent une indication supplémentaire que les CSMs-GW pourraient être une source prometteuse de cellules souches pour générer des cellules nécessaires pour le développement d'un modèle fonctionnel *in vitro* en fonction du foie humain hépatocytes analogue. Fait intéressant, une autre étude suggère un rôle de soutien des CSMs-GW indifférenciées à sauver les fonctions du foie et la réduction de la fibrose blessé *in vivo*. Cette étude confirme l'hypothèse selon laquelle, même en l'absence d'un processus de transdifférenciation réel, les CSMs-GW pourraient exercer une action favorable dans l'augmentation de la récupération fonctionnelle du foie bénéficiaire, peut-être en stimulant la différenciation des cellules parenchymateuses endogènes et promouvant de la dégradation de la matrice fibreuse (Anzalone, Lo Iacono et al. 2010; Kamolz, Keck et al. 2014; King and Newsome 2014). En outre, leur capacité de différenciation en lignée hépatique peut être améliorée *in vivo* et *in vitro* après culture avec des facteurs hépatogène (Boruckowski, Gladysz et al. 2015). Dans le traitement de la cirrhose du foie, des CSMs-GW ont des propriétés anti-inflammatoires et anti-fibrose par des facteurs endogènes sécrétés tels que les métalloprotéinases (Lee, Jeong et al. 2014). Cette capacité de se différencier en hépatocytes visant à mieux comprendre

que les cellules peuvent repeupler et de sauvetage de la fonction du foie (Anzalone, Lo Iacono et al. 2010).

3 l'ingénierie tissulaire et la reconstruction d'organe

3.1 Définition et concepts généraux de l'ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire est un domaine fortement interdisciplinaire combinant les principes et les techniques des sciences de la vie avec ceux de l'ingénierie et de la chimie afin de développer des matériaux capables de soigner, améliorer ou remplacer des tissus malades ou endommagés (Langer and Vacanti 1993). Le principe général est d'associer une matrice tridimensionnelle avec des cellules autologues/allogéniques et des facteurs de croissance pour reconstruire un nouveau tissu hybride. Une des premières expériences démontrant que la génération d'un tissu peut être possible a été réalisée par Bisceglie en 1933 dans laquelle des cellules tumorales de souris ont été implantées au sein d'une membrane de polymère pour être insérées ensuite dans la cavité abdominale d'un porc (Bisceglie 1933). Cette discipline émergente depuis les années 1990 dans le domaine biomédical s'étend de l'élaboration du matériau à implanter jusqu'au contrôle des réponses cellulaires, de la manipulation de l'environnement de cicatrisation jusqu'au contrôle de la structure du tissu régénéré, mais consiste aussi en la production de cellules et de tissus nécessaires pour les transplantations. L'objectif principal est le développement d'organes de remplacement, cependant, l'ingénierie tissulaire peut contribuer également à mettre au point des modèles d'études pour la biologie.

Selon Langer, trois stratégies ont été adoptées pour la création de nouveaux tissus (Langer and Vacanti 1993). Cependant la méthode la mieux appropriée et la plus généralement utilisée est représentée par la Figure 26. Cette stratégie implique 5 étapes principales :

- 1) l'identification d'une source de cellules et leur prélèvement.

- 2) leur multiplication et différenciation.

- 3) les cellules sont associées à une matrice (matériau biocompatible) ainsi qu'à des molécules bioactives. Le matériau est capable d'être utilisé comme support pour la croissance cellulaire (système ouvert) ou d'intégrer les cellules (système fermé). Cette structure doit être isolée ou synthétisée selon la forme et les dimensions désirées.

- 4) les cellules doivent êtreensemencées uniformément sur et/ou dans le matériau puis proliférer dans un bioréacteur.

- 5) enfin, la « structure » d'ingénierie tissulaire est réimplantée chez le patient. Une vascularisation adéquate peut être nécessaire en fonction du site d'implantation.

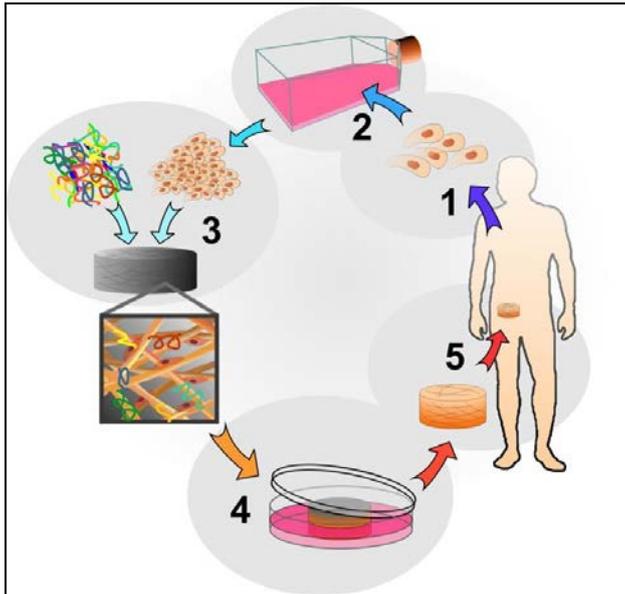


Figure. 26 La schéma illustrant le concept de l'ingénierie tissulaire

(http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2007_Groups/group12/Homepage.html)

En utilisant cette approche, plusieurs équipes de recherche ont tenté d'élaborer les différents organes chez les mammifères. Des tissus produits par ingénierie tissulaire provenant de l'ectoderme ont été développés dans le cadre de déficience du système nerveux associant les maladies neurologiques, comme la maladie de Parkinson. Cet axe de recherche représente un des axes majeurs de l'ingénierie tissulaire (Shoichet, Tate et al. 2008; Subramanian, Krishnan et al. 2009). D'autres études ont permis d'élaborer des tissus artificiels pour la régénération et la greffe de peau afin d'apporter une alternative aux traitements de brûlures (Pomahac, Svensjo et al. 1998; Bhardwaj, Sow et al. 2014; Wu, Fan et al. 2014) mais aussi vers la réalisation de cornées artificielles pour remplacer celles des patients atteints de cécité cornéenne (Duan, Klenkler et al. 2006; Shah, Brugnano et al. 2008). Le développement d'organe de remplacement issus de l'endoderme a aussi été exploré avec des recherches portant sur le foie (Fiegel, Lange et al. 2006; Adwan, Fuller et al. 2013; Su, Li et al. 2014), la vessie (Vaz, van Tuijl et al. 2005; Korossis, Bolland et al. 2006) et l'urètre (Atala 2011; Feil, Daum et al. 2011; Vaegler, Amend et al. 2013). Pour les tissus issus du mésoderme, les travaux d'ingénierie tissulaire ont permis de générer des fibres musculaires susceptibles d'être utilisées pour les traitements de muscles endommagés, des maladies cardiaques, des dystrophies musculaires (Klumpp, Horch et al. 2010; An and Li 2014) mais aussi pour la conception de vaisseaux sanguins artificiels (Zakhem, Raghavan et al. 2012). Deux axes de recherche également très actifs sont ceux de l'ingénierie des tissus cartilagineux (Balakrishnan and Banerjee 2011; Liu, Yu et al. 2013), et en particulier des tissus osseux (Lee and Shin 2007; Jang, Castano et al. 2009; Jurgens, Kroeze et al. 2011; Mravic, Peault et al. 2014; Shahini, Yazdimamaghani et al. 2014).

3.2 Une nouvelle ingénierie tissulaire innovante: le développement d'organe auto-construit

La lutte contre l'insécurité routière a permis de réduire régulièrement la mortalité sur les routes. Cette bonne nouvelle implique cependant une réduction du nombre de greffons. Depuis plusieurs années et malgré les différents appels de la communauté médicale, on constate une véritable pénurie d'organes et de tissus à greffer (Sullivan, Radosevich et al. 2014). En 2012, 5 023 greffes d'organes ont été réalisées en France. Une tendance à la hausse qui ne suffit pas à combler le fossé entre le nombre de greffons et de patients en attente. Chaque année, plus de 15 600 personnes ont besoin d'une greffe d'organe (<http://www.doctissimo.fr/>). Pour pallier cette pénurie d'organes, diverses solutions ont été envisagées, avec un succès très relatif:

- Les transplantations à partir de donneurs vivants soulèvent encore trop de problèmes éthiques et sont, de toutes manières, limitées à certains organes;
- Pendant un temps, les chercheurs ont exploré la voie des xéno-greffes, mais face aux problèmes de rejet des organes d'origine animale, ils ont abandonné cette voie (Trabuco, Klingele et al. 2007; Kashofer, Tschernatsch et al. 2009);
- Les organes artificiels sont également apparus très prometteurs, mais le fait qu'ils se limitent au rein et, dans certaines conditions d'utilisation, au cœur, et surtout qu'ils altèrent considérablement la qualité de vie, a obligé les scientifiques à imaginer d'autres approches (Malchesky 2006; Malchesky 2014).

Face à cette pénurie, les chirurgiens et scientifiques doivent envisager d'autres recours. Lors d'une séance commune des Académies nationales de Médecine et de Chirurgie, les experts ont fait le point sur les avancées de la recherche sur le développement d'organes auto-construits. Le principe : reconstruire un "organe neuf" en se servant de l'organe atteint comme d'une matrice après l'avoir dépeuplé de ses cellules malades pour le recoloniser avec des "cellules neuves". Pour cela, on utilise des cellules souches capables de se différencier et de donner naissance aux cellules fonctionnelles voulues (An and Li 2014). Il est également envisageable de créer une matrice de synthèse, qui serait repeuplée de cellules souches (Liu, Yu et al. 2013; Meng, Leslie et al. 2014).

Aux États-Unis, des essais menés sur des tissus ont été réalisés avec succès, ouvrant la voie à la médecine régénérative : ménisques, cornées, urètres, artères et même vagins ont ainsi été recréés à partir de cellules de patients. Mais du tissu à l'organe il y a un pas, que la science peine à franchir car les obstacles sont nombreux.

Tout d'abord, l'origine des cellules souches. L'utilisation des cellules souches embryonnaires soulève toujours des problèmes éthiques, même si les lois de bioéthique ont ouvert une brèche lors de leurs révisions en juillet 2011. Il est interdit de "travailler" sur ces cellules sauf en cas de dérogation justifiée par de possibles "progrès médicaux majeurs" (Tondeur, Assou et al. 2008; Trounson, Daley et al. 2013). Des progrès majeurs ont été récemment obtenus avec ces cellules souches

pluripotentes induites dites IPS : il s'agit de cellules ayant les propriétés de cellules souches (Laurent, Ulitsky et al. 2011; Toivonen, Ojala et al. 2013), produites à partir de cellules déjà matures et spécialisées de notre organisme, comme celles de la peau. Ces cellules présentent l'avantage de ne pas susciter de réactions de rejets immunologiques, provenant elles-mêmes du patient à traiter (Toivonen, Ojala et al. 2013). Mais là encore, les travaux, même s'ils sont assez avancés chez l'animal, n'ont pas été appliqués à l'homme. Le risque de prolifération cancéreuse de ces cellules reste également à évaluer (Fontes, Macarthur et al. 2013; Song, Carroll et al. 2014). De plus, se pose le problème de la production en grandes quantités de telles cellules : reconstruire des organes requiert un nombre de cellules souches autrement plus important que pour des tissus.

Récemment, du fait que les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton possèdent la capacité de migration vers un tissu lésé (homing), de leur faible immunogénicité permettant d'envisager une utilisation allogénique, de leur fortes capacités d'auto-renouvellement et de se différencier vers des cellules diverses en culture *in vitro*, et de l'absence de considérations éthiques liées à leur origine, grâce à ces propriétés, l'intérêt que suscitent ces cellules en médecine régénérative depuis maintenant deux décennies (Taghizadeh, Cetrulo et al. 2011; Chang, Hou et al. 2014; Kamolz, Keck et al. 2014; Liu, Hou et al. 2014; Zhang, Zhao et al. 2015). Donc, nous avons isolés des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton issue du cordon ombilical humain et puis elles sont cultivées *in vitro* afin d'ensemencer les CSMs-GW dans l'échafaudage hépatique acellulaire. Les CSMs-GW peut-être une source cellulaire idéal dans le domaine du développement d'organes auto-construits.

3.3 L'importance des scaffolds dans le domaine de l'ingénierie tissulaire

Un élément clé dans le domaine de l'ingénierie tissulaire est l'utilisation des « scaffolds », littéralement échafaudage en anglais, qui sont des architectures sophistiquées tridimensionnelles. Ces scaffolds bioactifs ont été considérés comme archétype pour favoriser les interactions cellulaires et la formation de la matrice extracellulaire (MEC), qui fournit un support structurel au tissu nouvellement généré. Les constituants majeurs de la MEC sont des protéines (élastine), des glycoprotéines (collagène, fibronectine, etc...), des glycoaminoglycanes, des protéoaminoglycanes et dans le cas de matrices osseuses des sels minéraux (hydroxyapatite et phosphate de calcium) (Welf, Naik et al. 2011; Lin, Yang et al. 2014). La réalisation d'une architecture temporaire capable de mimer les fonctions physiologiques de la MEC est primordiale pour préserver la capacité des cellules à se différencier vers différents phénotypes mais aussi pour constituer un matériau apte à combler la lésion tissulaire (Robertson, Dries-Devlin et al. 2014; Teodori, Costa et al. 2014). Le scaffold est une matrice 3D utilisée comme biomatériau en ingénierie, qui en

mimant la matrice extra cellulaire permet la formation d'un néo-tissus et aboutit à la croissance tissulaire; c'est le biomimétisme tissulaire. Dans l'idéal, le scaffold avec matrices 3D doit permettre une prolifération et une différenciation 3D *in vitro* très similaire à celle obtenue *in vivo*. Elle facilite aussi l'agrégation cellulaire. Ainsi, l'utilisation de ces matrices, limite le besoin en cellules et en facteurs de croissance. Elle va guider la régénération et former une structure 3D grâce à l'obtention d'interactions cellule/cellule et cellule/matrice (Handschel, Depprich et al. 2007). Les scaffolds ont de nombreux rôles dans la régénération médicale (Pandit, Malik et al. 2011):

- ils supportent la migration cellulaire.
- ils peuvent renforcer structurellement le défaut pour maintenir sa forme initiale.
- ils forment une barrière contre l'infiltration par des éléments qui empêcheraient la régénération.
- ils servent de matrice pour l'adhésion cellulaire avant absorption.

Le scaffold joue un rôle dans l'attachement cellulaire, la rétention spatiale, la détermination de la morphologie, le recrutement de l'oxygène et des nutriments. Il existe différents types de scaffold. Le choix du scaffold va dépendre de propriétés importantes; la porosité, la biocompatibilité, la conductivité tissulaire et le taux de résorption (Hynes, Menicanin et al. 2012), selon ce que l'on pourrait appeler leur « fonctionnalisation cellulaire » : des scaffolds non cellularisées et décellularisées.

Les scaffolds non cellularisées constituent des matrices biodégradables sur lesquelles aucune cellule n'a étéensemencée, seuls les facteurs de signalisations (protéines ou facteurs de croissance) sont présents. Ils participent à la régénération de la lésion en stimulant les cellules résiduelles du patient. Ils représentent une alternative à la greffe (Matsumura, Nitta et al. 2012).

Les scaffolds constituent des dispositifs décellularisés lorsque tout le matériel cellulaire a été éliminé; elles sont immunologiquement inertes (Girard, Jensen et al. 2013). Cela permet de fabriquer des matrices commercialisables à plus grande échelle, sans risque de transmission de maladie. Ainsi, dans ce travail, nous avons utilisé une technique de décellularisation du foie de rat avec du SDS et du Triton-X 100 par perfusion continue pour obtenir des squelettes décellularisés (Ye, Stoltz et al. 2015).

Dans l'optique d'élaborer la structure tridimensionnelle la mieux adaptée à la régénération du foie, le matériau doit répondre à divers critères afin de remplir au mieux ses fonctions (Nieto and Lutolf 2011). Le matériau doit avant tout être biocompatible, c'est-à-dire qu'il ne doit pas provoquer de réaction inflammatoire importante ni de toxicité au niveau des tissus receveurs et des cellules qu'il peut héberger (Brown, Barnes et al. 2010; Nieto and Lutolf 2011). Une interface optimale entre le matériau et le tissu hôte est nécessaire pour assurer le processus de conduction hépatique qui définit la capacité du matériau à permettre l'adhésion, la migration des cellules, le développement d'un réseau vasculaire et le dépôt de tissus phagocytaires (Nieto and Lutolf 2011; He, Liu et al. 2013; Lee, Shin et al. 2014). En plus des propriétés de biocompatibilité, les matériaux doivent présenter des propriétés mécaniques similaires à celles de la zone à remplacer et suffisantes pour

maintenir la morphologie du biomatériau pendant le développement des cellules (Ohashi, Kay et al. 2005; Sellaro, Ravindra et al. 2007; Brown, Barnes et al. 2010; Lee, Shin et al. 2014). La sélection des matériaux utilisés doit donc tenir compte de l'évolution de leur comportement mécanique au cours de leur dégradation afin qu'ils conservent leur intégrité structurelle jusqu'à la formation du nouveau tissu biologique. Par conséquent, la biodégradation et biorésorption doit s'effectuer à un taux comparable à celui de la génération et du remodelage des tissus en cours de formation (Brown, Barnes et al. 2010; Kasoju and Bora 2012).

En résumé, le concept d'ingénierie tissulaire est basé sur le triptyque cellules/biomatériaux/facteurs biologiques dans le but de générer un tissu hybride (Merceron, Vinatier et al. 2008). Afin d'améliorer la fonctionnalité du tissu néoformé et d'obtenir une nouvelle matrice tridimensionnelle la plus appropriée possible du tissu d'origine, une source abondante de cellules saines est nécessaire (Ma, Both et al. 2014; Xu, Xu et al. 2014). Une des sources cellulaires pouvant servir à cette amélioration est : les cellules souches mésenchymateuses (Romagnoli and Brandi 2014).

3.4 La préparation de scaffold d'organe-complet

3.4.1 Généralités sur les scaffolds d'organes-complets

La transplantation d'organes dans un endroit orthotopique est actuellement le traitement de référence de l'insuffisance organique à la phase terminale. Environ, 27,000 décès surviennent chaque année aux États-Unis seulement pour les patients atteints de maladie hépatique au stade terminal, 120,000 décès surviennent à la suite d'une maladie pulmonaire chronique, 112,000 d'une maladie rénale en phase terminale et 425,000 d'insuffisance cardiaque (Soto-Gutierrez, Zhang et al. 2011). Toutefois, la demande d'organes appropriés pour la transplantation dépasse de loin le nombre de donateurs d'organes disponibles. Cette grave pénurie de donateurs a conduit au développement de nouvelles technologies visant à créer des organes solides pour la transplantation dans le laboratoire en utilisant l'ingénierie tissulaire et des stratégies régénératives fondées sur la médecine. Le but de l'ingénierie tissulaire est de reconstruire des tissus ou des organes, afin de remplacer les pièces endommagées ou blessés du corps. Les principales composantes des approches d'ingénierie tissulaire sont des cellules spécifiques des tissus, des biomatériaux (système d'échafaudage) et un environnement approprié pour promouvoir la maturation des tissus / formation. La combinaison appropriée de ces composants peut conduire à la création d'un tissu *in vitro* et construire ces constructions peuvent faciliter la création de produits de remplacement de tissus fonctionnels suivants dans l'implantation *in vivo* (Langer and Vacanti 1993). Récemment, le domaine de la médecine régénérative a émergé grâce à l'intégration de l'ingénierie tissulaire, biologie des cellules souches, les sciences des matériaux, la biologie du

développement et de la biologie moléculaire. L'objectif est de créer des tissus fonctionnels ou des organes pour une utilisation dans les procédures de réparation ou de remplacement chez les patients sur la base de clinique approches pertinentes (Atala 2007; Toyoda and Umezawa 2014). Les progrès récents dans l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative ont conduit à la création de tissus et d'organes fonctionnels *in vitro* et la intégration bénéficiaire. Des progrès significatifs ont été réalisés dans le développement des tissus d'ingénierie comme les vaisseaux sanguins (L'Heureux, McAllister et al. 2007), la vessie et de la trachée (Atala, Bauer et al. 2006). Toutefois, il convient de noter que ces tissus n'ont pas besoin d'un grand réseau vasculaire pour devenir fonctionnel. Les constructions d'organes entiers tels que le cœur, les poumons, le foie et les reins sont beaucoup plus grandes, et elles exigent un accès immédiat à l'approvisionnement en sang du donneur après la transplantation afin d'obtenir des nutriments et de l'oxygène. Un des défis dans l'ingénierie d'organes solides est le développement d'une nouvelle méthode qui pourrait produire des organes avec les réseaux vasculaires intacts qui sont capables d'échanges de nutriments et de gaz (Baptista, Siddiqui et al. 2011). Bien que les chercheurs aient utilisé diverses techniques pour imiter la structure d'un réseau vasculaire dans les tissus d'ingénierie, y compris les matériaux synthétiques et artificielles échafaudages, leurs efforts n'ont pas tout à fait réussi.

Une solution possible à ce défi est d'utiliser les organes solides, d'obtenir des structures naturelles intacts qui incluent les réseaux vasculaires. En décellularisant un organe entier, un scaffold de l'organe décellularisé contenant une microarchitecture tissulaire avec un système vasculaire original intact, peut être obtenu. Des progrès significatifs dans le domaine de la conception de bioscaffold ont conduit à la possibilité d'utiliser divers tissus décellularisés que échafaudages en ingénierie tissulaire et les stratégies de la médecine régénérative. Des techniques de décellularisation simples ont été développées. Elle permettent l'élimination des composants cellulaires à partir d'organes de donneurs, tout en conservant l'architecture d'origine du tissu, et ces techniques ont été utilisées pour la fabrication de fines matrices simplement structurées, tels que des valves cardiaques et des petites sous-muqueuses intestinales (SIS) (Badylak 2005). Au cours des dernières décennies, ces tissus décellularisés ont été utilisés avec succès en tant que modèles pour les stratégies d'ingénierie tissulaire. Le succès de cette approche suggère que la technique de décellularisation est une méthode appropriée qui peut être utilisée non seulement pour produire des tissus acellulaires simplement structurés, mais pour fabriquer des structures d'organes complexes avec vascularisation intacte si des modifications sont apportées aux protocoles de décellularisation.

Les techniques de décellularisation complète d'organe sont basées sur des techniques de décellularisation traditionnelles. Cependant, contrairement à la simple agitation ou la diffusion uniquement utilisée justement peut-être convenable comme la méthode de décellularisation pour obtenir des matrices de tissus minces et simplement structurées, la décellularisation de grands organes nécessite un traitement plus sophistiqué en raison de l'épaisseur et des structures complexes intrinsèques de ces organes. A cet effet, les protocoles de décellularisation à base de

perfusion ont été appliqués à des organes solides pour permettre l'élimination efficace de toutes les cellules natives et de l'ADN résiduel, tout en maintenant l'intégrité structurelle de l'ECM de l'organe. En outre, ces procédés de décellularisation à base de perfusion, sont capables de préserver le système vasculaire normal et cet échafaudage vasculaire peut ensuite être utilisé en tant que modèle pour l'ensemencement cellulaire ultérieur avec des cellules parenchymateuses fonctionnelles ou des populations de cellules progénitrices sélectionnées. Lorsqu'il est combiné avec des techniques de recellularisation efficaces, les structures d'organes complets ont été fabriqués *in vitro* et ces organes complets comme le cœur(Ott, Matthiesen et al. 2008; Wainwright, Czajka et al. 2010), le poumon(Cortiella, Niles et al. 2010), et le foie(Barakat, Abbasi et al. 2012; Pan, Hu et al. 2013; Yagi, Fukumitsu et al. 2013; Ye, Stoltz et al. 2015) ont été appliquées aux études pré-cliniques *in vivo* utilisant des modèles de petits animaux. Bien que de nombreux défis restent à relever, y compris la détermination des espèces de candidats à partir de laquelle l'organe du donneur peut être récolté et les méthodes optimales de décellularisation de l'organe du donneur, les progrès récents dans les techniques d'ingénierie du scaffold d'organe-complet se montrent très prometteuses pour de futurs essais cliniques(Ren, Shi et al. 2013; Yagi, Soto-Gutierrez et al. 2013).

3.4.2 La technique décellularisée du scaffold d'organe-complet

Contrairement aux procédés d'agitation simple utilisés pour décellulariser des tissus relativement minces en utilisant des détergents, la préparation d'un échafaudage à partir d'un grand organe-complet de mammifère, nécessite plusieurs étapes sophistiquées. Plusieurs facteurs peuvent affecter la capacité de la décellularisation de tissus / organes comprennent : (a) la densité cellulaire d'un tissu ou organe particulier ; (b) la densité spécifique du tissu / organe ; (c) la teneur en lipides ; (d) l'épaisseur du tissu / organe et (e) des propriétés de l'agent de décellularisation sélectionné(Crapo, Gilbert et al. 2011). Comme les agents de décellularisation peuvent également avoir un impact négatif sur la composition native de l'ECM et la structure au cours du processus de décellularisation, la sélection de ces agents, avec le développement de nouveaux protocoles, ont été considérés comme des étapes critiques du processus. Pour atteindre cet objectif, plusieurs groupes d'agents de décellularisation ont été explorés tels agents comprennent : (a) non ionique (Triton-X), ioniques (sodium dodécylsulfate: SDS) et des détergents zwitterioniques ; (b) des agents enzymatiques ; (c) les agents physiques et (d) de l'application directe de la force(Crapo, Gilbert et al. 2011). Il doit être entendu que tout agent d'élimination de cellule est un procédé modifie la composition de l'ECM et de provoquer un certain degré de perturbation de l'ultrastructure. La minimisation de ces effets indésirables plutôt que l'évitement complet est l'objectif de la décellularisation. Les organes solides nécessitent des techniques dynamiques de décellularisation afin d'éliminer efficacement les

composants cellulaires du système d'organe-complet(Goh, Bertera et al. 2013). En particulier, des forces mécaniques associées à des techniques de décellularisation dynamiques sont importantes pour une décellularisation efficace(Evans, Moran et al. 2013). Ces paramètres mécaniques peuvent être la pression, le stress de cisaillement et la vitesse d'écoulement d'agents de décellularisation (Faulk, Carruthers et al. 2014). Différentes intensités de forces mécaniques doivent être appliquées à des processus de décellularisation, selon la taille et le type des organes(Kajbafzadeh, Javan-Farazmand et al. 2013).

La technique de perfusion antérograde et rétrograde de l'agent de décellularisation à travers le système vasculaire natif de l'organe a été la méthode la plus couramment utilisée pour produire des échafaudages d'organes entiers acellulaire(Kang, Wang et al. 2009; Liu, Liu et al. 2009; Nari, Cid et al. 2013; Pan, Hu et al. 2013). Les réseaux vasculaires subsistent dans les organes qui réduisent au minimum la distance de diffusion de l'oxygène aux cellules. Par conséquent, la perfusion dans le système vasculaire est une méthode particulièrement efficace pour délivrer des agents à des cellules décellularisées pour le transport de matière cellulaire à partir du tissu(Barakat, Abbasi et al. 2012; Nari, Cid et al. 2013; Pan, Hu et al. 2013). Dans cette approche, un agent de décellularisation perfusé est réparti uniformément dans l'organe et, en outre, l'application d'une certaine quantité de pression pendant le processus de perfusion a été montré pour atteindre efficacement la perméation des tissus de gros vaisseaux sanguins jusqu'au niveau capillaire(Yagi, Fukumitsu et al. 2013; Ye, Stoltz et al. 2015). La perfusion de solution de décellularisation permet également l'excrétion de débris cellulaires par le système veineux. Néanmoins, il est important de souligner que la décellularisation complète d'organes tout en préservant les composantes d'ECM intrinsèque est une tâche extrêmement difficile (Shirakigawa, Takei et al. 2013; Faulk, Carruthers et al. 2014). En effet, certains matériaux cytoplasmiques et nucléaires résiduels demeurent après décellularisation (Gilbert, Freund et al. 2009). Ainsi, des efforts massifs poursuivant cet objectif ont été réalisés à ce jour.

Les agents de décellularisation tels que le SDS et le Triton X-100 ont été utilisés seuls, ou en combinaison avec un rinçage final de PBS, sur différents organes solides. Par exemple, le cœur a été décellularisé par perfusion pour générer un échafaudage trois dimensions qui conserve la géométrie de l'organe d'origine(Ott, Matthiesen et al. 2008). L'aorte d'un cœur de rat a été canulée pour la perfusion coronaire rétrograde avec du PBS contenant de l'adénosine héparinée pendant 15 min, 1% de SDS pendant 12 h, et 1% de Triton X-100 pendant 30 min, chaque étape étant suivie d'un rinçage à l'eau désionisée. La décellularisation a été suivie par perfusion avec du PBS contenant des antibiotiques pendant 24 h. Le résultat était un tissu décellularisé qui semblait similaire à un cœur à l'exception d'un aspect translucide blanc. Après la perfusion de l'organe décellularisé, le réseau vasculaire était intacte malgré l'utilisation de détergents. La recellularisation a montré que l'ECM était prête à l'ensemencement des cellules avec des cardiomyocytes qui formaient de petits foyers de contraction musculaire (Ott, Matthiesen et al. 2008). Récemment, un certain nombre de groupes ont étudié la décellularisation par perfusion pour les

tissus pulmonaires (Cortiella, Niles et al. 2010; Ott, Clippinger et al. 2010). Ott a utilisé la perfusion vasculaire seule dans une approche similaire à celle utilisée pour les travaux antérieurs avec le cœur et il a constaté que la perfusion avec 0,1% de SDS pendant 2 h à la pression physiologique était suffisante pour décellulariser les poumons de rat (Ott, Clippinger et al. 2010). Cortiella a perfusé les poumons avec SDS à 1% dans le compartiment tandis que le tissu a été mis en circulation dans un système de bioréacteur (Cortiella, Niles et al. 2010). Tous les groupes ont montré que les principaux composants de l'ECM et la microstructure générale du poumon ont été conservés, mais d'autres comparaisons sont nécessaires pour déterminer les effets complets de chaque protocole sur l'ECM et les implications sur la réponse de l'hôte après l'implantation. La décellularisation du foie a été effectuée par perfusion à travers la veine (par exemple, la perfusion antérograde) avec des combinaisons de SDS et Triton X-100 (Uygun, Soto-Gutierrez et al. 2010; Baptista, Siddiqui et al. 2011; De Kock, Ceelen et al. 2011; Baptista, Vyas et al. 2013; Ye, Stoltz et al. 2015). Uygun a perfusé le foie avec 0,1% de SDS seul, alors que nous avons fait la perfusion antérograde/rétrograde du foie continue avec 1% de SDS et Triton X-100 1% pendant 6h. Comme avec d'autres organes entiers décellularisés, le foie a pris un aspect translucide blanc pendant la perfusion dans les études. Notre étude a montré une absence d'ADN par coloration à l'hématoxyline et l'éosine (H&E) et la microvascularisation a été préservée (Ye, Stoltz et al. 2015). Uygun a également prouvé que l'ADN a été retiré et que la microvascularisation, l'ultrastructure d'ECM et les constituants tels que les collagènes I et IV, la fibronectine, la laminine ont été préservés (Uygun, Soto-Gutierrez et al. 2010). Les hépatocytes ont été réintroduits dans le foie décellularisé par perfusion dans la veine porte, dans les études de Uygun qui a montré la préservation des fonctions d'hépatocytes telles que la synthèse de lactate déshydrogénase et de l'albumine et la production d'urée persistante jusqu'à 8 h après l'implantation hétérotopique (Uygun, Soto-Gutierrez et al. 2010).

Ensemble, ces études démontrent le développement initial des stratégies de la décellularisation pour créer des scaffolds d'organe-complet qui préservent en charge une infiltration cellulaire et la fonction phénotypique normale. Cependant, il a également été démontré que le procédé de décellularisation optimale doit être adaptée à chaque organe spécifique et les applications seront utilisées après décellularisation.

3.4.3 L'évaluation de scaffold décellularisé d'organe-complet

Le matériel cellulaire résiduel dans les ECM peut contribuer à des problèmes de cytocompatibilité *in vitro* et à des réponses de l'hôte indésirables *in vivo* lors de la réintroduction des cellules (Zhang, Raoof et al. 2010; Crapo, Gilbert et al. 2011). Bien que les techniques de décellularisation ne peuvent pas enlever 100% du matériau cellulaire, il est possible de quantifier des composants cellulaires tels que d'ADN double brin (ADNdb), les mitochondries, ou des molécules associées à la membrane tels que des phospholipides. Le seuil de concentration de matière cellulaire

résiduelle à l'intérieur de l'ECM pour provoquer une réponse de remodelage négatif n'a pas été étudié en détail et peut varier en fonction de la source ECM, du type de tissu dans lequel est implanté l'ECM, et d'accueillir la fonction immunitaire.

Le terme décellularisation n'a pas été défini par des mesures quantitatives. Sur la base de conclusions d'études dans lesquelles une réponse constructive de remodelage *in vivo* a été observée et où les réponses cellulaires nuisibles et allogènes indésirables ont été évitées, les critères minimaux suivants suffisent à satisfaire l'intention de décellularisation :

<50 ng d'ADN double brin par mg d'ECM sec ;

<200 pb de longueur des fragments d'ADN (Zheng MH 2005; Crapo, Gilbert et al. 2011);

manque de matières nucléaires visible dans les coupes de tissus colorés avec 4', 6-diamidino -2- phénylindole (DAPI) ou H & E (Wang, Bao et al. 2014; Ye, Stoltz et al. 2015).

L'accent mis sur matériel nucléique est justifié parce que l'ADN est directement corrélé à des réactions indésirables d'hôte, il est omniprésent dans tous les types de tissus et de cellules, est facilement dosé, et fournit un indice général pour d'autres résidus de cellules dans l'ECM (Zheng MH 2005; Crapo, Gilbert et al. 2011). Les premier et deuxième critères sont facilement quantifiés à l'aide d'intercalants de l'ADN disponibles dans le commerce tels que PicoGreen(Ahn, Costa et al. 1996), l'iodure de propidium ou bisbenzimidazole et par électrophorèse sur gel, respectivement. Le troisième critère est facilement évalué par des procédés de coloration ou d'immunofluorescence histologique de routine et sert à une vérification qualitative des deux premiers critères (Wagner, Bonenfant et al. 2014; Wang, Bao et al. 2014; Ye, Stoltz et al. 2015). Il convient de noter que les colorations histologiques tels que H & E ou trichrome fournissent des procédés relativement peu sensibles pour l'identification et l'analyse de l'ADN qualitativement dans l'ECM. Un standard pour la décellularisation de tissus offre de nombreux avantages, y compris : (1) permettre aux enquêteurs et aux fabricants de produits d'ECM d'évaluer l'efficacité d'un protocole lors de la déclaration de nouvelles techniques décellularisées ou quand ils décrivent des produits composés d'ECM dérivées d'un tissu décellularisé; 2) permettre la comparaison congrue des différents produits d'ECM; (3) éliminer les variations dans la cellule hôte et les réponses aux produits d'ECM dues aux variations dans l'ADN résiduel, facilitant ainsi l'interprétation et la comparaison des résultats *in vitro* et *in vivo*; (4) promouvoir le développement rapide et efficace des applications cliniques supplémentaires pour les produits d'ECM dans le domaine de la médecine régénératrice et du génie tissulaire.

Les preuves et les techniques disponibles montrent une association entre les constituants cytoplasmiques et associés à la membrane et les réponses indésirables de l'hôte. Les critères ci-dessus doivent être modifiés ou complétés pour maintenir la qualité et la cohérence des méthodes de décellularisation et des résultats *in vivo*. Une enquête systématique sur la relation entre la concentration de phospholipides dans les vannes décellularisées et le remodelage constructif dans les prothèses valvulaires permettrait l'établissement d'un critère de teneur en phospholipides

acceptable pour éviter les événements indésirables de remodelage. Avec la vérification de l'élimination cellulaire terminée, les effets de la décellularisation sur les propriétés mécaniques et matérielles de l'échafaudage de l'ECM restant sont intéressants. Actuellement, il n'y a pas de consensus concernant les effets de n'importe quel agent de décellularisation individuelle sur les propriétés mécaniques. Il existe des rapports contradictoires concernant les effets du SDS et du TritonX-100 sur les propriétés de divers tissus décellularisés. Des études ont montré que les détergents perturbent le collagène dans certains tissus, ce qui diminue la résistance mécanique du tissu, tandis que le même détergent peut n'avoir aucun effet apparent sur le collagène dans les tissus, même assez similaires (par exemple, des tendons contre ligament)(Cartmell and Dunn 2000; Woods and Gratzner 2005). Des études ont également montré que la plupart des détergents provoquent au moins certaines suppressions de glycosaminoglycanes (GAGs) de l'échafaudage, un effet qui a des degrés divers d'impact négatif sur le comportement viscoélastique de l'échafaudage (Lovekamp, Simionescu et al. 2006; Mendoza-Novelo, Avila et al. 2011). Une autre variable qui peut affecter les propriétés mécaniques d'un greffon est la durée de l'exposition aux agents de décellularisation. Par exemple, un protocole de décellularisation de tissu trachéal qui implique des cycles répétés de désoxycholate et la DNase a montré de profonds changements mécaniques entre les cycles 18 et 22 (Conconi, De Coppi et al. 2005). Le test mécanique spécifique qui doit être effectué dépend de l'application clinique envisagée (Hosseinkhani, Mehrabani et al. 2014; Ou and Hosseinkhani 2014).

3.4.4 Travaux futurs et considérations du scaffold d'organe-complet

Il a été montré jusqu'aujourd'hui que le scaffold décellularisé d'organe-complet peut donner l'ECM intact d'organes qui sont capables de supporter la recellularisation sur un niveau de 3D complexe et de maintenir la fonctionnalité cellulaire et tissulaire appropriée. Ces constructions d'organes bio-artificiels permettent également une manipulation chirurgicale relativement facile, d'autant qu'ils conservent le pédicule vasculaire intacte pour l'anastomose directe sur le site d'implantation orthotopique. Le système vasculaire intact et propre permet la perfusion directe du tissu et maintient la fourniture de substances nutritives et de l'oxygène au greffon implanté, dans un parallèle exact à la procédure de transplantation. En tant que tel, cette technique pourrait fournir un raccourci idéal pour la bioingénierie à savoir un remplacement d'organes qui est structurellement et histologiquement similaire à l'organe d'origine (Taylor 2009).

Actuellement, il y a des limites à toutes les constructions d'organes de l'ingénierie tissulaire obtenus jusqu'à présent en termes de fonctionnalité et de viabilité *in vivo*, variant de la réalisation suffisante ou comparable à la densité cellulaire normale, la réalisation de la différenciation cellulaire et le tissu complet, et l'évaluation de la viabilité à long terme, la fonctionnalité, et le remodelage constructif de greffes d'organes implanté *in vivo*. Il serait également nécessaire

d'étendre ces techniques sur les organes de plus grands animaux, qui sont plus proches de la taille et de la fonctionnalité pour les humains. Ce sont des questions à traiter et à optimiser avant de passer à l'étape clinique, en liaison avec les questions réglementaires qui guident le choix de la cellules (Sasai 2013). En outre, il serait important d'étudier la possibilité de régénération des organes provenant d'une source cellulaire de remplacement comme une population de cellules souches (Bonandrini, Figliuzzi et al. 2013; Evans, Moran et al. 2013). Si les cellules éventuellement autologues telles que les cellules souches mésenchymateuses provenant seulement du créancier pouvaient être utilisées pour créer une greffe d'organe fonctionnel, il pourrait y avoir d'importantes implications cliniques pour surmonter la barrière et le problème de rejet immunitaire, avec d'autres grands avantages potentiels pour le patient (He, Liu et al. 2013; Mirmalek-Sani, Sullivan et al. 2013; Shirakigawa, Takei et al. 2013).

