



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'UNIVERSITÉ LORRAINE

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

par Yueying LI

Vieillesse des cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse :
implications en médecine régénérative

Date de soutenance : 26 Juin 2015

Membres du jury :

Rapporteurs :

Mme Magali CUCCHIARINI

Professeur, Saarland University, Allemagne

M. Bernard PIGNON

PH, Hôpital Maison Blanche, Reims

Examineurs :

Mme Yinping LI

Professeur, Université de Wuhan, Chine

M. Jacques MAGDALOU

DRE, UMR 7365 CNRS-UL, Nancy

M. Jean-François STOLTZ

PU-PHE, UMR 7365 CNRS-UL, directeur de thèse

Mme Natalia De ISLA

MCF, HDR, UMR 7365 CNRS-UL, co-directeur de thèse

Membres invités:

Mme Xiaohua HE

Professeur, Université de Wuhan, Chine

M. Yun CHEN

Professeur, Université de Wuhan, Chine

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 et le laboratoire de Physiopathologie de la Faculté de Médecine de Wuhan, Chine.

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur Jean Yves JOUZEAU, directeur de l'UMR CNRS 7365, pour m'avoir acceptée dans l'unité de recherche et pour sa gentillesse.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Patrick MENU, directeur de l'équipe 5 de l'UMR, qui m'a permis de réaliser ce travail dans son équipe.

Je souhaiterais aussi exprimer ma reconnaissance à mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Jean-François STOLTZ, qui m'a permis de réaliser ce travail. Je lui suis très reconnaissante pour la confiance qu'il m'a témoignée.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à ma co-directrice de thèse, Madame Natalia de ISLA, Maître de conférences des Universités, qui a su guider ce travail avec une profonde connaissance dans le domaine du vieillissement des cellules souches. Je vous remercie pour votre pédagogie, la confiance que vous avez eu dans mon travail et vos encouragements permanents.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Madame Magali CUCCHIARINI et Monsieur Bernard PIGNON pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je les remercie pour le temps qu'ils m'ont consacré et les remarques qui ont amélioré la présentation de mon manuscrit.

J'exprime ma gratitude à Madame le Professeur Jinping LI et Monsieur le Professeur Jacques MAGDALOU pour avoir accepté de juger cette thèse. Je vous exprime ici ma sincère reconnaissance ainsi que mon profond respect.

Je remercie très sincèrement Madame le Professeur Xiaohua HE et Monsieur le Professeur Yun CHEN pour avoir accepté d'être membres invités du jury. Je vous exprime ma profonde gratitude.

Je tiens également à remercier Madame le Professeur Danièle BENSOUSSAN, directrice de l'UTCT, et Monsieur le Professeur Didier MAINARD, directeur du COT, qui ont joué un rôle

particulièrement important au cours de ces trois années, en particulier au niveau des prélèvements de moelle osseuse.

J'exprime également ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Xiong WANG, pour sa disponibilité et ses encouragements au cours de ma thèse.

Je tiens également à remercier Madame Astrid PINZANO, chargé de recherche CNRS, qui m'a appris toutes les techniques histologiques nécessaires à la réalisation de mon travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Madame le Docteur Huguette LOUIS pour ses conseils et son aide concernant la cytométrie en flux.

Je tiens également à remercier Monsieur Naceur CHARIF, assistant ingénieur au laboratoire, et Madame Ghislaine CAUCHOIS, technicienne, de m'avoir aidée au cours de ces années. Je les remercie pour leur aide précieuse concernant les manipulations.

Je remercie également Madame Monique GENTILLS et Madame Brigitte GUERBER pour leur gentillesse à mon égard et leur soutien constant. Je leur exprime ma profonde reconnaissance.

Un grand merci à mes collègues et amis du laboratoire : Laïla, Laurie, Lina, Melissa, Léonore, Mathilde, Jullie, Junsong, Victor, Olivier, Hao, Loïc, Jacqueline, Anne-Sophie, Pan, Gautier, Gabriel, Xiaomeng, Xavier, Xu, Fatima, Talar, Reine, Chaza, Hassan, Mathew, Irfan.

Enfin, je remercie mes amis d'ici, de là-bas et de toujours.

Je remercie toute ma famille, et plus particulièrement ma mère et mon père.

À mon mari, toujours merci !

Table de Matières

Table de Matières	1
Liste des publications et communications	5
Liste d'illustrations.....	6
Liste des tableaux	9
Introduction générale.....	10
Etat de l'art	13
1. Les cellules souches	13
1.1 Définition des cellules souches	13
1.2 Caractéristiques des cellules souches	13
1.3 Les différentes sources et catégories de cellules souches	14
1.3.1 Les cellules souches pluripotentes	15
1.3.2 Les cellules souches fœtales	16
1.3.3 Les cellules souches du sang de cordon ombilical et de la gelée de Wharton.....	17
1.3.4 Les cellules souches adultes	17
1.3.4.1 Flexibilité–plasticité des cellules souches adultes	18
2. Les cellules stromales mésenchymateuses(CSM).....	18
2.1 La découverte des CSM	18
2.2 Identification des CSM.....	19
2.3 L'isolement et la culture initiale de CSM.....	20
2.4 Les marqueurs de surface	21
2.4.1 Les marqueurs généraux.....	21
2.4.2 Sélection de CSM via des marqueurs de surface	21
2.5 Morphologie cellulaire et capacité de prolifération des CSM.....	23
2.6 La capacité de multipotence	23
2.6.1 Lignées mésodermiques	24
2.6.2 Lignées ectodermiques.....	25
2.6.3 Lignées endodermiques.....	25
2.7 Une capacité de trans-différenciation in vitro	26
2.8 Immunomodulation	26
2.9 Les CSM et leurs applications cliniques.....	27
3. Le vieillissement des CSM	29