3.5 Un résumé du scaffold de l'organe-complet du foie

décellularisé

La bio-ingénierie du foie a été un domaine de recherche intense et a provoqué l'excitation populaire dans les dernières décennies. Elle suscite un grand intérêt depuis l'introduction des échafaudages acellulaires hépatiques entiers qui sont générés par la technique de décellularisation par perfusion (Baptista, Siddiqui et al. 2011; Pan, Hu et al. 2014; Wang, Bao et al. 2014; Ye, Stoltz et al. 2015). Ces bioscaffolds conservent leur microarchitecture du tissu et un réseau vasculaire intact qui peut être facilement utilisée en tant que voie pour recellularization par perfusion de différentes populations de cellules avec un milieu de culture défini. Cette approche d'ingénierie d'organe présente plusieurs avantages par rapport à l'injection de suspensions de cellules dans des organes solides. Les matrices fournissent un volume suffisant pour la transplantation d'une masse cellulaire suffisante jusqu'à l'équivalent d'un organe entier, sans limitations d'oxygène et en nutriments, lorsque une perfusion continue de milieux de culture oxygéné est fourni (Takebe, Zhang et al. 2014). En utilisant la technologie du scaffold d'organe-complet, plusieurs laboratoires récemment ont foies génie biologique utilisant des cellules humaines ou animales (Shupe, Williams et al. 2010; Uygun, Soto-Gutierrez et al. 2010; Badylak, Taylor et al. 2011; Barakat, Abbasi et al. 2012). Ces foies biologiques présentent certaines des fonctions d'un foie natif (sécrétion d'albumine et de l'urée, le métabolisme des médicaments, etc.) et un réseau vasculaire endothélialisée critique pour la perméabilité des vaisseaux sanguins après la transplantation (Figure 27). Néanmoins, les différentes stratégies développées jusqu'à présent n'ont pas réussi à générer des tissus hépatiques *in vitro* bioéquivalents aux tissus du foie natif. Tout d'abord, il n'y a pas de foie transgénique en mesure de maintenir le flux sanguin après une transplantation pendant plus de quelques heures, en raison de la coagulation sanguine indésirable. Il y a plusieurs raisons possibles à ces échecs, mais

une pauvre re-vascularisation cellulaire du réseau vasculaire du scaffold est probablement la plus pertinente, avec des fibres de collagènes de la membrane basale vasculaire exposée à la circulation sanguine et l'activation de la cascade de coagulation. Par ailleurs, les changements chimiques et mécaniques qui se produisent une fois que le sang commence à perfuser le foie est également intéressant à noter, parce que le sang se comporte comme un fluide non-newtonien, alors que la plupart des milieux de culture se comporte comme l'eau, un fluide newtonien. Ce changement dans le comportement en mécanique des fluides pourrait également avoir un impact sur la perméabilité des vaisseaux post-transplantation du scaffold de l'organe-complet du foie. Enfin, malgré les causes qui conduisent à la coagulation du sang sur la transplantation, il y a un besoin urgent d'accroître l'efficacité de re-vascularisation du scaffold d'organes, pour éviter la coagulation du sang après anastomose *in vivo* et de faire la transplantation d'organe-complet du foie sur la domaine clinique. Par conséquent, c'est important de décrire les méthodes qui ont été employées à ce jour et de les analyser sur l'organogenèse du foie, ECM et mécanobiologie. Les conditions optimales doivent encore être élucidées et peuvent varier en fonction de l'organe décellularisé et des cellules. Selon le travail de cette thèse, nous allons résumer le point principal: la technique utilisée pour la préparation du scaffold d'organe-complet du foie.

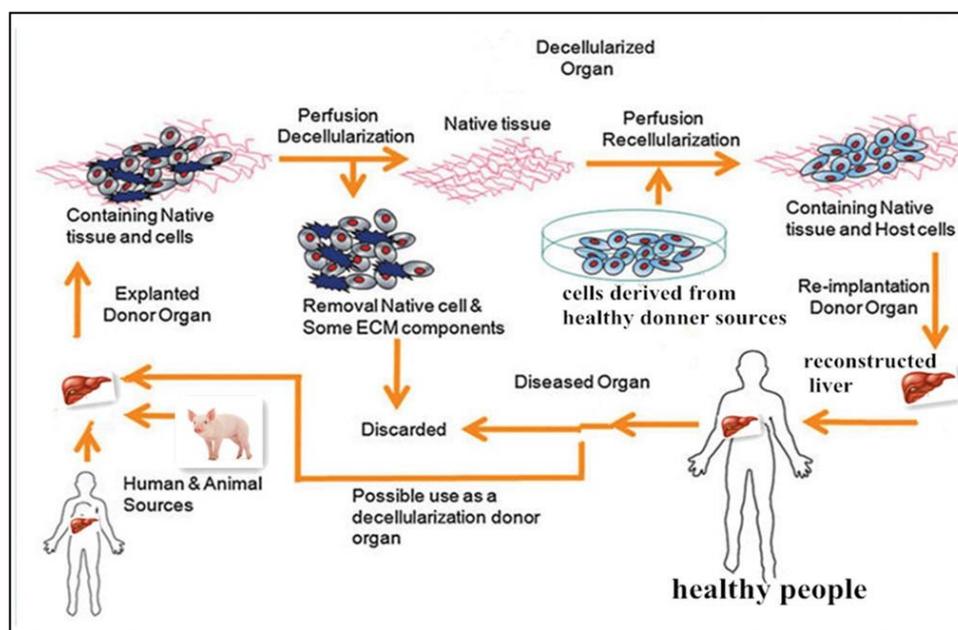


Figure. 27 Le schéma de l'ingénierie tissulaire à partir du scaffold de l'organe-complet du foie décellularisé et des cellules données

Une disponibilité insuffisante des organes du foie pour la transplantation hépatique a conduit à la recherche d'options alternatives pour résoudre ce problème. Depuis la publication du rapport sur la décellularisation réussie du foie par Uygun et al (Uygun, Soto-Gutierrez et al. 2010), plusieurs groupes ont commencé à développer des techniques de bio-ingénierie pour obtenir un organe transplanté d'un échafaudage d'ECM tridimensionnel, impliquant la décellularisation d'organes. L'objectif de la décellularisation du foie est d'obtenir un échafaudage d'ECM avec

une architecture adaptée, contenant la capsule de Glisson intacte et une structure vasculaire et biliaire conservée autant que possible. Les techniques et les matériaux utilisés dans ce processus permettent une lyse cellulaire plus grande, ce qui préserve l'ECM et diminue le temps nécessaire pour le réaliser. Dans la littérature, différents protocoles ont été modifiés et combinés de manière différente, en ce qui concerne les agents physiques et chimiques utilisés, ainsi que le temps de l'application (Uygun, Soto-Gutierrez et al. 2010; Pan, Hu et al. 2014; Ye, Stoltz et al. 2015). Le détergent est essentiellement choisi en tenant compte des caractéristiques de l'organe ou du tissu à decellulariser, par exemple, la décellularisation du tendon nécessite un détergent différent que pour le poumon ou le foie (Crapo, Gilbert et al. 2011). A ce jour, les protocoles de décellularisation hépatiques ont impliqué la perfusion d'une combinaison de détergents: Triton X-100 et du SDS ont été utilisés dans le portail ou la veine cave, avec un rat étant le donneur de foie.

L'évaluation des résultats de décellularisation des foies est effectuée par microscopie optique avec coloration HE, la microscopie électronique à balayage (MEB), et la présence de noyaux de cellules en utilisant la technique DAPI et / ou quantification de l'ADN par la détermination de la base paires (pb). Une décellularisation réussie est considérée comme ayant eu lieu lorsque des fragments sont moins de 300 pb selon certains auteurs, tandis que d'autres ont proposé que qu'ils doivent être inférieurs à 200 pb, ce qui éviterait une réponse inflammatoire chez l'hôte. La recherche de traces d'ADN dans des échafaudages commerciaux révèle des vestiges cellulaires et la teneur en ADN, bien que ceux-ci ne seraient pas capables de déclencher une réponse inflammatoire. En outre, diverses études, certaines d'entre eux sur l'apoptose des cellules porcines, ont éliminé la possibilité de la présence de traces d'ADN de rétrovirus dans des échafaudages biologiques pour la xénotransplantation étant apte à transmettre une maladie de l'hôte (Di Nicuolo, van de Kerkhove et al. 2005). La visualisation au microscope des voies biliaires a été vérifiée par observation macroscopique de l'arbre biliaire à travers la perforation et la coloration de la vésicule biliaire. En outre, l'arbre vasculaire a été conservé après le processus de décellularisation, comme en témoigne la perfusion de bleu de méthylène à 2% d'agarose *via* la veine cave. Une technique chirurgicale sophistiquée en préservant les éléments vasculaires et des voies biliaires et la capsule de Glisson, ainsi que l'insertion du cathéter en téflon permettant une perfusion adaptée à différents lobes du foie. En outre, une pompe péristaltique à flux contrôlé de 5 à 10 ml / min assurée avec une architecture conservée de l'ECM (Soto-Gutierrez, Zhang et al. 2011; Yagi, Soto-Gutierrez et al. 2013). Nous résumons les techniques et caractérisations de la décellularisation du foie dans le tableau 1.

Tableau. 1 Le résumé des techniques et caractérisations de la décellularisation du foie

Espèces	Agents	Vitesse perfusion	Le temps de la décellularisation	Caractérisations et techniques	Références
Rat	SDS,	1mL/min	5 jours	Histologie, IHC, EMB,	(Uygun,

(Lewis)	SDS+Triton			quantification de l'ADN, corrosion coulée	Soto-Gutierrez et al. 2010)
Rat (Fischer344)	SDS, SDS+Triton	5mL/min	5 heures	Histologie, IHC	(Shupe, Williams et al. 2010)
Rat (Sprague-Dawley)	Tripsine, EDTA, Triton	8mL/min	20-26 heures	Histologie, IHC, EMB, quantification de l'ADN, corrosion coulée	(Soto-Gutierrez, Zhang et al. 2011)
Ferret	Triton, hydroxyde d'ammonium	5mL/min	-	Histologie, IHC, EMB, corrosion coulée, L'électrophorèse gel de l'ADN	(Baptista, Siddiqui et al. 2011)
Rat (Sprague-Dawley)	SDS, SDS+Triton	30mL/min	1-2 heures	Histologie, IHC, EMB, Quantification de l'ADN, Fluoroscopie, Microscopie Confocale	(De Kock, Ceelen et al. 2011)
Cochon (Yorkshire)	SDS	-	2-3 jours	Histologie, IHC, Fluoroscopie, corrosion coulée	(Barakat, Abbasi et al. 2012)
Cochon	SDS, Triton	30mL/min	4 jours	Histologie, IHC, EMB, corrosion coulée, Quantification de l'ADN, Assay d'urée	(Yagi, Fukumitsu et al. 2013)
Rat (Sprague-Dawley)	SDS, Triton, EDTA, Solution alcaline hypotonique	10mL/min	5 heures	Histologie, IHC, corrosion coulée, L'analyse de biocompatibilité	(Pan, Hu et al. 2013)
Rat (Sprague-Dawley)	SDS, Triton	5mL/min	6 heures	Histologie, EMB, Quantification de l'ADN	(Ye, Stoltz et al. 2015)

En résumé, en termes de protocoles de décellularisation, ceux-ci varient considérablement selon de nombreux aspects, par exemple, la souche / espèce animale utilisée, agents de décellularisation et d'autres paramètres (plus postdécellularisation stérilisation) pour atteindre l'ECM scaffold entier d'organes requis pour recellularisation. D'une part, c'est une indication de l'applicabilité universelle du principe de perfusion décellularisation à tous les tissus animaux, tandis que les variations dans le protocole optimal peuvent également être attribuées à des différences dans la nature de chaque type d'organe/tissu et de sa structure et de la composition spécifique ; d'autre part, il apparaît également que la justification complète et systématique pour déterminer le processus de décellularisation optimale par perfusion n'a pas encore été atteint. C'est un domaine qui nécessite une enquête plus approfondie dans tous les organes/tissus de pertinence, que les questions de réglementation et de normalisation (par exemple,

contrôle de la qualité et de libérer critères) sont fondamentales pour la traduction clinique et la commercialisation de ces produits de scaffold du foie décellularisé.

Chapitre 2: Matériel et Méthodes

1 Culture cellulaires

Durant cette étude, les cellules utilisées sont des cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh) issues de la gelée de wharton.

1.1 Les manipulations de base en culture cellulaire

1.1.1 Les matériels des plus utilisés en culture cellulaire

- Microscope inversé à imagerie par contraste de phase, Olympus IMT-2 (Japon) et Nikon DIAPHOT 300 (Japon)
- Boite de culture ventilée T75, avec un bouchon à filtre (réf. CC7682-4875, CytoOne)
- Boîte carrée stérile (réf. C223693, Fisher, France)
- Cryotubes (réf. 11311675 Fisher, France)
- Tube Falcon de 50 mL (réf. 352098, Dutscher, France)
- Une pince, une pince à clamper, et une paire de ciseaux stériles
- Cellule de Thoma (réf. Chambre de Thoma, A4500T, Bioblock, France)

1.1.2 Préparation du milieu de culture α -MEM complet

- Alpha Modified Eagle Medium (α -MEM) (réf. Lonza, Belgique)
- Sérum de veau foetal (SVF, réf.F7524, Sigma, France) décomplémenté à +56°C pendant 30 min et utilisé à 10% (v/v dans α -MEM).
- L-Glutamine à 2 mM (réf. G7513, Sigma, France)
- Antibiotiques : Pénicilline à 10 mU/mL / Streptomycine à 10 ng/mL (P/S, réf. 15070-063, Gibco, France) et une solution antifongique (Fungizone 2,5 μ g/mL, réf. Gibco, France).
- Lorsque le milieu de base est supplémenté avec les antibiotiques, la glutamine et le SVF, il forme le milieu complet.

1.1.3 Préparation du tampon d' HBSS (Hank's Balanced Salts Solution)

Ce tampon est formé des composés suivants : KCl 0,4g/L, NaCl 8,0g/L, KH₂PO₄ 0,06g/L, Na₂HPO₄ 0,04778g/L, D-glucose 1,0g/L et de rouge de phénol 0,011g/L. Ce tampon sans ion calcium (Ca²⁺) ni ion magnésium (Mg²⁺) (Réf.H2387, Sigma, France),

est fourni en poudre et se prépare en solution aqueuse de la façon suivante:

- Dissoudre un sachet de poudre d'HBSS (9,5g) dans 800mL d'eau distillée à température ambiante (solution A).
- Ajuster le pH à 7,2 en rajoutant environ 0,35g de NaHCO₃ dans la solution A en agitant.
- Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 1 litre.

1.1.4 Préparation du tampon de PBS (Phosphate Buffered Saline)

Ce tampon contient du NaCl (137 mM), du KCl (2,7 mM), Na₂HPO₄ (10mM), KH₂PO₄(1,76 mM) ce tampon est fabriqué de la façon suivant:

- Peser précisément de KCl 0,2 g, KH₂PO₄ 0,24 g, NaCl 8,0 g, Na₂HPO₄ • 2H₂O 1,56 g (comme Na₂HPO₄ • 12H₂O est 3.14g) et dissoudre successivement des réactifs dans 800mL d'eau distillée.
- Ajuster à pH 7.4 avec HCl.
- Ajuster le volume à 1litre avec de l'eau distillée.
- Utiliser l'autoclave pour la stérilisation et stocker à 4°C.

1.1.5 Préparation de la Solution de digestion

Collagenase II à 1 mg/mL (réf. 17101-105, Gibco), dissous dans du milieu α -MEM contenant des antibiotiques.

1.1.6 Préparation de la Solution de 0,025% trypsine-EDTA

La solution de trypsine–EDTA (réf. 25300-054, Sigma, France) initialement à une concentration de 0,05, est diluée de moitié dans de l'HBSS pour l'amener à la concentration de 0,025%.

1.1.7 Préparation de la solution de congélation

DMSO (Diméthyl Sulfoxyde, Laboratoires Braun, France, référence: 2791102) dilué à 10% (v/v) dans du SVF, puis filtré sur un filtre de 0,2 μ m (réf. PN 4612, Life Sciences).

1.1.8 Passages cellulaires et comptage des cellules

Passages cellulaires :

Lorsque les cellules de P0 (cellules ensemencées pour la première fois sur des boîtes de culture) sont arrivées à 90% de confluence, elles sont trypsinées et

réensemencées. Elles sont alors au passage P1.

Les cellules sont lavées 2 fois avec du tampon HBSS afin d'éliminer tout le sérum qui contient $\alpha 1$ antitrypsine. 2 mL de trypsine-EDTA sont ensuite ajoutés dans chaque boîte de 75 cm² contenant les cellules et les boîtes sont incubées pendant 5-10 minutes à 37°C avec 5% CO₂ afin de favoriser l'action de l'enzyme et de décoller les cellules. 5 mL de milieu de culture sont ajoutés dans chaque boîte de culture afin d'inhiber l'action de la trypsine et les cellules en suspension sont récupérées par centrifugation à 300g pendant 10 minutes.

Enfin, les cellules sont ensemencées au premier passage (P1) avec une densité de 1000/cm². Les passages suivants (P2, P3...) sont réalisés selon le même protocole.

Comptage des cellules :

Le dénombrement des cellules est réalisé à l'aide d'une chambre de Thoma (réf.A4500T, Bioblock, France). Nous mélangons 30 μ L de suspension cellulaire avec 30 μ L de bleu trypan. Le bleu trypan va pénétrer dans les cellules mortes et les colorer en bleu. Nous pouvons compter les cellules vivantes, non colorées, à l'intérieur du quadrillage de la chambre de Thoma. Le nombre total de cellules est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$N = n * 10^4 * fd$$

N= nombre total de cellules

n= nombre de cellules au sein de la chambre

fd= facteur de dilution

1.1.9 CFU-F et Comptage des CFU-F

Ce type de culture permet de refléter le nombre de cellules capables de générer une colonie dans un échantillon.

Pour la manipulation des CFU-F, les cellules sont cultivées dans des boîtes de Petri de 58 cm² à une densité de 1000 cellules mononuclées/cm² pour le P0 et à une densité de 100 cellules/58cm² pour P1, P2, P3, P4, P5, P6 et P7.

Deux semaines après la mise en culture, les CFU-F sont comptées en utilisant une solution de cristal violet. Les boîtes sont lavées 2 fois avec 5mL du PBS à 37°C, 3mL de cristal violet sont ajoutés et les plaques sont laissées sous agitation pendant 15 minutes.

Ensuite, les boîtes sont bien rincées avec de l'eau distillée. Les colonies sont colorées en violet et peuvent être alors comptées. Les boîtes sont scannées pour déterminer le nombre et la taille des colonies contenant plus de 30 cellules par colonie en utilisant le software « Image J ».

1.1.10 Congélation et décongélation des cellules

Les cellules décollées sont rincées et centrifugées pendant 10min à 300g, puis le culot est repris dans le milieu de congélation afin d'obtenir une concentration de 1 x

10⁶ cellules/mL. Le mélange est alors fractionné dans des cryotubes à une densité cellulaire de 10⁶ cellules/cryotube. Enfin, les cryotubes sont congelés en les plaçant 30min à 4°C, puis 2h à -20°C, 12h à -80°C, et finalement transférés dans de l'azote liquide à -196°C.

Pour le décongélation, les cellules cryoconservées dans l'azote liquide sont décongelées dans un bain-marie à 37°C, puis diluées immédiatement dans le milieu de culture complet. Afin d'éliminer le DMSO, toxique pour les cellules, ces dernières sont lavées 2 fois dans le milieu de culture complet par centrifugation (300g, 5minutes). Le culot cellulaire est repris dans du milieu complet et les cellules sontensemencées avec ce même milieu supplémenté à 10% de SVF. Enfin, le renouvellement du milieu de culture est fait deux fois chaque semaine.

1.2 Obtention de Cellules Souches Mésoenchymateuses à partir de la Gelée de Wharton

1.2.1 Prélèvement des cordons ombilicaux

Les cordons ont été prélevés à la Maternité Régionale Universitaire de Nancy directement après l'accouchement et après le contentement des parturiantes. De longueurs variables (entre 15 et 40cm), ils sont placés rapidement dans une boîte de culture T75 cm² contenant 200 mL d'HBSS stérile et 2 mL de fungizone. Le cordon ombilical est ensuite stocké à 4°C jusqu'à utilisation. Il est préférable que le cordon soit manipulé le plus rapidement possible après son prélèvement, il doit être utilisé dans les 48 heures qui suivent le prélèvement lors de l'accouchement.

Deux protocoles d'extraction de CSMs issues de la gelée de Wharton sont utilisés dans le cadre de ce travail. Le premier protocole est appelé « méthode mécanique » et se base sur la capacité de migration des CSMs selon d'étude publiée (Wang, Hung et al. 2004; Salehinejad, Alitheen et al. 2012). Le second protocole sur une digestion enzymatique à la collagénase pour isoler les cellules.

1.2.2 Méthode mécanique

Matériel:

- cordon ombilical humain
- Milieu de culture a MEM (Lonza, Réf BE12-169F)
- Sérum de Veau Foetal (Sigma, F7524, lot 010M3396) décomplémenté
- Fungizone (Gibco, Réf CG 10501)
- Glutamine (Sigma, G7513)
- Pénicilline/Streptomycine(Gibco,Réf 15070-063)
- Cellule de Thomas

-
- Bleu Trypan (Sigma , Réf T8154)
 - Trypsine (Gibco, Réf 25300-054)
 - Tampon HBSS (préparé au laboratoire Sigma, Réf H2387-1L)
 - Boîte de Pétri carrée (CML, Réf BPS120SJ)
 - Pince acier à bout plat (LPCR, Réf 3710020)
 - Pince Kocher (VWR, Réf 231-0251).
 - Scalpel.

Protocole:

- Verser de l'HBSS dans les 2 couvercles de la boîte pétri carrée et y déposer le cordon. Couper le cordon en fragments de 4 à 5 cm de long.
- Nettoyer l'extérieur des fragments avec de l'alcool 70° et les déposer dans l'autre couvercle propre.
- Couper le long du fragment en superficie sans couper les vaisseaux (2 artères +1 veine) et dérouler l'épithélium.
- Retirer les vaisseaux et récupérer la gelée située dans l'espace péri-vasculaire sous forme de lamelles fines en tirant avec la pince plate et en immobilisant le reste du fragment avec la pince kocher. Déposer la gelée prélevée dans une autre boîte contenant un peu d'HBSS et recommencer avec le reste du et/ou des fragments.
- Découper la gelée prélevée en plusieurs morceaux et la hacher (environ 2mm) avec le scalpel. A l'aide la pince plate, déposer des quantités égales de gelée dans les différents puits de plaque 6 puits. Ajouter 2 mL/puits de milieu complet.
- Incuber à 37°C, 5% CO₂, 90% d'humidité et laisser en culture les cellules pendant une semaine. Les MSCs vont migrer et adhérer au plastique.
- Pendant la culture primaire des cellules souches mésenchymateuses, les plaques 6 puits contenant les morceaux de gelée de Wharton sont légèrement agités chaque jour afin de favoriser la migration des cellules du tissu foetal vers le support de culture.
- Après une semaine, éliminer les fragments puis rincer les puits avec de l'HBSS et ajouter du milieu frais (2 mL/puits).

1.2.4 Subculture cellulaire

La solution de trypsine à 0,025% et d'EDTA à 1%(Réf 25300-054 Gibco,France) est utilisée pour détacher les cellules des supports de culture. Lorsque les cellules arrivent à 90% de confluence, le tapis cellulaire est lavé 2 fois avec 5mL de tampon HBSS.

Les cellules sont ensuite décollées par un traitement de 5min avec 2mL de mélange trypsine-EDTA pour 75cm² de surface cellulaire à 37°C, 5% de CO₂.

L'action de la trypsine est inactivée par addition de 5mL de milieu complet et la suspension cellulaire est récupérée dans un falcon de 50mL.

Une numération cellulaire est effectuée à l'aide d'une cellule de Thoma. Les cellules sont comptées 2 fois au microscope optique à l'aide d'une cellule de Thoma

et d'un colorant, le bleu de trypan (Réf T8154, Sigma, France). Seules les cellules viables, non colorées, sont comptées et l'estimation du nombre de cellules est la moyenne des comptages.

La suspension cellulaire est alors centrifugée à 300g pendant 10min.

Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans le milieu de culture complet afin d'obtenir une densité de 1000cellules/cm². La suspension cellulaire est fractionnée dans des flacons de culture de 75cm².

Les cellules restes sont congelées dans la solution de congélation.

2 L'analyse des CSMs-GW par Cytométrie en flux

2.1 Le principe de cytométrie en flux

La technique de cytométrie en flux permet l'analyse rapide d'un grand nombre de particules de manière individuelle. La caractérisation des particules est réalisée à l'aide d'un appareil qui comprend, outre une source lumineuse (laser), une chambre de prélèvement et un système optique précédant des photomultiplicateurs(PMT) qui convertissent des signaux lumineux en impulsions électriques analogues digitalisées, analysées et mémorisées par un ordinateur.

Les particules étudiées sont propulsées dans un flux de liquide appelé "liquide de gaine". Elles sont alors entraînées une à une dans une cellule de lecture (cuvette) où elles passent dans le faisceau lumineux émis par la source. Une analyse simultanée de la lumière diffractée à 90°[FSC (forward scatter detector)] et aux petits angles [SSC (side scatter detector)] fournit des données sur la taille et la structure des éléments étudiés. Cette technique repose sur la mesure de paramètres physiques (taille, volume, granulosité) et biologiques (mise en évidence de la présence de molécules grâce à un marquage fluorescent) de cellules.

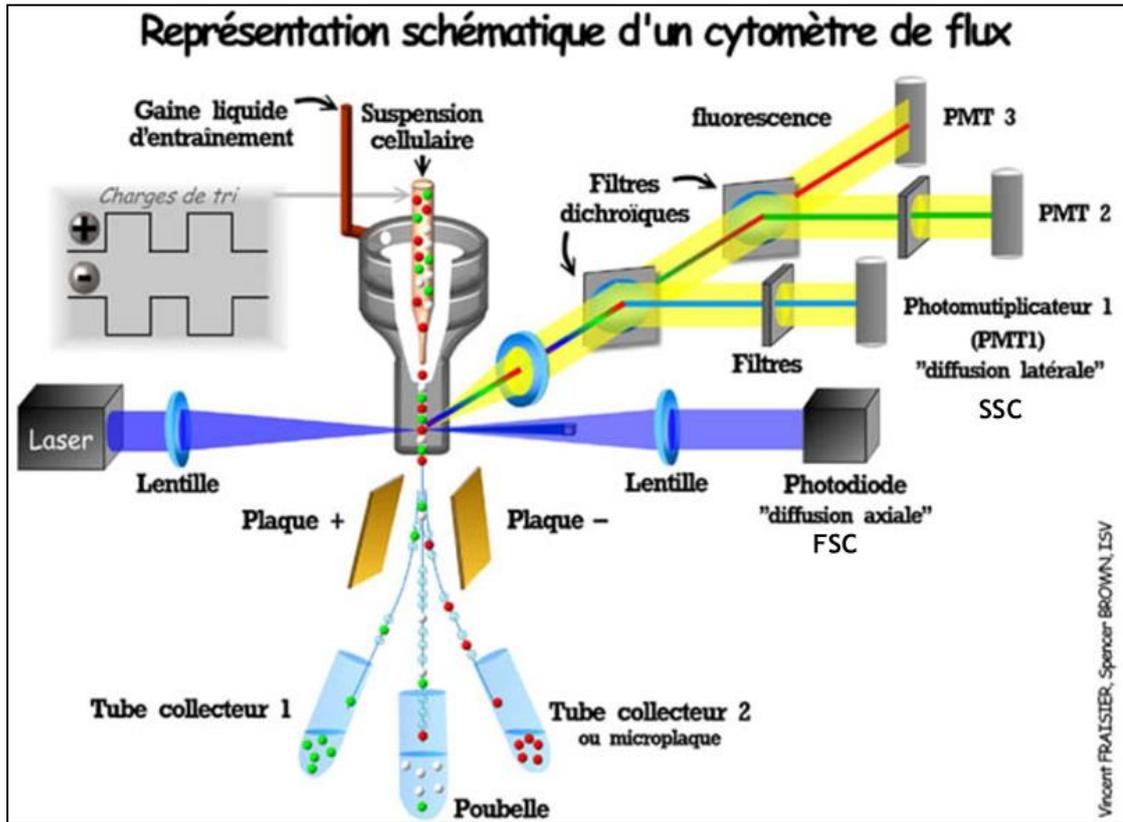


Figure. 28 Principe de la cytométrie en flux

(d'après olivier CLATRICE et Spencer BROWN, ISV, CNRS)

2.2 Marquage des CSMs-GW

Pour identifier le phénotype des CSMs-GW avant leur utilisation, nous avons étudié l'expression de certains marqueurs de surface cellulaire par immunomarquage direct et cytométrie en flux.

2.2.1 Principe de Marquage par immunofluorescence directe

Les récepteurs exprimés à la surface des cellules sont reconnus spécifiquement par un anticorps directement couplé à un fluorochrome. L'immuno-fluorescence directe est utilisée pour identifier les protéines membranaires appelées clusters de différenciation (CD), dont la présence ou l'absence permettent de déterminer le phénotype des cellules (Figure 29).

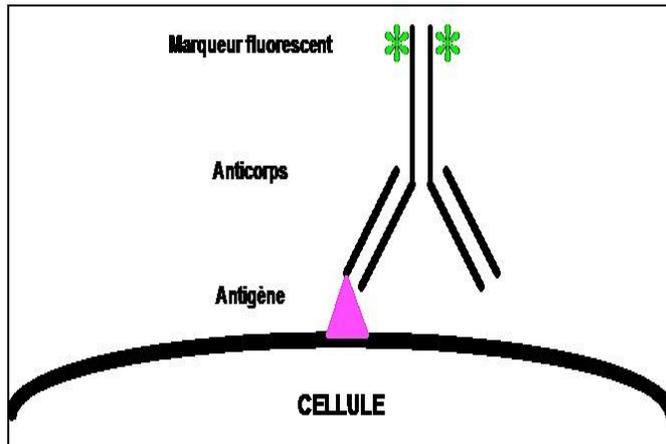


Figure. 29 Principe de l'immuno-fluorescence directe.

2.2.2 Matériels et Réactifs

A. Matériels

Plaques 48 puits (réf. 677 180, Greiner Bio-one)
 Centrifugeuse "Labofuge 400" (Heraeus Instruments)
 Tube à hémolyse (réf. 212-1837, VWR)

B. Réactifs

α MEM sans rouge de phénol (Lonza, Réf BE12-169F).
 Tampon Phosphate Buffer Saline (PBS) (réf. 14190, Invitrogène, France)
 Solution de blocage : albumine de sérum bovin (BSA, réf. A-9667, Sigma, France)
 dissoute dans du α MEM sans rouge de phénol à 0,5% (p/v). La BSA est utilisée
 afin d'empêcher toute fixation aspécifique des anticorps.
 Solution d'immunomarquage: anticorps dilués dans la solution de blocage afin
 d'obtenir une concentration finale appropriée. Anticorps impliqués dans
 l'immunomarquage direct (Tableau.2)

Tableau. 2 anticorps utilisés pour la phénotypage des CSMs-GW

Anticorps	Autres noms	Fluorochrome	Fournisseur	Fonctions
IgG1 FITC		FITC	DakoCytomation (X0927)	Contrôle isotopique FITC
IgG1 PE		PE	DakoCytomation (X0928)	Contrôle isotopique PE
CD34		PE	BD Pharmigen (555822)	Marqueur des cellules souches hématopoïétiques, adhérence
CD44	H-CAM, Pgp-1	FITC	Beckman coulter	recepteur de l'acide

			(IOTest,IM1219U)	hyaluronique, adhérence
CD45	LCA, T200, B220	FITC	DakoCytomation (F0861)	Protéine présente chez toutes les cellules hématopietiques, excepté les érythrocytes
CD71	TRFC, p90	FITC	BD Pharmigen (555536)	Récepteur à la transferrine, régulation du fer
CD73	NT5E	PE	BD Pharmigen (550275)	régulation de nucléoside
CD90	Thy-1	FITC	Beckman Coulter (IOTest, IM1839U)	marqueur de cellules souches et pour des processus axonaux des neurones matures
CD105	Endogline	PE	Bekman Coulter (IOTest, A07414)	Réponse cellulaire au TGF- β 1
CD106	VCAM-1	PE	BD Pharmigen (555647)	adhérence leucocytaire, migration, costimulation
CD140b	IMF1;PDGFR β	FITC	BD Pharmigen (558821)	récepteur de la tyrosine kinase de surface cellulaire
CD146	MUC18, MCAM	FITC	BD Pharmigen (560846)	récepteur de la laminine alpha 4
CD166	ALCAM	PE	Bekman Coulter (IOTest,A22361)	Ligand: CD6, adhérence
CD200	MRC; MOX2; OX-2	PE	BD Pharmigen (552475)	regulation de l'activité des cellules myéloïdes
HLA-DR		FITC	Bekman Coulter (IOTest, IM0463U)	récepteur de surface cellulaire du CMH et constitue un ligand du récepteur des cellules T

2.2.3 Méthode

Les CSMs suspendues dans la solution de blocage, sont réparties à raison de 100,000 cellules par tube. Après 20 minutes d'incubation, elles sont lavées par centrifugation (300 g, 5 min) et les culots cellulaires sont resuspendus dans 100 μ L de solution d'immunomarquage incluant soit différents anticorps, soit IgG-PE/FITC (contrôle isotopique) ou dans 100 μ L de la solution de blocage (contrôle négatif). A l'issue d'une incubation pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, 0,5 mL de PBS sont ajoutés dans chaque tube, puis une centrifugation (300 g, 5 min) est faite afin d'éliminer les anticorps en excès. Le culot cellulaire est alors repris dans 300 μ L de PBS avant d'être analysé au cytomètre (BD FACScanto (BD,France)).

2.2.4 Analyse des échantillons

Un minimum de 10,000 évènements a été collecté lors de chaque analyse. La population cellulaire est repérée sur le scattogramme en fonction de la taille et de la granulosité de cellules (voir résultats, partie 1). Une fenêtre prenant en compte uniquement cette population est dessinée afin d'éliminer les débris cellulaires, ou les doublets et triplets de cellules. Ainsi, les valeurs de SSC (Side Scatter) et de FSC (Forward Scatter) sont réglées de façon à bien visualiser la population cellulaire.

Sur l'histogramme de fluorescence, la tension du PMT est réglée de manière à ce que les cellules non marquées (le contrôle négatif qui permet de s'affranchir de l'autofluorescence des cellules) ainsi que les cellules incubées en présence d'immunoglobulines non spécifiques (le contrôle isotypique qui permet de s'affranchir de la fluorescence du marquage aspécifique) apparaissent négatives. La tension du PMT ne doit plus être modifiée après ce réglage afin de pouvoir comparer les échantillons analysés.

3 Différenciation des CSMs-GW

3.1 Différenciation ostéocytaire

3.1.1 La procédure de la différenciation ostéocyte

Pour l'ostéogenèse, lorsque les cellules arrivent à 80% de confluence, elles sont trypsinées dans une solution de trypsine-EDTA à 0,25% selon le protocole décrit au paragraphe (I.C.4.a.), lavées dans le milieu de culture I etensemencées à 1000 cellules par cm^2 dans des plaques six puits. A sub-confluence, le milieu de culture est alors retiré et les cellules sont lavées dans du tampon HBSS avant de déposer dans chaque puits un milieu d'induction spécifique de la différenciation ostéocytaire. Les cellules sont remises en culture pendant 21 jours et le renouvellement du milieu de culture III (dans le kit de différenciation ostéocytaire) est effectué deux fois par semaine. La révélation de la différenciation ostéogénique a été réalisée par la coloration en Rouge Alizarine. Elle est utilisée pour identifier les dépôts calciques durant le processus de différenciation ostéogénique. Le calcium forme un complexe avec le rouge alizarine par chélation. Après élimination du milieu de culture, les cellules sont rincées avec du PBS puis fixées au paraformaldéhyde (PAF) 4% pendant 1 heure à la température ambiante. Après trois rinçages avec de l'eau distillée, les cellules sont incubées avec la solution de Rouge Alizarine pendant 10 minutes. La réaction est arrêtée par des rinçages successifs avec de l'eau distillée puis les cellules sont laissées dans du PBS pendant 15 minutes sous légère agitation. Enfin, les cellules sont laissées sécher avant d'être observées au microscope. Le Rouge

Alizarine est utilisé pour identifier les dépôts calciques. Le fond cytoplasmique est orangé pâle, les sels de calcium (phosphates et carbonates) sont orange vif à rouge, le tissu conjonctif et les noyaux ne sont pas colorés.

3.1.2 La coloration ROUGE D'ALIZARINE S:

L'alizarine est un colorant rouge d'origine végétale, extrait de la racine de la garance des teinturiers (*Rubia tinctorum* L), une plante vivace de la famille des Rubiacées. Le ROUGE D'ALIZARINE S est une alizarine sulfoconjuguée (dioxyanthraquinose ou 1,2-dihydroxyanthraquinone). C'est une oxyquinose. Le groupe quinonine est un chromophore acide très énergique. Ce colorant donne une couleur rouge en présence de sels calciques spécifiques des ostéocytes.

Matériel :

- Tampon PBS (Gibco, Réf 14190)
- Alizarin Red S (Sigma, Réf A5533-25G, Lot 027K0725, MW : 342,3 g/mol)
- Ammonium hydroxide (SIGMA, Réf 320145, Lot STBB6876, 28-30 %)
- Hexadecylpyridinium chloride monohydrate (CPC) (Sigma, Réf C9002-25G, lot 041M0118V)

Protocole :

1) Préparation de la solution de la solution de rouge alizarine

- Peser la poudre correspondant au volume nécessaire (13,692 g pour 1000 mL).
- Dissoudre dans de l'eau distillée, mais pas la totalité du volume.
- Filtrer la solution avec un filtre 0,45 µm pour éliminer les précipités.
- Ajuster le pH avec de l'hydroxyde d'ammonium à un pH de 4,1 à 4,3 (quelques gouttes).
- Ajuster le volume avec de l'eau distillée et vérifier le pH.

2) La coloration des cellules

- Lavage : Rincer (3X) les cellules avec du PBS : 1 mL/puits.
- Fixation : Ajouter 0,5 mL/puits d'éthanol 70% froid.
- Incubation 1 heure à 4°C.
- Lavage : Rincer (3X) les cellules avec de l'eau distillée : 1 mL/puits.
- Coloration : Ajouter 0,5 mL/puits de rouge alizarine 40 mM. Incubation 30 minutes à température ambiante.
- Lavage : Rincer (3X) les cellules avec de l'eau distillée : 1 mL/puits.
- Séchage : des plaques à température ambiante après avoir éliminé l'eau.
- Photographie : une photographie d'ensemble de la plaque et une photographie par puits au microscope : en lumière transmise à l'aide du microscope à fluorescence Leica DMI300B.

● Quantification de la coloration

Remarque : il s'agit d'un dosage semi quantitatif, car on compare uniquement l'absorbance des puits différenciés aux puits contrôles (non différenciés).

- Ajouter 500 µL/puits de CPC 10% (dans de l'eau) afin de dissoudre le colorant.
- Prélever 50 µL de chaque puits et les déposer dans une plaque 96 puits en

triplicat.

- Lecture de l'absorbance à 570 nm au spectrophotomètre.
- Comparer les valeurs obtenues pour les puits différenciés aux puits témoins.

3.2 Différenciation adipocytaire

3.2.1 La procédure de la différenciation adipocytaire

Pour induire la différenciation adipogénique, les cellules sont trypsinées puisensemencées dans des plaques six puits à une densité de 1000 cellules/cm² dans un milieu de croissance normale. Ce dernier est changé 2 fois par semaine jusqu'à 80% de confluence, puis le milieu de croissance a été remplacé par un milieu de différenciation adipogénique consistant du milieu I avec 1 µM dexaméthasone, 60 µM indométhacin, 0,5 Mm 3-isobutyl-1-méthyl-xanthine, et 5µg/ml insuline. Les cellules sont cultivées pendant trois semaines.

Pour visualiser les vacuoles lipidiques, une coloration avec du l'huile rouge O est utilisée permettant la mise en évidence de la différenciation adipocytaire. Les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS et fixées avec du méthanol à 4°C pendant 2min, puis rincées une fois avec de l'éthanol 50°. Les cellules sont ensuite incubées dans une solution d'huile rouges O (2mL/puit) à 37°C dans une étuve pendant 10min. Enfin, elles étaient rincées deux fois avec de l'eau distillée, laissées sécher et les cellules étaient observées à l'aide d'un microscope optique. L'huile rouge O permet d'identifier les lipides hydrophobes en phase liquide (gouttelettes lipidiques contenues dans les cellules) par un mécanisme physique de transfert d'un corps coloré (lysochrome) du solvant dans lequel il se trouve (alcool, diacétine, ...) au corps gras en phase liquide.

3.2.2 La coloration 'Oil Red O

L'Oil Red O est un lysochrome (corps soluble dans les graisses), qui se déplace du solvant dans lequel il se trouve vers le lipide tissulaire. Cette technique de coloration permet d'identifier des lipides hydrophobes en phase liquide.

Matériel :

- Tampon PBS (Gibco, Réf 14190)
- Oil Red O (Sigma, Réf O0625-25G, Lot 077K0123, MW : 408,51 g/mol)
- Formaldéhyde (VWR, Réf 20913.284, Lot 07C280011, MW : 30,03 g/mol, d : 1,09)
- Isopropanol (Carlo ERBA, Réf 415213, lot V9E851099F)
- DMSO (Prolabo, Réf 23487291)
- Microscope inversé Leica DMI 3000B (Leica)
- Spectrophotomètre Variskan flash (Thermoscientific)

Protocol :

1) *Préparation de la solution de l'oil Red O*

- Peser la poudre correspondant au volume nécessaire (0,03 g pour 6 mL d'isopropanol pur).
- Ajouter l'eau distillée (4 mL pour 6 mL de solution stock).
- Laisser la poudre se dissoudre (environ 10 minutes).
- Filtrer la solution pour éliminer les précipités avec un filtre 0,45µm (conservation 1 à 2 heures).

2) *La coloration des cellules*

- Lavage : Rincer (3X) les cellules avec du PBS : 1 mL/puits.
- Fixation : Ajouter 0,5 mL/puits de formaldéhyde 10% dilué dans du PBS. Incubation 1 heure à température ambiante.
- Lavage : Rincer (1X) les cellules isopropanol 60% : 1 mL/puits.
- Coloration : Ajouter 0,5 mL/puits de solution de coloration. Incubation 30 minutes à température ambiante.
- Lavage : Rincer (3X) les cellules avec de l'eau distillée : 1 mL/puits.
- Séchage : des plaques à température ambiante après avoir éliminé l'eau.
- Photographie : une photographie d'ensemble de la plaque et une photographie par puits au microscope : en lumière transmise à l'aide du microscope à fluorescence Leica DMI300B.
- Quantification de la coloration

Remarque : il s'agit d'un dosage semi quantitatif, car on compare uniquement l'absorbance des puits différenciés aux puits contrôles (non différenciés).

- Ajouter 250 µL/puits de DMSO afin de dissoudre les vésicules lipidiques contenant le colorant.
- Prélever 50 µL de chaque puits et les déposer dans une plaque 96 puits en triplicat
- Lecture de l'absorbance à 510 nm au spectrophotomètre.*
- Comparer les valeurs obtenues pour les puits différenciés aux puits témoins.

3.3 Différenciation hépatocytaire

3.3.1 Matériels et réactifs

Produit	Fournisseur	Référence	Volume
Milieu de culture a MEM	Lonza, France	BE12-169F	
Serum de veau foetal	Sigma, France	F7524	10%(V/V)
L-glutamine	Sigma, France	G7513	2mM
Fungizone	Gibco, France	CG10501	5ug/mL
Pénicilline/streptomycine	Gibco, France	15070-063	10mU/mL, 10ng/mL
Trysine	Gibco, France	25300-054	
Tampon HBSS	Sigma, France	H2387-1L	

Tampon PBS	Gibco, France	14190	
Plaque de 24 puits	Corning, France		
Boite de culture ventilée T75	CytoOne, France	CC7682-4875	
Recombinant humain HGF	Peptotech, France	100-39	20ng/mL
Recombinant humain FGF- β	Peptotech, France	100-31	10ng/mL
Recombinant humain EGF	Peptotech, France	100-15	10ng/mL
Oncostatin M	Peptotech, France	300-10	20ng/mL
Insuline-Transferrine-Sodium	Corning, France	354352	50mg/mL
Dexamethasone	Sigma, France	D4902	2 μ M
Nicotinamide	Sigma, France	N0636	5mM

Préparation des solutions utilisées pendant la différenciation hépatocellulaire :

Le milieu complet : Lorsque le milieu de base (DMEM-LG) est supplémenté avec les antibiotiques (Pénicilline à 10 mU/mL/Streptomycine à 10 ng/mL) et une solution de Fungizone à 5 μ g/mL , la glutamine à 2 mM et le SVF à 10%, il forme le milieu complet.

Le milieu de préparation : le milieu de base (DMEM-LG) sans sérum est supplémenté avec le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) à 20ng/ml, le facteur de croissance des fibroblastes- β (FGF- β) à 10ng/ml, on obtient ainsi le milieu préparatoire.

Le milieu d'induction : le milieu de base (DMEM-LG) avec du sérum à 1% est supplémenté avec différents facteurs de croissance, le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) à 20ng/ml, le facteur de croissance des fibroblastes- β (FGF- β) à 10ng/ml, le facteur de croissance épidermique (EGF) à 10ng/ml et la nicotinamide à 5Mm, il forme alors le milieu induit.

Le milieu de maturation : le milieu de base (DMEM-LG) est supplémenté avec de l'insuline-transferrine-sodium(50mg/ml), de l'oncostatine M (20ng/ml) et de la dexamethasone (2 μ M).

3.3.2 La procédure de différenciation hépatocytaire

Pour induire la différenciation hépatique, les cellules sont trypsinées puis ensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 1000 cellules / cm² dans un milieu de croissance normale. Ce dernier est changé 2 fois par semaine jusqu'à 80% de confluence, puis les cellules sont lavées trois fois avec du PBS et sont immergées en milieu de préparation pendant 2 jours.

Puis le milieu de préparation est remplacé par un milieu de différenciation hépatique (milieu d'induction) constitué par le milieu de base enrichi en facteur de croissance des hépatocytes (HGF) à 20ng/ml, en facteur de croissance des fibroblastes- β (FGF- β) à 10ng/ml, en facteur de croissance épidermique (EGF) à 10ng/ml et en nicotinamide à 5Mm. Les cellules sont cultivées pendant 7 jours. Ensuite, les cellules sont cultivées avec le milieu de maturation comprenant le milieu de base avec de l'insuline-transferrine-sodium(50mg/ml), de l'oncostatine M

(20ng/ml) et de la dexaméthasone (2 uM) pendant 21 jours. Tous les milieux sont changés 2 fois par semaine.

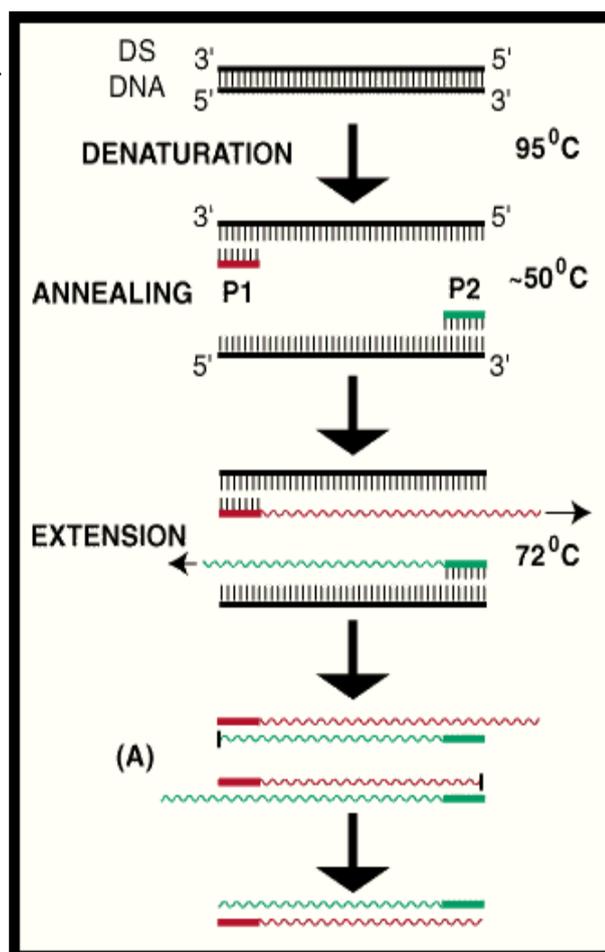
4 Transcription inverse et réaction en chaîne de la polymérisation (PCR) quantitative en temps réel (RT-PCR)

4.1 Principe

La technique de PCR permet l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. La technique de RT-PCR quant à elle, permet l'amplification d'un fragment d'ADN qui est complémentaire à une molécule d'ARN donnée. Pour cela il est nécessaire d'extraire les ARNs messagers (ARNm) des cellules et de rétro transcrire les ARN en ADNc. Ces ADNc vont servir de matrice à la technique de PCR pour connaître l'expression des gènes à étudier à l'aide d'amorces spécifiques. La réaction de PCR se déroule en trois étapes : dénaturation, hybridation et élongation. Grâce à l'utilisation des enzymes thermorésistantes et à des cycles de température, cette technique permettra l'amplification d'un fragment d'ADNc choisi.

1. Digestion enzymatique par endonucléase de restriction
2. Dénaturation de l'ADN
3. Préparation de deux sondes nucléotidiques complémentaires des extrémités de la séquence cible
4. Ajout des amorces en excès à 50 - 60°C ; **hybridation**
5. synthèse des brins à partir des sondes hybridées servant d'amorces à 60 - 72°C ; **extension**
6. Dénaturation des duplex néoformés à 95°C, puis retour à 60°C.
7. Reprise de la polymérisation du fait de l'excès amorcés

Figure. 30 Principe de la



4.2 Extraction d'ARN des cellules par le Trizol

4.2.1 Principe

Pour réaliser la PCR et étudier l'expression des gènes, une étape supplémentaire, précédant l'étape d'amplification, est nécessaire : il s'agit de la conversion des ARNm en ADN, dits ADN complémentaires ou ADNc. Cette étape fait appel à une autre ADN polymérase, la transcriptase inverse ou RT (Reverse Transcriptase). Il faut ainsi au préalable procéder à l'obtention des ARN.

Le Trizol est un réactif permettant d'isoler l'ARN total des cellules ou tissus et empêche la dégradation de l'ARN par les RNases. Il contient une solution monophasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine, qui après ajout de chloroforme et centrifugation permet d'obtenir 2 phases : aqueuse et organique. L'ARN présent dans la phase aqueuse peut ensuite être précipité par de l'isopropanol, tandis que l'ADN présent dans l'interphase peut être précipité par de l'éthanol et les protéines présentes dans la phase organique peuvent être précipitées par de l'isopropanol.

4.2.2 Matériel

Produit	Fournisseur	Référence
Chloroforme		
Isopropanol		
Ethanol		
Eau Rnase free		
Trizol	Invitrogen	15596-018
Ou Qiazol	Qiagen	79306
Glycogène	Ambion	AM9515

4.2.3 Protocole

- Laver 2 fois les cellules adhérentes en culture sont avec du PBS à TA ou directement sur glace.
Remarque : Après le lavage, les cellules sont conservées sur la glace le temps de rajouter le Trizol.
- Ajouter le Trizol à la boîte de culture (0,5 à 1mL en fonction de l'échantillon)
- Gratter les cellules

-
- Récupérer dans des microtubes Rnases free avec la P1000.
Attention : A partir de cette étape, l'expérience se déroule sous la sorbonne car le Trizol est toxique.
 - Vortexer le tube 15-30 secondes.
 - Incuber à température ambiante 5 minutes.
Remarque : A cette étape, il est possible de congeler les échantillons 1 mois au maximum à -80°C ou de stocker les échantillons à 4°C pendant plusieurs heures ou de continuer l'extraction immédiatement.
 - Si les échantillons ont été congelés, les décongeler sur glace ou à TA. Attendre 10 minutes à température ambiante (TA) après décongélation.
 - Ajouter 200 µL de chloroforme par 0,75 mL de Trizol initial (P1000)
 - Vortexer 5 secondes
 - Laisser sur la paillasse pendant 2- 15 min.
 - Centrifugation à 12000 g pendant 15 min à TA.
Remarque : A ce stade, 2 phases sont observées, la phase aqueuse au-dessus (60% du volume de trizol), séparée de la phase organique par une interphase.
 - Transférer la phase aqueuse (phase supérieure) dans un nouveau microtube Rnase free (avec la P1000 ou P200).
 - Si volonté d'extraire l'ADN (interphase) et les protéines (phase organique), récupérer l'interphase et la phase organique et suivre les protocole « extraction d'ADN à partir de cellules au trizol, méthode classique » ou « extraction de protéines à partir de cellules au trizol, méthode classique ».
 - Attention à ne pas contaminer la phase aqueuse par l'interphase ou la phase organique.
 - Optionnel : Rajouter le même volume de chloroforme à la phase aqueuse (V/V).
 - Vortexer 5 secondes.
 - Centri 12000 g pendant 15 min à TA.
 - Transférer la phase aqueuse (phase supérieure) dans un nouveau microtube Rnase free (avec la P1000 ou P200).
Remarques :
Attention à ne pas contaminer par l'interphase.
Il est plus difficile de prélever lors de cette étape car les 2 phases se mélangent.
Il est possible de continuer l'extraction avec la méthode classique (ci-dessous) ou sur colonne.
 - Continuer avec la méthode classique.
Remarques :
il est possible de rajouter du glycoqène 1 µL (15 mg/mL) à la phase aqueuse si la quantité de cellules est faible. Déposer au fond du tube avec la P10.
 - Précipiter la phase aqueuse dans de l'isopropanol : 0,5 mL/750 µL de trizol initial. Vortexer.
 - Incuber à TA pendant 10 minutes.
 - Centrifuger à 12000g pendant 10 minutes à 4°C.
 - Eliminer le surnageant avec la P1000
Remarque : ce n'est pas grave s'il reste un peu de liquide avec le culot.

-
- Laver le culot par de l'éthanol 75% (>75%) : 1 mL / mL de Trizol initial.
 - Vortexer.
 - Centrifuger à 7500 g pendant 10 minutes à 4°C.
 - Réaliser le séchage du culot :
 - Eliminer le maximum d'Ethanol avec la P1000 sans toucher le culot et lancer un spin.
 - Eliminer le maximum d'Ethanol avec la P200 sans toucher le culot et en tournant autour du culot et lancer un spin.
 - Eliminer le maximum d'Ethanol avec la P10 sans toucher le culot et lancer un spin.
 - Laisser évaporer 3 à 5 minutes à TA ou au bain à sec à 37 °C.

Remarques :

en attendant de tout récupérer, on peut laisser sur le bain à sec mais en laissant les tubes ouverts ; Il est important de bien éliminer les traces d'alcool.

- Remettre en suspension le culot :
 - Dissoudre le culot dans de l'eau Rnase free (30 µL/tube).
 - Aspirer refouler.
 - Vortexer.
 - Incuber environ 5 minutes le bain à sec à 30 °C et sous agitation maximale (1400 rpm).
 - Puis déposer les échantillons sur glace à 4°C.
- Conserver les échantillons à -80°C (les aliquoter au besoin pour éviter les cycles de congélation/décongélation des échantillons).

4.3 Mesure de la concentration et de la pureté de l'ARN

Le rapport des absorbances à 260nm et 280nm (A260/A280) nous renseigne sur la pureté en ARN de la solution. La densité optique à 280nm reflète la quantité de protéines contaminantes présentes dans l'ARN total extrait. Celle à 260nm est spécifique des acides nucléiques. Le rapport A260/A280 atteste de la qualité de l'ARN, s'il est compris entre 1,8 et 2,0, la pureté de l'ARN est élevée, s'il est supérieur à 2,2, l'ARN est contaminé par des sels, s'il est inférieur à 1,6, l'ARN est contaminé par des protéines. Pour les autres valeurs du rapport A260/A280, l'ARN est moins pur, mais reste acceptable.

La concentration des ARN est déterminée par la mesure de la densité optique (DO) à 260nm sur un spectrophotomètre (DU 600, Beckman, USA) selon la formule ci-dessous :

Concentration d'ARN (Qg/µL) = DO260 × 40Qg/mL × dilution

(1 unité de DO à 260 nm correspond à 40pg/pL d'ARN simple brin).

4.4 Rétrotranscription des ARNm (RT)

L'étape de transcription inverse était effectuée à l'aide d'un kit de synthèse d'ADN, iScript cDNA Synthesis Kit (Réf. 170-8891, BioRad, USA). Les mélanges des échantillons sont préparés dans des tubes de 20pL sans nucléase (Réf. 223-9473, BioRad, USA) dans de la glace avec les proportions ci-dessous :

Tableau. 3 Les compositions de rétrotranscription des ARNm

Produit	Finisseur	Reference	Volume
5x iScript™ Reaction Mix	Bio-Rad, France	réf. 170-8891	4uL
cDNA Synthesis			
iScript Reverse Transcriptase	Bio-Rad, France	réf. 170-8891	1uL
Nuclease –Free water	Bio-Rad, France	réf. 170-8891	4uL
Échantillon d'ARN			2uL
DEPC-H2O	Invitrogen, France	réf.750024	9uL
Volume totale			20uL

L'ADNc est obtenu à partir d'une quantité inférieure à 1µg d'ARN par transcription inverse en utilisant des amorces de polydT se fixant sur la séquence poly-Adénylée des ARNm. La RT est réalisée dans un mélange final de 20 µL, dont 4µL de iScript Reaction Mix 5x et 1µL de iScript Reverse Transcriptase. Le mélange complet de la réaction est incubé 5 minutes à 25°C, puis 30 minutes à 42°C. Après une incubation de 5 minutes à 85°C, il est maintenu à 4°C. La réaction est exécutée dans un MyCycler™ (Bio-Rad, USA). Les ADNc peuvent être gardés à -80°C jusqu'à la réalisation de PCR.

4.5 PCR Semi-Quantitative

4.5.1 Réactifs

- Solution de dNTP Mix10mM (réf. 18427-013, Invitrogen, France).
- Taq DNA Polymérase (réf. 10966-034, Invitrogen, France).
- Tampon de PCR 10x (sans MgCl₂) (réf. y02028, Invitrogen, France)
- Solution de MgCl₂ 10mM (réf. y02018, Invitrogen, France)
- Amorces des gènes (Tableau) : (MWG-Biotech AG, France)

Tableau. 4 Amorces des gènes de PCR

Gène	Séquence (5'-3')	Tm (°C)	Produit prévu (bp)
Albumine	Sense : TGC TTG AAT GTG CTG ATG ACA GGG Anti-sense: AAG GCA AGT CAG CAG GCA TCT CATC	60	163

AFP	Sense: GCT TGG TGG TGG ATG AAA CA Anti-sense: TCC TCT GTT ATT TGT GGC TTT TG	62	157
HNF4 α	Sense: AGC TGC AGA TCG ATG ACA ATG AG Anti-sense: CAT ACT GGC GGT CGT TGA TGT AG	62	153
G6P	Sense: GCT GGA GTC CTG TCA GGC ATT GC Anti-sense: TAG AGC TGA GGC GGA ATG GGAG	56	350
Notch1	Sense: ATC CAT GGC TCC ATC GTC TA Anti-sense: TTC TGA TTG TCG TCC ATC AG	60	422
Jagged1	Sense: GGG AAT AAA AGG CTG CGC AT Anti-sense: CGA CTG GAA AAC AAC ACC AC	62	195
Hes-1	Sense: TGG AAA TGA CAG TGA AGC ACC T Anti-sense: GTT CAT GCA CTC GCT GAA GC	62	116
Hey-1	Sense: GCT GGT ACC CAG TGC TTT TGA G Anti-sense: TGC AGG ATC TCG GCT TTT TCT	60	339
RP29	Sense: AGA TGG GTC ACC AGC TCT ACT G Anti-sense: AGA CGC GGC AAG AGC GAG AA	60	72

La phase d'amplification est réalisée dans un mélange final de 50 μ L (Tableau 5)

Tableau. 5 Liste des réactifs utilisés pour le mélange d'amplification

Réactif	Volume par μ L
Tampon de PCR 10X	5
MgCl ₂ 50 mM	1,5
dNTPs mix 10 mM	1
Amorce de forward 10 μ M	1
Amorce de reverse 10 μ M	1
Taq polymérase	0,4
ADNc	2
Eau Rnase Free	38,1

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

30 secondes de dénaturation à 94°C

60 secondes d'hybridation des amorces à 58°C

60 secondes d'élongation à 72°C

Ce cycle est répété plusieurs fois, puis les échantillons sont soumis à 10 minutes d'élongation à 72°C. Ensuite ils sont maintenus à 4°C. Les ADN peuvent être gardés à -80°C jusqu'à la réalisation de l'électrophorèse.

4.6 Electrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose

4.6.1 Réactifs

- Tampon de charge 5x : (réf, 161-0767, Bio-Rad, France)
- Agarose (réf. H070928, Euromedex, France) utilisé à 1% (dans un tampon d'électrophorèse TBE 0,5x)
- Tampon d'électrophorèse TBE 10x : acide borique 0,89 M, EDTA 20 mM, Tris 0,89M (réf. 161-0733, Bio-Rad, France) utilisé à une concentration de travail de TBE 0,5x (v/v dans l'eau distillée)
- Marqueur de taille d'ADN de 100pb (réf. 15628-019, Invitrogen, France)
- Gel red

4.6.2 Protocole

En milieu basique, les fragments d'ADN sont chargés négativement. Placés dans un champ électrique, ils vont donc se déplacer de la cathode vers l'anode, mais, leurs charges respectives étant à peu près équivalentes, c'est leur masse moléculaire qui va régler leur vitesse de déplacement dans le gel d'agarose. Plus les fragments sont petits, plus ils vont migrer rapidement vers l'anode.

Dans notre manipulation, 1,2g d'agarose ont été dissous dans 60mL de tampon d'électrophorèse TEB 0,5x (Réf.161-0733, BioRad, USA) en chauffant jusqu'à ce que la solution devienne transparente (environ 30min, à 100°C). Puis, la solution est refroidie jusqu'à atteindre la température de 60°C. La solution de gel est alors transférée dans une boîte dans laquelle un peigne était placé. Lorsque le gel est refroidi (environ 30min), le peigne est retiré formant ainsi des puits pour charger les échantillons d'ADN. Pour préparer les échantillons à charger, nous avons mélangé 8pL de solution d'ADN après PCR dans chaque capillaire avec 2pL de tampon de charge 5x (Réf.161-0767, BioRad, USA) dans les puits du gel d'agarose. Afin d'estimer la taille des fragments, 2pL d'échelle de taille (DNA Ladder, Réf. 15628-019, Invitrogen, USA) ont été ajoutés dans l'un des puits. La migration s'est effectuée à 100V pendant 90min dans du tampon d'électrophorèse TEB. Puis le gel a été pigmenté en le plongeant dans une solution de bromure d'éthidium à 0,5pg/mL pendant 30min. Les bandes ont alors été observées et photographiées sous UV ($\lambda=365\text{nm}$) (Réf. GS-2000, Bio-Rad, USA). L'analyse densitométrique est alors réalisée avec le logiciel d'image (Image J).

5 La coloration hématoxyline/éosine (H&E)

5.1 Principe

Ces deux colorants sont fréquemment utilisés en histologie. L'hématoxyline est un colorant basique qui donne une couleur bleu ou bleu-noir aux substances acides des cellules et tissus. Ainsi la chromatine des noyaux composée d'acide désohybriconucléiques se colore en bleu foncé par l'hématoxyline. De même le cytoplasme est coloré plus ou moins intensément en bleu dû aux ribosomes qui contiennent l'acide ribonucléique. Les substances ou structures qui se colorent en bleu par l'hématoxyline sont dites *basophiles*. L'éosine est un colorant acide qui se lie aux protéines basiques et leur donne une couleur rouge ou rosée. Ainsi les mitochondries du cytoplasme ou les fibres de collagène du tissu conjonctif, colorées par l'éosine, sont acidophiles.

5.2 Réactifs

Tableau. 6 Liste des réactifs utilisés pour la coloration H&E

Produit	Fournisseur	Référence
Haematoxyline	Gurr microscopy material	34034
Erythosine239	Réactifs ral	312820-0100
Tissue clear	Sakura	1466 tissue-clear 5L xylene substitute
Paraformaldéhyde (PFA)	Sigma, France	P6148
sodium Cacodylate trihydrate	Sigma, France	C4945
BaCl ₂	Sigma, France	B0750

Préparation des colorants et des solutions :

Solution de fixation: Paraformaldéhyde (PFA) à 4%(poids/volume), 100 mM de sodium Cacodylate Trihydrate, 10 mM de CaCl₂ dissous dans de l'eau distillée à pH 7,4.

Solution de lavage: 100 mM de sodium Cacodylate trihydrate, 50 mM de BaCl₂ dissous dans de l'eau distillée.

Solution d'Hématoxyline : Haematoxyline.

Solution d'éosine : Erythrosine 239 dilué à 1% dans de l'eau distillée.

5.3 Protocole

Les échantillons sont lavés avec du PBS, puis fixés 4 heures dans la solution de fixation. Puis, ils sont conservés à +4°C dans la solution de lavage jusqu'à l'étape suivante. Les échantillons sont ensuite placés entre deux rectangles de mousse dans des cassettes en plastique. Les cassettes sont placées dans un appareil de déshydratation pour que les échantillons soient dans un premier temps déshydratés progressivement dans des bains croissant d'alcool : un bain d'alcool à 70° pendant une heure minimum, deux bains d'une heure d'alcool à 95°, et trois bains d'alcool absolu d'une heure. L'alcool est ensuite éliminé avec trois bains de toluène de 15 min. Enfin, les échantillons sont laissés dans un bain de paraffine liquide (+58°C) pendant 2-3 heures. Les prélèvements sont ensuite inclus définitivement dans la paraffine, puis les blocs se solidifient avec la diminution de la température. Les blocs sont alors découpés de manière transversale en tranches d'une épaisseur de 5 µm, à l'aide d'un microtome et les coupes sont déposées sur des lames histologiques. Enfin, les échantillons sont passés successivement dans différents bains d'alcool décroissants pour les réhydrater, puis ils sont colorés et déshydratés par un appareil de coloration comme décrit succinctement dans le tableau. Les échantillons seront colorés avec de l'H&E. Après la coloration, les lames histologiques sont montées avec une résine synthétique PERTEX pour permettre l'observation des colorations avec un microscope optique.

Tableau. 7 La programme de la coloration de l'H&E

Réactifs	Temps (minutes)
Tissue clear	10
Alcool 100	5
Alcool 95	5
Alcool 70	5
Lavage	5
Hématoxyline	5
Lavage	3
Alcool amoniacal	1
Lavage	3
Eau distillée	3
Éosine	5
Lavage	3
Alcool 95	3
Alcool 100	3
Alcool 100	5
Tissue clear	5

6 La coloration au trichrome de Masson

6.1 Principe

Cette méthode est utilisée pour la détection de fibres de collagène dans les tissus tels que le foie, la peau, le cœur, etc., sur des sections de paraffine fixés au formol, et peut être utilisé pour des coupes congelées ainsi. La coloration trichromique associe une coloration nucléaire par l'hématoxyline, une coloration cytoplasmique par le rouge ponceau (fuchsine acide et ponceau xylidine), un traitement par l'acide phosphomolybdique dépouillant les fibres de collagènes et une coloration par le bleu d'aniline.

6.2 Réactifs

Tableau. 8 Liste des réactifs de la coloration du trichrome de Masson

Produit	Fournisseur	Référence
Biebrich scarlet-acid fuchsin solution	Sigma, France	HT15-1
Phosphomolybdic acid solution	Sigma, France	HT15-3
Phosphotungstic acid solution 10 % (w/v)	Sigma, France	HT15-2
Weigert's Iron Hematoxylin solution	Sigma, France	HT1079
10% formalin	Sigma, France	HT501128-4L
Bouin's solution	Sigma, France	HT10-1

Préparation des colorants et des solutions :

Solution de travail Fer hématoxyline de Weigert : ajoutert des quantités égales de la partie A et de la partie B (Weigert's Iron Hematoxylin solution, sigma, HT1079).

Solution de l'acide phosphotungstique-phosphomolybdique : mélanger 1 volume de solution d'acide phosphotungstique avec 1 volume de solution d'acide phosphomolybdique avec deux volumes d'eau déminéralisée. Utiliser une fois et jeter.

6.3 Protocole

- Couper le tissus déparaffiné et hydrater à l'eau déminéralisée.
- Incuber dans la solution de Bouin à 56 °C pendant 15 minutes.
- Laver à l'eau du robinet jusqu'à disparition de la couleur jaune.
- Colorer dans la solution de travail Fer hématoxyline de Weigert pendant 5 minutes.
- Laver à l'eau du robinet pendant 5 minutes.
- Rincer à l'eau distillée.

-
- Colorer dans une solution écarlate de Biebrich fuchsine acide pendant 5 minutes.
 - Rincer à l'eau distillée.
 - Placer les lames dans la solution de travail phosphotungstique-acide phosphomolybdique pendant 5 minutes.
 - Colorer dans l'aniline solution Bleu pendant 5 minutes.
 - Enfin, les échantillons sont traités à l'eau acétifiée 1% pendant 5 minutes puis déshydratés par des bains successifs de 30 secondes dans de l'éthanol à 70°,90°,100°, clarifier dans le xylène incrémenté. Elles ont ensuite été conservées à température ambiante jusqu'à analyse au microscope optique. Le dépôt de collagène et glycosaminoglycane a été analysé en présence de la fibrose des zones vasculaires au grossissement x100.

7 La microscopie électronique à balayage (MEB)

7.1 Principe

La microscopie électronique à balayage MEB (ou «Scanning Electron Microscopy» SEM) est une technique puissante d'observation de la topographie des surfaces. Elle est fondée principalement sur la détection des électrons secondaires émergents de la surface sous l'impact d'un très fin pinceau d'électrons primaires qui balaye la surface observée et permet d'obtenir des images avec un pouvoir séparateur souvent inférieur à 5 nm et une grande profondeur de champ. En résumé, c'est une technique de microscopie électronique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière.

La MEB utilise, en complément, les autres interactions des électrons primaires avec l'échantillon : émergence des électrons rétrodiffusés, absorption des électrons primaires, ainsi que l'émission de photons X et parfois celle de photons proches du visible. Chacune de ces interactions est souvent significative de la topographie et/ou de la composition de la surface. Un microscope électronique à balayage est essentiellement composé d'un canon à électrons et d'une colonne électronique, dont la fonction est de produire une sonde électronique fine sur l'échantillon, d'une platine porte-objet permettant de déplacer l'échantillon dans les trois directions et de détecteurs permettant de capter et d'analyser les rayonnements émis par l'échantillon. En outre l'appareil doit nécessairement être équipé d'un système de pompes à vide.

L'instrument permet de former un pinceau quasi parallèle, très fin (jusqu'à quelques nanomètres), d'électrons fortement accélérés par des tensions réglables de 0,1 à 30 kV, de le focaliser sur la zone à examiner et de la balayer progressivement. Des détecteurs appropriés, détecteurs d'électrons spécifiques (secondaires, rétrodiffusés, parfois absorbés...), complétés par des détecteurs de photons, permettent de recueillir des signaux significatifs lors du balayage de la surface et

d'en former diverses images significatives.

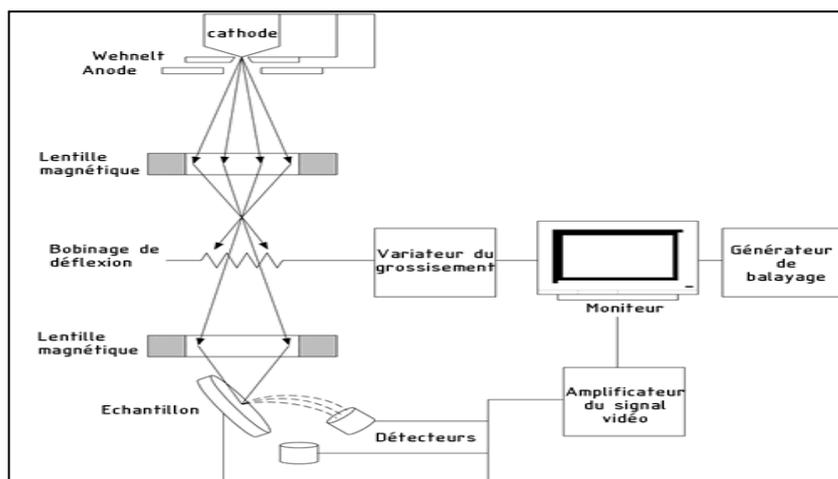


Figure. 31 Le schéma de principe de la microscopie à balayage

La cathode émet des électrons qui sont accélérés par le Wehlnet et l'anode et forment un faisceau dit cohérent. Les lentilles magnétiques rendent alors le faisceau ponctuel et le convergent sur l'échantillon. Un certain nombre d'électrons du faisceau rebondissent sur l'objet, d'autres lui arrachent quelques électrons. Les électrons sont récupérés par les détecteurs qui les envoient à la centrale de traitement des informations et module l'intensité du point lumineux sur un écran. Le faisceau est alors déplacé par le bobinage de déflexion sur le point suivant de l'objet et tout le processus se répète jusqu'à obtenir une image complète à l'écran. (http://www.microscopix.ch/microscopie_principe.php?smenu=3)

7.2 La préparation des échantillons

La qualité des images obtenues en microscopie électronique à balayage dépend grandement de la qualité de l'échantillon analysé. Idéalement, celui-ci doit être absolument propre, si possible plat et doit conduire l'électricité afin de pouvoir évacuer les électrons. Il doit également être de dimensions relativement modestes, de l'ordre de 1 à 2 centimètres. Toutes ces conditions imposent donc un travail préalable de découpe et de polissage. Les échantillons isolants (échantillons biologiques, polymères, etc.) doivent en plus être métallisés, c'est-à-dire recouverts d'une fine couche de carbone ou d'or. Cependant cette couche métallique, du fait de son épaisseur, va empêcher la détection de détails très petits. On peut donc utiliser un faisceau d'électrons de plus basse énergie qui évitera de charger l'échantillon (et donc de perdre de la visibilité), la couche métallique ne sera alors plus nécessaire.

Matériel de base pour la préparation des échantillons : pincettes, curre-dents, lames de rasoir, moyens de collages, plusieurs plots pour le microscope, poire soufflante, 2,5% de glutaraldéhyde, éthanol absolue.

La procédure de la préparation des échantillons :

- Les tissus hépatiques ont été coupés à la taille d'un centimètre carré.
- Les tissus hépatiques ont été fixés avec 2,5% de glutaraldéhyde pendant 12 h,

ensuite, les échantillons sont conservés dans la frigo à 4°C.

- Les échantillons sont lavés trois fois avec un tampon phosphate(PBS).
- Les échantillons sont soumis à un gradient d'éthanol (1 fois respectivement de 30%, 50%, 70%, 90% d'éthanol, éthanol à 100% deux fois, 10 min/fois)
- Les échantillons sont placés dans un lyophilisateur à sécher pendant 12 h pour d'utilisation ultérieure.
- Les échantillons sont chargés électriquement par un revêtement d'une mince couche de matériau conducteur : l'or. Pour sécher de l'or, un évaporateur par pulvérisation cathodique est le plus courant et le plus pratique.

8 La préparation du scaffold décellularisé du foie

8.1 Matériels et réactifs

Tableau. 9 Liste des matériels et réactifs pour préparer le scaffold décellularisé du foie

Produit	Fournisseur	Référence
Ciseau coudé	Shanghai médical Ltd., Chine	WAB030
Ciseau droit	Shanghai médical Ltd., Chine	WAB020
Pince coudé	Shanghai médical Ltd., Chine	WT3020
Pince droit	Shanghai médical Ltd., Chine	WA3030
porte-aiguillé	Shanghai médical Ltd., Chine	WT2090
pompe à perfusion	Huaxi, France	HX801-D
infusion	Bhagwati, France	Infusion-set
cathéter intraveineuse(18G)	BD, France	383405
Solution physiologique	Praxis, France	OM32E0001
Héparine sodique injectable	China-gene, Chine	0.5mL
Sodium dodecyl sulfate	Sigma, France	L6026
Triton x-100	Sigma, France	T9284
Pince Kocher courbe	Natech, France	C205114

8.2 La procédure de décellularisation du foie de rat

8.2.1 Les animaux et l'éthique

Dans cette étude, quarante rats Sprague-Dawley femelles (SD-rats) pathogènes-exempts spécifiques (SPF), poids 150 g-220 g, ont été utilisés pour la récolte du foie et la préparation de scaffold du foie à travers d'un dispositif de perfusion pour effectuer la décellularisation entière de l'organe. Les animaux ont été

pris en charge complètement selon les recommandations fixées par le Comité des ressources de laboratoire, National Institutes of Health, et institutionnel de protection des animaux et l'utilisation du Comité université médicale de Kunming, Chine et ils ont aussi été pris en charge complètement sous les recommandations fixées par le Comité des ressources de laboratoire, et institutionnel de protection des animaux et l'utilisation du Comité Université de Lorraine, France.

8.2.2 Le protocole chirurgical

Les animaux ont été sacrifiés par l'injection directe de KCl dans le coeur. Les cadavres ont été placés dans la position couchée sur le dos avec les jambes fixes. La cavité abdominale a été ouverte par l'incision médiane ventrale longitudinale qui a été plus tard étendue à l'xyphoïde et exposé la veine esenteric et l'aorte abdominale, la veine esenteric a été coupé avec une pince bulldog. Les animaux ont été perfusés avec 250mL de solution saline physiologique contenant 10,000 UI d'héparine via l'aorte abdominale pour empêcher la coagulation du sang. Le portail triade a été identifié et ligaturé après a été cannulé avec une canule de calibre 18 (18G). L'identification de la veine cave inférieure supra-hépatique a été réalisée et a également été ligaturée et cannulée avec un calibre 18 (18G). Les tissus entourant le foie ont été disséqués et le foie intact a été enlevé.

La veine porte cannulée a été reliée à une pompe peristaltique et 100mL de solution saline physiologique ont été perfusés à un débit d'environ 5 ml/minute. Ensuite, 1000 ml de solution saline physiologique dissous complète avec 1% de dodécylsulfate de sodium a été perfusée antograde à travers la veine porte à un débit d'environ 10 ml/minute. Immédiatement, nous avons fait une perfusion rétrograde de 1,000 ml de solution saline physiologique dissous avec 1% de Triton X-100 à travers la veine cave supra-hépatique inférieure à un débit d'environ 10 ml/minute pour decellularizer l'organe. Enfin, 500 ml de solution saline physiologique ont été perfusés pour laver le détergent restant. La consommation de temps total pour la décellularisation du foie était inférieur à 6 heures.

Après la décellularisation, le scaffold décellularisé du foie a été caractérisé de la façon suivante : (1) le foie est devenu translucide et blanche sous macroscopie avec des arbres microvasculaires visibles ; (2) il n'y a pas de cellules visibles par l'examen histologique de Hématoxyline - éosine (H & E) ; (3) la coloration de masson a montré que des collagènes et des glycosaminoglycanes sont bien restés ; (4) la quantification de l'ADN du foie décellularisé a été inférieure à 10% par rapport au foie normal à la même masse ; (5) la microscopie électronique à balayage (SEM) en utilisant des procédés décrits précédemment montre une vasculaire intrahépatique et une architecture de matrice décellularisé conservés.

9. Caractérisation de la différenciation hépatique

9.1 L'analyse de la production d'urée

9.1.1 Principe

L'urée est le principal produit final du métabolisme de l'azote dans la plupart des animaux et il est produit dans une série de réactions dans le foie appelé cycle de l'urée. Dans le cycle de l'urée, de l'ammoniac est converti en urée, qui est porté par le sang vers les reins pour l'élimination de l'organisme. Des niveaux élevés de l'urée dans le sang peut indiquer une défaillance rénale. Les taux d'urée peuvent également être élevés en réponse au traitement avec certains médicaments tels que les corticostéroïdes ou en réponse à une diminution de la filtration rénale due à une déshydratation ou une insuffisance cardiaque congestive. Les taux d'urée dans le sang modifiés peuvent se produire en réponse à une maladie du foie ou de la malnutrition. Dans ce dosage, la concentration de l'urée est déterminé par une réaction enzymatique couplée, ce qui conduit à un produit, proportionnelle à l'urée présente colorimétrique (570 nm).

9.1.2 Procédure

Les cellules ont été incubées avec du milieu DMEM-LG sans sérum contenant 5 mM NH₄Cl (Sigma, cat :A9434, USA) pendant 24 heures. Les concentrations d'urée dans les surnageants ont été mesurées par dosage colorimétrique avec le kit QuantiChrom Assay Kit Urée (BioAssay Systems, cat :375-100, USA) selon les instructions du fabricant avec un lecteur d'absorbance. Des cellules indifférenciées (jour 0) et la lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire humain (HepG2) étaient représentés comme un contrôle négatif et contrôle positif, respectivement.

9.2 Periodic Acid-Schiff staining (PAS Staining)

9.2.1 Principe

Le système de coloration PAS permet la détection des lymphocytes et des mucopolysaccharides. La coloration des lymphocytes est utile pour la prise de décisions thérapeutiques dans les cas établis de leucémie lymphocytaire. La diastase (α -amylase) procédure de digestion, suivie par la tache de PAS est utile comme aide au diagnostic d'une maladie de stockage du glycogène. Lorsqu'ils sont traités avec de l'acide périodique, les glycols sont oxydés en aldéhydes. Après réaction avec le réactif

de Schiff (un mélange de pararosaniline et le métabisulfite de sodium), un produit d'addition de pararosaniline est libéré qui colore les composants cellulaires contenant glycol. Cette réaction peut être effectuée sur le sang ou de films de moelle osseuse, ou des préparations de tissus.

9.2.2 Procédure

Après fixation dans 4% de paraformaldéhyde, les cellules ont été incubées pendant 5 minutes dans de l'acide périodique 1% (Sigma, cat :395-1, USA) et lavés avec de l'eau distillée avant incubation avec le réactif de Schiff (Sigma, cat :395-2, USA) pendant 15 minutes. Après lavage de 5 minutes dans de l'eau, un contraste avec l'hématoxyline (Sigma, cat :GSH-3, USA) a été effectuée pendant 1 minute. Les cellules ont été lavées et visualisés au microscope optique.