3.1 Les CSM et le vieillissement <i>in vivo</i>	29
3.2 Le vieillissement de cellules souches	29
3.2.1 Les propriétés de CSM-MO en fonction de l'âge du donneur	30
3.2.2 Les propriétés de CSM-MO selon l'expansion <i>in vitro</i>	32
3.2.3 L'effet du vieillissement sur de CSM d'autres sources	33
4. La sénescence	34
4.1 Le vieillissement	34
4.2 La sénescence	34
4.2.1 Définition de la sénescence	34
4.2.2 Découverte de la senescence	35
4.3.3 Types de sénescence	35
4.3.3.1 Sénescence répllicative	36
4.3.3.1.1 Télomères	36
4.3.3.1.1.1 Les télomères : structure et fonction	36
4.3.3.1.1.2 Le raccourcissement des télomères et l'âge	37
4.3.3.1.1.3 Réplication des télomères	39
4.3.3.1.2 Le raccourcissement des télomères induit la sénescence	40
4.3.3.2 Sénescence prématurée	40
4.3.3.3 Régulation transcriptionnelle dans la sénescence	42
4.3.3.3.1 Le voie p53	42
4.3.3.3.2 Le voie p16-pRB	43
4.3.3.3.3 Sénescence contrôlée par les voies p53 et p16-pRB	43
4.3.3.4 Les marqueurs de sénescence cellulaire	44
4.3.3.4.1 L'arrêt du cycle cellulaire	44
4.3.3.4.2 Transformation morphologique	45
4.3.3.4.3 L'activité beta-galactosidase associée à la senescence (SA-β-gal)	45
4.3.3.4.4 Activation des réseaux suppresseurs de tumeurs	45
4.3.3.4.5 Les foyers d'hétérochromatine associées à la senescence (SAHF)	46
4.3.3.4.6 La résistance à l'apoptose	46
Objectifs	47
Résultats	48
1. Effet de l'âge du donneur et le temps d'expansion <i>in vitro</i> sur le potentiel de prolifération et de différenciation des CSM de moelle osseuse	48
Culture des CSM issues de la moelle osseuse	48

Isolement des CSM-MO	48
Expansion	49
Dénombrement.....	49
Congélation	49
Décongélation	49
Clonogénicité.....	50
Calcul de la prolifération	50
Le « Population Doubling » (PD)	50
Le « doubling time » (DT).....	50
Phénotypage par cytométrie en flux.....	50
Différenciation des CSM de MO	51
Culture	51
Coloration	51
Coloration rouge alizarine	51
Coloration oil red	52
Coloration Bleu alcian/Kernechtrot.....	52
ARTICLE 1:.....	54
Donor's age dependent proliferation decrease of human mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity	54
METHODOLOGIE :	54
RESULTATS ET CONCLUSIONS :	54
ARTICLE 2:.....	55
Human Bone marrow Mesenchymal stromal cells from aged donors show heterogeneity in proliferation capacity but homogenous diminished osteogenic and chondrogenic differentiation.....	55
METHODOLOGIE :	55
RESULTATS ET CONCLUSIONS :	56
Prolifération des CSM-MO en fonction de l'âge des donneurs	56
Contrôle qualité des CSM-MO.....	57
Clonogénicité en fonction de l'expansion et de l'âge des donneurs	57
Phénotypage des CSM-MO provenant de donneurs d'âges différents	58
Multipotence des CSM-MO provenant de donneurs d'âges différents.....	59
EXPRESSION GENIQUE DE FOXO1, FOXO3, P21 ET SOD2 SELON L'AGE DES DONNEURS ..	61
2. Effet de l'âge du donneur et le temps d'expansion <i>in vitro</i> sur les sous-populations des CSM.	63

METHODOLOGIE :.....	63
RESULTATS ET CONCLUSIONS :	63
3. Effet de l'âge des donneurs et le temps d'expansion <i>in vitro</i> sur la senescence des CSM.	71
METODOLOGIE	71
RESULTATS ET CONCLUSION	72
Discussion générale	75
Conclusions et perspectives	79
Références bibliographique.....	82
Annexes	110
I. Annexe 1 : Liste des prélèvements utilisés dans l'étude.....	110
II. Annexe 2 : Composition des milieux de culture utilisés pour la différenciation adipocytaire, ostéocytaire et chondrocytaire.....	111
Fiche technique des milieux de différenciation de la société Lonza	111
Milieux utilisés pour la différenciation adipocytaire	111
Milieux utilisés pour la différenciation ostéocytaire	111
Milieux utilisés pour la différenciation chondrocytaire.....	111
III. Annexe 3 : Liste d'anticorps	112

Liste des publications et communications

Publications :