9.3 L'analyse d'absorption de Lipoprotéines de basse densité

(LDL)

9.3.1 Principe

Le cholestérol est un composant cellulaire essentielle et la maintenance de l'homéostasie du cholestérol est essentiel pour les fonctions physiologiques normales. Des niveaux élevés de cholestérol dans le plasma sont associés à diverses pathologies, les maladies cardiaques coronariennes notamment où les niveaux de cholestérol élevés conduisent à la formation de cellules et de l'accumulation de plaque dans les artères, entraînant potentiellement une crise cardiaque ou un AVC. La régulation des taux de métabolisme du cholestérol et de cholestérol plasmatique cellulaire dépend de lipoprotéines de basse densité (LDL) cholestérol LDL absorption médiée par le récepteur dans des cellules spécifiques.

Les lipoprotéines de basse densité (LDL) sont constituées d'une coquille de protéines, contenant l'apolipoprotéine B-100 ainsi que d'autres protéines auxiliaires, et un coeur hydrophobe constitué de cholestérol et de triglycérides entouré par des phospholipides et des esters de cholestérol. LDL est absorbé par les cellules, telles que les hépatocytes, les macrophages et les cellules endothéliales, par endocytose médiée par récepteurs.

9.3.2 Procédure

L'absorption de lipoprotéines de basse densité (LDL) a été détecté avec le kit Dil-Ac-LDL coloration (biovision, cat : K585-100, USA). Le dosage a été effectué selon

les instructions du fabricant. Brièvement, les cellules ont été incubées dans du DMEM -LG sans sérum contenant 10 pg / mL 1,1'-Dioctadecyl- 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorateacetylant-LDL (Dil-Ac-LDL) pendant 4 heures à 37°C. Les cellules ont été ensuite lavées et visualisées sous un microscope à fluorescence.

11. Analyse Statistique

Les données sont présentées selon la moyenne \pm l'écart type de la moyenne. Les différences statistiques entre les groupes d'expériences sont analysées par analyse de la variance ou un test-t(Prism 5). Un test de Boneferri est effectué à posteriori et les valeurs de p inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives statistiquement.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1 Isolement et caractérisation des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton

Comme mentionné précédemment, la source des cellules est un facteur clé à prendre en compte en ingénierie tissulaire. Il est essentiel de contrôler la qualité des cellules souches selon les protocoles en usage dans les Unités de Thérapie Cellulaire agréées. Ainsi, dans ce travail, la qualité des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton a été contrôlée via l'analyse de leur morphologie, leur capacité à former des colonies, l'analyse du phénotypage via l'expression de marqueur de surface et leur capacité de différenciation vers des lignées mésodermiques.

1.1 Isolement des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton

Afin de pouvoir extraire les cellules de la gelée de Wharton avant la mise en culture, nous avons utilisé un protocole d'extraction dite mécanique. Elle consiste à décaper le cordon ombilical de une veine et de ses deux artères puis à découper la matrice extracellulaire en petits morceaux et à les mettre au fond d'un puits de culture dans lequel les CSMs vont migrer et adhérer (Margossian, Reppel et al. 2012).

Les cordons ombilicaux ont été recueillis par la Maternité Régionale Universitaire du CHU de Nancy entre novembre 2013 et juillet 2014. L'acheminement de ces cordons ombilicaux vers le laboratoire est encadré par une convention signée entre la faculté de médecine, la maternité et le CHU. A cette époque, ces cordons ombilicaux sont encore considérés comme des déchets opératoires dont le don est soumis au régime de « non opposition » et ne nécessite pas le consentement des mères donneuses. Nous avons prélevé de la gelée de wharton selon le protocole mentionné précédemment strictement (Figure 32), après prélèvement, les cellules ont été mises en culture.

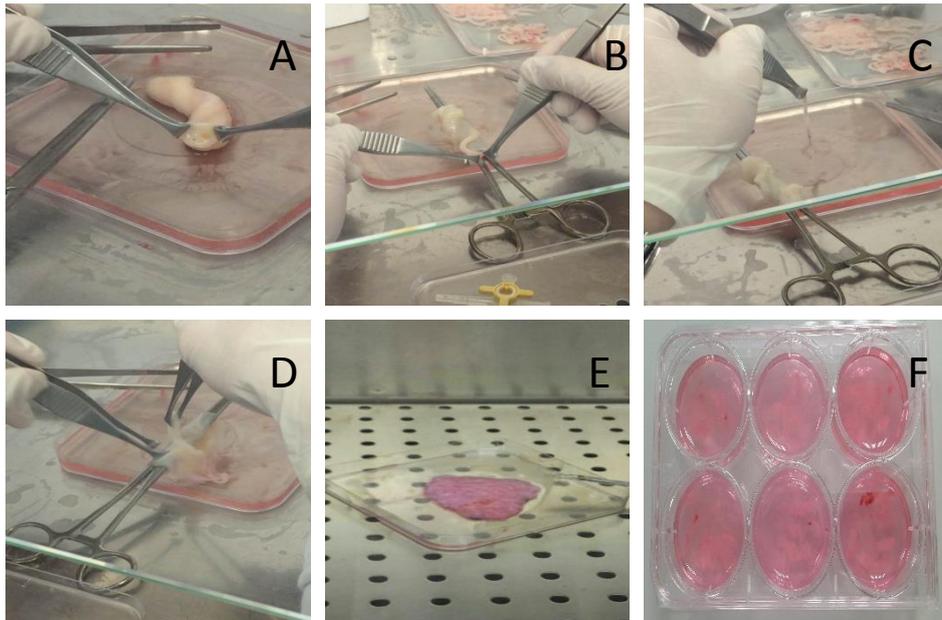
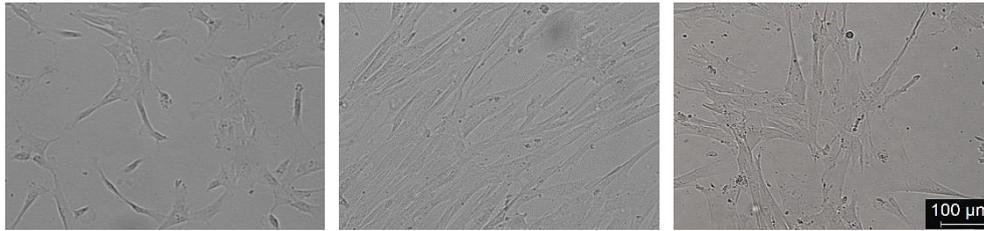


Figure. 32 Isolement de la gelée de wharton issue du cordon ombilical.

(A) le cordon ombilical a été retiré du flacon T75 et lavé avec de l'alcool. (B) incision longitudinale dans la paroi du cordon. (C) retrait des artères ombilicales. (D) décollement de la veine ombilicale (E) coupure de la gelée de Wharton en morceaux après enlèvement des artères et des veines et (F) la gelée de wharton est distribué dans la plaque à six puits.

Lors de la primo-culture (P0), les morceaux de gelée de Wharton ont été maintenus, durant 7 jours, dans des plaques 6 puits. Il y a deux grands groupes de cellules à passage primaire (P0) : l'un composé de cellules adhérentes sur le fond des boîtes de culture et l'autre formé de cellules rondes et flottantes. Les cellules rondes et flottantes disparaissaient au fur et à mesure des changements du milieu de culture, alors que les cellules adhérentes aux boîtes se multipliaient. Dès le 7^{ème} jour, ces dernières cellules ont été observées au microscope optique, elles ont une forme fusiforme; cette morphologie est semblable à celle des fibroblastes. Environ 14 jours après l'ensemencement initial, les cellules arrivaient complètement à confluence et la première subculture était effectuée (P1). Les cellules ressemblaient à de longues cellules fibroblastiques et commençaient à former des colonies. Cette morphologie fibroblastique a été maintenue tout au long de l'expansion : de P0 à P7 (Figure 33). En même temps, après deux passages, toutes les cellules présentent une forme fusiforme (P3) et devenaient de plus en plus uniformes et ordonnées. Avec l'augmentation du temps de culture, les cellules deviennent plus larges (P7). Leurs qualités d'adhésion et de morphologie étaient conformes à celle des CSMs (Figure 33).



P0 X 100

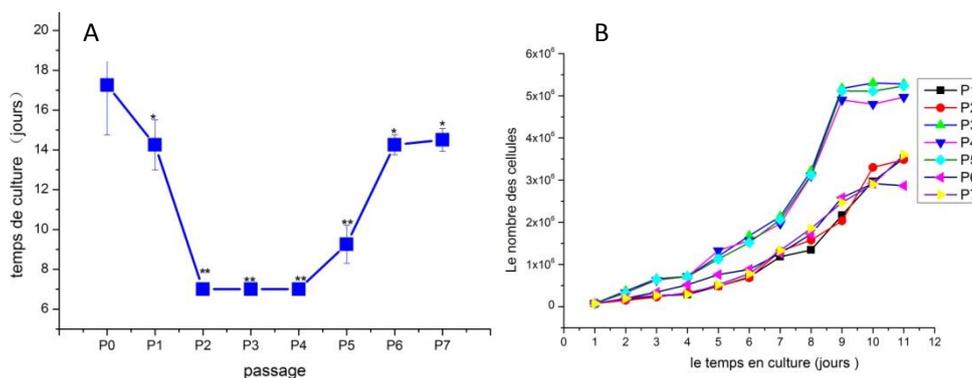
P3 X 100

P7 X 100

Figure. 33 Morphologie des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton

Lors de la culture en P0, deux morphologies sont observées au microscope à contraste de phase : des cellules sphériques et des cellules fusiformes. Lors du P3 à P7, toutes les cellules devenaient uniformes et ordonnées et présentent une forme fusiforme. La taille des cellules augmente de P3 à P7

Concernant l'expansion cellulaire, il apparaît, sur la figure 34, que le temps de culture diminue de manière significative entre P0 et P1 pour atteindre un temps minimum de 7 jours au cours du 2^{ème} passage et jusqu'au 5^{ème} passage, ceci augmente aux passages suivantes ($p < 0,001$ figure 34 A). Parallèlement au temps de culture, une estimation du temps de doublement de la population, qui reflète la capacité de prolifération des cellules, a été réalisée lorsque les cellules atteignaient > 90% de confluence par le calcul du nombre total de cellules à l'aide de bleu trypan. Ceci a permis de tracer la courbe de croissance des cellules (Figure 34 B). Le temps de doublement est calculé selon la formule suivante (Temps de doublement = $T_c \times \text{Log}2 / (\text{Log} (N_f/N_i))$ avec, T_c = temps de culture (jours), N_f = nombre final de cellules, N_i = Nombre initial de cellules). Le temps de doublement de population semble augmenter au cours de l'expansion (Figure 34 C, D).



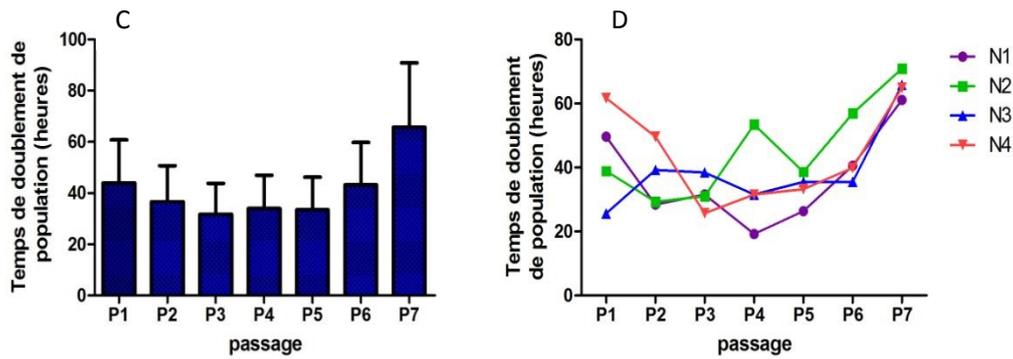


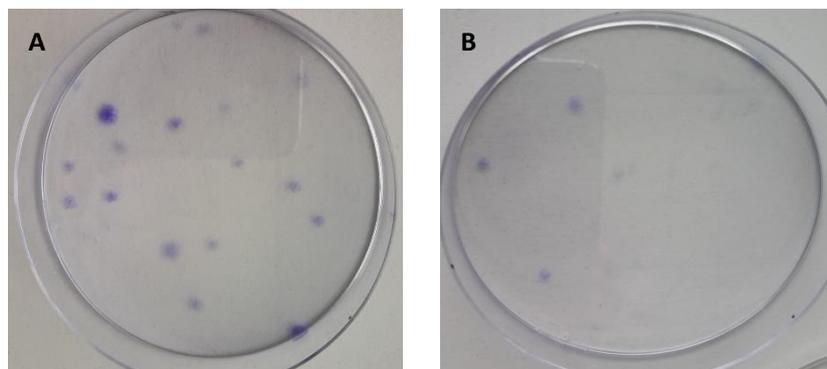
Figure. 34 La capacité de prolifération cellulaire

(A) l'expansion en monocouche des CSMs-GW. Concernant l'influence de l'expansion sur le temps de culture, il apparaît que le temps de culture diminue de manière significative entre P0 et P1 pour atteindre un temps minimum dès P2 à P5 ; (B) courbe de croissance des cellules ; (C), (D) Le temps de doublement de population semble augmenter au cours de l'expansion. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (N = 4). ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ (Fig A : P0 vs Px, Fig C P1 vs Px)

1.2 Caractérisation des CSMs-GW utilisées dans cette étude

1.2.1 La capacité des CSMs-GW à former des colonies (CFU-F)

La capacité à former des colonies fibroblaste (CFU-F) est une des caractéristiques des cellules souches. En effet toutes les cellules d'une colonie sont issues d'une seule cellule et forment ainsi un clone. De ce fait, la qualité de l'échantillon sera déterminée entre autre, par le nombre de colonies obtenues en culture dite clonogénique. Nous avons réalisé des essais clonogéniques avec 100 cellules par boîte de Pétri (58cm²) lors des passages P1, P2, P3 et P7. Des images représentatives de CFU-F obtenues en passage 3 et passage 7 sont présentées dans la Figure 5. Après 14 jour les colonies sont colorés par cristal violet. La taille et le nombre de CFU-F sont analysés à l'aide du logiciel ImageJ. Le nombre (Figure 35 C) et la taille (Figure 35 D) de CFU-F semble diminuer au cours de l'augmentation du passage.



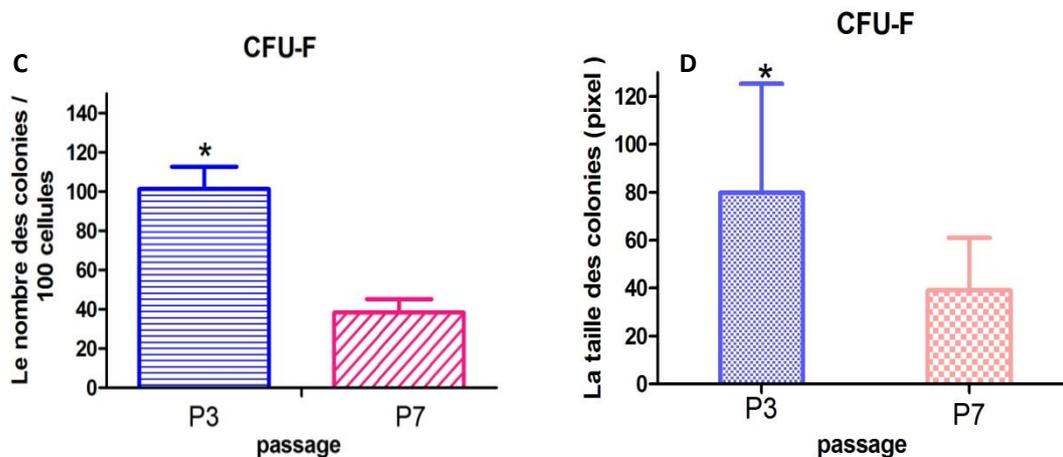


Figure. 35 Formation de CFU-F.

Le test de CFU-F indiquant le potentiel des CSMs à former des colonies grâce à la coloration au cristal violet. (A) passage 3, (B) passage 7 ; (C) nombre et (D) taille des colonies de CFU-Fs . Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (N = 4), * $p < 0,001$.

En parallèle, nous avons déterminé, via l'expression de l'activité de l'enzyme SA- β -galactosidase, la présence de cellules sénéscentes dans les cultures. Nos résultats montrent que une diminution de la capacité de prolifération et lié à la capacité de formation de colonies mais également à une augmentation des marqueurs de senescent liés à l'expansion *in vitro*. Au long de l'expansion *in vitro*, les cellules présentent un arrêt irréversible du cycle cellulaire associé à des modifications morphologiques et fonctionnelles des cellules a l'aide de la coloration d'activité accrue de l'activité de SA- β -galactosidase (SA- β -galactosidase) (Figure 36).

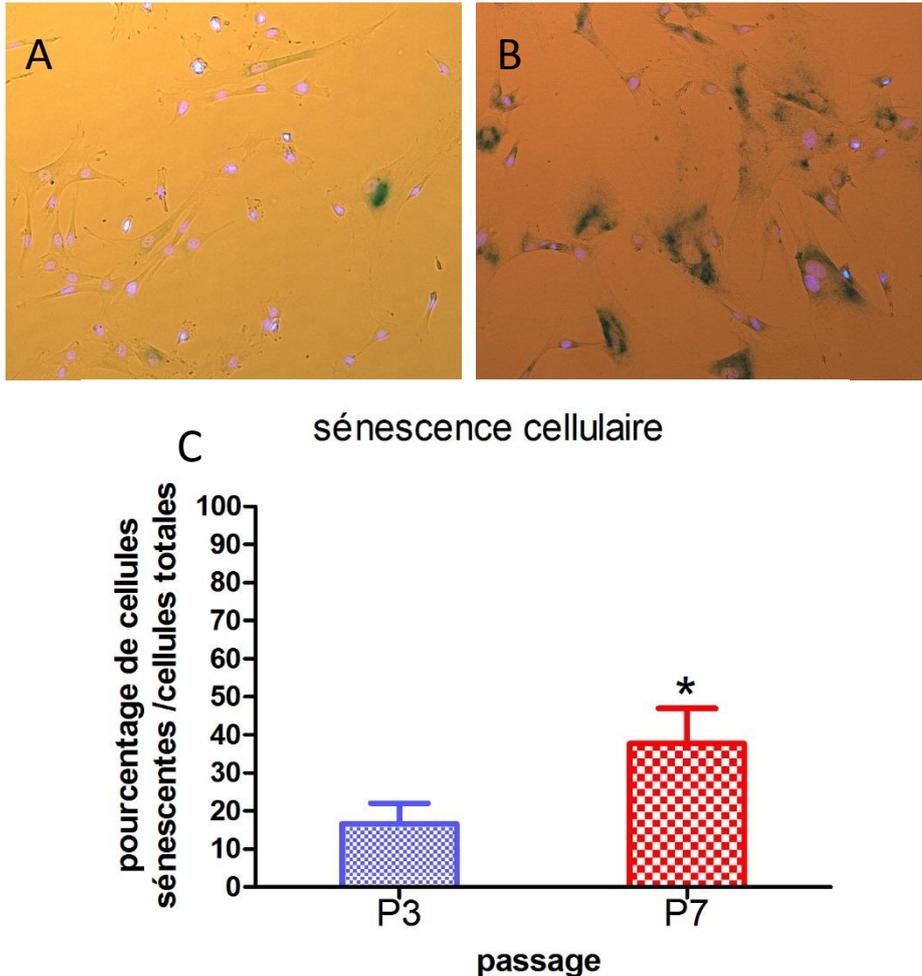


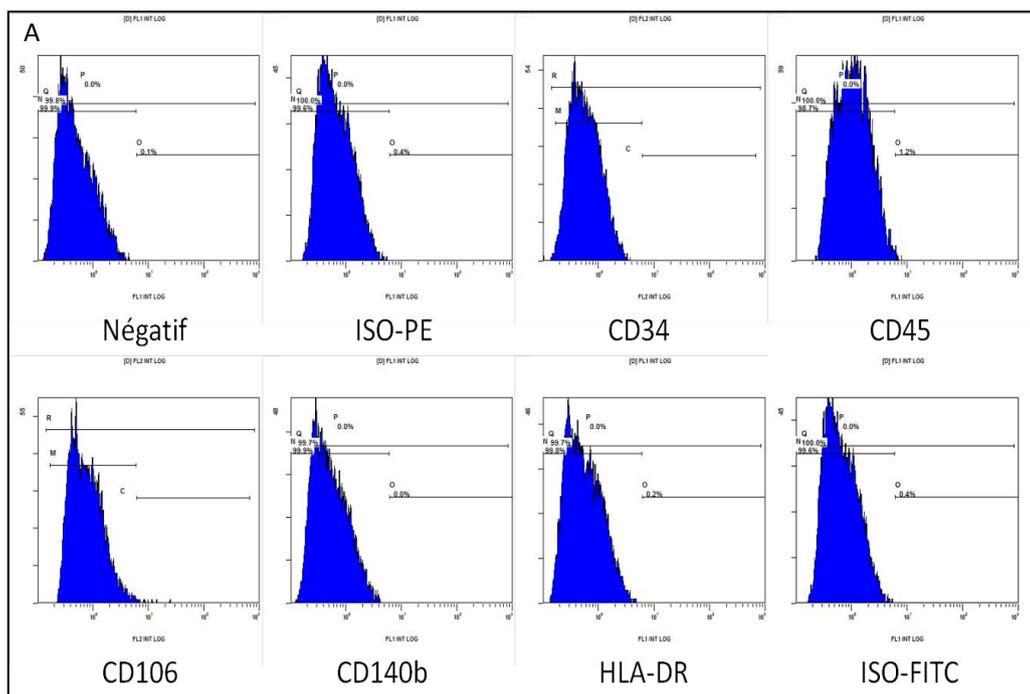
Figure. 36 Sénescence de CSM-GW lors de la culture

Activité de l'enzyme SA-β-galactosidase à passage 3 (A) et passage 7 (B). Le pourcentage de cellules sénescents augmente au long de la culture (C). Le résultat est exprimé en moyenne ± SD (N = 4), * $p < 0,001$.

1.2.2 Expression des marqueurs à la surface des CSMs-GW

L'analyse du phénotype est réalisée par l'étude de l'expression de marqueurs exprimés à la surface cellulaire (CD34, CD44, CD45, CD71, CD73, CD90, CD105, CD106, CD140b, CD146, CD166, CD200 et HLA-DR) par cytométrie en flux après immunomarquage direct à l'aide des anticorps spécifiques couplés à des fluorochromes (FITC ou PE). La Figure 37 et la Figure 38 montrent un exemple de phénotypage des CSMs-GW à passage 3 et/ou passage 7 utilisées dans cette étude. Dans chaque graphique, l'abscisse est le nombre d'événements et l'ordonnée est l'intensité de fluorescence. Le seuil de positivité est arbitrairement fixé à la zone O/C, c'est-à-dire que si l'intensité de fluorescence des cellules dépasse le seuil de positivité, ces cellules expriment positivement le marqueur. e négatif et les contrôles isotypiques permettent de déterminer le seuil de positivité (O/C). L'étude du

phénotypage indique l'absence des marqueurs CD34, CD45, CD106, CD140b, et l'absence de HLA-DR (Figure 37 A) ainsi que la présence de CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, et CD200 (Figure 38 A) à la surface de cellules. Nous avons constaté que la pourcentage d'expression des marqueurs négatifs de surface cellulaire (Figure 37 B) ne changent pas entre les cellules en passage 3 et passage 7. En parallèle, l'expression des marqueurs positifs de surface cellulaire (Figure 38 B) et l'intensité de fluorescence (Figure 38 C) ne changent pas significativement entre les cellules en passage 3 et passage 7 hormis pour le marqueur CD146 qui présente une corrélation négative entre le passage en culture et le pourcentage d'expression ou l'intensité moyenne de fluorescence (Figure 38 B, C).



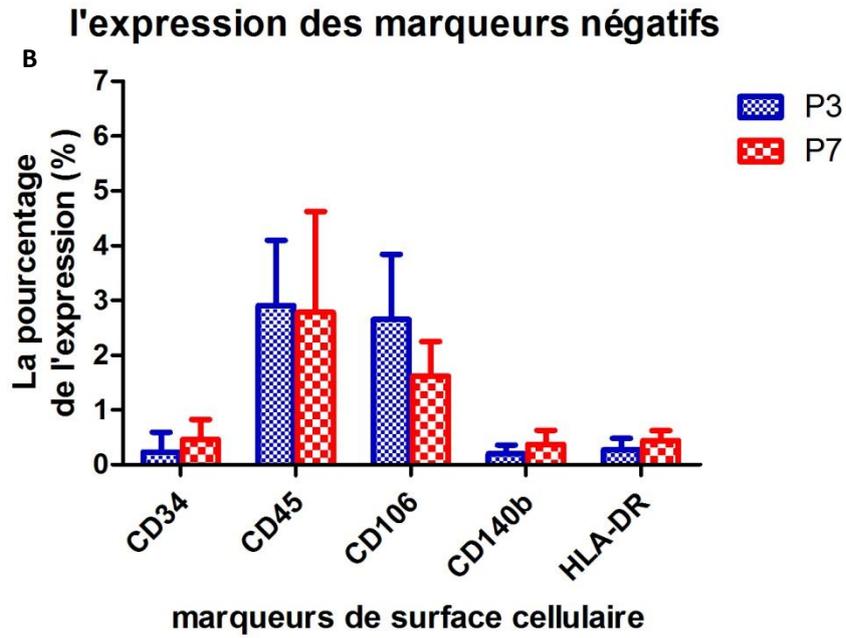
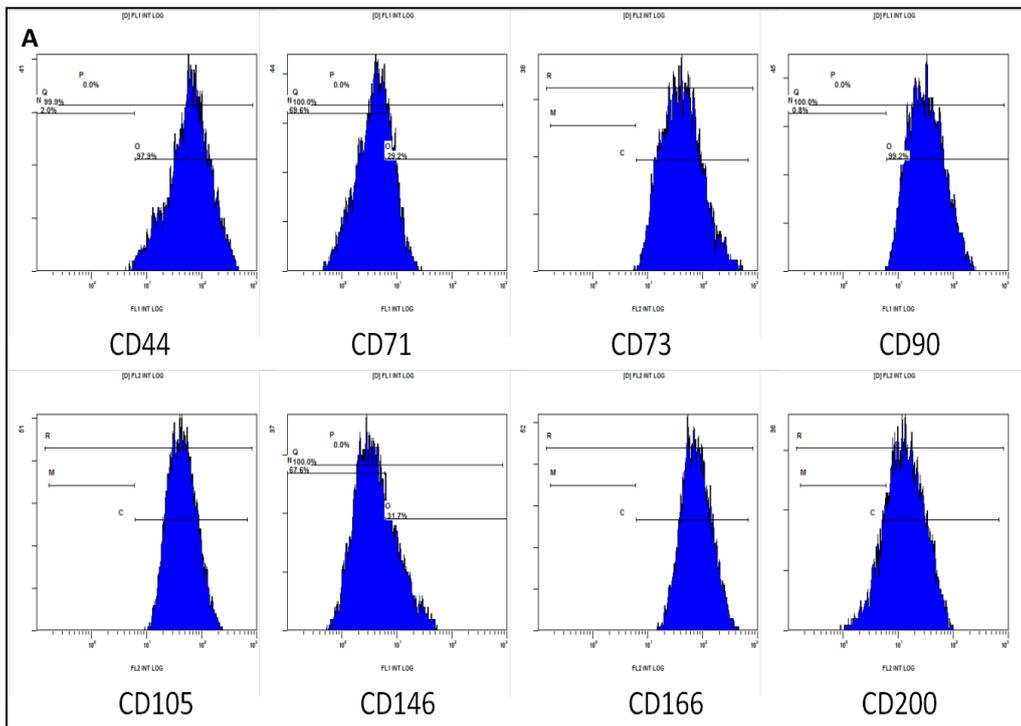


Figure. 37 Expression des marqueurs négatifs des CSMs-GW par cytométrie en flux

(A) L'étude du phénotypage présente l'absence des marqueurs de surface CD34, CD45, CD106, CD140b, et l'absence de HLA-DR ; (B) Pourcentage d'expression des marqueurs négatifs de surface cellulaire à passage 3 et à passage 7. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (N = 4), * $p < 0,05$.



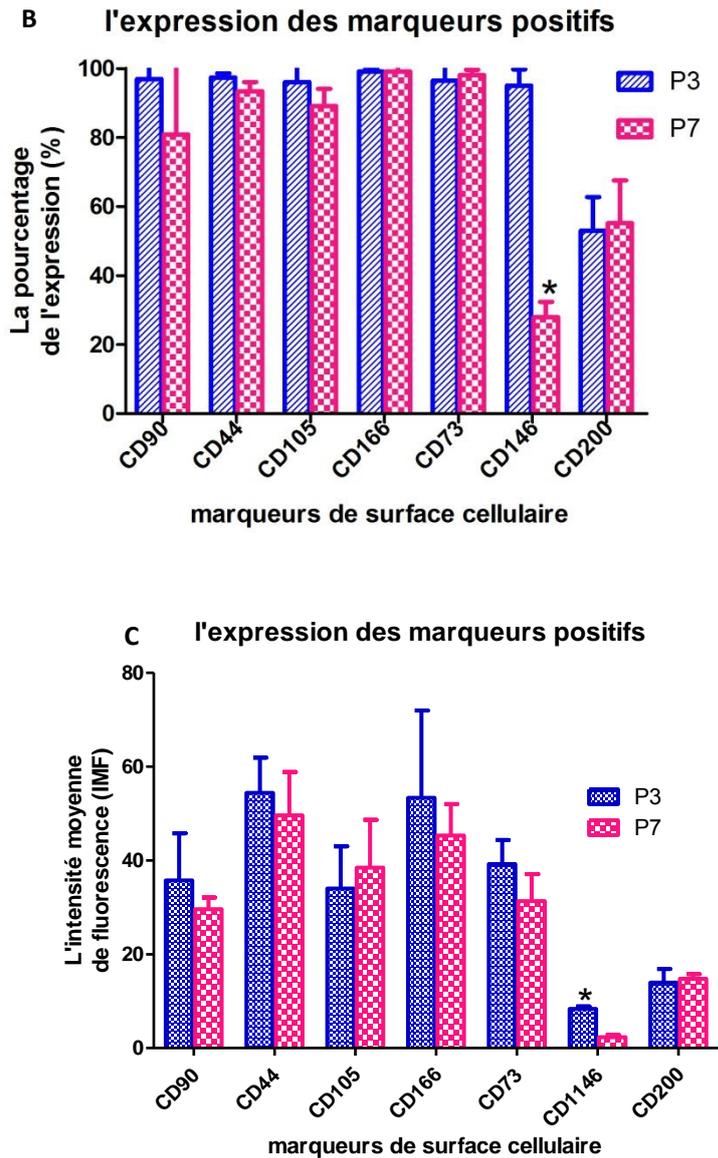


Figure. 38 Le présence des marqueurs surfaciques par cytométrie en flux des CSMs-GW

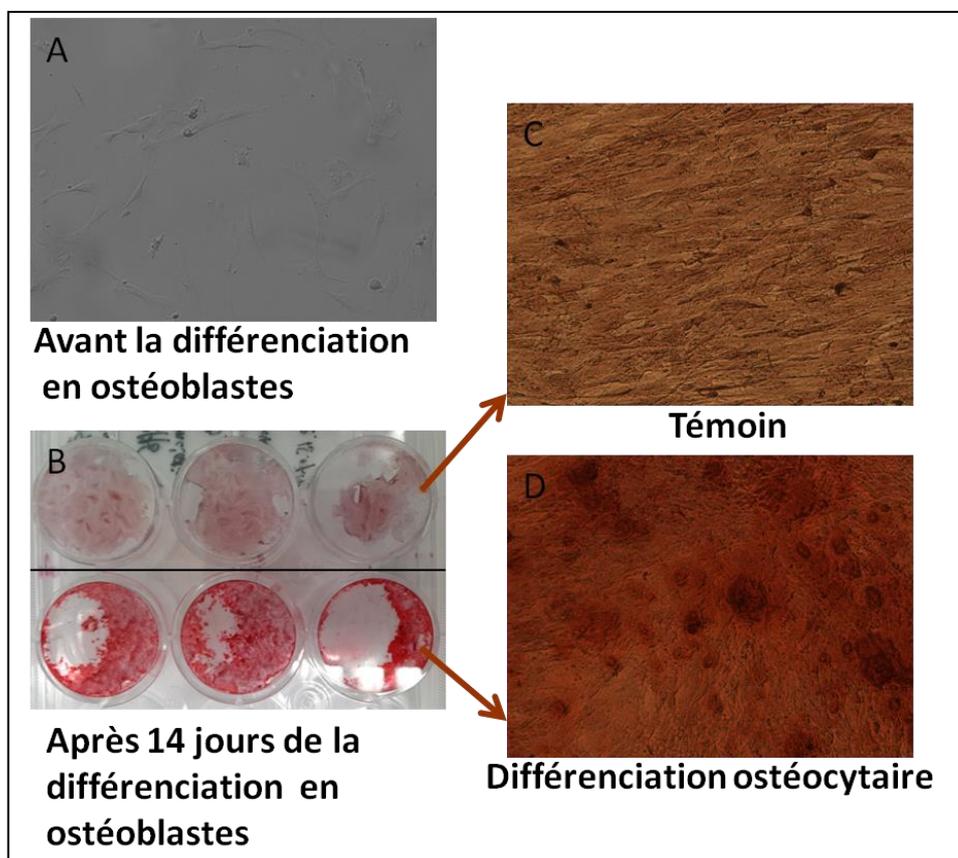
(A) L'étude du phénotypage présente la présence de CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, et CD200; (B) Analyse du pourcentage de l'expression des marqueurs positifs de surface cellulaire à passage 3 et à passage 7; (C) Analyse de l'intensité moyenne de fluorescence des marqueurs positifs de surface cellulaire à passage 3 et à passage 7. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (N = 4), * $p < 0,05$.

1.2.3 Différenciation des CSMs-GW en ostéoblastes et adipocytes

Afin de vérifier la capacité de différenciation de CSM-GW vers des lignées mésodermiques, nous avons effectué le différenciation en ostéoblastes et en adipocytes.

Lorsque les CSMs-GW à passage 3 et passage 7 arrivent à une confluence de 40%

dans des plaque de 6 puits, nous réalisons la différenciation osteocytaire. Après 14 jours de différenciation des CSMS-GW à passage 3 et passage 7 en ostéoblastes dans un milieu conditionnel commercial (differentiation basal medium-osteogenic, cat : PT3924, Lonza, France), le méthode de la coloration sélective, le rouge d'alizarine, a été appliqué pour mettre en évidence le dépôt de calcium. La coloration d'alizarine pigmente les dépôts calciques en rouge. Les images de coloration de rouge d'alizarine sont montrées dans la figure 39, les dépôts calciques colorés en rouge ont été observés au microscope optique. Ceci prouve que les CSMS-GW obtenues peuvent bien se différencier en ostéoblastes (B, C D). Nous avons par la suite réalisé la quantification de la coloration du rouge d'alizarine par un dosage semi quantitatif, par comparaison de l'absorbance à 570 nm des puits différenciés aux puits témoins (non différenciés). Nous avons aussi comparé les valeurs obtenues pour les puits différenciés en passage 3 et passage 7. Une diminution de la capacité de différenciation des cellules a été observé au cours des passages.



Quantification de la coloration du rouge alizarine

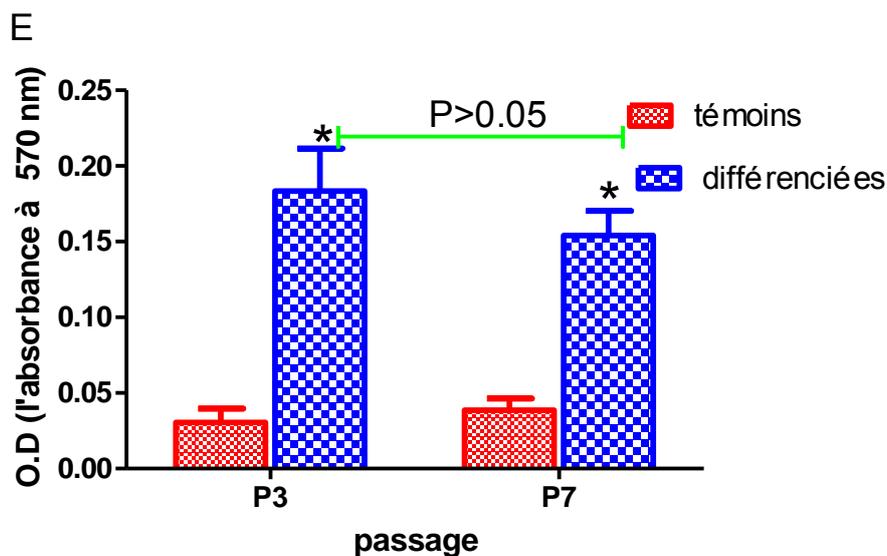


Figure. 39 Evaluation des dépôts de minéralisation calcique après 14 jours de différenciation ostéocytaire, après coloration par le Rouge Alizarine

(A). Avant la différenciation ostéocytaire, la confluence est d'environ 40% ; (B) image de toute la plaque de 6 puits après 14 jours de la différenciation en ostéoblastes. (C) image d'un puit témoin (cellules maintenues en culture dans un milieu non inductif) sous la microscope optique (X 100) ; (D) image d'un puit des cellules induites en différenciation ostéocytaire (X 100) ; (E) quantification de la coloration du rouge d'alizarine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (N = 3), * $p < 0,05$.

Lorsque les CSMs-GW à passage 3 et passage 7 arrivent à confluence dans des plaques de culture de 6 puits, nous avons réalisé la différenciation adipocytaire selon les instructions du fabricant dans des milieux conditionnels commerciaux qu'ils s'appellent adipogenic induction medium (cat:PT-3102B, lonza, France) et adipogenic maintenance medium (cat:PT-3102A, lonza, France). Le méthode de coloration sélective, « Oil Rouge O », a été appliquée pour identifier des lipides hydrophobes. La différenciation induit un changement morphologique des cellules, les cellules sont devenues plus sphériques. L'espace intercellulaire est devenu plus grand et la tendance au détachement cellulaire a été observée pendant la différenciation. Les cellules différenciées contenaient de gouttelettes lipidiques visibles au microscope après coloration par de l'huile rouge O. Quelque soit le milieu d'induction utilisé dans notre étude, la Figure 40, montre que les CSMs issues de la gelée de Wharton peuvent difficilement être induites dans la voie de différenciation adipogénique. Ensuite, nous avons fait la quantification de la coloration Oil rouge O par un dosage semi quantitatif, et nous avons comparé l'absorbance à 510 nm au spectrophotomètre des puits différenciés aux puits témoins (non différenciés). Nous avons aussi comparé les valeurs obtenues pour les puits différenciés en passage 3 et passage 7.

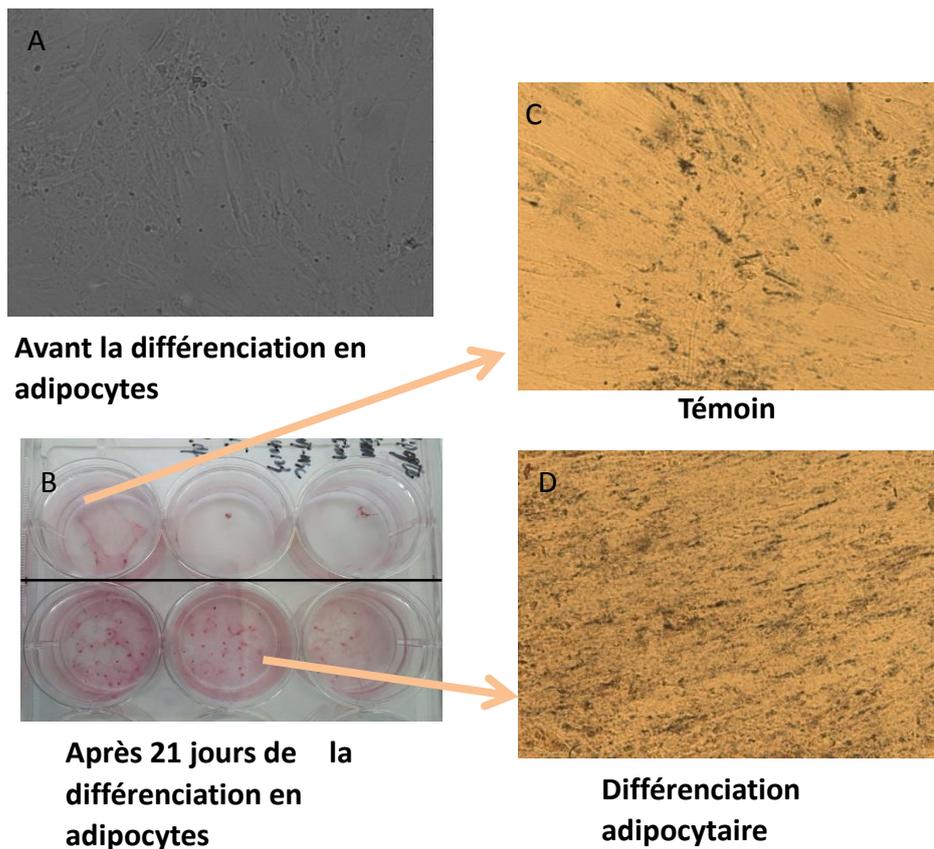


Figure. 40 Evaluation de la coloration Oil Red après 21 jours de différenciation adipocytaire des CSMs-GW

(A) Avant la différenciation adipocytaire, la confluence est d'environ 100% ; (B) image de toute la plaque de 6 puits après 21 jours de différenciation en adipocytes. (C) image d'un puit témoins (cellules maintenues en culture dans un milieu non inductif) (X 100) ; (D) image d'un puit des cellules induites en différenciation adipocytaire (X 100) ; (E) quantification de la coloration du Oil Red. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (N = 3), * $p < 0,05$.

1.3 Discussion

La gelée de Wharton tient son nom de son découvreur, Thomas Wharton (Wharton 1656). Il est un tissu conjonctif embryonnaire, la prédominance de sa substance fondamentale lui donne une matrice extracellulaire très fluide. Son rôle est d'enrober le cordon ombilical. La gelée de Wharton du cordon ombilical est riche en cellules souches mésenchymateuses et en progéniteurs endothéliaux. Parce qu'il a une relation ontogénétique étroite avec les cellules souches embryonnaires, les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton ont des caractéristiques immunoprivilégiées, possèdent une plasticité multipotente plus large, et prolifèrent plus rapidement que les cellules souches mésenchymateuses adultes (Marcus and Woodbury 2008; Roubelakis 2013). Les cellules de la gelée de Wharton sont faciles à prélever avec de l'avantage non invasive et pourraient par le biais de banques cellulaires servir de réserve potentielle cellulaire pour toute la vie d'un individu donné. En outre, ces cellules pourraient être isolées et utilisées sans problème éthique, car les tissus extra-embryonnaires sont normalement jetés après la naissance (Marcus and Woodbury 2008; Kmiecik, Niklinska et al. 2013). Ces avantages nous ont conduits à vouloir caractériser ces cellules. Ce travail a été réalisé, au sein de notre laboratoire de recherche, lors de ma première année de thèse d'Université. Actuellement, il y a deux méthodes (enzymatique ou mécanique) plus utilisées pour prélever des cellules souches mésenchymateuses fœtales issues de la gelée de Wharton, et ces deux méthodes peuvent influencer sur la quantité et la qualité des cellules isolées en modifiant notamment la capacité de prolifération des cellules isolées selon du travail de la thèse d'Université de Talar Margossian intitulée : « Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses du sang placentaire et de la gelée de Wharton », soutenue le 25 mars 2013. Nous adoptons « la méthode mécanique » pour prélever des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton parce que « la méthode enzymatique » induit plus de risque de contamination et les méthodes de digestion enzymatique diminuaient la viabilité cellulaire due à l'activité lytique et à la sensibilité aux collagénases (Salehinejad, Alitheen et al. 2012) bien que la méthode enzymatique utilisant la collagénase permet d'extraire plus rapidement les cellules (24 heures après la digestion) et d'obtenir une densité cellulaire plus élevée par rapport à la méthode mécanique.

Le terme de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) a été donné par Arnold Caplan en 1991 lors de travaux qui ont permis l'identification de cellules présentant les propriétés de cellules souches (Caplan 1991) et sont définies comme des progéniteurs non hématopoïétiques caractérisés par leur capacité d'adhérence au plastique, l'expression de marqueurs phénotypiques spécifiques et leur potentiel de différenciation en cellules de la voie mésodermique (Paniushin, Domaratskaia et al. 2006; Menard and Tarte 2011; Kim and Cho 2013). Les CSMs sont des cellules souches présentes dans le mésenchyme de l'embryon. Elles sont un exemple de tissu ou de cellules souches "adultes". Elles sont "multipotentes", ce qui signifie

qu'elles peuvent produire plus d'un type de cellule spécialisée du corps, mais pas tous les types (Paniushin, Domaratskaia et al. 2006; Kode, Mukherjee et al. 2009; Parekkadan and Milwid 2010). En générale, les cellules souches mésenchymateuses doivent concorder trois critères : (1) possèdent la puissante capacité à s'adhérer à la boîte en plastique de culture, à se multiplier et à se renouveler avec une morphologie fibroblastique; (2) exprimer au moins un marqueur des marqueurs protéiques spécifiques : CD6, CD10, CD29, CD44, CD73, CD90, CD106, CD146, CD166, CD200, STRO-1, etc. mais en même temps, elles n'expriment pas au moins deux marqueurs parmi les marqueurs de cellules hématopoïétiques : CD11b, CD34, CD45, CD105, HLA-DR, etc. ; (3) se différencier en nombreuses lignes cellulaires comme chondrocytes, adipocytes et ostéocyte. Nous avons donc observé les cellules provenant de la gelée de wharton aux microscopes optique et fait des colonies du CFU-F au début de ce travail. Sous le microscope optique, nous pouvons observer deux morphologies : des cellules sphériques et des cellules fusiformes à passage primo (P0) mais toutes les cellules devenaient uniformes et ordonnées et présentent une forme fusiforme dès passage prime (P1). En même moment, les CSMs provenant du cordon ombilical forment des colonies grâce à la coloration du cristal violet qui possèdent morphologie de type fibroblastique observée dès P0 et jusqu'à P7. Ce résultats indiquent que les cellules peuvent s'adhérer à la boîte en plastique de culture et à se proliférer avec une morphologie fibroblastique. Nous avons aussi constaté que avec l'augmentation de la génération de cellules, la capacité à se former des colonies a diminué. Ce phénomène peut être dû à l'augmentation de la génération cellulaire, les cellules ont progressivement commencé à vieillir, par conséquent aboutir à la diminution de la prolifération.

Les caractéristiques mésenchymateuses de cellules issues de la gelée de wharton ont été confirmées par l'expression de marqueurs de lignée cytosquelette spécifiques, tels que SMA et la vimentine (Al-Nbaheen, Vishnubalaji et al. 2013). En outre, les marqueurs cellulaires souches embryonnaire, comme CD59, CD146, Oct-4, SSEA4, Nucleostemin, SOX-2 et Nanog, ont également été révélés (Mikaeili Agah, Parivar et al. 2013). CD146 est une molécule d'adhésion cellulaire exprimée non seulement sur les cellules endothéliales, mais aussi sur les cellules souches mésenchymateuses (Noort, Oerlemans et al. 2012). Preuves *in vitro* et *in vivo* indiquent la gelée de wharton comme une excellente source de cellules souches mésenchymateuses parce que ses cellules présentent une large gamme d'applications thérapeutiques potentielles. Ce potentiel de différenciation myogénique des CD105⁽⁺⁾ des cellules de la gelée de wharton a été confirmée en utilisant des essais *in vitro* (Amiri, Halabian et al. 2014). Les antigènes de surface SH2 (CD105), SH3 (CD73), et Thy-1 (CD90) sont largement utilisés pour l'identification des CSMs issues de la gelée de Wharton (Roura, Farre et al. 2006; Amiri, Halabian et al. 2014). Ces marqueurs sont également exprimés par les cellules hématopoïétiques et endothéliales, par conséquent, il est nécessaire de bien exclure les cellules d'origine hématopoïétique ou endothéliale en étudiant l'expression des marqueurs de surface comme CD34, CD45 ou CD31 (Margossian, Reppel et al. 2012). Le récepteur CD44 est également un marqueur communément

admis. En résumé, les CSMs du cordon ombilical représentent une population de cellules adhérentes qui partagent un ensemble de marqueurs de surface avec les CSMs adultes, y compris CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD51, CD73/SH3, CD90 (Thy-1), CD105/SH2, CD106, le CD117, CD166 et HLA -1/HLA ABC, et sont négatifs pour les marqueurs hématopoïétiques (par exemple, CD14, CD34, CD38, CD45 et HLA-DR) et endothéliaux (CD31 négatif) (Margossian, Reppel et al. 2012; Batsali, Kastrinaki et al. 2013; Roubelakis 2013; Glenn and Whartenby 2014). Nos résultats montrent que les cellules cultivées en monocouche possèdent un phénotype avec des présences de CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, et CD200 mais simultanément une absence de CD34, CD45, CD106, CD140b, et HLA-DR. Ces résultats montrent que nos cellules prélevées de la gelée de Wharton et cultivées *in vitro* ont le phénotype des cellules souches mésenchymateuses caractéristiques non différenciées.

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 cellules souches mésenchymateuses (CSMs) et l'un de ses critères critiques des CSMs est défini de se différencier en nombreuses lignes cellulaires (Horwitz, Le Blanc et al. 2005; Keating 2006). Les CSMs 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. Concernant leur multipotence, une fois induite dans les différentes voies mésenchymateuses adipo-ostéo-chondrocytaire, par ajout de milieux de différenciation spécifique, les cellules provenant de la gelée de Wharton expriment de façon régulée dans le temps, les marqueurs moléculaires causaux de ces voies de différenciation. 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. Afin de confirmer que les cellules issues de la gelée de Wharton sont des CSMs, nous avons vérifié qu'elles pouvaient se différencier en de multiples cellules de tissus conjonctifs différents. Ainsi, nous avons choisi de les différencier en ostéocytes et en adipocytes, les pigmentations de d'alizarine (ostéocytes) et d'huile rouge O (adipocytes) bien que nous avons constaté que la différenciation en adipocytes est très difficile à réussir mais ce résultat est en accord avec le résultat de la thèse de Loïc Reppel 2011 dans notre laboratoire. En conclusion, les données de notre travail semblent indiquer que la multipotence des cellules soit le fruit d'une véritable « plasticité » comme définie précédemment.

L'ensemble des résultats de morphologie, la capacité de la prolifération, des colonies du CFU-F, des marquages spécifiques et des différenciations des cellules mésodermiques confirment que les cellules que nous avons obtenues à partir de la gelée de Wharton sont bien des CSMs avec une pureté importante. Nous en concluons que notre méthode de prélèvement des CSMs-GW est valable.

2 Le scaffold du foie décellularisé

Un élément clé dans le domaine de l'ingénierie tissulaire est l'utilisation des « scaffolds » qui sont des architectures sophistiquées tridimensionnelles, ces scaffolds bioactifs ont été considéré comme archétype pour favoriser les interactions cellulaires et la formation de la matrice extracellulaire, qui fournit un support structurel au tissu nouvellement généré. Dans l'optique d'élaborer la structure tridimensionnelle la mieux adaptée à la régénération du foie, le matériau doit avant tout être biocompatible, c'est-à-dire qu'il ne doit pas provoquer de réaction inflammatoire importante ni de toxicité au niveau des tissus receveurs et des cellules qu'il peut héberger (Brown, Barnes et al. 2010; Nieto and Lutolf 2011). Nous avons donc tout d'abord préparé des scaffolds décellularisés avec des architectures vasculaires intactes pour fabriquer des foies artificiels dans le domaine de l'ingénierie tissulaire du foie.

2.1. Optimisation du protocole pour la préparation du scaffold du foie de rat

L'intervention chirurgicale a été effectuée sans difficultés rigoureuses, sauf que nous devrions faire beaucoup d'attention lors de l'identification des éléments anatomiques, en particulier lorsqu'il est effectué la canulation de la veine porte et la veine cave supra-hépatique inférieure. Les animaux (rats Sprague-Dawley) ont été sacrifiés par injection directe de KCl dans le cœur. Les animaux ont été pris en charge complètement sous les recommandations fixées par le Comité des ressources de laboratoire, National Institutes of Health, et institutionnel de protection des animaux et l'utilisation du Comité Université de Lorraine, France. Après que le cadavre du rat a été placé avec les jambes fixes, la cavité abdominale a été ouverte par incision médiane ventrale longitudinale qui a ensuite été étendue à l'xyphoïde et exposé la veine mesentérique et l'aorte abdominale (Figure 41.A). Ensuite, nous avons déroulé des tissus autour et l'aorte abdominale a été isolée (Figure 41.B). Après l'aorte abdominale a été insérée du trocart et la veine a été clipsée avec mesentérique bouclée pince (Figure 41.C), les animaux ont été injectés avec une solution saline physiologique 250 ml contenant 10,000 UI d'héparine par l'aorte abdominale pour empêcher la coagulation du sang et les foies sont devenus pâles (Figure 41.D). La triade portale du foie du rat a été identifiée et ligaturée après injectée un canule (Figure 41.E). Les pièces jointes du foie ont été disséquées et le foie a été enlevé complètement. (Figure 41.F).

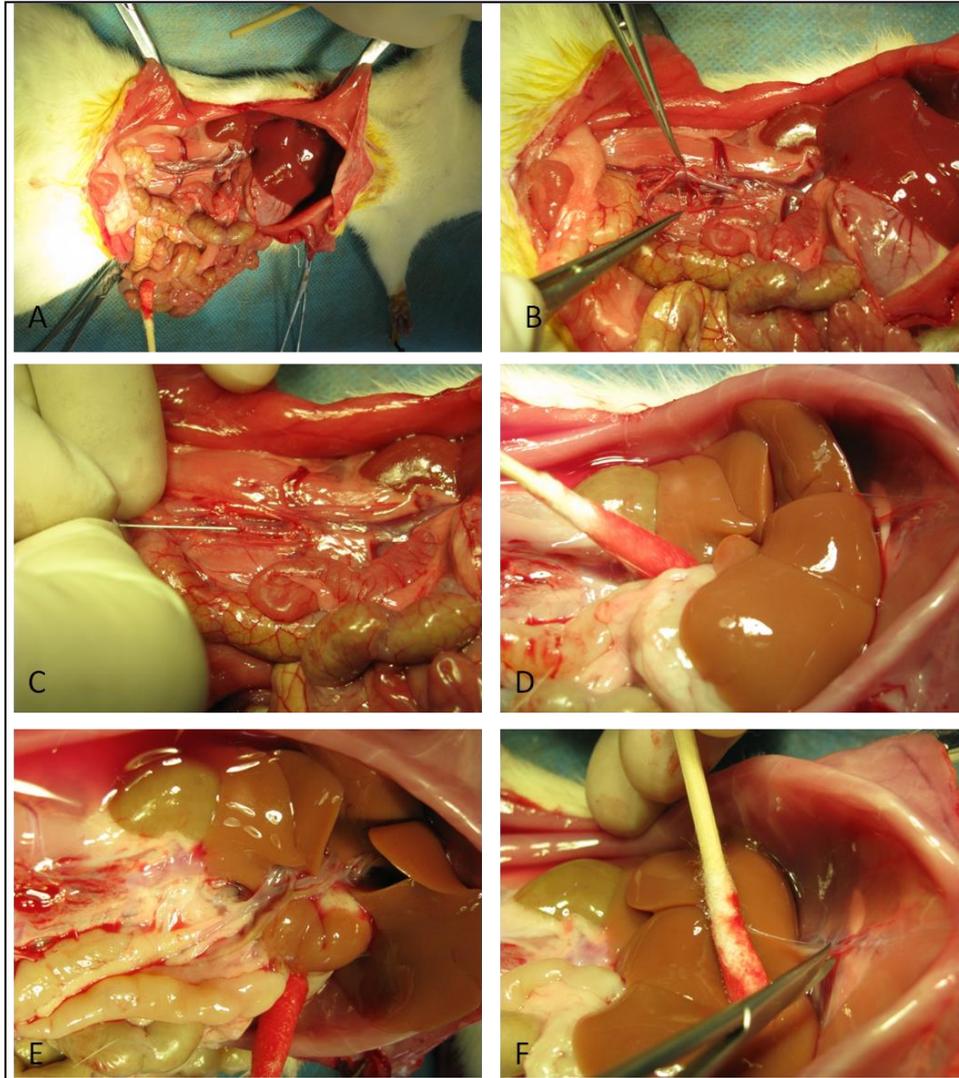


Figure. 41 La procédure chirurgicale de la préparation du scaffold du foie du rat (A) exposer la veine esenteric et l'aorte abdominale ; (B) isoler l'aorte abdominale ; (C) insérer du trocart et clipser la veine abdominale ; (D) injecter une solution saline physiologique ; (E) identifier et ligaturer la triade portail du foie ; (F) disséquer les pièces jointes du foie.

2.2 La caractérisation du scaffolds décellularisé du foie du rat

Comme mentionné précédemment (Figure 41.D), avant la perfusion de la solution contenant des agents de décellularisation *via* la veine porte et la veine cave inférieure du foie, le foie du rat montre une couleur kaki et après la perfusion continue pendant 6 heures avec du SDS 1% et triton-X100 1% à la vitesse fluide de 5mL/minute, le foie de rat montre un aspect translucide et blanc (Figure 42.A). Nous pouvons même voir clairement un arbre de capillaires dans une partie du foie (Figure 42.B).

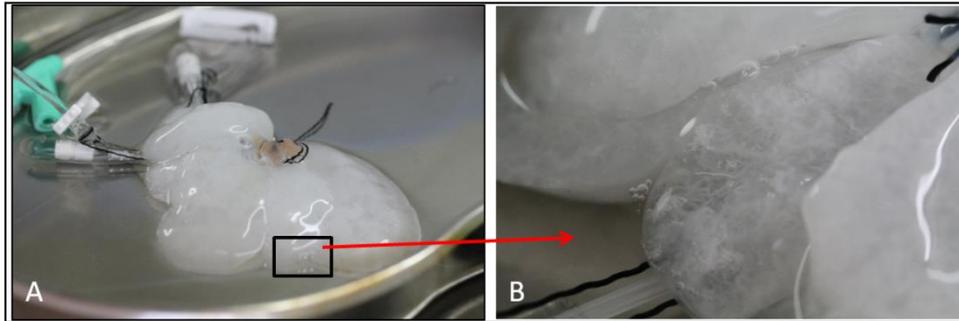


Figure. 42 Le Foie décellularisé avec aspect translucide et blanc.

(A) Aspect du foie décellularisé ; (B) un arbre de capillaires dans une partie du foie.

Après la décellularisation des foie des rats, nous avons fait les colorations des H&E (Hematoxylin and eosin stain) et Masson's trichrome pour déterminer que les cellules dans le scaffold décellularisé ont été éliminées mais que les collagènes et les glycosaminoglycanes étaient restés. A partir du résultat histologique de coloration H&E, une disparition complète de la configuration de la cellule et l'absence de noyaux a pu être observée dans le scaffold d'organes de foie décellularisé (Figure 43.A). La coloration de l'Masson a montré que les collagènes et les glycosaminoglycanes sont bien présentes (Figure 43.B) dans l'échafaudage du foie décellularisé qui indique que les architectures extracellulaires sont conservés intégralement.

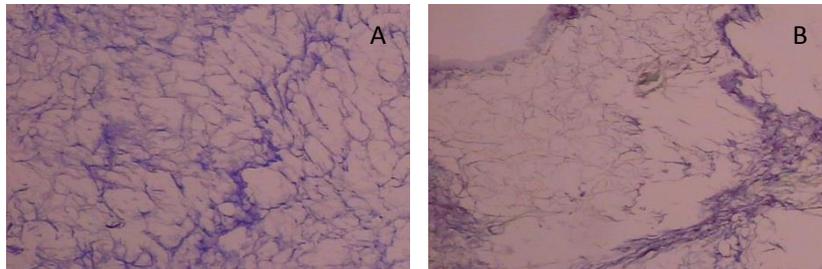


Figure. 43 Les colorations de foie décellularisé.

(A) H&E stain (Hematoxylin and eosin stain) : aucune cellule est observée en tranches. (B) Masson's stain : réseaux de Collagènes et des glycosaminoglycanes (200 ×).

Nous avons également réalisé la microscopie électronique à balayage (MEB) pour observer la micro-architecture extracellulaire, surtout pour déterminer si le réseaux vasculaires est resté intact. L'image d'une section transversale du scaffold du foie décellularisé (Figure 44.D) a montré une structure vasculaire sans cellules résiduelles tandis que le foie normal (Figure 44.C) a montré une section richement couverte de cellules. Ce résultat a confirmé que plus grand portail et le système de circulation veineuse des vaisseaux et la grande majorité des branches de la microcirculation plus petits ont été conservés, ce qui indique que l'écoulement physiologique pourrait être atteint en traversant le système veineux portal et de se jeter dans la circulation veineuse systémique via la veine hépatique et la veine cave inférieure cava.

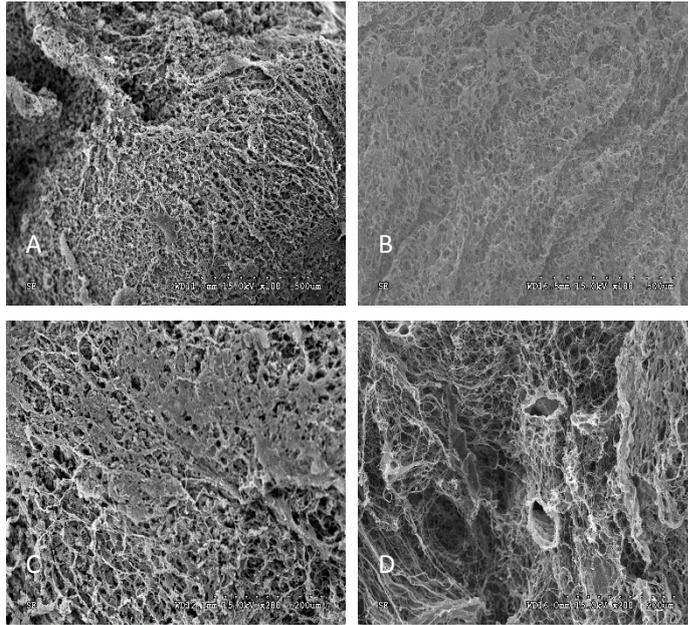


Figure. 44 Images de microscopie électronique à balayage (MEB).

Le foie de rat normal (A et C), et le foie décellularisé (B et D) ; A et B grossissement x 100, C et D grossissement x 200. L'image d'une section transversale du scaffold du foie décellularisé à 200 x grossissement (Figure 44.D) a montré une structure vasculaire sans cellules résiduelles tandis que le foie normal à 200 x grossissement (Figure 44.C) montre une section richement couverte de cellules.

L'accent mis sur matériel nucléaire est justifié parce que l'ADN est directement corrélé à des réactions indésirables d'hôte, est omniprésent dans tous les types de tissus et de cellules. Donc, la recherche de traces d'ADN dans des échafaudages décellularisés révèlent des vestiges cellulaires et la teneur en ADN suggère un indice général pour d'autres résidus de cellules dans l'ECM. Pour déterminer la trace d'ADN, nous avons extrait l'ADN dans tissus des foies différents. Le t-test pour des échantillons appariés a montré que la quantification de l'ADN évaluée par absorption ultraviolette à 260 nm ensuite converti en le contenu net de l'ADN par ng / mg de tissu était significativement différent ($p < 0,001$) entre les échantillons décellularisés et les échantillons normales (Figure 45). Ce résultat indique aussi que il n'a pas beaucoup de cellules dans les foie décellularisés et les scaffolds décellularisés sont adaptés pour accueillir les cellules exogènes.

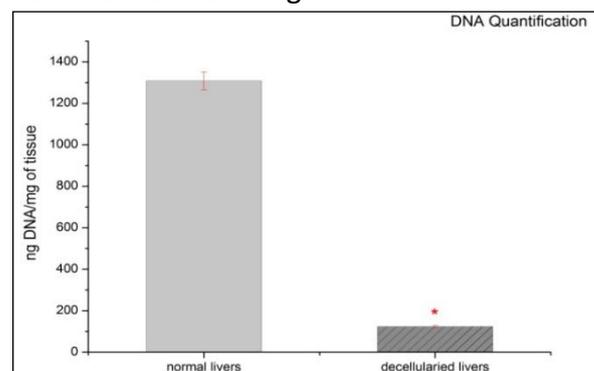


Figure. 45 Quantification de l'ADN.

Détermination d'ADN des foies normaux et décellularisés. Les barres représentent la moyenne \pm SD. (* $p < 0,001$ comparé avec foies normaux).

2.3 Discussion

La transplantation hépatique est considérée comme le traitement le plus efficace de l'insuffisance hépatique aiguë ou chronique résultant d'une variété de causes, mais cette procédure est limitée principalement en raison du manque de donneurs d'organes (Arenas-Herrera, Ko et al. 2013; Li, Harn et al. 2013; Sasai 2013; Takebe, Koike et al. 2014). En d'autres termes, le développement de l'ingénierie tissulaire du foie est également entravé par l'absence d'un scaffold transplantable idéal qui a tout le microenvironnement structurel et extracellulaire essentiel pour le homing cellulaire, la différenciation, le fonctionnement et la microvasculaire pour l'arrivée de l'oxygène et le transport des nutriments (Evans, Moran et al. 2013; Goh, Bertera et al. 2013; Li, Harn et al. 2013). Face à ce problème, les chirurgiens et scientifiques doivent envisager d'autres recours. Récemment, les experts ont fait le point sur les avancées de la recherche sur le développement d'organes auto-construits: reconstruire un "organe neuf" en se servant de l'organe atteint comme d'une matrice après l'avoir dépeuplé de ses cellules malades pour le recoloniser avec des "cellules neuves" (Shirakigawa, Takei et al. 2013; Yagi, Fukumitsu et al. 2013; Yagi, Soto-Gutierrez et al. 2013).

Depuis la publication du rapport sur la décellularisation réussie du foie par Uygun et al (Uygun, Soto-Gutierrez et al. 2010) plusieurs groupes ont commencé à développer des techniques de bio-ingénierie pour obtenir un organe à transplanter à partir d'un échafaudage tridimensionnel, impliquant la décellularisation d'organes. L'objectif de la décellularisation du foie est d'obtenir un échafaudage d'MEC avec une architecture adaptée, contenant la capsule de Glisson intacte et la structure vasculaire et biliaire conservée autant que possible. A ce jour, les protocoles de décellularisation hépatique sont extrêmement divers. Par exemple, Uygun et al. ont réussi la décellularisation hépatique par la perfusion seulement de SDS à 0,1% (Uygun, Soto-Gutierrez et al. 2010), tandis que Shupe et ses collègues ont effectué des concentrations de 1%, 2%, 3% de Triton X-100 et 0,1% de SDS (Shupe, Williams et al. 2010) et Soto-Gutierrez ont utilisé un agent enzymatique: la trypsine, combinant avec 3% de Triton X-100 (Soto-Gutierrez, Zhang et al. 2011). Basé sur le fait que 1% de SDS exerce une bonne décellularisation en éliminant avec succès les restes cellulaires, mais pourrait avoir un effet défavorable et porter atteinte à des facteurs de croissance extracellulaires et sur l'architecture du foie, tandis que 1% de Triton X-100 cause moins de dommages à l'architecture microvasculaire, nous avons fait la perfusion antérograde/rétrograde du foie continue avec 1% de SDS et Triton X-100 1%. Comme avec d'autres organes entiers décellularisés, les foies ont pris un

aspect translucide blanc pendant la perfusion dans nos études. Par rapport à de nombreux articles (plus de 16 heures de protocole), notre étude décrit une approche simple et relativement rapide (moins de 6 heures) pour la préparation d'un scaffold du foie décellularisée chez le rat. Dans nos études, après la décellularisation, les foies translucides blancs qui ont été évalués par microscopie optique avec coloration H&E, microscopie électronique à balayage (MEB), et la quantification de l'ADN. Tout d'abord, l'aspect visible de la vascularisation dans l'échafaudage décellularisé (montré en Figure 42), qui a été caractérisé par la suite par la coloration H&E, a montré que presque tous les composants cellulaires ont été détruits (Figure 43.A). En parallèle, la coloration de Masson a suggéré que les protéines extracellulaires de collagènes et des glycosaminoglycanes ont été bien conservés dans le scaffold décellularisé (Figure 43.B). En outre, les résultats de SEM (Figure 44.B et D) ont montré une vascularisation intrahépatique intacte et une architecture de matrice dans le foie décellularisé. Tous les résultats ci-dessus sont compatibles avec les investigations précédentes (Shupe, Williams et al. 2010; Uygun, Soto-Gutierrez et al. 2010; Soto-Gutierrez, Zhang et al. 2011; Pan, Hu et al. 2013; Ren, Shi et al. 2013). Il convient de noter que les colorations histologiques tels que H&E ou Masson trichrome fournissent des procédés relativement peu sensibles pour l'identification et l'analyse qualitative de l'ADN de la matrice extracellulaire. Enfin, nous avons procédé à la quantification de l'ADN pour évaluer la réaction immunologique potentielle du scaffold décellularisé du foie due à l'ADN abondant restant dans la matrice extracellulaire et qui doit être évité si l'application clinique est destinée à éluder toutes les réactions inflammatoires (Crapo, Gilbert et al. 2011; Arenas-Herrera, Ko et al. 2013). Le résultat a suggéré que l'ADN résiduel dans le foie décellularisé est inférieur à 10% par rapport aux foies de rats normaux (Figure 45). Uygun a aussi également montré des preuves que l'ADN a été retiré et que la microvascularisation, l'ultrastructure de la MEC et ses constituants tels que les collagènes I et IV, la fibronectine, la laminine et ont été préservés (Uygun, Soto-Gutierrez et al. 2010). La caractérisation complète des scaffolds décellularisés du foie indique s'ils seront aptes à supporter la réensemencement des cellules exogènes via la veine porte et la veine cave inférieure par d'assemblage avec la structure ultravasculaire. Les hépatocytes ont été réintroduits dans le foie décellularisé par portail perfusion veineuse dans les études de Uygun qui a montré la préservation des fonctions d'hépatocytes telles que la synthèse de lactate déshydrogénase et de l'albumine et de la production d'urée persistant jusqu'à 8 h après l'implantation hétérotopique (Uygun, Soto-Gutierrez et al. 2010).

Nos résultats (Ye, Stoltz et al. 2015) indiquent que les foies décellularisés seront utilisés dans la transplantation allogénique sans réaction immunologique grave et c'est cruciale dans l'évaluation fonctionnelle hépatique après la transplantation. Cependant, notre objectif à long terme est d'utiliser le scaffold comme une plate-forme de modèle pour les tests de toxicité hépatique métabolique des composés sélectionnés pendant le développement préclinique de médicaments. Notre souhait ultime est de développer une stratégie thérapeutique pratique en utilisant cette plate-forme pour produire des hépatocytes fonctionnels et suffisants

pour le foie en ingénierie tissulaire et en thérapie des maladies du foie. Aussi, les aspects suivants doivent être l'objet d'une profonde réflexion : (1) comment récellulariser le foie décellularisé avec les cellules souches mésenchymateuses et maintenir la prise de greffe à haute efficacité et des hépatocytes fonctionnels ?; (2) comment fournir de l'oxygène et des nutriments suffisants pour l'ultrastructure vasculaire du scaffold du foie décellularisé même dans le système de culture cellulaire en bioréacteur ?; (3) est-ce que la procédure de décellularisation et recellurization est appropriée pour les différentes maladies du foie?

En résumé, notre procédure de décellularisation est relativement simple et rapide pour la préparation de scaffold du foie chez le rat avec une structure vasculaire et biliaire conservée qui prennent en charge une infiltration cellulaire et la fonction phénotypique normale. Le rapport ici fourni une compréhension plus profonde de l'évolution du scaffold du foie et une ingénierie tissulaire à base de cellules régénératives pour construire des greffes de foie. Cependant, la technique de la préparation de scaffold décellularisé du foie a également démontré que le procédé optimal doit être adapté à chaque espèce spécifique. Si les techniques décrites ici peuvent être mises à l'échelle pour une utilisation chez l'homme, il est certain de générer une énorme valeur clinique pour le traitement des maladies du foie.

3 La différenciation de CSM-GW en hépatocytes *in vitro*

La technologie des cellules souches pourraient offrir un outil unique pour développer des modèles du foie humain *in vitro*. Le remplacement des hépatocytes infectés et la régénération des hépatocytes fonctionnels par les cellules souches sont les principales alternatives thérapeutiques pour le traitement des maladies du foie. À ce jour, nombreuses études ont montré le potentiel de différenciation endodermique de CSMs provenant de diverses sources qui peuvent se différencier en hépatocytes *in vitro* dans des conditions de culture appropriées (Schwartz, Reyes et al. 2002; Lee, Kuo et al. 2004; Christ and Stock 2012; Lee, Lee et al. 2012). La plupart de ces procédés de différenciation font référence à des facteurs de croissance et des cytokines, tels que le facteur de croissance des hépatocytes (HGF), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance épidermique (EGF), l'oncostatine M (OSM) (Wu and Tao 2012; Mou, Lin et al. 2013; van de Kamp, Jahnen-Dechent et al. 2013). Parce qu'il a une relation ontogénétique étroite avec les cellules souches embryonnaires, les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton sont immunoprivilégiés, possèdent une plasticité et une multipotence plus large, et prolifèrent plus rapidement que les cellules souches mésenchymateuses adultes.

Dans cette partie, les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton ont été induites à se différencier en cellules d'hépatocytes en fome par un protocole en trois-étapes (Fig 46). Les cellules différenciées ont été examinées par l'expression de marqueurs spécifiques des hépatocytes et des fonctions spécifiques à

l'hépatocyte.

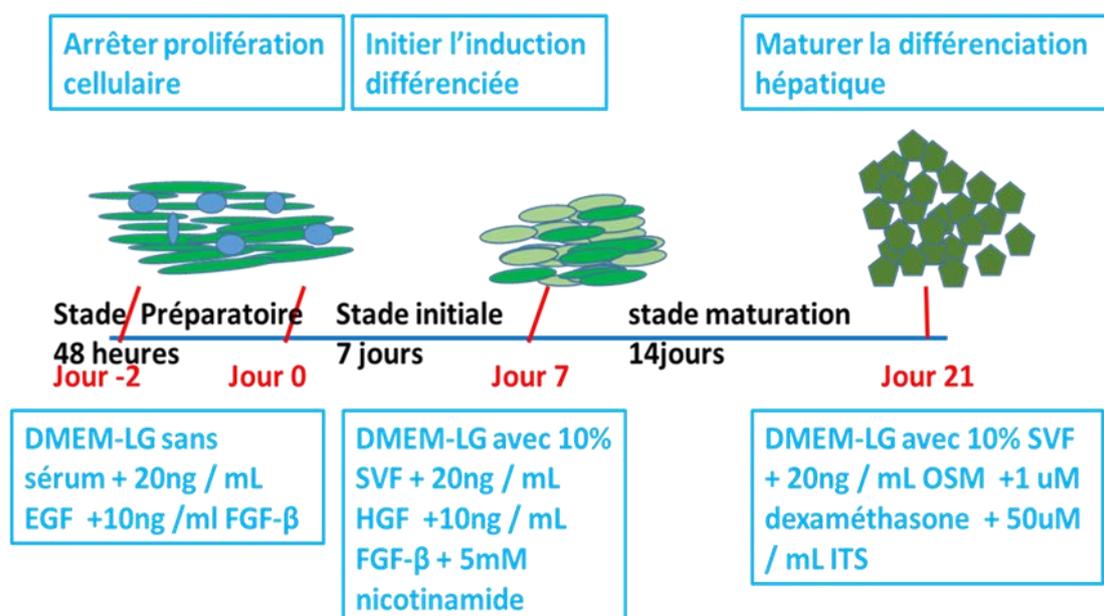


Figure. 46 Schéma du protocole différenciation hépatique

Protocole en trois stades pour la différenciation hépatique in vitro. EGF (Facteur de croissance épiderme), FGF-β (Facteur de croissance de fibroblastes-β), SVF (Sérum de veau foetal), HGF (Facteur de croissance Hépatique), OSM (Oncostatin M), ITS (insuline-transferrine-sélénium).

3.1 Le changement de la morphologie cellulaire au cours de la différenciation hépatique

Au cours de l'étape d'induction de la différenciation hépatique, les cellules cultivées ont montré une transformation remarquable. En culture 48 heures avec le milieu de l'absence de sérum, la prolifération cellulaire a été arrêtée, et en présence de HGF, FGFβ et nicotinamide, la morphologie fibroblastique (Fig.47 E) des cellules souches mésenchymateuses a été perdue et les cellules ont montré un élargissement avec une morphologie aplatie (Fig.47 F) après 1 semaine de l'induction. En présence d'oncostatine M, la dexaméthasone et l'ITS, une rétraction des extrémités de la forme allongée a été observée (Fig. 47 G) après 2 semaines d'induction, et la morphologie caractéristique cubique hépatocytes survient en fonction du temps de différenciation. Après culture à maturité prolongée, la morphologie des hépatocytes mûri avec l'apparition de granules abondants dans le cytoplasme (Fig. 47 H).

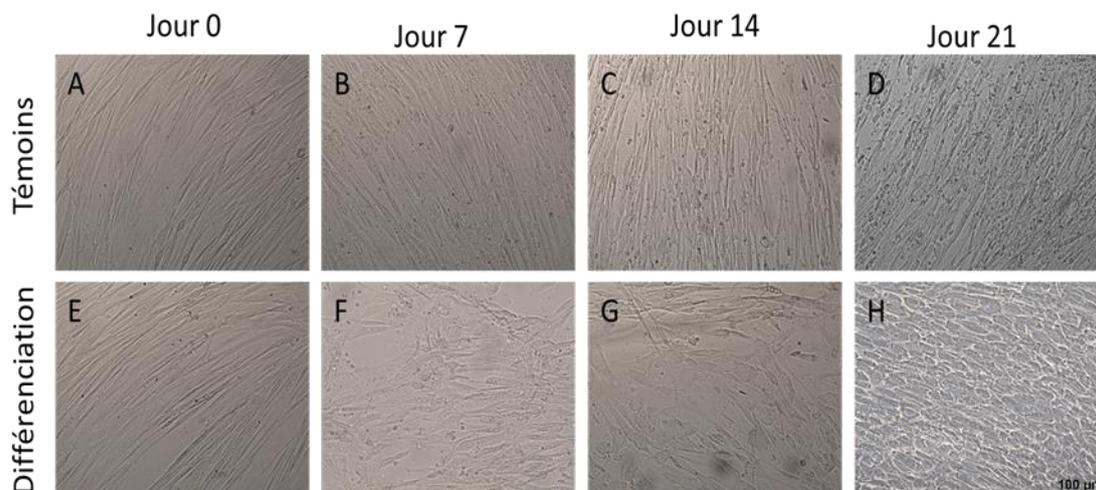


Figure. 47 Le changement morphologique des cellules au cours de la différenciation hépatique

La morphologie cellulaire a changé au cours de la différenciation hépatique in vitro. Après deux jours de culture avec le milieu préparatoire sans sérum, les cellules ont arrêté la prolifération mais resté uniformes et ordonnées et présentent une forme fusiforme au jour 0 (E); après l'induction pendant 7 jours avec le milieu d'induction, les cellules ont perdu la morphologie fibroblastique et deviennent aplaties et s'élargissent (F); après 7 jours de différenciation avec le milieu de maturation, quelques cellules retraitent les extrémités et la forme deviennent cubique ou ovale (G); après de 21 jours de différenciation hépatique, la plupart de cellules ont la morphologie typique d'hépatocytes. Parallèlement, la morphologie des cellules témoins cultivés dans le milieu culture de croissance ne changent pas et les cellules restent fibroblastiques (A, B C, D). Grossissement d'origine X 100.

3.2 Analyse RT-PCR en temps réel de l'expression spécifique de marqueurs hépatocytaires

Nous avons détecté l'expression de marqueurs spécifiques d'hépatocytes sur les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton indifférenciées et les cellules différenciées par RT-PCR. Fait intéressant, les CSMs-GW naïves expriment de façon constitutive certains marqueurs hépatiques, y compris ALB, AFP et G-6P (Fig 48). L'expression de ces marqueurs a été détectée au niveau élevé de gènes dans des cellules différenciées. L'expression d'hépatocytes de facteur nucléaire-4 (HNF-4), un facteur de transcription largement exprimé dans le foie adulte, a été détectée à 3 semaines après l'induction qui indique que la différenciation hépatique a été engagée.