- Jean-François Stoltz, Céline Huselstein, Jessica Schiavi, **Yueying Li**, Danièle Bensoussan, Véronique Decot, Natalia de Isla. Human stem cells and articular cartilage tissue engineering. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012 Dec;13(15):2682-91.
- **Yueying Li**, Naceur Charif, Didier Mainard, Danièle Bensoussan, Jean-François Stoltz, Natalia de Isla. Donor's age dependant proliferation decrease of human mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity, *Bio-Medical Materials and Engineering* 2014;24(1 Suppl):47-52.
- Laila Benameur, Naceur Charif, **Yueying Li**, Jean-François Stoltz and Natalia de Isla. Toward an understanding of mechanism of aging-induced oxidative stress in human mesenchymal stem cells, *Bio-Medical Materials and Engineering* 2015;(1 Suppl):41-46.
- Jean-François Stoltz, Danièle Bensoussan, Lei Zhang, Véronique Decot, Natalia de Isla, Ying-Ping Li, Céline Huselstein, Nadia Benkirane-Jessel, Na Li, Loïc Reppel, Y He, **Yueying Li**. Stem cells and applications: a survey. *Bio-Medical Materials and Engineering* 2015;25(1 Suppl):3-26.
- **Yueying Li**, Naceur Charif, Laila Benameur, Didier Mainard, Ying-Ping Li, Ghislaine Cauchois, Danièle Bensoussan, Jean-François Stoltz, Natalia de Isla. Human Bone marrow Mesenchymal stromal cells from aged donors show heterogeneity in proliferation capacity but homogenous diminished osteogenic and chondrogenic differentiation. *Stem Cell and Development* (Soumis).

Communications dans des congrès :

- **Li YY**, Charif N, Stoltz JF, de Isla N. The effect of donor aging on bone marrow mesenchymal stem cells properties. 4th Meeting FIRST, Pavie, Italie, 14 mai 2012.
- **Li YY**, Charif N, Mainard D, de Isla N, Stoltz JF. Changes in chondrogenesis differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells according to donor age. World Congress of the Osteoarthritis-Research-Society-International (OARSI), 18-21 Avril 2013, Philadelphie, USA-. Osteoarthritis and Cartilage, 2013, 21, Suppl. S283.
- **Li YY**, de Isla N. Mesenchymal stem cells aging and regenerative medicine. Meeting of Nancy-Wuhan Research Lab without Wall on Regenerative Medicine, Wuhan, Chine, juin 2013 (com. orale).
- **LI YY**, Charif N, Mainard D, Stoltz JF, de Isla N. Bone marrow MSC aging: implication in regenerative medicine. Satellite meeting of the 8th Scientific Meeting of the Lorraine Pole for Cartilage Engineering. Nancy, 24-25 Septembre 2013 (com. orale).
- **Li YY**, Charif N, Mainard D, Stoltz JF, de Isla N. The importance of mesenchymal stem cell donor's age for cartilage engineering. World Congress of the Osteoarthritis-Research-Society-International (OARSI), Paris, France, Apr 24-27, 2014. Osteoarthritis and Cartilage, 2014, 22: S61.

Liste d'illustrations

Figure 1 : Différents potentiels de différenciation des cellules souches au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte.	14
Figure : 2 Les cellules souches embryonnaires. Les cellules souches embryonnaires peuvent provenir de tissus issus des trois couches germinales (d'après(Nelson et al., 2009)).	16
Figure 3 : Plasticité des cellules souches adultes (après(Fernandes et al., 2004)).	18
Figure 4 : La capacité de différenciation des cellules souches (http://www.ncmr.co.jp/en/technology/#tch01).....	26
Figure 5 : Immunomodulation induite par les CSM. (d'après J.Larghero et al. 2009).....	28
Figure 6 : Les télomères (en jaune) sont formés de complexes nucléoprotéiques qui coiffent l'extrémité des chromosomes (bleu). (d'après http://medicalschooll.tumblr.com).....	36
Figure 7 : Structure de l'extrémité des télomères (de Lange, 2009).....	37
Figure 8 : Relation entre l'âge et la longueur des télomères dans le plasma humain mesurée par ELISA (d'après (Jiang et al., 2010)).	38
Figure 9 : Réplication semi-conservative de l'ADN.....	39
Figure 10 : Voies impliquées dans la sénescence (d'après (Campisi and d' Adda di Fagagna, 2007)).	44
Figure 11 : Les différents objectifs de la thèse.....	47
Figure 12 : Représentation schématique de la stratégie expérimentale.	55
Figure 13 : Prolifération – Représentation graphique du nombre de « population doubling » (PD) cumulés en fonction du temps de culture en passage pour les 4 tranches d'âges. <i>Un passage a une durée de 14 jours. Pour chaque groupe, les résultats sont exprimés en moyenne $\pm SD$, $p < 0,05$.</i>	56
Figure 14 : Prolifération – Représentation graphique du nombre de « population doubling » (PD) cumulés en fonction du temps de culture en passage pour 2 tranches d'âges. <i>Un passage a une durée de 14 jours. Pour chaque groupe, les résultats sont exprimés en moyenne $\pm SD$, $p < 0,05$.</i>	57
Figure 15 : Clonogénicité des CSM-MO de donneurs âgés de +/- 40 ans à du passage 1 à 5..	58
Figure 16 : Coloration oil red de CSM-MO de donneurs âgés de +/- 40 ans à passage précoce et tardif.	59

Figure 17 : Coloration rouge alizarine de CSM-MO de donneurs âgés de +/- 40 ans à passage précoce et tardif.	60
Figure 18 : Coloration bleu alcian de coupes histologiques de pellets de CSM-MO de donneurs âgés de +/- 40 ans à passage précoce et tardif.	60
Figure 19 : Expression des gènes de longévité (FOXO1 et FOXO3A), inhibiteur du cycle cellulaire (P21) et de protection contre le stress oxydant (SOD2) dans les CSM-MO à passage 1 en fonction de l'âge des donneurs.	61
Figure 20 : Corrélation de l'expression des gènes de longévité (FOXO1 et FOXO3A), inhibiteur du cycle cellulaire (P21) et de protection contre le stress oxydant dans les CSM-MO à passage précoce en fonction de la prolifération, population doubling (PD).	62
Figure 21 : Expression des marqueurs CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD44, CD166 et HLA-DR à la surface de CSM humaines.	64
Figure 22 : Expression du marqueur CD71 à la surface de CSM humaines.	65
Figure 23 : Corrélation entre l'âge des donneurs et le pourcentage d'expression du marqueur CD71. *p <0,05	65
Figure 24 : Corrélation entre l'âge des donneurs et l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) du marqueur CD71. *p <0,05	66
Figure 25 : Expression du marqueur CD106 à la surface de CSM humaines.	66
Figure 26 : Corrélation entre l'âge des donneurs et le pourcentage d'expression du marqueur CD106. *p >0,05	67
Figure 27 : Corrélation entre l'âge des donneurs et l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) du marqueur CD106. *p >0,05	67
Figure 28 : Expression du marqueur CD146 à la surface de CSM humaines.	68
Figure 29 : Corrélation entre l'âge des donneurs et le pourcentage d'expression du marqueur CD146. *p <0,05	68
Figure 30 : Corrélation entre l'âge des donneurs et l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) du marqueur CD146. *p <0,05	68
Figure 31 : Expression du marqueur CD200 à la surface de CSM humaines.	69
Figure 32 : Corrélation entre l'âge des donneurs et le pourcentage d'expression du marqueur CD200. *p >0,05	69
Figure 33 : Corrélation entre l'âge des donneurs et l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) du marqueur CD200. *p >0,05	70

Figure 34 : Photographie des CSM-GW et CSM-MO de donneurs âgés de +/- 40 ans à passage précoce (P3) et tardif (P7) après le test de sénescence. 73

Figure 35 : Pourcentage de sénescence dans les CSM-GW et CSM-MO de donneurs âgés de +/- 40 ans à passage précoce (P3) et tardif (P7). 74

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classifications et caractéristiques des cellules souches.	15
Tableau 2 : Les marqueurs des cellules stromales mésenchymateuses les plus fréquents	23
Tableau 3 : études sur l'effet de l'âge du donneur sur le potentiel des CSM-MO d'origine humain (liste non exhaustive).	31
Tableau 4 : études sur l'effet de l'expansion <i>in vitro</i> sur le potentiel des CSM-MO d'origine humain (liste non exhaustive).	33
Tableau 5 : Protocole de coloration Bleu Alcian.....	53

Introduction générale

Le vieillissement de la population mondiale est un fait avéré. D'après l'institut national d'études démographiques (INED), l'espérance de vie a atteint les 82 ans en France (78,7 ans pour les hommes et 85,4 ans pour les femmes) en 2012. D'après l'organisation mondiale de la santé (OMS), le nombre de personnes de plus de 60 ans serait de 600 millions aujourd'hui et devrait doubler d'ici 2025 pour atteindre les 2 milliards d'ici 2050 avec une majorité de personnes âgées dans les pays industrialisés. Puisque le développement de nombreuses pathologies est favorisé par la sénescence de l'organisme, le vieillissement de la population s'accompagne inévitablement d'une augmentation de l'incidence des affections liées à l'âge. On y trouve ainsi des affections dites dégénératives touchant le système nerveux central (maladie d'Alzheimer), le système circulatoire (maladies cardiovasculaires) ou l'appareil locomoteur (dégénérescence du cartilage, arthrose,...). Depuis quelques années le développement de travaux en médecine régénérative constitue une ouverture prometteuse pour le traitement de ce type de pathologies.

La médecine régénérative *via* la thérapie cellulaire ou l'ingénierie tissulaire, a pour objectif de remplacer ou de réparer des cellules ou d'organes endommagés par un accident, une maladie ou le vieillissement par des cellules saines et pleinement fonctionnelles. Il s'agit de régénérer à partir de l'activation de cellules endogènes ou l'injection de cellules exogènes, ou de remplacer *via* la fabrication de biotissus *in vitro*, des tissus lésés. Cette approche thérapeutique est considérée comme une voie innovante, en complément des deux principales thérapies reconstructrices que sont la transplantation d'organes et la chirurgie prothétique. Elle devrait constituer une alternative permettant à terme de s'affranchir de certains problèmes tels que le manque de donneurs, le risque de transmission virale, ou la nécessité de remplacer les prothèses après un certain temps. La médecine régénérative présente donc un réel intérêt dans le domaine de la réparation osseuse, cartilagineuse ou ligamenteuse.

Les cellules utilisées en thérapie peuvent être des cellules natives du tissu telles que les chondrocytes pour le tissu cartilagineux, mais celles-ci présentent l'inconvénient de se dédifférencier lors de l'expansion *in vitro*. D'où l'intérêt d'utiliser les cellules souches (CS) provenant du patient lui-même ou d'un donneur en tant que cellules thérapeutiques, faisant des CS un élément majeur de cette discipline. En effet les deux propriétés essentielles des CS font d'elles un outil très intéressant pour la médecine régénérative : (i) l'auto-renouvellement ou capacité à se diviser à l'identique *in vitro* sans perdre leur caractère indifférencié, et (ii) la différenciation en cellules spécialisées dans un environnement donné.