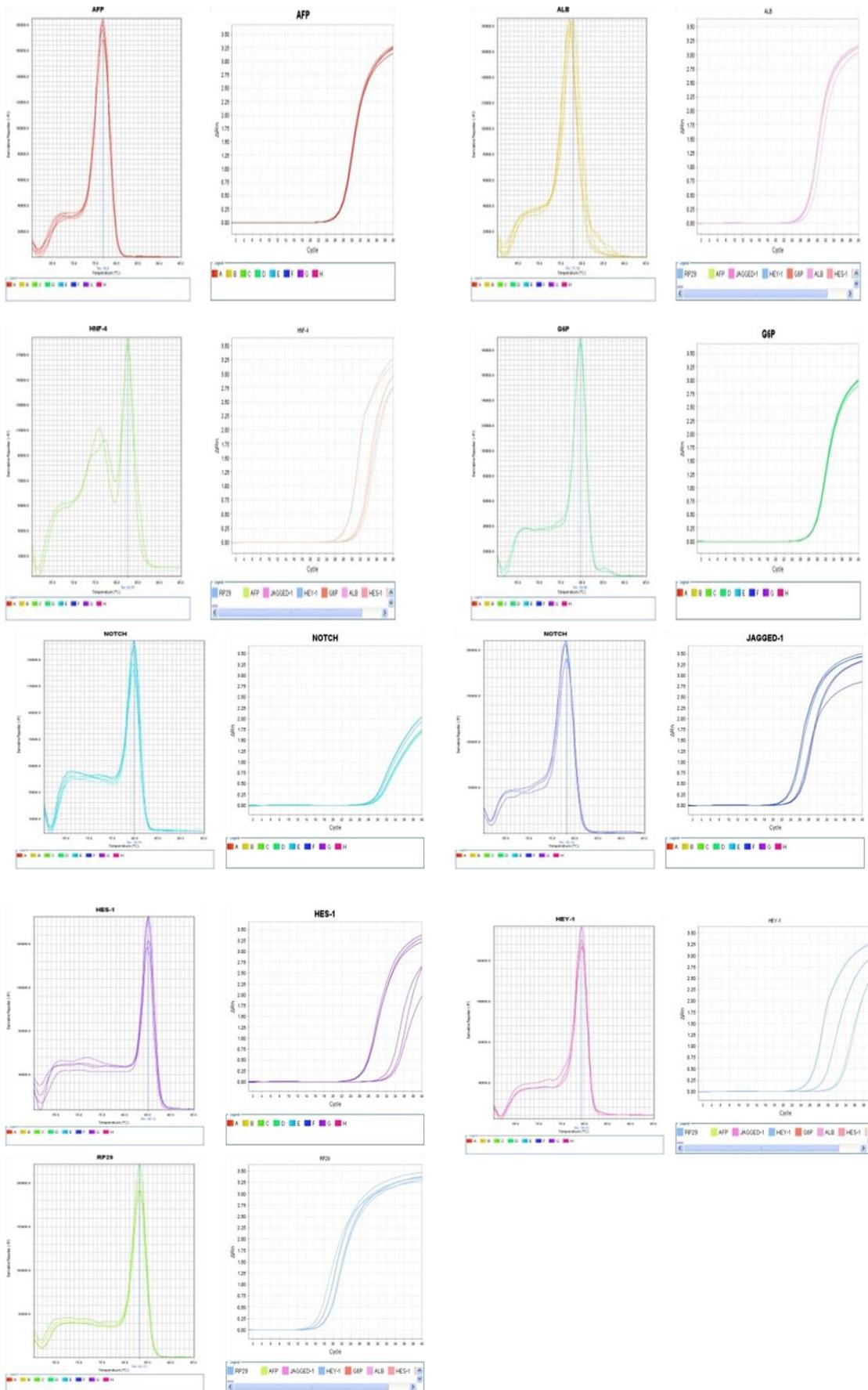


Figure. 48 Expression d'ARN des gènes associés au développement du foie.

3.3 Caractérisation fonctionnelle des hépatocytes provenant des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton

3.3.1 La coloration à l'acide périodique de Schiff et l'essai de absorption du LDL

Nous avons examiné si les hépatocytes différenciées issues des CSMs-GW étaient fonctionnels. Après que les CSMs-GW ont été cultivées dans un milieu de différenciation des hépatocytes pendant 21 jours, elles ont été analysés d'abord pour la différenciation en hépatocytes par la coloration acide périodique-Schiff (PAS) pour l'accumulation de glycogène. Après la coloration de PAS, des noyaux cellulaires ont été contre-colorées avec du DAPI pour compter le nombre cellules colorées. Les cellules ont été colorées positivement par le traitement à l'acide périodique-Schiff (Fig 47 B, D) et le pourcentage de cellules positives a été de $84,6\% \pm 4.1\%$ (Fig 47 E), par contre, les colorations de PAS des témoins est de $6.97\% \pm 1.5\%$ indiquant une absence de différenciation (Fig 47 A, C).

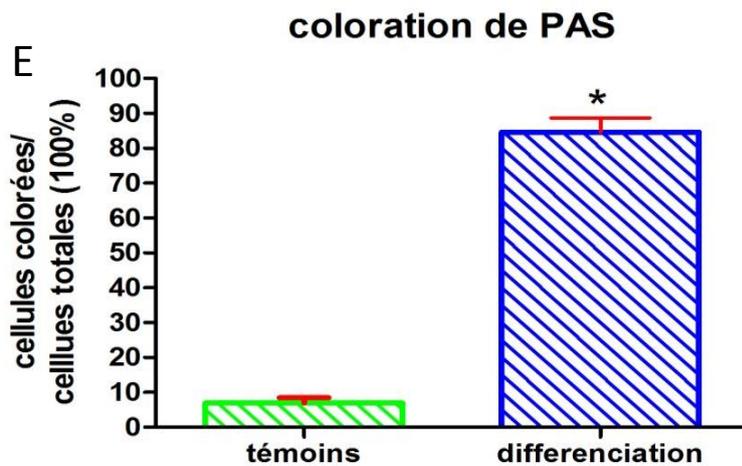
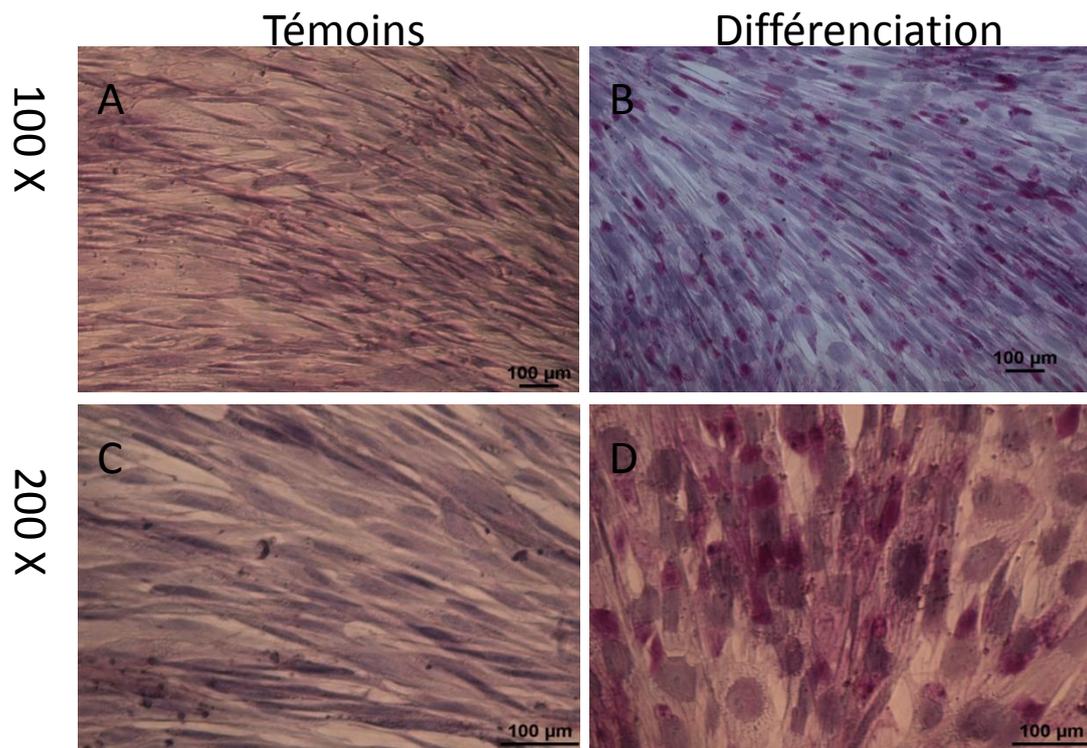
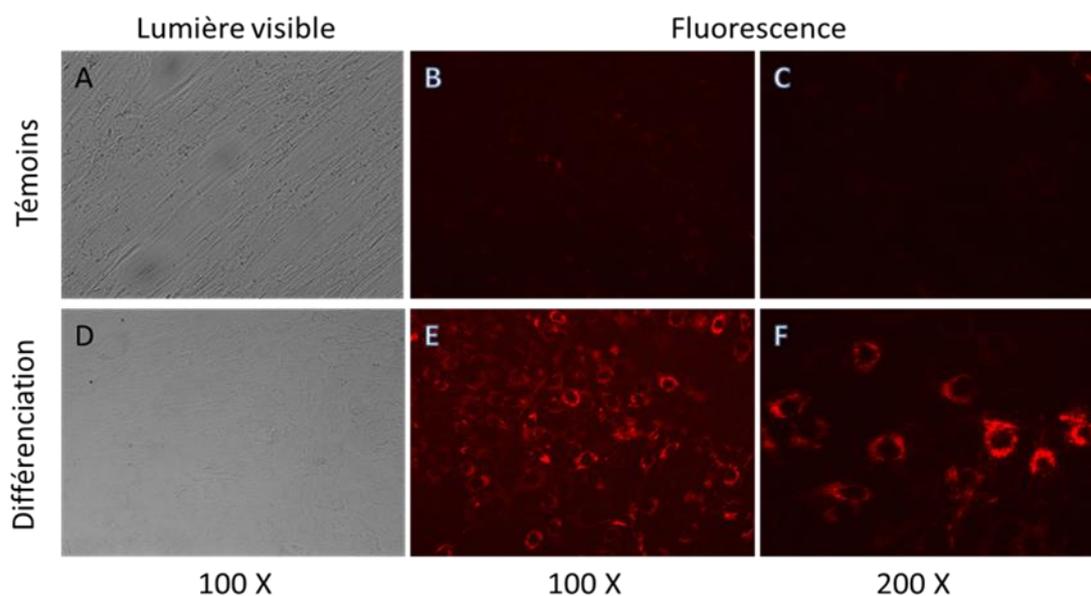


Figure. 49 Coloration à l'acide périodique de Schiff.

CSMs-GW ont été incubées dans un milieu de différenciation hépatique pendant 21 jours ou dans un milieu de croissance en tant que témoins négatifs. Les cellules ont été analysées par coloration à l'acide périodique-Schiff pour le stockage du glycogène et des noyaux ont été contre-colorées avec du DAPI pour compter le nombre de cellules colorées (les barres représentent la moyenne ± SD. (p < 0,001 comparé avec les cellules non-différenciation, n=4).*

Nous avons examiné si les hépatocytes différenciés issues de CSMs-GW étaient fonctionnels. L'absorption de Dil-ac-LDL est un marqueur spécifique des hépatocytes *in vitro*, et la coloration par immunofluorescence dans notre étude a révélé que les cellules différenciés ont été positifs pour l'absorption ac-LDL. Après 3 semaines

d'induction hépatique, les cellules différenciées absorbaient le LDL (Fig 50 D, E, F) et le pourcentage de cellules positives a été de 85,8%. En même temps, les cellules qui ont été cultivées dans le milieu de croissance en tant que témoins négatifsne montrent pas d'absorption du LDL (Fig 50 A, B, C).



G l'analyse de l'absorption de LDL

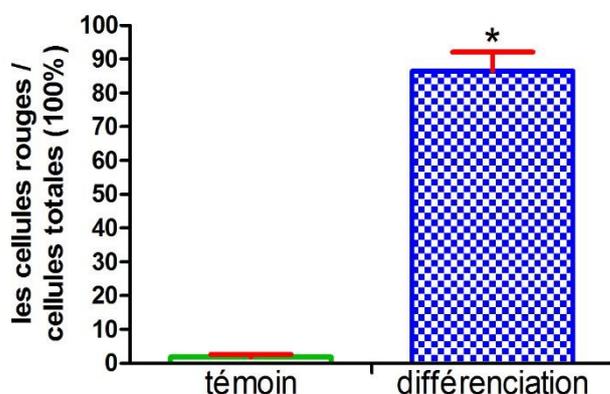


Figure. 50 L'analyse de l'absorption de LDL par les CSMs-GW.

Des cellules indifférenciées ne pouvaient pas incorporer Dil-ac-LDL (Fig 50 A, B, C), alors que les CSMs-GW soumis au milieu de différenciation hépatogène pendant 21 jours étaient compétentes pour l'absorption de LDL. Dil-ac-LDL : coloration rouge (Fig 50 E, F). Pour le dosage de l'absorption LDL, les cellules ont été incubées avec 20 pg / mL de Dil-Ac-LDL. Grossissement d'origine, 100 X (B,E) et 200 X (C, F). Les cellules témoins et les cellules différenciées hépatique par rapport au pourcentage de cellules rouges dans toutes les cellules a été montré (Fig 50.G). Les barres représentent la moyenne \pm SD. (* $p < 0,001$ comparé avec les cellules non-différenciation, $n=4$).

Ainsi, notre protocole développé dans cette étude pourrait générer un rendement élevé des hépatocytes fonctionnels avec plus de 80% des cellules induites à partir de CSM-GW.

3.3.2 La production d'urée des cellules différenciées

Les hépatocytes matures ont la capacité de métaboliser, détoxifier, et inactiver les composés exogènes tels que des médicaments et des composés tels que les stéroïdes endogènes. Le drainage du sang veineux intestinale dans le foie nécessite une désintoxication efficace des substances absorbées pour maintenir l'homéostasie et protéger l'organisme. Une des fonctions de la détoxification par les hépatocytes est de modifier l'ammoniac en urée pour l'excrétion. La synthèse de l'urée est une voie majeure pour l'élimination irréversible d'azote. L'organisation lobulaire permet l'ajustement du flux de cycle de l'urée. Ainsi, nous avons analysé la concentration d'urée dans le surnageant de culture tout au long de la différenciation hépatique à partir de cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton. Les concentrations d'urée dans les surnageants ont été mesurées par dosage colorimétrique (OD.570 nm) selon les instructions du fabricant avec un lecteur d'absorbance (table 10 et Fig 51).

Tableau. 10 Concentration d'urée

Temps de culture	Jour 0	Jour7	Jour14	Jour21
Concentration (mg /dl)	1.72 ± 0.58	5.37 ± 0.27	8.91 ± 0.21	10.06 ± 0.70

la concentration d'urée est détectée dans les surnageants du milieu différencié hépatique à différents points de culture (chaque 7 jours) par dosage colorimétrique selon les instructions du fabricant.

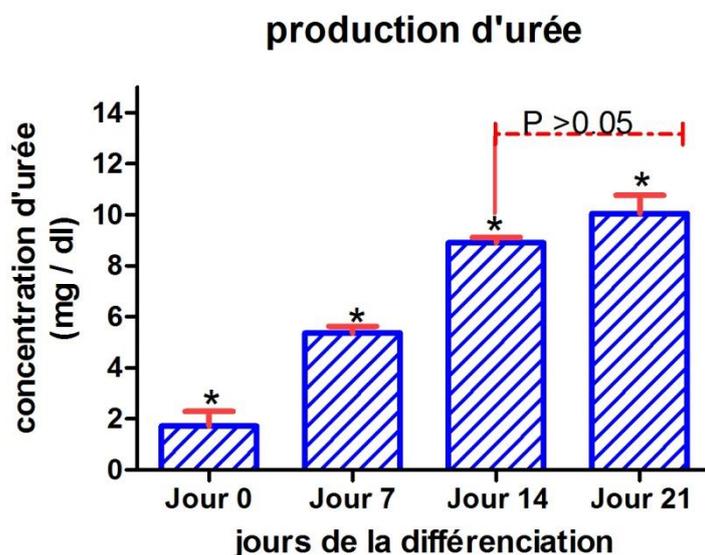


Figure. 51 Concentration d'urée au cours de la différenciation hépatique

Les barres représentent la moyenne ± SD. (* p < 0,05 est considéré différence significative statistique, n=4).

En résumé, nous avons généré avec succès une méthode pour établir un

rendement élevé de différenciation hépatique avec des hépatocytes fonctionnels à partir de cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton qui peut avoir des avantages dans les applications cliniques.

3.4 Discussion

Les CSMs-GW sont un outil prometteur pour des propos thérapeutiques. Ceci est principalement dû à leur capacité de différenciation, la collecte non invasive, et une faible immunogénicité. Elles ont un effet inhibiteur sur les cellules T stimulées in vitro qui serait un avantage pour la transplantation allogénique (Zhang, Chen et al. 2012; La Rocca, Lo Iacono et al. 2013). Une étude antérieure a montré que les cellules souches humaines de la matrice de cordon ombilical pourraient être transplantées avec succès dans des rats immunocompétents avec peu ou pas de réponse immunitaire de l'hôte (Weiss, Medicetty et al. 2006). Ces résultats soutiennent la propriété de faible immunogénicité des CSMs-GW in vitro. En outre, les CSMs-GW ont un potentiel de différenciation plus large en plusieurs types de cellules, comme les cellules productrices d'insuline (Chao, Chao et al. 2008), les cellules cartilagineuses (Liu, Yuan et al. 2012), et les lymphocytes (Zhou, Yang et al. 2011) y compris les cellules hépatocytaires (Campard, Lysy et al. 2008). Des études précliniques ont constaté que CSMs-GW pourrait améliorer les fonctions du foie, de restaurer le taux de survie, et de diminuer la fibrose du foie dans un modèle animal avec des lésions du foie (Tsai, Fu et al. 2009; Yan, Xu et al. 2009). Bien que les CSMs-GW n'ont pas été appliquées dans les essais cliniques relatifs aux maladies du foie, une étude pilote récente a démontré la sécurité et le traitement réussi avec les CSMs de placenta pour des patients diabétiques de type 2 (Si-Tayeb, Noto et al. 2010). Basé sur leurs avantages, les CSMs-GW semblent posséder un effet bénéfique sur le traitement de la maladie du foie.

Dans cette étude, nous visons à étudier l'efficacité d'une nouvelle méthode établie pour l'induction de CSMs-GW in vitro en la lignée hépatique. Selon l'élaboration d'un nouveau protocole, la réalisation de la production d'hépatocytes a été observée à partir des CSMs-GW par traitement séquentiel avec notre cocktail à base de cytokines. L'exposition séquentielle à ces cytokines imite le développement du foie embryonnaire. Nous avons d'abord utilisé le milieu sans sérum mais contenant facteur de croissance épiderme (EGF) et facteur de croissance basique de fibroblastes (FGF β) pour arrêter la prolifération. L'EGF régule les processus importants de la développement embryonnaire, y compris la survie cellulaire, de la progression du cycle cellulaire, l'invasion tumorale et l'angiogénèse (De Luca, Carotenuto et al. 2008). Des ligands, y compris le facteur de croissance épidermique se lient à l'EGFR et ils activent les voies de transduction de signaux qui régulent à la hausse des facteurs de transcription conduisant à la prolifération et la différenciation lors du développement du foie (Cienfuegos, Rotellar et al. 2014; Wang, Ma et al. 2015). Le facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF ou FGF β) fait partie des facteurs de croissance cellulaire polypeptidique et est un mitogène à large

spectre, il joue un rôle important dans le développement embryonnaire et la prolifération cellulaire, en particulier pour ceux qui dérivent du mésoderme et de l'ectoderme. Ils servent à réguler l'organisation et la différenciation des cellules des tissus environnants. Au stade précoce de la différenciation, nous avons utilisé FGF β , HGF, et la nicotinamide comme principaux facteurs d'induction. En effet, les FGF exprimées par mésoderme cardiaque jouent un rôle dans l'induction intestin antérieur ventral pour initier le développement précoce du foie (Shin, Shin et al. 2007; Tsai, Liu et al. 2013). Par la suite, la formation des bourgeons du foie est survenu et la prolifération de hepatoblast rapide est stimulée par le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) qui est un facteur crucial pour hepatogenesis et qui est impliqué dans le développement de l'endoderme dans le processus de développement de l'embryon. Il est un puissant agent mitogène pour hépatocytes clonage, et a été considérée comme une cytokine pléiotropique de l'origine mésenchymateuse. (Ghaedi, Tuleuova et al. 2011; Tan, Xiao et al. 2012; van de Kamp, Jahnen-Dechent et al. 2013). Nicotinamide est une forme de vitamine B3 ou niacine amide soluble dans l'eau qui sert de précurseur primaire de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) et la synthèse NADP⁺ dérivé phosphorylée (Surjana, Halliday et al. 2010). Pour la différenciation hépatogène, le nicotinamide a été montré pour améliorer la prolifération des hépatocytes primaires de rat et de formation de petits colonies d'hépatocytes (Sato, Mitaka et al. 1999). Sur la base de ces littératures, nous avons également utilisé le nicotinamide en combinaison avec HGF et FGF β dans notre milieu d'induction hépatogène à un stade précoce.

Au stade mature de la différenciation, nous avons utilisé l'OSM, la dexaméthasone, et ITS comme principaux facteurs. Il a été rapporté que l'OSM sécrétée par les cellules hématopoïétiques est impliquée dans la maturation déterminé des hépatocytes foetaux. En plus de ces facteurs, il a été rapporté que la dexaméthasone est nécessaire pour le maintien de l'expression de facteurs de transcription enrichis en foie qui sont essentiels pour la stimulation de la transcription des gènes spécifiques du foie (Sidhu, Liu et al. 2004; Cai, Zhao et al. 2007; Chen and Zeng 2011). ITS est connu comme supplément chimiquement défini pour soutien prolifération in vitro dans diverses cellules de mammifères. Pour l'induction hépatogène, ITS semble maintenir la survie des cellules en tant que monocouche pendant la période d'induction (Wu, Wang et al. 2009; Ayatollahi, Soleimani et al. 2011; Ye, Su et al. 2015). Ainsi, nous avons également utilisé la dexaméthasone et ITS pour induire la différenciation des hépatocytes plus mature dans notre système. En même temps, nous nous devons soutenir que le optimale stimulation de cytokines, la dose, le temps et la combinaison de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses soient bien organisés selon les sources de cellules souches et de types (telles que des cellules embryonnaire, les cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse ou de cellules souches hépatiques) mais la formulation des combinaisons «optimales» de facteurs cytokine / croissance est encore à un stade immature de développement.

Pour les expressions de marqueurs de la lignée hépatiques, HNF4 est un facteur de transcription du foie enrichi crucial qui joue un rôle important dans la stimulation

de l'expression de gènes spécifiques du foie au cours du développement du foie(Costa, Kalinichenko et al. 2003). Pendant les processus de différenciation hépatogène, l'expression précoce de HNF4 a été détectée dans les hépatocytes générés par CSMs-GW au jour 7 qui sont corrélés avec les upregulations de marqueurs hépatiques matures comme l'ALB et G6P. En outre, beaucoup de preuves montrent que les voies de signalisation Notch détermine auto-renouvellement cellulaire, la prolifération et la différenciation(Ader, Norel et al. 2006; Huang, Yang et al. 2010; Chen, Zheng et al. 2012). Le rôle des voies de signalisation Notch dans la différenciation des cellules souches est fonction de l'origine du tissu(Ader, Norel et al. 2006; Han, Dziedzic et al. 2011; Ortica, Tarantino et al. 2013). Dans mésoderme, il a été largement rapporté que l'activation de Notch dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH) induit l'auto-renouvellement(Varnum-Finney, Xu et al. 2000). Au cours de la différenciation des cellules souches, Notch est exprimé de manière différentielle entre les cellules souches et les cellules matures(Zhao, Ren et al. 2009). Dans notre études, nous avons examiné la expression des gènes associés à la voie Notch. Les gènes, y compris le gène Notch et son ligand Jagged-1, aussi ses gènes de transcription nucléaire en aval comme l'activateur poilue de Split 1 (Hes1) et d'activateur Poilue de Split lié à motif YRPW (Hey-1) expriment au niveau hauts dans les cellules non-différenciées en comparaison avec ses expressions après la différenciation hépatique in vitro qui indique les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton sont s'arrêtées et se transdifférenciées en ligne cellulaire de nonmésoderme. Ces résultats impliquent que CSMs-GW avaient une tendance à se différencier en lignée hépatique en réponse à notre méthode d'induction. Bien que ces cellules d'hépatocytes comme pouvaient exprimer tous les marqueurs hépatiques matures, l'expression de l'AFP qui est un marqueur des hépatocytes immatures était encore détecté même au stade tardif de la différenciation. Des études antérieures ont démontré que les cellules humaines de placenta dérivée pluripotentes(Chien, Yen et al. 2006; Huang 2007), les cellules souches de la matrice cordon ombilical(Campard, Lysy et al. 2008) et des cellules mésenchymateuses du stroma dérivées de la gelée de Wharton de cordon ombilical(Zhang, Lie et al. 2009; Bai, Hu et al. 2012) sont pas encore totalement différenciées en hépatocytes matures parce que l'expression d'AFP a été encore détectée dans les cellules différenciées pendant toute la période d'induction. Basé sur ces résultats, CSMs isolées d'origine primitive semblent être réservé le phénotype immature, même si elles ont poussé vers la lignée spécifique.

Dans le stade tardif de différenciation, CSMs-GW différenciés obtenus caractéristiques des hépatocytes fonctionnels qui ont été confirmés par analyse de la coloration PAS pour le stockage de glycogène, l'absorption de LDL et la sécrétion de l'urée. En comparaison avec les protocoles précédents publiés(Schwartz, Reyes et al. 2002; Zhang, Lie et al. 2009; Bai, Hu et al. 2012; Wu and Tao 2012), notre méthode a fourni la production à haut rendement de cellules hépatocytes à partir de CSMs-GW, environ plus de 80% des cellules induites. Au total, ces résultats fournissent une nouvelle alternative pour une génération de hépatocytes in vitro dans lequel cellules souches mésenchymateuses adultes indifférenciées peuvent être largement étendu

culture in vitro et, par conséquent, de grandes quantités de cellules différenciées peuvent être générées pour des applications potentielles de thérapie cellulaire ou de l'ingénierie tissulaire qui peut surmonter la limitation des donneurs de cellules du foie pour une utilisation future dans les applications cliniques. Le plus important, les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton peuvent se servir de source de cellules pour l'ingénierie tissulaire ou la thérapie de cellules du foie.

Conclusion et perspectives

L'ingénierie cellulaire, et particulièrement l'ingénierie de cellules souches, a suscité l'intérêt des scientifiques depuis quelques années. Les cellules souches sont une cellule indifférenciée se caractérisant par la capacité à engendrer des cellules spécialisées par différenciation cellulaire et une capacité à se maintenir par prolifération dans l'organisme. Les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton (CSMs-GW) sont une source des cellules souches mésenchymateuses facilement prélevables avec une méthode non-invasive et possèdent quelques supériorités comme un phénotype hypo-immunogène, la forte capacité de prolifération *in vitro*, et les potentialités de se différencier vers des lignées mésodermiques. En outre, ces cellules pourraient être isolées et utilisées sans problème éthique, car les cordons ombilicaux humains sont normalement jetés après la naissance. Donc, les CSMs-GW sont considérées bénéfiques pour le traitement des maladies cliniquement variées telles que l'accident vasculaire cérébral, le diabète, la maladie de Parkinson, et les maladies du foie. L'émergence de cette stratégie novatrice apporte une nouvelle espérance thérapeutique.

Au cours de ce travail de cette thèse, l'objectif est de développer un foie artificiel par ingénierie tissulaire à partir de cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton et du scaffold du foie décellularisé qui préserve le réseau vasculaire et la matrice extracellulaire.

Nous avons, dans une première partie, effectué le prélèvement, l'identification et la caractérisation phénotypique des CSMs-GW humaines. En effet, la gelée de wharton contient non seulement les cellules souches mésenchymateuses (CSM) mais aussi des fibroblastes et des macrophages. Il est donc indispensable de s'assurer que les cellules étudiées soient bien des CSMs. Tout d'abord, nous adoptons « la méthode mécanique » pour prélever des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton provenant du cordon ombilical humain. Puis, ces cellules ont été purifiées au cours des différents passages. Elles ont ensuite été identifiées morphologiquement par leur capacité d'adhérence et de prolifération au plastique et leur capacité de se former des colonies cellulaires à l'aide de la coloration au cristal violet qui possèdent une morphologie de type fibroblastique et par des marqueurs phénotypiques (une phénotypage avec des présences de CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, et CD200 mais simultanément des absences de CD34, CD45, CD106, CD140b, et HLA-DR) à l'aide de la cytométrie en flux, ainsi que par la différenciation en ostéoblastes et en adipocytes (les CSMs obtenues pouvaient être différenciées facilement en ostéoblastes mais difficilement en adipocytes en présence du milieu de culture conditionnel associé).

Nous avons donc conclu que les cellules prélevées de la gelée de wharton issue du cordon ombilical et cultivées en monocouche *in vitro* sont des cellules souches mésenchymateuses caractéristiques non différenciées.

Récemment, le domaine de la médecine régénérative a émergé grâce à l'intégration de l'ingénierie tissulaire, la biologie des cellules souches, les sciences des matériaux, la biologie du développement et la biologie moléculaire, et l'objectif est de créer des tissus fonctionnels ou des organes pour une utilisation dans les procédures de réparation ou de remplacement chez les patients sur la base d'approches clinique pertinentes. Un élément critique et indispensable dans le domaine scientifique de l'ingénierie tissulaire et cellulaire est l'utilisation des « scaffolds ». Une solution possible pour réussir l'obtention d'un scaffold idéal est d'utiliser les organes solides, par décellularisation d'un organe entier, un scaffold d'organes acellulaire contenant la microarchitecture du tissu, comprenant un système vasculaire intact.

Donc, dans la seconde partie de ce travail, nous avons étudié la technique de la préparation et la caractérisation du scaffold d'organe-complet décellularisé du foie. Étant donné que les différentes espèces de modèle animal ont des structures anatomiques de foie variées et tenant compte de la faisabilité et de la commodité expérimentale, nous avons utilisé du foie de rat pour récolter des scaffolds décellularisés.

Le foie du rat a été décellularisé par perfusion continue avec du SDS 1% et triton-X100 1% pendant moins de 6 heures, via la veine porte et la veine cave inférieure du foie. Nous avons pu obtenir des foies avec un aspect translucide blanc après la décellularisation. La caractérisation concernant l'absence de cellules a été confirmée par la coloration H&E, la coloration de Masson's trichrome, la détection au microscope électronique à balayage et la diminution de la quantité d'ADN.

Tout d'abord, l'aspect visible de la vascularisation acellulaires dans les scaffolds décellularisés qui ont été caractérisés par de la coloration H&E qui a montré que non cellules intégrales sont restées. Pendant ce temps, la coloration de l'Masson a suggéré que les protéines extracellulaires de collagènes et des glycosaminoglycanes ont été bien conservés dans du scaffold décellularisé. En outre, les résultats de MEB ont montré une vasculaire intrahépatique intact et une architecture de matrice dans le foie décellularisé. Enfin, le résultat de la diminution de la quantité d'ADN a suggéré l'ADN résiduel dans le foie décellularisées est inférieure à 10% qui va favoriser la transplantation de cellules exogènes.

Nous avons donc conclu que notre procédure de décellularisation est relativement simple et rapide pour la préparation de scaffold du foie avec une architecture vasculaire et tridimensionnelle conservée.

La capacité des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton à se différencier en types de cellules multiples et la facilité relative de l'expansion en fait des candidats attractifs de traitement dans une variété de conditions. Au cours de la dernière décennie, plusieurs études ont suggéré que les cytokines et les effets des composés chimiques sont le principal contributeur de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton vers des hépatocytes. Les principales cytokines comme HGF, EGF et la dexaméthasone sont impliqués dans la modification de l'ADN. Le HGF, EGF, FGF et OSM utilisés pour la combinaison, tandis que la formulation des combinaisons optimales de facteurs cytokine / croissance est encore à un stade immature du développement dépendra de la source et des types de cellules souches mésenchymateuses.

Donc, dans la troisième partie de ce travail, nous avons étudié la formulation optimum de la différenciation en hépatocytes à partir de cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton issue du cordon ombilical humain. Nous avons utilisé une combinaison de facteurs cytokine EGF et FGF β dans le milieu sans sérum pour l'arrêt de la prolifération cellulaire. Ensuite, nous avons utilisé les facteurs croissances HGF, FGF β et le composé chimique de nicotinamide dans le milieu contenant 10% de sérum de veau foetal pour initier la différenciation hépatique. Après 7 jours d'initiation de la différenciation hépatique, nous avons encore induit le maturation des cellules vers des hépatocytes fonctionnels par des cytokine tels que l'OSM, l'ITS et la dexaméthasone dans un milieu avec 10% de sérum de veau foetal. Au cours de la différenciation hépatique, d'abord, des cellules souches mésenchymateuses ont perdue leur morphologie élargie et retrouvé une morphologie aplatie après une semaine de l'induction. En présence de l'OSM, de la dexaméthasone et d' ITS, une rétraction des extrémités de forme allongée a été observée après deux semaines l'induction. Après culture à maturité prolongée (trois semaine après l'induction hépatique), les cellules différenciées ont montré la morphologie cubique des hépatocytes typique avec l'apparition de granules dans le cytoplasme. En outre, des cellules différenciées ont été caractérisées par l'expression de marqueurs spécifiques des hépatocytes et des fonctions spécifiques à l'hépatocyte.

Nous avons extrait les ARNs cellulaires après la différenciation hépatique et nous avons constaté pendant les processus de différenciation hépatogène que l'expression du gène HNF4 a été augmentée dans les hépatocytes générés par CSMs-GW au jour 21 en comparaison avec les cellules non-différenciées. Ce résultat est corrélé avec les upregulations de marqueurs hépatiques matures comme l'ALB et G6P. Bien que ces cellules différenciées pouvaient exprimer tous les marqueurs hépatiques matures aux niveaux élevés, l'expression de l'AFP qui est un marqueur des hépatocytes immatures n'était pas changé considérablement même au stade tardif de la différenciation. Par contre, les gènes associés à la voie de transduction de signaux de Notch, y compris Notch-1, jagged-1, Hes-1, Hey-1, ont diminué l'expression de ARN par rapport aux cellules souches avant l'induction hépatique. Ce

résultat a indiqué les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton déterminent du sort et la différenciation des cellules souches en hépatocytes après l'induction hépatique *in vitro*.

Ensuite, nous avons caractérisé les cellules différenciées via l'évaluation des capacités fonctionnels d'hépatocytes par l'analyse de la coloration PAS pour le stockage de glycogène, l'absorption de LDL et la sécrétion d'urée. Nos résultats ont montré que les cellules ont été colorées positivement par traitement à l'acide périodique-Schiff et le pourcentage de cellules positives a été 84,6%. En même temps, notre méthode de l'induction hépatique a indiqué que environ 80% des cellules différenciées expriment la coloration fluorescente positive par l'absorption de LDL. En outre, la production d'urée a également été déterminée pour confirmer les fonctions hépatocytes. La sécrétion d'urée a augmenté au long de la différenciation hépatique qui a montré les cellules d'induites deviennent plus en plus matures comme les cellules hépatique et possèdent la fonction d'hépatocyte.

Nous avons donc conclu à partir des résultats obtenus dans ce travail que la différenciation hépatique à partir de cellules souches mésenchymateuses a été réussi et a permis d'obtenir des hépatocytes fonctionnels avec une efficacité élevée.

L'ensemble de ce travail a permis de prélever et en cultiver les cellules souches mésenchymateuses issue de la gelée de wharton *in vitro*. En conséquence, CSMs-GW peuvent être induites et se différencient vers hépatocytes soumis à des conditions spécifiques. En combinaison avec le scaffold décellularisé, elles ont le potentiel d'être utilisées comme une source de cellules substitutives des hépatocytes endommagées au sein de l'ingénierie tissulaire et médecine régénérative du foie.

Par ailleurs, ce travail donne lieu à plusieurs travaux complémentaires permettant :

Premièrement, bien que notre méthode a montré que cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton peuvent se différencient vers hépatocytes soumis la condition spécifique mais la formation optimum doit être encore étudié à fond à l'avenir dépendra sources et les types de cellules souches mésenchymateuses.

Deuxièmement, dans la plupart des littératures, les hépatocytes différenciation se réfère aux facteurs de croissance et des cytokines supplémentaires différemment, cependant, le mécanisme de la différenciation d'hépatocytes à partir de cellules souches mésenchymateuses, en particulier, les voies de signalisation impliquées dans cette procédure doit être illustré pour favoriser la standardisation de la différenciation en hépatocytes.

Troisièmement, étant donné que nous avons fabriqué les scaffolds décellularisé d'organes contenant la microarchitecture et un système vasculaire intact du foie. Nous allons entreprendre le travail de récellulariser le foie décellularisé avec les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton et de soutenir la prise de greffe à haute efficacité des hépatocytes fonctionnels.

Enfin, des études ont suggéré que l'injection des cellules souches mésenchymateuses non manipulées et /ou les cellules différenciées comme d'hépatocytes améliorer les fonctions du foie chez les animaux présentant une insuffisance hépatique. Toutefois, si des cellules différenciées comme d'hépatocytes continuerait d'être immunoprivilégiés dans les tissus du foie après la transplantation, et pourrait produire des facteurs qui inhibent la fibrose hépatique et d'améliorer les fonctions du foie, doit être démontré à l'avenir afin d'établir une nouvelle approche thérapeutique pour la maladie du foie.

Résumé

Il existe plus de 100 formes de pathologies hépatiques causées par divers facteurs et touchant une grande quantité de personnes. Mais, le seul traitement pour les maladies du foie en phase terminale est la greffe du foie. Cependant, la greffe de foie échoue souvent à cause du déficit en donneurs hépatiques. Récemment, une nouvelle alternative innovante pour traiter les maladies du foie apparaît : les organes auto-construits. En ingénierie tissulaire du foie, la source de cellules, l'échafaudage décellularisé du foie et les bioréacteurs, sont des facteurs à prendre en compte. L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier deux étapes nécessaires au développement d'un foie artificiel : les cellules et la décellularisation de l'organe. Tout d'abord, nous avons prélevé et caractérisé les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de wharton (CSMs-GW) CSMs-GW et nous avons étudié leur potentiel de différenciation en hépatocytes. La deuxième étape du travail est consacrée à la décellularisation du foie. Nous avons obtenu des scaffolds acellulaires par la perfusion continue avec du SDS 1% et triton-X100 1%. En conclusion, cette étude montre la capacité de CSM-GW de se différencier en hépatocytes et la faisabilité de la décellularisation du foie. Ceci ouvre des perspectives intéressantes pour le développement d'un foie artificiel et le traitement des pathologies hépatiques

Mots clés: cellules souches mésenchymateuses, décellularisation, foie, scaffold, différenciation hépatique

Abstract

There are over 100 forms of liver diseases caused by various factors and affecting a lot of people. Unfortunately, the only treatment of a terminal liver disease is liver transplantation. However, liver transplantation often fails because of the deficit in human liver donors. Recently, a new innovative alternative for treating end-stage liver disease appears: self-built organ. In liver tissue engineering the source of cells, the decellularized liver scaffold and circular culture bioreactor, are essential factors to be taken into account. The objective of this thesis is to study two steps needed for the development of an artificial liver : cells and organ decellularization. In the first stage, we collected and characterize Wharton's-Jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs), and their differentiation potential into hepatocytes. In the second stage of the work, we developed a method for liver decellularization. We were able to get acellular scaffolds by continuous perfusion with 1% SDS and Triton X100 1%. In conclusion, this study shows the capability of WJ-MSC to be differentiated into hepatocytes and the feasibility to obtain acellular livers. That open perspectives toward the development of an artificial liver and the treatment of liver diseases.