Parmi les CS, les cellules stromales/souches mésenchymateuses (CSM) sont inévitablement associées à la médecine régénérative étant donné leurs capacités d'auto-renouvellement et de différenciation en cellules spécifiques de certains organes d'origine mésodermique telles que les chondrocytes qui constituent le seul type cellulaire du cartilage articulaire, les ostéocytes ou les adipocytes, mais également en cellules endothéliales, musculaires ou fibroblastes ligamentaires. D'autres propriétés telles que la sécrétion de nombreuses molécules ou leurs propriétés immunomodulatrices les rendent aussi très intéressantes. Les CSM peuvent être d'origine fœtale telle que la gelée de Wharton (GW) du cordon ombilical ou d'origine adulte telle que la moelle osseuse (MO). La majeure partie des essais cliniques ayant recours à des CSM concerne les CSM de MO (CSM-MO) obtenue par aspiration au niveau de la crête iliaque mais aussi du tibia et du fémur, les CSM du cordon ombilical ou le CSM du tissu adipeux.

Étant donné que les CSM représentent une faible fraction des cellules du tissu où elles se trouvent, l'isolement et l'expansion cellulaire *in vitro* sont des étapes nécessaires pour obtenir une quantité suffisante. Cependant, il a été montré dans la littérature et confirmé par des résultats au sein du laboratoire, qu'il existe une diminution de la capacité de prolifération et de différenciation des CSM-MO après un certain nombre de passages (vieillessement répliatif). De plus, des paramètres liés aux donneurs de CSM-MO et en particulier leur âge (vieillessement chronologique), seraient également impliqués dans les capacités de prolifération et de différenciation des CSM-MO. En effet différentes études montrent que les capacités d'expansion et de différenciation sont dépendantes de l'âge des donneurs, tandis que d'autres montrent que les capacités de différenciation sont indépendantes de l'âge des donneurs. Ce sujet reste à ce jour controversé.

La réussite thérapeutique basée sur l'utilisation des CSM-MO dépend énormément de la qualité de ces cellules d'une part, mais aussi de la connaissance des mécanismes impliqués dans le maintien de ces qualités d'autre part. C'est pourquoi une meilleure compréhension des mécanismes du vieillissement des CSM-MO (répliatif et lié à l'âge des donneurs) est nécessaire pour le développement de protocoles en médecine régénérative.

Dans ce travail nous nous sommes donc intéressés à l'étude du vieillissement des CSM-MO pour des développements en ingénierie tissulaire. L'objectif principal de ce travail étant de comprendre l'effet du vieillissement sur les CSM-MO afin de déterminer des paramètres de contrôle qualité à mettre en place pour l'utilisation des CSM-MO en médecine régénérative.

Ainsi, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'étude de l'effet de l'âge des donneurs et de l'expansion *in vitro* sur les propriétés des CSM-MO : prolifération,

clonogénicité, phénotype, multipotence et l'expression génique. Nous avons étudié des échantillons de moelle osseuse provenant de donneurs d'âges différents, séparés dans un premier temps en 4 groupes en fonction de leur âge (<20 ans ; 20-40 ans ; 40-60 ans ; >60 ans), puis en deux groupes (<40 ans ; >40 ans). Chaque échantillon a été amplifié pendant 5 passages. Les résultats obtenus à partir des échantillons de moelle osseuse montrent que les propriétés de CSM sont influencées par l'âge du donneur mais également par le temps d'expansion *in vitro*.

Nous nous sommes intéressés dans un deuxième temps aux marqueurs du vieillissement de CSM-MO. Nous avons soulevé l'hypothèse que les modifications des propriétés de CSM en lien avec l'âge des donneurs est le résultat d'un changement de sous-populations des CSM et de l'apparition de cellules sénescents. Nous avons ainsi, élargi notre étude sur les sous-populations des CSM en réalisant la comparaison de l'expression des certains marqueurs comme CD71, CD106, CD146 et CD200 selon l'âge de donneurs. En parallèle nous avons étudié la senescence cellulaire en lien avec l'âge des donneurs.

Une discussion suivra la présentation des résultats. Enfin en conclusion, nous décrirons les principaux paramètres de contrôle qualité à mettre en place pour l'utilisation des CSM-MO en médecine régénérative avant de finir par les perspectives qui permettront de compléter ce travail.

Etat de l'art

1. Les cellules souches

1.1 Définition des cellules souches

Les cellules souches sont définies de plusieurs façons différentes. Cependant, les grands principes comprennent (i) la capacité d'auto-renouvellement sur une très longue durée, ou la capacité à générer au moins une cellule fille présentant des caractéristiques similaires à la cellule initial; (ii) la différenciation en des cellules spécialisées (Pittenger et al., 1999); et (iii) la reconstitution fonctionnelle *in vivo* d'un tissu donné. Les deux premières propriétés, l'auto-renouvellement et la capacité de différenciation sont absolument nécessaires pour affirmer le caractère «souche » d'une cellule; celle-ci doit en effet pouvoir être cultivée à long terme, et donc être capable de subir un grand nombre de divisions cellulaires mais aussi de se différencier (Weissman et al., 2001)(Coulombel, 2007)(Coulombel, 2005)(Coulombel, 2004).

1.2 Caractéristiques des cellules souches

Les cellules souches sont des cellules capables de :

- se renouveler, ce qui assure une réserve de cellules souches pour réapprovisionner constamment l'organe adulte. Ce mécanisme physiologique est nécessaire pour le maintien de la composition cellulaire des tissus et des organes du corps. En effet, un faible pourcentage de cellules d'un organe particulier a la capacité de se multiplier et ceci suivant un modèle d'expansion clonale (Gardner, 2002).

- se différencier en de nombreuses lignées. Cette dernière capacité est utilisée pour classer les cellules souches en 4 catégories : totipotente, pluripotente, multipotente et unipotente. La totipotence est un terme que certains utilisent pour identifier une cellule souche qui peut se différencier, permettant le développement complet d'un individu (**Figure 1**). A l'origine de la vie d'un organisme, il existe une cellule souche, il s'agit d'une cellule unique totipotente. Ensuite, à travers une série de divisions et de différenciations, les cellules souches embryonnaires perdent leur totipotence et acquièrent les fonctions des cellules plus différenciées. Ces cellules sont pluripotentes. Parmi les cellules pluripotentes il existe quatre catégories de cellules souches : les cellules souches embryonnaires, les cellules germinales embryonnaires, les cellules de carcinome embryonnaire et les cellules progénitrices multipotentes adultes de la moelle osseuse(Smith, 2001). Une étude a démontré l'existence de cellules souches pluripotentes adultes isolées de la moelle osseuse de souris, appelées MAPC (Multipotent Adult Progenitor Cells)(Jiang et al., 2002). Ces cellules ont l'aptitude de donner plusieurs types de cellules des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme), mais pas l'organisme tout entier(Sohni and Verfaillie, 2011).

Au cours du renouvellement de tissu dans les organes adultes, les cellules souches tissulaires donnent lieu à une descendance qui se différencie en cellules fonctionnelles matures (cellules progénitrices). Les cellules multipotentes donnent naissance à plusieurs types cellulaires. Des rapports récents suggèrent que les cellules souches adultes, comme les cellules souches hématopoïétiques, les cellules souches neuronales et les cellules souches mésenchymateuses, pourraient se différencier en cellules de différents tissus (Bjornson et al., 1999) (Clarke et al., 2000) (Jackson et al., 1999) (Krause et al., 2001). Il existe également des exemples de populations de cellules souches qui sont tripotentes, bipotentes ou bien unipotentes, comme les cellules souches épidermiques (Stojković and Daher, 2009). Ce phénomène de plasticité des cellules souches adultes a été appelé «transdifférenciation» et semble défier les règles canoniques de l'engagement strict de la lignée embryonnaire au cours du développement embryonnaire.

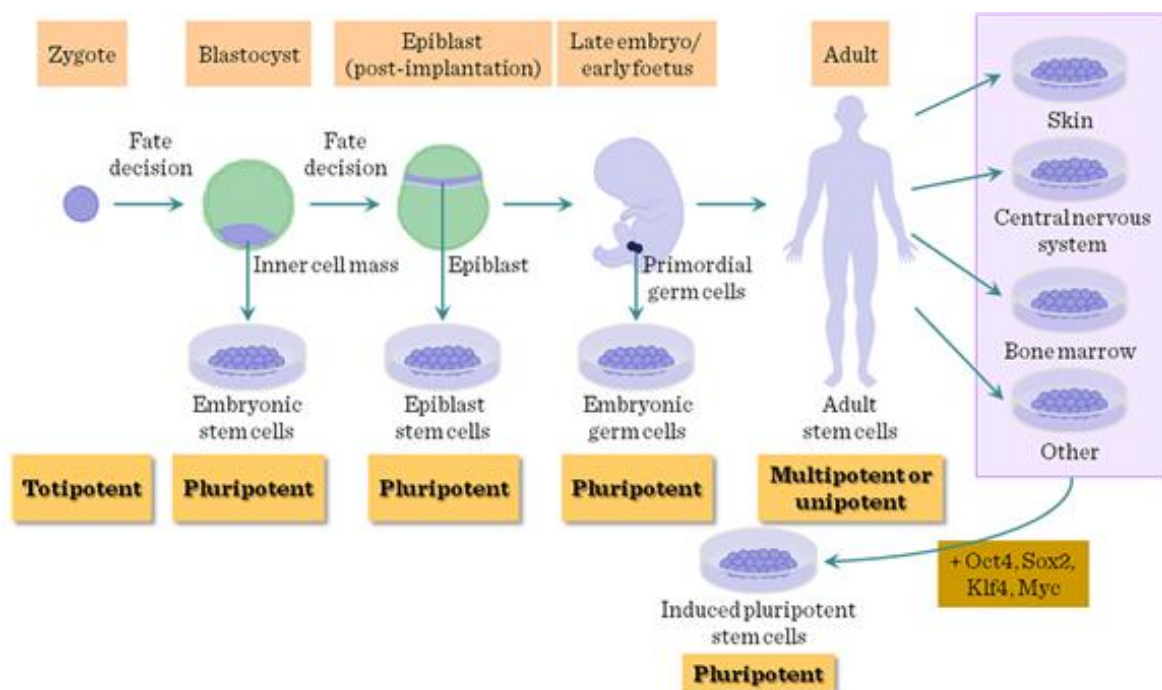


Figure 1 : Différents potentiels de différenciation des cellules souches au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte.