Keywords: mesenchymal stem cells, decellularization, liver, scaffolds, hepatic differentiation

Références bibliographiques

- 1 Abbott, A. (2014). "Fetal-cell revival for Parkinson's." Nature **510**(7504): 195-196.
- 2 Abu-Lubad, M., T. F. Meyer, et al. (2014). "Chlamydia trachomatis inhibits inducible NO synthase in human mesenchymal stem cells by stimulating polyamine synthesis." J Immunol **193**(6): 2941-2951.
- 3 Abumaree, M., M. Al Jumah, et al. (2012). "Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells." Stem Cell Rev **8**(2): 375-392.
- 4 Ader, T., R. Norel, et al. (2006). "Transcriptional profiling implicates TGFbeta/BMP and Notch signaling pathways in ductular differentiation of fetal murine hepatoblasts." Mech Dev **123**(2): 177-194.
- 5 Adwan, H., B. Fuller, et al. (2013). "Modifying three-dimensional scaffolds from novel nanocomposite materials using dissolvable porogen particles for use in liver tissue engineering." J Biomater Appl **28**(2): 250-261.
- 6 Aggarwal, S. and M. F. Pittenger (2005). "Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses." Blood **105**(4): 1815-1822.
- 7 Ahn, S. J., J. Costa, et al. (1996). "PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR." Nucleic Acids Res **24**(13): 2623-2625.
- 8 Al-Nbaheen, M., R. Vishnubalaji, et al. (2013). "Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential." Stem Cell Rev **9**(1): 32-43.
- 9 Ali Kamkar, M. M., R. Ahmad, et al. (2014). "Insight into the impact of diabetes mellitus on the increased risk of hepatocellular carcinoma: mini-review." J Diabetes Metab Disord **13**: 57.
- 10 Alvarez, P., E. Carrillo, et al. (2013). "Regulatory systems in bone marrow for hematopoietic stem/progenitor cells mobilization and homing." Biomed Res Int **2013**: 312656.
- 11 Amiri, F., R. Halabian, et al. (2014). "Positive selection of Wharton's jelly-derived CD105 cells by MACS technique and their subsequent cultivation under suspension culture condition: A simple, versatile culturing method to enhance the multipotentiality of mesenchymal stem cells." Hematology.
- 12 An, Y. and D. Li (2014). "Engineering skeletal muscle tissue in bioreactor systems." Chin Med J (Engl) **127**(23): 4130-4139.
- 13 Antona, D., E. Couturier, et al. (2011). "Epidemiology of viral hepatitis in France." Rev Prat **61**(1): 25-27, 30-22.
- 14 Anzalone, R., M. Lo Iacono, et al. (2010). "New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity." Stem Cells Dev **19**(4): 423-438.
- 15 Arenas-Herrera, J. E., I. K. Ko, et al. (2013). "Decellularization for whole organ bioengineering." Biomed Mater **8**(1): 014106.

-
- 16 Atala, A. (2007). "Engineering tissues, organs and cells." J Tissue Eng Regen Med **1**(2): 83-96.
- 17 Atala, A. (2011). "Tissue engineering of human bladder." Br Med Bull **97**: 81-104.
- 18 Atala, A., S. B. Bauer, et al. (2006). "Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty." Lancet **367**(9518): 1241-1246.
- 19 Ayatollahi, M., M. Soleimani, et al. (2011). "Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by insulin like growth factor-I." World J Stem Cells **3**(12): 113-121.
- 20 Badylak, S. F. (2005). "Regenerative medicine and developmental biology: the role of the extracellular matrix." Anat Rec B New Anat **287**(1): 36-41.
- 21 Badylak, S. F., D. Taylor, et al. (2011). "Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds." Annu Rev Biomed Eng **13**: 27-53.
- 22 Bai, J., Y. Hu, et al. (2012). "Comparison of human amniotic fluid-derived and umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stromal cells: Characterization and myocardial differentiation capacity." J Geriatr Cardiol **9**(2): 166-171.
- 23 Balakrishnan, B. and R. Banerjee (2011). "Biopolymer-based hydrogels for cartilage tissue engineering." Chem Rev **111**(8): 4453-4474.
- 24 Baldwin, T. (2009). "Morality and human embryo research. Introduction to the Talking Point on morality and human embryo research." EMBO Rep **10**(4): 299-300.
- 25 Baptista, P. M., M. M. Siddiqui, et al. (2011). "The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid." Hepatology **53**(2): 604-617.
- 26 Baptista, P. M., D. Vyas, et al. (2013). "Human liver bioengineering using a whole liver decellularized bioscaffold." Methods Mol Biol **1001**: 289-298.
- 27 Barakat, O., S. Abbasi, et al. (2012). "Use of decellularized porcine liver for engineering humanized liver organ." J Surg Res **173**(1): e11-25.
- 28 Barlow, S., G. Brooke, et al. (2008). "Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells." Stem Cells Dev **17**(6): 1095-1107.
- 29 Batsali, A. K., M. C. Kastrinaki, et al. (2013). "Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications." Curr Stem Cell Res Ther **8**(2): 144-155.
- 30 Baumann, K. (2014). "Stem cells: moving out of the niche." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(2): 79.
- 31 Becker, K. A., P. N. Ghule, et al. (2010). "Cyclin D2 and the CDK substrate p220(NPAT) are required for self-renewal of human embryonic stem cells." J Cell Physiol **222**(2): 456-464.
- 32 Beltrami, A. P., D. Cesselli, et al. (2007). "Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow)." Blood **110**(9): 3438-3446.
- 33 Ben-Ami, E., A. Miller, et al. (2014). "T cells from autoimmune patients display

-
- reduced sensitivity to immunoregulation by mesenchymal stem cells: role of IL-2." Autoimmun Rev **13**(2): 187-196.
- 34 Benhamou, J.-P. (2000). " Maladies du foie et des voies biliaires. s.l. :Flammarion," ISBN : 2-257-13471-0.
- 35 Bernardo, M. E., D. Pagliara, et al. (2012). "Mesenchymal stromal cell therapy: a revolution in Regenerative Medicine?" Bone Marrow Transplant **47**(2): 164-171.
- 36 Bhardwaj, N., W. T. Sow, et al. (2014). "Silk fibroin-keratin based 3D scaffolds as a dermal substitute for skin tissue engineering." Integr Biol (Camb) **7**(1): 53-63.
- 37 Bifari, F., L. Pacelli, et al. (2010). "Immunological properties of embryonic and adult stem cells." World J Stem Cells **2**(3): 50-60.
- 38 Bisceglie, V., Uber (1933). "die antineoplastische immunitat: Heterologe Einpflanzung von Tumoren in Hubner-embryonen." Ztschr. Krebsforsch **40**: 122-140.
- 39 Blackburn, E. H., C. W. Greider, et al. (2006). "Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging." Nat Med **12**(10): 1133-1138.
- 40 Blanc, J. F., P. Bioulac-Sage, et al. (1997). "Stellate cells of the liver and hepatic fibrogenesis." Gastroenterol Clin Biol **21**(11): 869-879.
- 41 Blaschitz, A., H. Juch, et al. (2005). "The soluble pool of HLA-G produced by human trophoblasts does not include detectable levels of the intron 4-containing HLA-G5 and HLA-G6 isoforms." Mol Hum Reprod **11**(10): 699-710.
- 42 Bonandrini, B., M. Figliuzzi, et al. (2013). "Recellularization of well preserved acellular kidney scaffold using embryonic stem cells." Tissue Eng Part A.
- 43 Boruczowski, D., D. Gladysz, et al. (2015). "The Potential of Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells in Treating Patients with Cystic Fibrosis." Adv Exp Med Biol **833**: 23-29.
- 44 Bronowicki, J. P., H. Barraud, et al. (2005). "Epidemiology and natural history of hepatitis C." Rev Prat **55**(6): 607-614.
- 45 Brown, B. N., C. A. Barnes, et al. (2010). "Surface characterization of extracellular matrix scaffolds." Biomaterials **31**(3): 428-437.
- 46 Bryja, V., J. Pachernik, et al. (2004). "Increased apoptosis in differentiating p27-deficient mouse embryonic stem cells." Cell Mol Life Sci **61**(11): 1384-1400.
- 47 Buitenhuis, M. (2011). "The role of PI3K/protein kinase B (PKB/c-akt) in migration and homing of hematopoietic stem and progenitor cells." Curr Opin Hematol **18**(4): 226-230.
- 48 Bunnell, B. A., M. Flaata, et al. (2008). "Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation." Methods **45**(2): 115-120.
- 49 Busuttill, R. W. (2002). "How safe are donors in adult-to-adult living related liver transplantation?" Liver Transpl **8**(2): 121-122.
- 50 Buyl, K., J. De Kock, et al. (2014). "Characterization of hepatic markers in human Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells." Toxicol In Vitro **28**(1): 113-119.
- 51 Cai, J., M. L. Weiss, et al. (2004). "In search of "stemness"." Exp Hematol **32**(7): 585-598.

-
- 52 Cai, J., Y. Zhao, et al. (2007). "Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells." Hepatology **45**(5): 1229-1239.
- 53 Caimi, P. F., J. Reese, et al. (2010). "Emerging therapeutic approaches for multipotent mesenchymal stromal cells." Curr Opin Hematol **17**(6): 505-513.
- 54 Calmus, Y. (2014). "[Difficulties to access to liver transplantation in France in 2014]." Presse Med **43**(7-8): 739-741.
- 55 Campard, D., P. A. Lysy, et al. (2008). "Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells." Gastroenterology **134**(3): 833-848.
- 56 Caplan, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." J Orthop Res **9**(5): 641-650.
- 57 Cartmell, J. S. and M. G. Dunn (2000). "Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties." J Biomed Mater Res **49**(1): 134-140.
- 58 Castells, L., A. Rimola, et al. (2015). "Pegylated interferon plus ribavirin in HIV-infected patients with recurrent hepatitis C after liver transplantation: A prospective cohort study." J Hepatol **62**(1): 92-100.
- 59 Chamberlain, G., J. Fox, et al. (2007). "Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing." Stem Cells **25**(11): 2739-2749.
- 60 Chang, Z., T. Hou, et al. (2014). "Umbilical cord Wharton's jelly repeated culture system: a new device and method for obtaining abundant mesenchymal stem cells for bone tissue engineering." PLoS One **9**(10): e110764.
- 61 Chao, K. C., K. F. Chao, et al. (2008). "Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes." PLoS One **3**(1): e1451.
- 62 Chen, X. and F. Zeng (2011). "Directed hepatic differentiation from embryonic stem cells." Protein Cell **2**(3): 180-188.
- 63 Chen, Y., S. Zheng, et al. (2012). "Inhibition of Notch signaling by a gamma-secretase inhibitor attenuates hepatic fibrosis in rats." PLoS One **7**(10): e46512.
- 64 Chien, C. C., B. L. Yen, et al. (2006). "In vitro differentiation of human placenta-derived multipotent cells into hepatocyte-like cells." Stem Cells **24**(7): 1759-1768.
- 65 Choi, J., S. J. Curtis, et al. (2010). "Local mesenchymal stem/progenitor cells are a preferential target for initiation of adult soft tissue sarcomas associated with p53 and Rb deficiency." Am J Pathol **177**(5): 2645-2658.
- 66 Christ, B. and P. Stock (2012). "Mesenchymal stem cell-derived hepatocytes for functional liver replacement." Front Immunol **3**: 168.
- 67 Christiano, A. M. (2004). "Epithelial stem cells: stepping out of their niche." Cell **118**(5): 530-532.
- 68 Christodoulou, I., F. N. Kolisis, et al. (2013). "Comparative Evaluation of Human Mesenchymal Stem Cells of Fetal (Wharton's Jelly) and Adult (Adipose Tissue) Origin during Prolonged In Vitro Expansion: Considerations for Cytotherapy." Stem Cells Int **2013**: 246134.
- 69 Chung, V. (2015). "Systemic Therapy for Hepatocellular Carcinoma and

-
- Cholangiocarcinoma." Surg Oncol Clin N Am **24**(1): 187-198.
- 70 Cienfuegos, J. A., F. Rotellar, et al. (2014). "Liver regeneration--the best kept secret. A model of tissue injury response." Rev Esp Enferm Dig **106**(3): 171-194.
- 71 Cignarelli, A., S. Perrini, et al. (2012). "Human adipose tissue stem cells: relevance in the pathophysiology of obesity and metabolic diseases and therapeutic applications." Expert Rev Mol Med **14**: e19.
- 72 Clausen, T. D., E. R. Mathiesen, et al. (2008). "High prevalence of type 2 diabetes and pre-diabetes in adult offspring of women with gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes: the role of intrauterine hyperglycemia." Diabetes Care **31**(2): 340-346.
- 73 Cockbain, A. J., P. J. Goldsmith, et al. (2010). "The impact of postoperative infection on long-term outcomes in liver transplantation." Transplant Proc **42**(10): 4181-4183.
- 74 Codega, P., V. Silva-Vargas, et al. (2014). "Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche." Neuron **82**(3): 545-559.
- 75 Conconi, M. T., P. Burra, et al. (2006). "CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential." Int J Mol Med **18**(6): 1089-1096.
- 76 Conconi, M. T., P. De Coppi, et al. (2005). "Tracheal matrices, obtained by a detergent-enzymatic method, support in vitro the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells." Transpl Int **18**(6): 727-734.
- 77 Conway, A. and D. V. Schaffer (2012). "Biophysical regulation of stem cell behavior within the niche." Stem Cell Res Ther **3**(6): 50.
- 78 Corouge, M. and S. Pol (2013). "Epidemiology, transmission and screening of viral hepatitis." Soins(780): 24-27.
- 79 Cortiella, J., J. Niles, et al. (2010). "Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation." Tissue Eng Part A **16**(8): 2565-2580.
- 80 Costa, R. H., V. V. Kalinichenko, et al. (2003). "Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration." Hepatology **38**(6): 1331-1347.
- 81 Coulombel, L. (2007). "Adult stem cells: their scientific interest and therapeutic future." Gynecol Obstet Fertil **35**(9): 806-810.
- 82 Coulson-Thomas, V. J., T. F. Gesteira, et al. (2014). "Umbilical cord mesenchymal stem cells suppress host rejection: the role of the glycocalyx." J Biol Chem **289**(34): 23465-23481.
- 83 Crapo, P. M., T. W. Gilbert, et al. (2011). "An overview of tissue and whole organ decellularization processes." Biomaterials **32**(12): 3233-3243.
- 84 Dabelea, D. and D. J. Pettitt (2001). "Intrauterine diabetic environment confers risks for type 2 diabetes mellitus and obesity in the offspring, in addition to genetic susceptibility." J Pediatr Endocrinol Metab **14**(8): 1085-1091.
- 85 De Kock, J., L. Ceelen, et al. (2011). "Simple and quick method for whole-liver decellularization: a novel in vitro three-dimensional bioengineering tool?" Arch Toxicol **85**(6): 607-612.

-
- 86 De Luca, A., A. Carotenuto, et al. (2008). "The role of the EGFR signaling in tumor microenvironment." J Cell Physiol **214**(3): 559-567.
- 87 Del Papa, B., P. Sportoletti, et al. (2013). "Notch1 modulates mesenchymal stem cells mediated regulatory T-cell induction." Eur J Immunol **43**(1): 182-187.
- 88 Deltenre, P., P. Mathurin, et al. (2005). "Managing the complications of cirrhosis." Rev Prat **55**(14): 1555-1563.
- 89 Deuse, T., M. Stubbendorff, et al. (2011). "Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells." Cell Transplant **20**(5): 655-667.
- 90 Devereaux, M. W. (2007). "Alternative sources of adult stem cells: a possible solution to the embryonic stem cell debate." Gend Med **4**(1): 85; author reply 86.
- 91 Di Nicola, M., C. Carlo-Stella, et al. (2002). "Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli." Blood **99**(10): 3838-3843.
- 92 Di Nicuolo, G., M. P. van de Kerkhove, et al. (2005). "No evidence of in vitro and in vivo porcine endogenous retrovirus infection after plasmapheresis through the AMC-bioartificial liver." Xenotransplantation **12**(4): 286-292.
- 93 Ding, L., Y. N. Ding, et al. (2014). "Proteins related to early changes in carcinogenesis of hepatic oval cells after treatment with methylnitronitrosoguanidine." Exp Toxicol Pathol **66**(2-3): 139-146.
- 94 Djouad, F., L. M. Charbonnier, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism." Stem Cells **25**(8): 2025-2032.
- 95 Dong, C., C. R. Rovnaghi, et al. (2014). "Ketamine affects the neurogenesis of rat fetal neural stem progenitor cells via the PI3K/Akt-p27 signaling pathway." Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol **101**(5): 355-363.
- 96 Duan, D., B. J. Klenkler, et al. (2006). "Progress in the development of a corneal replacement: keratoprostheses and tissue-engineered corneas." Expert Rev Med Devices **3**(1): 59-72.
- 97 Educationnels, S. (2013).
- 98 Egozi, D., M. Shapira, et al. (2007). "Regulation of the cell cycle inhibitor p27 and its ubiquitin ligase Skp2 in differentiation of human embryonic stem cells." FASEB J **21**(11): 2807-2817.
- 99 Eguchi, S., M. Takatsuki, et al. (2014). "Liver transplantation for patients with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus co-infection: update in 2013." J Hepatobiliary Pancreat Sci **21**(4): 263-268.
- 100 El Alami, M., J. Vina-Almunia, et al. (2014). "Activation of p38, p21, and NRF-2 mediates decreased proliferation of human dental pulp stem cells cultured under 21% O₂." Stem Cell Reports **3**(4): 566-573.
- 101 Engela, A. U., C. C. Baan, et al. (2013). "Mesenchymal stem cells control alloreactive CD8(+) CD28(-) T cells." Clin Exp Immunol **174**(3): 449-458.
- 102 Eseonu, O. I. and C. De Bari (2014). "Homing of mesenchymal stem cells: mechanistic or stochastic? Implications for targeted delivery in arthritis."

-
- Rheumatology (Oxford).
- 103 Evans, D. W., E. C. Moran, et al. (2013). "Scale-dependent mechanical properties of native and decellularized liver tissue." Biomech Model Mechanobiol **12**(3): 569-580.
- 104 Evans, J. R., S. L. Mason, et al. (2012). "Current status of clinical trials of neural transplantation in Parkinson's disease." Prog Brain Res **200**: 169-198.
- 105 Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-156.
- 106 Faulk, D. M., C. A. Carruthers, et al. (2014). "The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material." Acta Biomater **10**(1): 183-193.
- 107 Feil, G., L. Daum, et al. (2011). "From tissue engineering to regenerative medicine in urology--the potential and the pitfalls." Adv Drug Deliv Rev **63**(4-5): 375-378.
- 108 Fiegel, H. C., C. Lange, et al. (2006). "Fetal and adult liver stem cells for liver regeneration and tissue engineering." J Cell Mol Med **10**(3): 577-587.
- 109 Fitchev, P., C. Chung, et al. (2014). "PEDF & stem cells: niche vs. nurture." Curr Drug Deliv **11**(5): 552-560.
- 110 Fontes, A., C. C. Macarthur, et al. (2013). "Generation of human-induced pluripotent stem cells (hiPSCs) using episomal vectors on defined Essential 8 Medium conditions." Methods Mol Biol **997**: 57-72.
- 111 Forbes, S. J. and P. N. Newsome (2012). "New horizons for stem cell therapy in liver disease." J Hepatol **56**(2): 496-499.
- 112 Foschi, A., C. A. Zavaglia, et al. (2014). "Autoimmunity after liver transplantation: a frequent event but a rare clinical problem." Clin Transplant.
- 113 Friedenstein, A. (1989). "Stromal-hematopoietic interrelationships: Maximov's ideas and modern models." Haematol Blood Transfus **32**: 159-167.
- 114 Friedenstein, A. J. (1976). "Precursor cells of mechanocytes." Int Rev Cytol **47**: 327-359.
- 115 Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhyan, et al. (1987). "Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers." Cell Tissue Kinet **20**(3): 263-272.
- 116 Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhyan, et al. (1974). "Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo." Transplantation **17**(4): 331-340.
- 117 Friedenstein, A. J., A. A. Ivanov-Smolenski, et al. (1978). "Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants." Exp Hematol **6**(5): 440-444.
- 118 Friedman, R., M. Betancur, et al. (2007). "Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation." Biol Blood Marrow Transplant **13**(12): 1477-1486.
- 119 Fu, Y. S., Y. C. Cheng, et al. (2006). "Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism." Stem Cells **24**(1): 115-124.

-
- 120 Fujii, H., K. Honoki, et al. (2007). "Reduced expression of INK4a/ARF genes in stem-like sphere cells from rat sarcomas." Biochem Biophys Res Commun **362**(3): 773-778.
- 121 Gao, Y., C. Gu, et al. (2010). "p27 modulates tropism of mesenchymal stem cells toward brain tumors." Exp Ther Med **1**(4): 695-699.
- 122 Gendrault, J. L., A. Bingen, et al. (1977). "[Sinusoidal cells of the liver in toxic hepatitis induced by the FV3 (Frog Virus 3): ultrastructural changes in Kupffer cells and endothelial cells]." Med Chir Dig **6**(7): 439-441.
- 123 Gerlach, G., S. Herpertz, et al. (2015). "Personality traits and obesity: a systematic review." Obes Rev **16**(1): 32-63.
- 124 Ghaedi, M., N. Tuleuova, et al. (2011). "Bottom-up signaling from HGF-containing surfaces promotes hepatic differentiation of mesenchymal stem cells." Biochem Biophys Res Commun **407**(2): 295-300.
- 125 Gheisari, Y., K. Azadmanesh, et al. (2012). "Genetic modification of mesenchymal stem cells to overexpress CXCR4 and CXCR7 does not improve the homing and therapeutic potentials of these cells in experimental acute kidney injury." Stem Cells Dev **21**(16): 2969-2980.
- 126 Giebel, B. (2008). "Cell polarity and asymmetric cell division within human hematopoietic stem and progenitor cells." Cells Tissues Organs **188**(1-2): 116-126.
- 127 Gilbert, T. W., J. M. Freund, et al. (2009). "Quantification of DNA in biologic scaffold materials." J Surg Res **152**(1): 135-139.
- 128 Girard, E. D., T. J. Jensen, et al. (2013). "Automated procedure for biomimetic de-cellularized lung scaffold supporting alveolar epithelial transdifferentiation." Biomaterials **34**(38): 10043-10055.
- 129 Glenn, J. D. and K. A. Whartenby (2014). "Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy." World J Stem Cells **6**(5): 526-539.
- 130 Goh, S. K., S. Bertera, et al. (2013). "Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering." Biomaterials **34**(28): 6760-6772.
- 131 Gomez-Lopez, S., R. G. Lerner, et al. (2014). "Asymmetric cell division of stem and progenitor cells during homeostasis and cancer." Cell Mol Life Sci **71**(4): 575-597.
- 132 Gotherstrom, C., O. Ringden, et al. (2003). "Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells." Bone Marrow Transplant **32**(3): 265-272.
- 133 Gotts, J. E. and M. A. Matthay (2012). "Mesenchymal stem cells and the stem cell niche: a new chapter." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **302**(11): L1147-1149.
- 134 Goujon (1869). "Recherches experimentales sur les proprietes physiologiques de la moelle des os." J Anat Physiol. **6**: 399-412.
- 135 Graf, T. and M. Stadtfeld (2008). "Heterogeneity of embryonic and adult stem cells." Cell Stem Cell **3**(5): 480-483.

-
- 136 Griffin, M. D., T. Ritter, et al. (2010). "Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies." Hum Gene Ther **21**(12): 1641-1655.
- 137 Guenard, H. (2009). "Physiologie humaine s.l. : Pradel." ISBN : **978-2-913996-76-2**.
- 138 Gutierrez-Aranda, I., V. Ramos-Mejia, et al. (2010). "Human induced pluripotent stem cells develop teratoma more efficiently and faster than human embryonic stem cells regardless the site of injection." Stem Cells **28**(9): 1568-1570.
- 139 Han, S., N. Dziedzic, et al. (2011). "An endothelial cell niche induces hepatic specification through dual repression of Wnt and Notch signaling." Stem Cells **29**(2): 217-228.
- 140 Handschel, J. G., R. A. Depprich, et al. (2007). "Prospects of micromass culture technology in tissue engineering." Head Face Med **3**: 4.
- 141 Hazeltine, L. B., M. G. Badur, et al. (2014). "Temporal impact of substrate mechanics on differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes." Acta Biomater **10**(2): 604-612.
- 142 He, H., X. Liu, et al. (2013). "Promotion of hepatic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells on decellularized cell-deposited extracellular matrix." Biomed Res Int **2013**: 406871.
- 143 He, X. C., Z. Li, et al. (2014). "Homing and migration assays of hematopoietic stem/progenitor cells." Methods Mol Biol **1185**: 279-284.
- 144 Hernaez, R., J. McLean, et al. (2013). "Association between variants in or near PNPLA3, GCKR, and PPP1R3B with ultrasound-defined steatosis based on data from the third National Health and Nutrition Examination Survey." Clin Gastroenterol Hepatol **11**(9): 1183-1190 e1182.
- 145 Holmberg, J., M. Genander, et al. (2006). "EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche." Cell **125**(6): 1151-1163.
- 146 Hoogduijn, M. J., M. Roemeling-van Rhijn, et al. (2011). "Immunological aspects of allogeneic and autologous mesenchymal stem cell therapies." Hum Gene Ther **22**(12): 1587-1591.
- 147 Horwitz, E. M., K. Le Blanc, et al. (2005). "Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **7**(5): 393-395.
- 148 Hosseinkhani, M., D. Mehrabani, et al. (2014). "Tissue engineered scaffolds in regenerative medicine." World J Plast Surg **3**(1): 3-7.
- 149 Hsuuw, Y. D., T. F. Kuo, et al. (2009). "Ginkgolide B induces apoptosis via activation of JNK and p21-activated protein kinase 2 in mouse embryonic stem cells." Ann N Y Acad Sci **1171**: 501-508.
- 150 <http://alcs.ma/?Hepatitis-virales&lang=fr>.
- 151 <http://angiocholite.blogspot.fr/2009/05/physiologie-hepatique.html>.
- 152 http://aristote.datacenter.dsi.upmc.fr/disc/PCEM1/Cours/JC_PF_metab_2005_fichiers/frame.htm.
- 153 http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2007_Groups/group12/Homepage.html.
- 154 <http://global.britannica.com/EBchecked/topic/344579/liver>.

-
- 155 <http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx>.
- 156 http://hepatoweb.com/gros_plans.php.
- 157 <http://pedicardiology-bala.blogspot.fr/2011/01/anatomy-hepatic-veins.html>.
- 158 <http://superonlinefr.wordpress.com/regeneration-cellulaire/>.
- 159 <http://www.alimentationvivante.com/cellules-souches-sante/>.
- 160 <http://www.apef.com.pt/?d=73>.
- 161 <http://www.centre-hepato-biliaire.org/maladies-foie/cirrhose.html>.
- 162 <http://www.centre-hepato-biliaire.org/maladies-foie/steatose.html>.
- 163 <http://www.doctissimo.fr/>.
- 164 http://www.microscopix.ch/microscopie_principe.php?smenu=3.
- 165 <http://www.nutergia.com/fr/nutergia-votre-expert-conseil/dossiers-bien-etre/drainage-et-detox-sante.php>.
- 166 <http://www.tetes-chercheuses.fr/magazines/numero-14/dossier/reparer-le-squelette-447/>.
- 167 <http://www.vetopsy.fr/reproduction/gestation/amnios-cordon-ombilical-apres-plicature-embryon.php>.
- 168 <https://www.pinterest.com/pin/504684701965210409/>.
- 169 Hu, J., Y. Wang, et al. (2014). "Effect and mechanisms of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on type 1 diabetes in NOD model." Endocrine.
- 170 Hu, J., X. Yu, et al. (2013). "Long term effects of the implantation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from the umbilical cord for newly-onset type 1 diabetes mellitus." Endocr J **60**(3): 347-357.
- 171 Huang, H. I. (2007). "Isolation of human placenta-derived multipotent cells and in vitro differentiation into hepatocyte-like cells." Curr Protoc Stem Cell Biol **Chapter 1**: Unit 1E 1.
- 172 Huang, W. H., H. L. Chen, et al. (2014). "Hypoxic mesenchymal stem cells engraft and ameliorate limb ischaemia in allogeneic recipients." Cardiovasc Res **101**(2): 266-276.
- 173 Huang, Y., X. Yang, et al. (2010). "gamma-secretase inhibitor induces adipogenesis of adipose-derived stem cells by regulation of Notch and PPAR-gamma." Cell Prolif **43**(2): 147-156.
- 174 Hynes, K., D. Menicanin, et al. (2012). "Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration." Periodontol 2000 **59**(1): 203-227.
- 175 Ilancheran, S., Y. Moodley, et al. (2009). "Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair?" Placenta **30**(1): 2-10.
- 176 Iwasaki, H. and T. Suda (2009). "Cancer stem cells and their niche." Cancer Sci **100**(7): 1166-1172.
- 177 Jang, J. H., O. Castano, et al. (2009). "Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering." Adv Drug Deliv Rev **61**(12): 1065-1083.
- 178 Jiang, X. X., Y. Zhang, et al. (2005). "Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells." Blood **105**(10): 4120-4126.
- 179 Jiao, J., J. M. Milwid, et al. (2011). "A mesenchymal stem cell potency assay."

-
- Methods Mol Biol **677**: 221-231.
- 180 Jones, P. D., P. H. Hayashi, et al. (2013). "Liver transplantation in 2013: challenges and controversies." Minerva Gastroenterol Dietol **59**(2): 117-131.
- 181 Jurgens, W. J., R. J. Kroeze, et al. (2011). "Rapid attachment of adipose stromal cells on resorbable polymeric scaffolds facilitates the one-step surgical procedure for cartilage and bone tissue engineering purposes." J Orthop Res **29**(6): 853-860.
- 182 Kajbafzadeh, A. M., N. Javan-Farazmand, et al. (2013). "Determining the optimal decellularization and sterilization protocol for preparing a tissue scaffold of a human-sized liver tissue." Tissue Eng Part C Methods **19**(8): 642-651.
- 183 Kamolz, L. P., M. Keck, et al. (2014). "Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote wound healing and tissue regeneration." Stem Cell Res Ther **5**(3): 62.
- 184 Kanatsu-Shinohara, M., M. Takehashi, et al. (2008). "Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche depends on beta1-integrin." Cell Stem Cell **3**(5): 533-542.
- 185 Kang, Y. Z., Y. Wang, et al. (2009). "[Decellularization technology application in whole liver reconstruct biological scaffold]." Zhonghua Yi Xue Za Zhi **89**(16): 1135-1138.
- 186 Kansagara, D., J. Papak, et al. (2014). "Screening for hepatocellular carcinoma in chronic liver disease: a systematic review." Ann Intern Med **161**(4): 261-269.
- 187 Kashofer, K., M. M. Tschernatsch, et al. (2009). "The disease relevance of human hepatocellular xenograft models: molecular characterization and review of the literature." Cancer Lett **286**(1): 121-128.
- 188 Kasoju, N. and U. Bora (2012). "Silk fibroin based biomimetic artificial extracellular matrix for hepatic tissue engineering applications." Biomed Mater **7**(4): 045004.
- 189 Kassis, I., A. Vaknin-Dembinsky, et al. (2011). "Bone marrow mesenchymal stem cells: agents of immunomodulation and neuroprotection." Curr Stem Cell Res Ther **6**(1): 63-68.
- 190 Kassmer, S. H. and D. S. Krause (2013). "Very small embryonic-like cells: biology and function of these potential endogenous pluripotent stem cells in adult tissues." Mol Reprod Dev **80**(8): 677-690.
- 191 Kasuya, K., H. Oshiro, et al. (2012). "Comparison of preoperative images with gross and histopathological findings of liver slices in patients with liver metastases from colorectal cancer after chemotherapy." Hepatogastroenterology **59**(116): 981-985.
- 192 Keating, A. (2006). "Mesenchymal stromal cells." Curr Opin Hematol **13**(6): 419-425.
- 193 Kew, M. C. (2014). "The role of cirrhosis in the etiology of hepatocellular carcinoma." J Gastrointest Cancer **45**(1): 12-21.
- 194 Kim, D. W., M. Staples, et al. (2013). "Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications." Int J Mol Sci **14**(6): 11692-11712.
- 195 Kim, N. and S. G. Cho (2013). "Clinical applications of mesenchymal stem cells."

-
- Korean J Intern Med **28**(4): 387-402.
- 196 King, A. and P. N. Newsome (2014). "Bone marrow stem cell therapy for liver disease." Dig Dis **32**(5): 494-501.
- 197 Klumpp, D., R. E. Horch, et al. (2010). "Engineering skeletal muscle tissue--new perspectives in vitro and in vivo." J Cell Mol Med **14**(11): 2622-2629.
- 198 Klyushnenkova, E., J. D. Mosca, et al. (2005). "T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression." J Biomed Sci **12**(1): 47-57.
- 199 Kmiecik, G., W. Niklinska, et al. (2013). "Fetal membranes as a source of stem cells." Adv Med Sci **58**(2): 185-195.
- 200 Kobayashi, T. and R. Kageyama (2011). "Hes1 oscillations contribute to heterogeneous differentiation responses in embryonic stem cells." Genes (Basel) **2**(1): 219-228.
- 201 Kode, J. A., S. Mukherjee, et al. (2009). "Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration." Cytotherapy **11**(4): 377-391.
- 202 Korossis, S., F. Bolland, et al. (2006). "Review: tissue engineering of the urinary bladder: considering structure-function relationships and the role of mechanotransduction." Tissue Eng **12**(4): 635-644.
- 203 Ksiazek, K. (2009). "A comprehensive review on mesenchymal stem cell growth and senescence." Rejuvenation Res **12**(2): 105-116.
- 204 Kulik, L. M. and A. Chokechanachaisakul (2015). "Evaluation and Management of Hepatocellular Carcinoma." Clin Liver Dis **19**(1): 23-43.
- 205 Kumar, S. and S. Ponnazhagan (2007). "Bone homing of mesenchymal stem cells by ectopic alpha 4 integrin expression." FASEB J **21**(14): 3917-3927.
- 206 L'Heureux, N., T. N. McAllister, et al. (2007). "Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization." N Engl J Med **357**(14): 1451-1453.
- 207 La Rocca, G., M. Lo Iacono, et al. (2013). "Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells maintain the expression of key immunomodulatory molecules when subjected to osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation in vitro: new perspectives for cellular therapy." Curr Stem Cell Res Ther **8**(1): 100-113.
- 208 Lafaro, K. J., A. N. Demirjian, et al. (2015). "Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma." Surg Oncol Clin N Am **24**(1): 1-17.
- 209 Lafortune, M., Denys, A., Sauvanet, A., Schmidt, S. (2007). "Anatomie du foie : ce qu'il faut savoir." s.l. : Elsevier Massons,.
- 210 Lang, I., A. Schweizer, et al. (2008). "Human fetal placental endothelial cells have a mature arterial and a juvenile venous phenotype with adipogenic and osteogenic differentiation potential." Differentiation **76**(10): 1031-1043.
- 211 Langer, R. and J. P. Vacanti (1993). "Tissue engineering." Science **260**(5110): 920-926.
- 212 Laperche, Y. (2003). "[Oval cells and liver regeneration]." Med Sci (Paris) **19**(6-7): 697-698.
- 213 Laperche, Y. (2007). "[Origin of liver murine oval cells]." Med Sci (Paris) **23**(5): 480-482.

-
- 214 Lapidot, T. (2013).
- 215 Lathia, J. D., J. Gallagher, et al. (2010). "Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells." Cell Stem Cell **6**(5): 421-432.
- 216 Laurent, L. C., I. Ulitsky, et al. (2011). "Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture." Cell Stem Cell **8**(1): 106-118.
- 217 Le Blanc, K., F. Frassoni, et al. (2008). "Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study." Lancet **371**(9624): 1579-1586.
- 218 Lee, J. H., K. H. Lee, et al. (2012). "Possibility of undifferentiated human thigh adipose stem cells differentiating into functional hepatocytes." Arch Plast Surg **39**(6): 593-599.
- 219 Lee, J. S., J. Shin, et al. (2014). "Liver extracellular matrix providing dual functions of two-dimensional substrate coating and three-dimensional injectable hydrogel platform for liver tissue engineering." Biomacromolecules **15**(1): 206-218.
- 220 Lee, K. D., T. K. Kuo, et al. (2004). "In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells." Hepatology **40**(6): 1275-1284.
- 221 Lee, M., S. Y. Jeong, et al. (2014). "Low immunogenicity of allogeneic human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro and in vivo." Biochem Biophys Res Commun **446**(4): 983-989.
- 222 Lee, S. H. and H. Shin (2007). "Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering." Adv Drug Deliv Rev **59**(4-5): 339-359.
- 223 Lee, Y. H., J. Y. Han, et al. (2004). "Stem cells expressing homing receptors could be expanded from cryopreserved and unselected cord blood." J Korean Med Sci **19**(5): 635-639.
- 224 Leung, K. T., K. Y. Chan, et al. (2011). "The tetraspanin CD9 regulates migration, adhesion, and homing of human cord blood CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells." Blood **117**(6): 1840-1850.
- 225 Li, Y., R. Pal, et al. (2012). "An opposite effect of the CDK inhibitor, p18(INK4c) on embryonic stem cells compared with tumor and adult stem cells." PLoS One **7**(9): e45212.
- 226 Li, Y. P., S. Paczesny, et al. (2008). "Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway." J Immunol **180**(3): 1598-1608.
- 227 Li, Y. S., H. J. Harn, et al. (2013). "Cells and materials for liver tissue engineering." Cell Transplant **22**(4): 685-700.
- 228 Lin, C. H., J. R. Yang, et al. (2014). "Evaluation of decellularized extracellular matrix of skeletal muscle for tissue engineering." Int J Artif Organs **37**(7): 546-555.
- 229 Lin, Y. C., P. F. Chang, et al. (2014). "Genetic variants in GCKR and PNPLA3 confer susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease in obese individuals." Am J Clin Nutr **99**(4): 869-874.
- 230 Ling, W., J. Zhang, et al. (2014). "Mesenchymal stem cells useIDO to regulate

-
- immunity in tumor microenvironment." Cancer Res **74**(5): 1576-1587.
- 231 Liu, C. X., S. R. Liu, et al. (2009). "[Preparation of whole-kidney acellular matrix in rats by perfusion]." Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao **29**(5): 979-982.
- 232 Liu, L., J. Chai, et al. (2011). "Research progress of biological characteristics and advantages of Wharton's jelly-mesenchymal stem cells." Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi **25**(6): 745-749.
- 233 Liu, M., X. Yu, et al. (2013). "Tissue engineering stratified scaffolds for articular cartilage and subchondral bone defects repair." Orthopedics **36**(11): 868-873.
- 234 Liu, S., K. D. Hou, et al. (2014). "Characteristics of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly of human umbilical cord and for fabrication of non-scaffold tissue-engineered cartilage." J Biosci Bioeng **117**(2): 229-235.
- 235 Liu, S., M. Yuan, et al. (2012). "Immune characterization of mesenchymal stem cells in human umbilical cord Wharton's jelly and derived cartilage cells." Cell Immunol **278**(1-2): 35-44.
- 236 Liu, T. W., Z. G. Ma, et al. (2013). "Transplantation of mouse CGR8 embryonic stem cells producing GDNF and TH protects against 6-hydroxydopamine neurotoxicity in the rat." Int J Biochem Cell Biol **45**(7): 1265-1273.
- 237 Loeffler, M. and I. Roeder (2002). "Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models--a conceptual approach." Cells Tissues Organs **171**(1): 8-26.
- 238 Loss, M., A. Obed, et al. (2008). "Split-liver transplantation." Chirurg **79**(2): 144-148.
- 239 Lovekamp, J. J., D. T. Simionescu, et al. (2006). "Stability and function of glycosaminoglycans in porcine bioprosthetic heart valves." Biomaterials **27**(8): 1507-1518.
- 240 Lu, W., M. O. Casanueva, et al. (2012). "Niche-associated activation of rac promotes the asymmetric division of Drosophila female germline stem cells." PLoS Biol **10**(7): e1001357.
- 241 Lucas, D. and P. S. Frenette (2014). "Stem cells: Reprogramming finds its niche." Nature **511**(7509): 301-302.
- 242 Lucey, M. R., N. Terrault, et al. (2013). "Long-term management of the successful adult liver transplant: 2012 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the American Society of Transplantation." Liver Transpl **19**(1): 3-26.
- 243 Lund, R. D., S. Wang, et al. (2007). "Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease." Stem Cells **25**(3): 602-611.
- 244 Lutz, M., M. Rosenberg, et al. (2008). "Local injection of stem cell factor (SCF) improves myocardial homing of systemically delivered c-kit + bone marrow-derived stem cells." Cardiovasc Res **77**(1): 143-150.
- 245 Ma, J., S. K. Both, et al. (2014). "Concise review: cell-based strategies in bone tissue engineering and regenerative medicine." Stem Cells Transl Med **3**(1): 98-107.
- 246 Malchesky, P. S. (2006). "The spread and breadth of artificial organ

-
- technologies." Artif Organs **30**(9): 655-656.
- 247 Malchesky, P. S. (2014). "Artificial organ technologies around the world." Artif Organs **38**(2): 99-100.
- 248 Marciniak-Czochra, A., T. Stiehl, et al. (2009). "Modeling of asymmetric cell division in hematopoietic stem cells--regulation of self-renewal is essential for efficient repopulation." Stem Cells Dev **18**(3): 377-385.
- 249 Marcus, A. J. and D. Woodbury (2008). "Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard." J Cell Mol Med **12**(3): 730-742.
- 250 Margossian, T., L. Reppel, et al. (2012). "Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly: comparative phenotype analysis between tissue and in vitro expansion." Biomed Mater Eng **22**(4): 243-254.
- 251 Martin, C. H. and D. S. Kaufman (2005). "Synergistic use of adult and embryonic stem cells to study human hematopoiesis." Curr Opin Biotechnol **16**(5): 510-515.
- 252 Martin, P., A. DiMartini, et al. (2014). "Evaluation for liver transplantation in adults: 2013 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the American Society of Transplantation." Hepatology **59**(3): 1144-1165.
- 253 Matsumoto, A. and Y. Fujino (2014). "Perioperative management of patients for living-donor liver transplantation." Masui **63**(5): 528-533.
- 254 Matsumura, G., N. Nitta, et al. (2012). "Long-term results of cell-free biodegradable scaffolds for in situ tissue-engineering vasculature: in a canine inferior vena cava model." PLoS One **7**(4): e35760.
- 255 Maurice, M., N. Rajho Meerson, et al. (1998). "Polarity of epithelial cells of the liver. Cellular and molecular mechanisms, and pathologic changes." Gastroenterol Clin Biol **22**(5): 530-540.
- 256 McCaughan, G. W., K. C. Sze, et al. (2015). "Is there such a thing as protocol immunosuppression in liver transplantation?" Expert Rev Gastroenterol Hepatol **9**(1): 1-4.
- 257 McElreavey, K. D., A. I. Irvine, et al. (1991). "Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord." Biochem Soc Trans **19**(1): 29S.
- 258 Menard, C. and K. Tarte (2011). "Immunosuppression and mesenchymal stem cells: back to the future." Med Sci (Paris) **27**(3): 269-274.
- 259 Mendoza-Novelo, B., E. E. Avila, et al. (2011). "Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content." Acta Biomater **7**(3): 1241-1248.
- 260 Meng, X., P. Leslie, et al. (2014). "Stem cells in a three-dimensional scaffold environment." Springerplus **3**: 80.
- 261 Mennan, C., K. Wright, et al. (2013). "Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord." Biomed Res Int **2013**: 916136.
- 262 Menon, K. V., A. R. Hakeem, et al. (2014). "Review article: liver transplantation for hepatocellular carcinoma - a critical appraisal of the current worldwide listing criteria." Aliment Pharmacol Ther **40**(8): 893-902.