1.3 Les différentes sources et catégories de cellules souches

Le terme de cellule souche regroupe plusieurs sous-types cellulaires présentant d'importantes différences biologiques et fonctionnelles. La classification des cellules souches est basée sur leur potentiel de différenciation ou sur leur origine. Selon leur capacité de différenciation, les cellules souches sont classées comme étant totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou unipotentes. Selon leur origine, on distingue les cellules souches embryonnaires, fœtales, ombilicales, et adultes (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Classifications et caractéristiques des cellules souches.

Types de cellules souches	Caractéristiques	Exemples
Totipotentes	Le génome de ces cellules est organisé de telle manière qu'il peut coder l'information nécessaire à la fabrication d'un organisme entier	Zygote et cellules filles immédiates
Pluripotentes	Peuvent se différencier en n'importe quelle cellule originaire des 3 feuillets embryonnaires. Leur capacité, plus restrictive que les cellules totipotentes, ne leur permet pas d'aboutir à la création d'un individu complet	Cellules souches embryonnaires de la masse interne du blastocyste Cellules souches Pluripotentes Induites
Multipotentes	Sont déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique (d'origine ectodermique, endodermique ou mésodermique)	Cellules souches hématopoïétiques Cellules souches mésenchymateuses
Unipotentes	Possèdent une capacité de différenciation vers un seul type de cellule spécialisée	Cellules souches épithéliales

1.3.1 Les cellules souches pluripotentes

L'embryogenèse est par définition le processus qui forme un individu entier à partir d'une seule cellule, le zygote (Rossant and Tam, 2009). Ce zygote et les cellules issues de ses premières divisions – les blastomères – sont les seules cellules totipotentes de l'organisme. Cela signifie que leur génome est organisé de telle manière qu'il peut coder l'information à la fabrication d'un organisme entier. Ce stade totipotent n'est conservé que jusqu'au stade de 8 cellules. Au-delà, l'embryon s'organise en territoires spécialisés, ayant chacun une identité et un destin propres. À ce stade (jour 4-5), avant l'implantation dans la membrane utérine, il n'y a plus de cellules totipotentes ; les cellules de la masse interne sont « pluripotentes ». Leur génome est organisé pour coder l'information afin de former tous les tissus de l'organisme. Puis, une fois l'embryon implanté dans l'utérus, les cellules de cette « masse » interne délimitent trois feuillets, ectoderme, endoderme et mésoderme, chacun est à l'origine de certains des futurs tissus de l'organisme. Par exemple, la peau et le tissu nerveux sont issus de l'ectoderme, l'intestin, le foie et le pancréas sont issus de l'endoderme, les cellules hématopoïétiques et musculaires sont issues du mésoderme (Rossant and Tam, 2009)(Kieffer et al., 2010).

Les cellules souches embryonnaires (CSE) possèdent un potentiel de division infini et ont la capacité de former – dans l’environnement cellulaire adapté – n’importe quel type cellulaire de l’organisme (**Figure 2**). Ces cellules allient les caractéristiques idéales pour produire des banques (capacité infinie de division) et un potentiel de différenciation universel. Elles sont un outil idéal de modélisation cellulaire pour la recherche. En effet, l’embryon est une structure en constante et rapide évolution, ces cellules totipotentes et pluripotentes ne s’autorenouvellent pas de façon prolongée, ce qui serait incompatible avec la progression du développement embryonnaire. La pluripotence n’existe que pendant une courte fenêtre temporelle, la situation est donc très différente des conditions *in vitro*. En 2007, la famille des cellules souches pluripotentes s’est agrandie avec la découverte d’une méthode de dérivation de lignées. Chaque cellule d’un organisme possède tous les gènes de son espèce dans ses chromosomes, mais n’en utilise que certains à un moment donné : les gènes spécifiques aux fonctions neurales pour un neurone, ou les gènes qui maintiennent un état indifférencié et permettent la division de la cellule souche. Plus récemment, une équipe a identifié la combinaison de 4 gènes qui poussent la cellule à changer son identité, perdant ses fonctions de cellule différenciée et retrouvant ses capacités de cellule souche pluripotente : c’est la cellule souche pluripotente induite (iPS)(Takahashi and Yamanaka, 2006)(Yu et al., 2007)(Takahashi et al., 2007). Le champ d’application des cellules souches pluripotentes s’est grandement élargi avec l’arrivée des iPS.

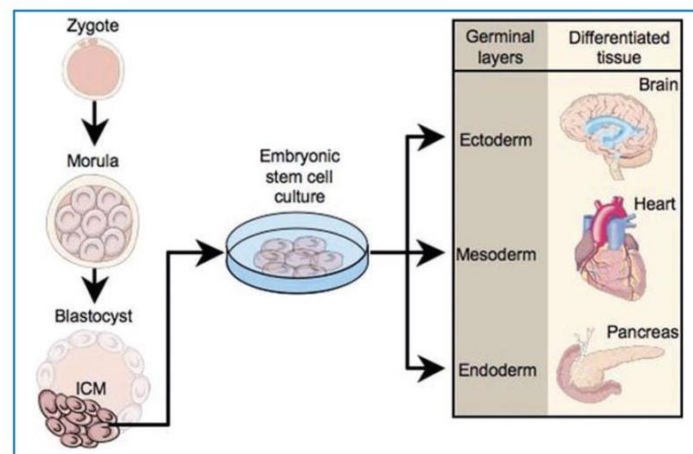


Figure : 2 Les cellules souches embryonnaires. Les cellules souches embryonnaires peuvent provenir de tissus issus des trois couches germinales (d’après(Nelson et al., 2009)).