-
- 263 Merceron, C., C. Vinatier, et al. (2008). "Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue engineering." Joint Bone Spine **75**(6): 672-674.
- 264 Mikaeili Agah, E., K. Parivar, et al. (2013). "Induction of human umbilical Wharton's jelly-derived stem cells toward oligodendrocyte phenotype." J Mol Neurosci **51**(2): 328-336.
- 265 Milwid, J. M., T. Ichimura, et al. (2012). "Secreted factors from bone marrow stromal cells upregulate IL-10 and reverse acute kidney injury." Stem Cells Int **2012**: 392050.
- 266 Mirmalek-Sani, S. H., D. C. Sullivan, et al. (2013). "Immunogenicity of decellularized porcine liver for bioengineered hepatic tissue." Am J Pathol **183**(2): 558-565.
- 267 Miro, J. M., P. Stock, et al. (2014). "Outcome and management of HCV/HIV coinfection pre- and post-liver transplantation. A 2015 Update." J Hepatol.
- 268 Miyake, N., A. C. Brun, et al. (2006). "HOXB4-induced self-renewal of hematopoietic stem cells is significantly enhanced by p21 deficiency." Stem Cells **24**(3): 653-661.
- 269 Miyanishi, M., Y. Mori, et al. (2013). "Do pluripotent stem cells exist in adult mice as very small embryonic stem cells?" Stem Cell Reports **1**(2): 198-208.
- 270 Moore, J. K., B. M. Stutchfield, et al. (2014). "Systematic review: the effects of autologous stem cell therapy for patients with liver disease." Aliment Pharmacol Ther **39**(7): 673-685.
- 271 Moorehead, K. J., J. R. Burton, Jr., et al. (2015). "Intrahepatic antiviral quantification in a patient undergoing orthotopic cadaveric liver transplantation." J Antimicrob Chemother **70**(1): 315-317.
- 272 Morasso, M. I. and M. Tomic-Canic (2005). "Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing." Biol Cell **97**(3): 173-183.
- 273 Morrison, S. J. and A. C. Spradling (2008). "Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life." Cell **132**(4): 598-611.
- 274 Mou, X. Z., J. Lin, et al. (2013). "Menstrual blood-derived mesenchymal stem cells differentiate into functional hepatocyte-like cells." J Zhejiang Univ Sci B **14**(11): 961-972.
- 275 Mravic, M., B. Peault, et al. (2014). "Current trends in bone tissue engineering." Biomed Res Int **2014**: 865270.
- 276 Na, H. N., H. Kim, et al. (2012). "Novel genes and cellular pathways related to infection with adenovirus-36 as an obesity agent in human mesenchymal stem cells." Int J Obes (Lond) **36**(2): 195-200.
- 277 Nagamura-Inoue, T. and H. He (2014). "Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility." World J Stem Cells **6**(2): 195-202.
- 278 Nari, G. A., M. Cid, et al. (2013). "Preparation of a three-dimensional extracellular matrix by decellularization of rabbit livers." Rev Esp Enferm Dig **105**(3): 138-143.

-
- 279 Nekanti, U., L. Mohanty, et al. (2010). "Optimization and scale-up of Wharton's
jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications." Stem Cell Res **5**(3):
244-254.
- 280 Nieto, N. and M. P. Lutolf (2011). "Extracellular matrix bioengineering and
systems biology approaches in liver disease." Syst Synth Biol **5**(1-2): 11-20.
- 281 Nishikawa, S. I., M. Osawa, et al. (2008). "Niche required for inducing quiescent
stem cells." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **73**: 67-71.
- 282 Niu, J., W. Yue, et al. (2014). "Prevention of acute liver allograft rejection by
IL-10-engineered mesenchymal stem cells." Clin Exp Immunol **176**(3): 473-484.
- 283 Njei, B., Y. Rotman, et al. (2015). "Emerging trends in hepatocellular carcinoma
incidence and mortality." Hepatology **61**(1): 191-199.
- 284 Noort, W. A., M. I. Oerlemans, et al. (2012). "Human versus porcine
mesenchymal stromal cells: phenotype, differentiation potential,
immunomodulation and cardiac improvement after transplantation." J Cell Mol
Med **16**(8): 1827-1839.
- 285 Norvell, J. P. (2015). "Liver disease after hematopoietic cell transplantation in
adults." Transplant Rev (Orlando) **29**(1): 8-15.
- 286 O'Leary, J. G., R. Lepe, et al. (2008). "Indications for liver transplantation."
Gastroenterology **134**(6): 1764-1776.
- 287 Oguro, H., A. Iwama, et al. (2006). "Differential impact of Ink4a and Arf on
hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment in
Bmi1-deficient mice." J Exp Med **203**(10): 2247-2253.
- 288 Ohashi, K., M. A. Kay, et al. (2005). "Heterotopically transplanted hepatocyte
survival depends on extracellular matrix components." Transplant Proc **37**(10):
4587-4588.
- 289 Okunieff, P. and S. Vidyasagar (2013). "Stem cell senescence: a double-edged
sword?" J Natl Cancer Inst **105**(19): 1429-1430.
- 290 Oniscu, G. C., G. Diaz, et al. (2014). "Meeting report of the 19th Annual
International Congress of the International Liver Transplantation Society (Sydney
Convention and Exhibition Centre, Sydney, Australia, June 12-15, 2013)." Liver
Transpl **20**(1): 7-14.
- 291 Orford, K. W. and D. T. Scadden (2008). "Deconstructing stem cell self-renewal:
genetic insights into cell-cycle regulation." Nat Rev Genet **9**(2): 115-128.
- 292 Ortica, S., N. Tarantino, et al. (2013). "The 4 Notch receptors play distinct and
antagonistic roles in the proliferation and hepatocytic differentiation of liver
progenitors." FASEB J.
- 293 Ott, H. C., B. Clippinger, et al. (2010). "Regeneration and orthotopic
transplantation of a bioartificial lung." Nat Med **16**(8): 927-933.
- 294 Ott, H. C., T. S. Matthiesen, et al. (2007). "The adult human heart as a source for
stem cells: repair strategies with embryonic-like progenitor cells." Nat Clin Pract
Cardiovasc Med **4** Suppl 1: S27-39.
- 295 Ott, H. C., T. S. Matthiesen, et al. (2008). "Perfusion-decellularized matrix: using
nature's platform to engineer a bioartificial heart." Nat Med **14**(2): 213-221.
- 296 Ou, K. L. and H. Hosseinkhani (2014). "Development of 3D in vitro technology for

-
- medical applications." Int J Mol Sci **15**(10): 17938-17962.
- 297 Owen, M. and A. J. Friedenstein (1988). "Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors." Ciba Found Symp **136**: 42-60.
- 298 Pan, M. X., P. Y. Hu, et al. (2013). "An efficient method for decellularization of the rat liver." J Formos Med Assoc.
- 299 Pan, M. X., P. Y. Hu, et al. (2014). "An efficient method for decellularization of the rat liver." J Formos Med Assoc **113**(10): 680-687.
- 300 Pandit, N., R. Malik, et al. (2011). "Tissue engineering: A new vista in periodontal regeneration." J Indian Soc Periodontol **15**(4): 328-337.
- 301 Paniushin, O. V., E. I. Domaratskaia, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential." Izv Akad Nauk Ser Biol(1): 6-25.
- 302 Pappa, K. I. and N. P. Anagnou (2009). "Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum?" Regen Med **4**(3): 423-433.
- 303 Pardal, R. and J. Lopez-Barneo (2012). "Neural stem cells and transplantation studies in Parkinson's disease." Adv Exp Med Biol **741**: 206-216.
- 304 Parekkadan, B. and J. M. Milwid (2010). "Mesenchymal stem cells as therapeutics." Annu Rev Biomed Eng **12**: 87-117.
- 305 Parekkadan, B., A. W. Tilles, et al. (2008). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate autoimmune enteropathy independently of regulatory T cells." Stem Cells **26**(7): 1913-1919.
- 306 Partridge, S. R., S. J. Juan, et al. (2015). "Poor quality of external validity reporting limits generalizability of overweight and/or obesity lifestyle prevention interventions in young adults: a systematic review." Obes Rev **16**(1): 13-31.
- 307 Perrini, S., A. Cignarelli, et al. (2009). "Human adipose tissue precursor cells: a new factor linking regulation of fat mass to obesity and type 2 diabetes?" Arch Physiol Biochem **115**(4): 218-226.
- 308 Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-147.
- 309 Pomahac, B., T. Svensjo, et al. (1998). "Tissue engineering of skin." Crit Rev Oral Biol Med **9**(3): 333-344.
- 310 Port, G. Z., K. Oliveira, et al. (2014). "Biochemical nutritional profile of liver cirrhosis patients with hepatocellular carcinoma." Arq Gastroenterol **51**(1): 10-15.
- 311 Poupon, R. (2005). "[Hepatitis C: epidemiology, management and treatment]." Bull Acad Natl Med **189**(2): 375-384; discussion 384-377.
- 312 Prasanna, S. J., D. Gopalakrishnan, et al. (2010). "Pro-inflammatory cytokines, IFNgamma and TNFalpha, influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially." PLoS One **5**(2): e9016.
- 313 Ramasamy, R., H. Fazekasova, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle." Transplantation **83**(1): 71-76.
- 314 Rameshwar, P. (2008). "IFNgamma and B7-H1 in the immunology of mesenchymal stem cells." Cell Res **18**(8): 805-806.

-
- 315 Ramos-Zuniga, R., O. Gonzalez-Perez, et al. (2012). "Ethical implications in the use of embryonic and adult neural stem cells." Stem Cells Int **2012**: 470949.
- 316 Rasmusson, I., O. Ringden, et al. (2003). "Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells." Transplantation **76**(8): 1208-1213.
- 317 Ratajczak, M. Z., R. Liu, et al. (2011). "The role of pluripotent embryonic-like stem cells residing in adult tissues in regeneration and longevity." Differentiation **81**(3): 153-161.
- 318 Raya, A., I. Rodriguez-Piza, et al. (2008). "Generation of cardiomyocytes from new human embryonic stem cell lines derived from poor-quality blastocysts." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **73**: 127-135.
- 319 Raza, A. and G. K. Sood (2014). "Hepatocellular carcinoma review: current treatment, and evidence-based medicine." World J Gastroenterol **20**(15): 4115-4127.
- 320 Ren, H., X. Shi, et al. (2013). "Evaluation of two decellularization methods in the development of a whole-organ decellularized rat liver scaffold." Liver Int **33**(3): 448-458.
- 321 Ren, Y., H. Wu, et al. (2012). "Isolation, expansion, and differentiation of goat adipose-derived stem cells." Res Vet Sci **93**(1): 404-411.
- 322 Renstrom, J., M. Kroger, et al. (2010). "How the niche regulates hematopoietic stem cells." Chem Biol Interact **184**(1-2): 7-15.
- 323 Rey, A. (2003). "Are stem cells well named?" Med Sci (Paris) **19**(6-7): 645.
- 324 Ribeiro, A., P. Laranjeira, et al. (2013). "Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells." Stem Cell Res Ther **4**(5): 125.
- 325 Ridker, P. M., G. Pare, et al. (2008). "Loci related to metabolic-syndrome pathways including LEPR,HNF1A, IL6R, and GCKR associate with plasma C-reactive protein: the Women's Genome Health Study." Am J Hum Genet **82**(5): 1185-1192.
- 326 Ridruejo, E. (2014). "Does hepatitis B virus therapy reduce the risk of hepatocellular carcinoma?" Expert Opin Drug Saf: 1-13.
- 327 Robertson, M. J., J. L. Dries-Devlin, et al. (2014). "Optimizing recellularization of whole decellularized heart extracellular matrix." PLoS One **9**(2): e90406.
- 328 Rodriguez, R., R. Rubio, et al. (2009). "Loss of p53 induces tumorigenesis in p21-deficient mesenchymal stem cells." Neoplasia **11**(4): 397-407.
- 329 Romagnoli, C. and M. L. Brandi (2014). "Adipose mesenchymal stem cells in the field of bone tissue engineering." World J Stem Cells **6**(2): 144-152.
- 330 Rooney, G. E., G. I. Nistor, et al. (2010). "In vitro differentiation potential of human embryonic versus adult stem cells." Regen Med **5**(3): 365-379.
- 331 Roubelakis, M. G. (2013). "Therapeutic potential of fetal mesenchymal stem cells." Curr Stem Cell Res Ther **8**(2): 115-116.
- 332 Roura, S., J. Farre, et al. (2006). "Effect of aging on the pluripotential capacity of human CD105+ mesenchymal stem cells." Eur J Heart Fail **8**(6): 555-563.

-
- 333 Rubio, R., I. Gutierrez-Aranda, et al. (2013). "The differentiation stage of p53-Rb-deficient bone marrow mesenchymal stem cells imposes the phenotype of in vivo sarcoma development." Oncogene **32**(41): 4970-4980.
- 334 Ruth, N. D., D. Kelly, et al. (2014). "Rejection is less common in children undergoing liver transplantation for hepatoblastoma." Pediatr Transplant **18**(1): 52-57.
- 335 Ryu, H. H., B. J. Kang, et al. (2012). "Comparison of mesenchymal stem cells derived from fat, bone marrow, Wharton's jelly, and umbilical cord blood for treating spinal cord injuries in dogs." J Vet Med Sci **74**(12): 1617-1630.
- 336 Saidi, R. F. (2012). "Current status of liver transplantation." Arch Iran Med **15**(12): 772-776.
- 337 Salehinejad, P., N. B. Alitheen, et al. (2012). "Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly." In Vitro Cell Dev Biol Anim **48**(2): 75-83.
- 338 Salisbury, E. M., D. S. Game, et al. (2014). "Transplantation tolerance." Pediatr Nephrol **29**(12): 2263-2272.
- 339 Santos, P. M., Y. Ding, et al. (2014). "Cell-intrinsic in vivo requirement for the E47-p21 pathway in long-term hematopoietic stem cells." J Immunol **192**(1): 160-168.
- 340 Sasai, Y. (2013). "Next-generation regenerative medicine: organogenesis from stem cells in 3D culture." Cell Stem Cell **12**(5): 520-530.
- 341 Sasportas, L. S., R. Kasmieh, et al. (2009). "Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(12): 4822-4827.
- 342 Sass, D. A. and D. J. Reich (2011). "Liver transplantation in the 21st century: expanding the donor options." Gastroenterol Clin North Am **40**(3): 641-658.
- 343 Sato, F., T. Mitaka, et al. (1999). "Effects of nicotinamide-related agents on the growth of primary rat hepatocytes and formation of small hepatocyte colonies." Liver **19**(6): 481-488.
- 344 Scheers, I. L., C.; Najimi, M.; Sokal, E. (2011). "Cell therapy for the treatment of metabolic liver disease: An update on the umbilical cord derived stem cells candidates." Open Tissue Eng. Regen. Med Arh **4**: 48-53.
- 345 Schreiber, T. D., C. Steinl, et al. (2010). "The integrin $\alpha 9 \beta 1$ on hematopoietic stem and progenitor cells: involvement in cell adhesion, proliferation and differentiation." Haematologica.
- 347 Schwartz, R. E., M. Reyes, et al. (2002). "Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells." J Clin Invest **109**(10): 1291-1302.
- 348 Sellaro, T. L., A. K. Ravindra, et al. (2007). "Maintenance of hepatic sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro using organ-specific extracellular matrix scaffolds." Tissue Eng **13**(9): 2301-2310.
- 349 Selmani, Z., A. Naji, et al. (2008). "Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and

-
- natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells." Stem Cells **26**(1): 212-222.
- 350 Semenov, O. V., S. Koestenbauer, et al. (2010). "Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: critical parameters for isolation and maintenance of stemness after isolation." Am J Obstet Gynecol **202**(2): 193 e191-193 e113.
- 351 Sepulveda, J. C., M. Tome, et al. (2014). "Cell senescence abrogates the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in the lethal endotoxemia model." Stem Cells **32**(7): 1865-1877.
- 352 Shah, A., J. Brugnano, et al. (2008). "The development of a tissue-engineered cornea: biomaterials and culture methods." Pediatr Res **63**(5): 535-544.
- 353 Shah, M. and C. Allegrucci (2013). "Stem cell plasticity in development and cancer: epigenetic origin of cancer stem cells." Subcell Biochem **61**: 545-565.
- 354 Shahini, A., M. Yazdimamaghani, et al. (2014). "3D conductive nanocomposite scaffold for bone tissue engineering." Int J Nanomedicine **9**: 167-181.
- 355 Shampay, J., J. W. Szostak, et al. (1984). "DNA sequences of telomeres maintained in yeast." Nature **310**(5973): 154-157.
- 356 Sharma, M., F. Afrin, et al. (2013). "Regulated expression of CXCR4 constitutive active mutants revealed the up-modulated chemotaxis and up-regulation of genes crucial for CXCR4 mediated homing and engraftment of hematopoietic stem/progenitor cells." J Stem Cells Regen Med **9**(1): 19-27.
- 357 Shen, Q., W. Zhong, et al. (2002). "Asymmetric Numb distribution is critical for asymmetric cell division of mouse cerebral cortical stem cells and neuroblasts." Development **129**(20): 4843-4853.
- 358 Shin, D., C. H. Shin, et al. (2007). "Bmp and Fgf signaling are essential for liver specification in zebrafish." Development **134**(11): 2041-2050.
- 359 Shirakigawa, N., T. Takei, et al. (2013). "Base structure consisting of an endothelialized vascular-tree network and hepatocytes for whole liver engineering." J Biosci Bioeng **116**(6): 740-745.
- 360 Shoichet, M. S., C. C. Tate, et al. (2008). "Strategies for Regeneration and Repair in the Injured Central Nervous System Environment."
- 361 Shupe, T., M. Williams, et al. (2010). "Method for the decellularization of intact rat liver." Organogenesis **6**(2): 134-136.
- 362 Si-Tayeb, K., F. K. Noto, et al. (2010). "Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells." Hepatology **51**(1): 297-305.
- 363 Sidhu, J. S., F. Liu, et al. (2004). "Phenobarbital responsiveness as a uniquely sensitive indicator of hepatocyte differentiation status: requirement of dexamethasone and extracellular matrix in establishing the functional integrity of cultured primary rat hepatocytes." Exp Cell Res **292**(2): 252-264.
- 364 Simpson, D. L., N. L. Boyd, et al. (2012). "Use of human embryonic stem cell derived-mesenchymal cells for cardiac repair." Biotechnol Bioeng **109**(1): 274-283.
- 365 Snykers, S., J. De Kock, et al. (2009). "In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art." Stem Cells **27**(3): 577-605.

-
- 366 Sohni, A. and C. M. Verfaillie (2013). "Mesenchymal stem cells migration homing and tracking." Stem Cells Int **2013**: 130763.
- 367 Sokal, E. M. (2009). "[Regeneration of the liver: from hepatocyte cells to deficient hepatic cells]." Bull Mem Acad R Med Belg **164**(5-6): 207-212; discussion 213.
- 368 Soltys, K. A., A. Soto-Gutierrez, et al. (2010). "Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation." J Hepatol **53**(4): 769-774.
- 369 Song, R. S., J. M. Carroll, et al. (2014). "Generation, Expansion, and Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs) Derived From the Umbilical Cords of Newborns." Curr Protoc Stem Cell Biol **29**: 1C 16 11-11C 16 13.
- 370 Soto-Gutierrez, A., L. Zhang, et al. (2011). "A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement." Tissue Eng Part C Methods **17**(6): 677-686.
- 371 Soubrane, O., C. Goumard, et al. (2014). "Laparoscopic resection of hepatocellular carcinoma: a French survey in 351 patients." HPB (Oxford) **16**(4): 357-365.
- 372 Spradling, A., D. Drummond-Barbosa, et al. (2001). "Stem cells find their niche." Nature **414**(6859): 98-104.
- 373 Su, Z., P. Li, et al. (2014). "PHBVHx scaffolds loaded with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells or hepatocyte-like cells differentiated from these cells for liver tissue engineering." Mater Sci Eng C Mater Biol Appl **45**: 374-382.
- 374 Subramanian, A., U. M. Krishnan, et al. (2009). "Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration." J Biomed Sci **16**: 108.
- 375 Sullivan, K. M., D. M. Radosevich, et al. (2014). "Health-related quality of life: two decades after liver transplantation." Liver Transpl **20**(6): 649-654.
- 376 Sun, L., D. Wang, et al. (2010). "Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **62**(8): 2467-2475.
- 377 Sun, L. Y., C. Y. Pang, et al. (2013). "Antioxidants cause rapid expansion of human adipose-derived mesenchymal stem cells via CDK and CDK inhibitor regulation." J Biomed Sci **20**: 53.
- 378 Surjana, D., G. M. Halliday, et al. (2010). "Role of nicotinamide in DNA damage, mutagenesis, and DNA repair." J Nucleic Acids **2010**.
- 379 Szostak, J. W. and E. H. Blackburn (1982). "Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors." Cell **29**(1): 245-255.
- 380 Tachibana, M., P. Amato, et al. (2013). "Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer." Cell **153**(6): 1228-1238.
- 381 Taghizadeh, R. R., K. J. Cetrulo, et al. (2011). "Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications." Placenta **32 Suppl 4**: S311-315.
- 382 Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-676.

-
- 383 Takebe, T., N. Koike, et al. (2014). "Engineering of human hepatic tissue with functional vascular networks." Organogenesis **10**(2).
- 384 Takebe, T., R. R. Zhang, et al. (2014). "Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant." Nat Protoc **9**(2): 396-409.
- 385 Tan, S. and N. Barker (2013). "Engineering the niche for stem cells." Growth Factors **31**(6): 175-184.
- 386 Tan, Y., E. H. Xiao, et al. (2012). "VEGF(165) expressing bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes under HGF and EGF induction in vitro." Cytotechnology **64**(6): 635-647.
- 387 Tanaka, K., M. Shimada, et al. (2014). "Characteristics of Long-Term Survivors following Sorafenib Treatment for Advanced Hepatocellular Carcinoma: Report of a Workshop at the 50th Annual Meeting of the Liver Cancer Study Group of Japan." Oncology **87 Suppl 1**: 104-109.
- 388 Tang, W., D. Zeve, et al. (2008). "White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature." Science **322**(5901): 583-586.
- 389 Taniguchi Ishikawa, E., K. H. Chang, et al. (2013). "Klf5 controls bone marrow homing of stem cells and progenitors through Rab5-mediated beta1/beta2-integrin trafficking." Nat Commun **4**: 1660.
- 390 Tavassoli, M. and W. H. Crosby (1968). "Transplantation of marrow to extramedullary sites." Science **161**(3836): 54-56.
- 391 Taylor, D. A. (2009). "From stem cells and cadaveric matrix to engineered organs." Curr Opin Biotechnol **20**(5): 598-605.
- 392 Tchoukalova, Y., C. Koutsari, et al. (2007). "Committed subcutaneous preadipocytes are reduced in human obesity." Diabetologia **50**(1): 151-157.
- 393 Teodori, L., A. Costa, et al. (2014). "Native extracellular matrix: a new scaffolding platform for repair of damaged muscle." Front Physiol **5**: 218.
- 394 Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-1147.
- 395 Thuluvath, P. J. (2009). "Toward safer sedation in patients with cirrhosis: have we done enough?" Gastrointest Endosc **70**(2): 269-271.
- 396 Tian, C. and A. G. Singal (2015). "Clinical reminders for hepatocellular carcinoma surveillance: an early step in a long journey." Clin Gastroenterol Hepatol **13**(1): 180-182.
- 397 Tian, C., G. Zheng, et al. (2013). "Hes1 mediates the different responses of hematopoietic stem and progenitor cells to T cell leukemic environment." Cell Cycle **12**(2): 322-331.
- 398 Ting, S., M. Lecina, et al. (2012). "Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes on microcarrier cultures." Curr Protoc Stem Cell Biol **Chapter 1**: Unit1D 7.
- 399 Toivonen, S., M. Ojala, et al. (2013). "Comparative analysis of targeted differentiation of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) and human embryonic stem cells reveals variability associated with incomplete transgene silencing in retrovirally derived hiPSC lines." Stem Cells Transl Med **2**(2): 83-93.

-
- 400 Tomasetti, C. and D. Levy (2010). "Role of symmetric and asymmetric division of stem cells in developing drug resistance." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(39): 16766-16771.
- 401 Tondeur, S., S. Assou, et al. (2008). "Biology and potential of human embryonic stem cells." Ann Biol Clin (Paris) **66**(3): 241-247.
- 402 Tondreau, T., L. Lagneaux, et al. (2004). "Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential." Cytotherapy **6**(4): 372-379.
- 403 Toyoda, M. and A. Umezawa (2014). "Stem cells bond our organs/tissues and engineering products." Circ J **78**(7): 1582-1583.
- 404 Trabuco, E. C., C. J. Klingele, et al. (2007). "Xenograft use in reconstructive pelvic surgery: a review of the literature." Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct **18**(5): 555-563.
- 405 Tracz, A., J. Madzio, et al. (2014). "Genetic variability of GCKR alters lipid profiles in children with monogenic and autoimmune diabetes." Exp Clin Endocrinol Diabetes **122**(9): 503-509.
- 406 Trevisani, F., F. Garuti, et al. (2015). "De novo hepatocellular carcinoma of liver allograft: A neglected issue." Cancer Lett **357**(1): 47-54.
- 407 Trivanovic, D., J. Kocic, et al. (2013). "Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly." Srp Arh Celok Lek **141**(3-4): 178-186.
- 408 Trounson, A., G. Q. Daley, et al. (2013). "A new route to human embryonic stem cells." Nat Med **19**(7): 820-821.
- 409 Troyer, D. L. and M. L. Weiss (2008). "Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population." Stem Cells **26**(3): 591-599.
- 410 Tsai, P. C., T. W. Fu, et al. (2009). "The therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in the treatment of rat liver fibrosis." Liver Transpl **15**(5): 484-495.
- 411 Tsai, S. M., D. W. Liu, et al. (2013). "Fibroblast growth factor (Fgf) signaling pathway regulates liver homeostasis in zebrafish." Transgenic Res **22**(2): 301-314.
- 412 Tsoulfas, G., P. Agorastou, et al. (2014). "Current and future challenges in the surgical treatment of hepatocellular carcinoma: a review." Int Surg **99**(6): 779-786.
- 413 Tsutsui, H. and S. Nishiguchi (2014). "Importance of Kupffer cells in the development of acute liver injuries in mice." Int J Mol Sci **15**(5): 7711-7730.
- 414 Turnpenny, L., S. Brickwood, et al. (2003). "Derivation of human embryonic germ cells: an alternative source of pluripotent stem cells." Stem Cells **21**(5): 598-609.
- 415 Uygun, B. E., A. Soto-Gutierrez, et al. (2010). "Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix." Nat Med **16**(7): 814-820.
- 416 Vaegler, M., B. Amend, et al. (2013). "Stem cell therapy and tissue engineering in regenerative urology." Urologe A **52**(12): 1671-1678.
- 417 van de Kamp, J., W. Jahnen-Dechent, et al. (2013). "Hepatocyte growth

-
- factor-loaded biomaterials for mesenchymal stem cell recruitment." Stem Cells Int **2013**: 892065.
- 418 Van Gool, S. W., P. Vandenberghe, et al. (1996). "CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model." Immunol Rev **153**: 47-83.
- 419 Varnum-Finney, B., L. Xu, et al. (2000). "Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling." Nat Med **6**(11): 1278-1281.
- 420 Vaz, C. M., S. van Tuijl, et al. (2005). "Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique." Acta Biomater **1**(5): 575-582.
- 421 von Bonin, M., F. Stolzel, et al. (2009). "Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium." Bone Marrow Transplant **43**(3): 245-251.
- 422 Wagner, D. E., N. R. Bonenfant, et al. (2014). "Comparative decellularization and recellularization of normal versus emphysematous human lungs." Biomaterials **35**(10): 3281-3297.
- 423 Wainwright, J. M., C. A. Czajka, et al. (2010). "Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart." Tissue Eng Part C Methods **16**(3): 525-532.
- 424 Wang, D., Y. R. Ji, et al. (2012). "IL-6 production stimulated by CD14(+) monocytes-paracrine IL-1beta does not contribute to the immunosuppressive activity of human umbilical cord mesenchymal stem cells." Cell Physiol Biochem **29**(3-4): 551-560.
- 425 Wang, G., Y. Li, et al. (2014). "Roles of the co-culture of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells with rat pancreatic cells in the treatment of rats with diabetes mellitus." Exp Ther Med **8**(5): 1389-1396.
- 426 Wang, H. S., S. C. Hung, et al. (2004). "Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord." Stem Cells **22**(7): 1330-1337.
- 427 Wang, N., K. Xie, et al. (2007). "Suppressing phosphatidylcholine-specific phospholipase C and elevating ROS level, NADPH oxidase activity and Rb level induced neuronal differentiation in mesenchymal stem cells." J Cell Biochem **100**(6): 1548-1557.
- 428 Wang, W., X. P. Ma, et al. (2015). "Epidermal growth factor receptor pathway polymorphisms and the prognosis of hepatocellular carcinoma." Am J Cancer Res **5**(1): 396-410.
- 429 Wang, Y., J. Bao, et al. (2014). "Method for perfusion decellularization of porcine whole liver and kidney for use as a scaffold for clinical-scale bioengineering engrafts." Xenotransplantation.
- 430 Wang, Y., F. Chen, et al. (2015). "Mesenchymal stromal cells as an adjuvant treatment for severe late-onset hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." Acta Haematol **133**(1): 72-77.
- 431 Wang, Y., X. Chen, et al. (2014). "Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications." Nat Immunol **15**(11): 1009-1016.

-
- 432 Weiss, M. L., C. Anderson, et al. (2008). "Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells." Stem Cells **26**(11): 2865-2874.
- 433 Weiss, M. L., S. Medicetty, et al. (2006). "Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease." Stem Cells **24**(3): 781-792.
- 434 Welf, E. S., U. P. Naik, et al. (2011). "Probabilistic modeling and analysis of the effects of extra-cellular matrix density on the sizes, shapes, and locations of integrin clusters in adherent cells." BMC Biophys **4**: 15.
- 435 Wenfeng, Z., W. Yakun, et al. (2014). "Kupffer cells: increasingly significant role in nonalcoholic fatty liver disease." Ann Hepatol **13**(5): 489-495.
- 436 Wharton, T. (1656). "Adenographia: sive glandularum totius corporis descriptio." london: 243-244.
- 437 Woods, T. and P. F. Gratzner (2005). "Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft." Biomaterials **26**(35): 7339-7349.
- 438 Wu, L. F., N. N. Wang, et al. (2009). "Differentiation of Wharton's jelly primitive stromal cells into insulin-producing cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells." Tissue Eng Part A **15**(10): 2865-2873.
- 439 Wu, X. B. and R. Tao (2012). "Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells." Hepatobiliary Pancreat Dis Int **11**(4): 360-371.
- 440 Wu, Z., L. Fan, et al. (2014). "Use of Decellularized Scaffolds Combined with Hyaluronic Acid and Basic Fibroblast Growth Factor for Skin Tissue Engineering." Tissue Eng Part A.
- 441 Xu, C., P. Yu, et al. (2014). "TGF-beta promotes immune responses in the presence of mesenchymal stem cells." J Immunol **192**(1): 103-109.
- 442 Xu, Y., G. Y. Xu, et al. (2014). "Preparation and characterization of bone marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix scaffolds." J Biomed Mater Res B Appl Biomater.
- 443 Yabut, O. and H. S. Bernstein (2011). "The promise of human embryonic stem cells in aging-associated diseases." Aging (Albany NY) **3**(5): 494-508.
- 444 Yagi, H., K. Fukumitsu, et al. (2013). "Human-scale whole-organ bioengineering for liver transplantation: a regenerative medicine approach." Cell Transplant **22**(2): 231-242.
- 445 Yagi, H., A. Soto-Gutierrez, et al. (2013). "Whole-organ re-engineering: a regenerative medicine approach to digestive organ replacement." Surg Today **43**(6): 587-594.
- 446 Yagi, H., A. Soto-Gutierrez, et al. (2010). "Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing." Cell Transplant **19**(6): 667-679.
- 447 Yamazoe, T., N. Shiraki, et al. (2013). "A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells." J Cell Sci **126**(Pt 23): 5391-5399.
- 448 Yan, M., M. Sun, et al. (2013). "Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopamine neurons mediated by the Lmx1a and neurturin in vitro: potential therapeutic application for

-
- Parkinson's disease in a rhesus monkey model." PLoS One **8**(5): e64000.
- 449 Yan, Q., G. Huang, et al. (2008). "Gene mutation might contribute to carcinogenesis by disrupting the asymmetric division of somatic stem cells." Med Hypotheses **70**(6): 1230-1231.
- 450 Yan, Y., W. Xu, et al. (2009). "Mesenchymal stem cells from human umbilical cords ameliorate mouse hepatic injury in vivo." Liver Int **29**(3): 356-365.
- 451 Yang, C. C., Y. H. Shih, et al. (2008). "Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord." PLoS One **3**(10): e3336.
- 452 Yang, J. D. and L. R. Roberts (2010). "Hepatocellular carcinoma: A global view." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **7**(8): 448-458.
- 453 Ye, J. S., J. F. Stoltz, et al. (2015). "An approach to preparing decellularized whole liver organ scaffold in rat." Biomed Mater Eng **25**(0): 159-166.
- 454 Ye, J. S., X. S. Su, et al. (2015). "Signalling pathways involved in the process of mesenchymal stem cells differentiating into hepatocytes." Cell Prolif **48**(2): 157-165.
- 455 Yi, S. Y., Y. B. Hao, et al. (2013). "Cancer stem cells niche: a target for novel cancer therapeutics." Cancer Treat Rev **39**(3): 290-296.
- 456 Yi, Y., Y. Zhang, et al. (2014). "Radiofrequency ablation or microwave ablation combined with transcatheter arterial chemoembolization in treatment of hepatocellular carcinoma by comparing with radiofrequency ablation alone." Chin J Cancer Res **26**(1): 112-118.
- 457 Yoon, H. I. and J. Seong (2014). "Multimodality treatment involving radiotherapy for advanced liver-confined hepatocellular carcinoma." Oncology **87** **Suppl 1**: 90-98.
- 458 Zakhem, E., S. Raghavan, et al. (2012). "Chitosan-based scaffolds for the support of smooth muscle constructs in intestinal tissue engineering." Biomaterials **33**(19): 4810-4817.
- 459 Zaky, A. and K. Bendjelid (2014). "Appraising cardiac dysfunction in liver transplantation: an ongoing challenge." Liver Int.
- 460 Zarkhin, V., A. Talisetti, et al. (2010). "Expression of soluble HLA-G identifies favorable outcomes in liver transplant recipients." Transplantation **90**(9): 1000-1005.
- 461 Zarski, J. P. (2006). "[Epidemiology of chronic hepatitis B]." Presse Med **35**(2 Pt 2): 304-307.
- 462 Zhang, E. and Z. Huang (2014). "Liver cirrhosis and choice of surgical modalities in patients with hepatocellular carcinoma." Zhonghua Wai Ke Za Zhi **52**(5): 325-328.
- 463 Zhang, F., D. Zhao, et al. (2007). "Asymmetric somatic stem cells division plays a critical role in cell senescence." Med Hypotheses **68**(2): 453-454.
- 464 Zhang, L., Y. H. Zhao, et al. (2015). "Application potential of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly in liver tissue engineering." Biomed Mater Eng **25**(0): 137-143.
- 465 Zhang, Q., X. Chen, et al. (2012). "The survival benefit of liver transplantation for

-
- hepatocellular carcinoma patients with hepatitis B virus infection and cirrhosis." PLoS One **7**(12): e50919.
- 466 Zhang, Q., M. Raoof, et al. (2010). "Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury." Nature **464**(7285): 104-107.
- 467 Zhang, S., L. Chen, et al. (2012). "Human umbilical cord matrix stem cells efficiently rescue acute liver failure through paracrine effects rather than hepatic differentiation." Tissue Eng Part A **18**(13-14): 1352-1364.
- 468 Zhang, Y. N., P. C. Lie, et al. (2009). "Differentiation of mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord Wharton's jelly into hepatocyte-like cells." Cytotherapy **11**(5): 548-558.
- 469 Zhao, Q., H. Ren, et al. (2009). "Stem/progenitor cells in liver injury repair and regeneration." Biol Cell **101**(10): 557-571.
- 470 Zhao, X., L. Liu, et al. (2012). "Progesterone enhances immunoregulatory activity of human mesenchymal stem cells via PGE2 and IL-6." Am J Reprod Immunol **68**(4): 290-300.
- 471 Zheng, J., G. Shao, et al. (2014). "Analysis of survival factors in patients with intermediate-advanced hepatocellular carcinoma treated with transcatheter arterial chemoembolization combined with sorafenib." Clin Transl Oncol **16**(11): 1012-1017.
- 472 Zheng MH, C. J., Kirilak Y, Willers C, Xu J, Wood D. (2005). "Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: possible implications in human implantation." Biomed Mater Res B Appl Biomater **73**((1)): 61e67.
- 473 Zheng, S. G., H. X. Xu, et al. (2014). "Management of hepatocellular carcinoma: The role of contrast-enhanced ultrasound." World J Radiol **6**(1): 7-14.
- 474 Zhijun, Z., G. Wei, et al. (2014). "Middle hepatic vein allocation in adult right lobe living donor liver transplantation." Clin Transplant **28**(10): 1194-1201.
- 475 Zhong, J. H., Y. Ke, et al. (2014). "Hepatic resection associated with good survival for selected patients with intermediate and advanced-stage hepatocellular carcinoma." Ann Surg **260**(2): 329-340.
- 476 Zhong, J. H., H. Li, et al. (2014). "Hepatic resection is safe and effective for patients with hepatocellular carcinoma and portal hypertension." PLoS One **9**(9): e108755.
- 477 Zhong, J. H., L. Ma, et al. (2014). "Postoperative therapy options for hepatocellular carcinoma." Scand J Gastroenterol **49**(6): 649-661.
- 478 Zhong, J. H., F. X. Wu, et al. (2014). "Hepatic resection associated with good survival for selected patients with multinodular hepatocellular carcinoma." Tumour Biol **35**(9): 8355-8358.
- 479 Zhou, C., B. Yang, et al. (2011). "Immunomodulatory effect of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on lymphocytes." Cell Immunol **272**(1): 33-38.
- 480 Zhou, Y., X. Lei, et al. (2014). "Outcomes of hepatectomy for noncirrhotic hepatocellular carcinoma: A systematic review." Surg Oncol **23**(4): 236-242.
- 481 Zhou, Y., A. K. Singh, et al. (2014). "Regulatory T cells enhance mesenchymal

-
- stem cell survival and proliferation following autologous cotransplantation in ischemic myocardium." J Thorac Cardiovasc Surg **148**(3): 1131-1137; discussion 1117.
- 482 Zhuang, Y., X. Chen, et al. (2009). "Chemokine stromal cell-derived factor 1/CXCL12 increases homing of mesenchymal stem cells to injured myocardium and neovascularization following myocardial infarction." Chin Med J (Engl) **122**(2): 183-187.
- 483 Zimdahl, B., T. Ito, et al. (2014). "Lis1 regulates asymmetric division in hematopoietic stem cells and in leukemia." Nat Genet **46**(3): 245-252.