1.3.2 Les cellules souches fœtales

Les cellules souches fœtales sont issues de tissus fœtaux à un stade beaucoup plus tardif (5-9 semaines) que le stade de blastocyte embryonnaire et sont isolées à partir de fœtus résultant d’avortements (Guillot et al., 2006) ou à partir du cordon ombilical, du sang

placentaire et du placenta.

1.3.3 Les cellules souches du sang de cordon ombilical et de la gelée de Wharton

Ce sont des cellules souches en circulation qui comprennent des cellules souches hématopoïétiques et des cellules souches non hématopoïétiques. Elles ont montré des caractéristiques multipotentes en étant capables de se différencier en neurones et en cellules hépatiques (Rogers and Casper, 2004). Tandis que les cellules souches de sang de cordon et plus spécifiquement leur stockage pour une utilisation ultérieure ont attiré l'attention, il a été également écrit que la matrice du cordon ombilical contient des cellules souches potentiellement utiles (Mitchell, 2003). Cette matrice appelée gelée de Wharton a été une source d'isolement des cellules souches mésenchymateuses. Ces cellules expriment des marqueurs typiques de cellules souches, et montrent une activité télomérase élevée (Margossian et al., 2012). Elles ont été amplifiées sur une longue période et peuvent être induites à se différencier in vitro en neurones.

1.3.4 Les cellules souches adultes

Elles sont également connues sous le nom de cellules souches somatiques, ce qui est un abus de langage dans la mesure où il existe des cellules souches germinales chez l'adulte, et peuvent être trouvées dans divers tissus et organes. Nous avons par exemple les cellules souche hématopoïétiques (voir ci-dessous) et les cellules souches mésenchymateuses (voir plus loin).

Les cellules souches hématopoïétiques(CSH) sont le point de départ de l'hématopoïèse qui a lieu au niveau de la moelle osseuse (MO). Elles assurent la production permanente des différentes lignées cellulaires sanguines, permettant à ces dernières un renouvellement constant. Elles sont capables de se différencier en précurseurs myéloïdes et lymphoïdes qui sont à l'origine de toutes les cellules hématopoïétiques (globules rouges, plaquettes, polynucléaires, macrophages et lymphocytes). La capacité d'auto-renouvellement des CSH permet à partir d'un stock limité de cellules d'assurer l'hématopoïèse d'un individu pendant toute sa vie.

Les cellules souches hématopoïétiques sont dérivées au début de l'embryogenèse à partir du mésoderme et se déposent dans des sites très spécifiques d'hématopoïèses dans l'embryon. Les cellules souches hématopoïétiques sont les cellules adultes les plus étudiées ; elles peuvent être purifiées en utilisant des anticorps monoclonaux (des cellules progénitrices lymphoïdes communes et des myéloïdes-érythrocytaires ont été isolées et caractérisées). Les CSH ont été largement utilisées en milieu clinique depuis plus de 40 ans et constituent la base du succès de transplantation de moelle osseuse. Malheureusement, les CSH sont rares et difficiles à isoler in vivo de leurs nombreuses niches. Dans l'organisme humain néonatal et adulte, le pourcentage de cellules CD34-positives (marqueur ubiquitaire des HSC) est de 0,2-0,5% dans le sang, de 0,5-1% dans la MO et 1% dans le thymus (Dalloul et al., 1999)(Canque

et al., 2000). L'auto-renouveau des CSH in vivo et in vitro est limité dans le temps. Au cours des divisions cellulaires, les télomères se raccourcissent conduisant les cellules sénescences vers l'apoptose. Pour cette raison et contrairement aux CSE, il est impossible de créer des lignées de CSH.

1.3.4.1 Flexibilité–plasticité des cellules souches adultes

Entre 1999 et 2002, plusieurs articles suggéraient que les CS adultes, placées dans un environnement différent de leur tissu d'origine, étaient capables de suivre une autre voie de différenciation, ce qui avait été nommé transdifférenciation (**Figure 3**). Des espoirs thérapeutiques avaient été imprudemment médiatisés, laissant penser qu'après une transplantation de moelle osseuse, les CS, hématopoïétiques ou mésenchymateuses, pourraient migrer et contribuer à la réparation de tissus variés (muscle, cerveau, etc.). La réalité est que ces observations provenaient soit d'artéfacts d'analyse histologique, soit d'un processus de fusion entre des cellules hématopoïétiques différenciées, de type monocyttaire, et les cellules tissulaires déficientes (Alvarez-Dolado et al., 2003). Une telle fusion entraîne la reprogrammation des cellules myéloïdes qui exprimaient certaines propriétés du tissu déficient, hépatique ou musculaire par exemple. Le consensus actuel est que des CS adultes sont peu capables de se dédifférencier et de prendre un autre chemin de différenciation que celui du tissu dans lequel elles résident, comme le font par exemple les cellules du membre sectionné des salamandres (Coulombel, 2003).

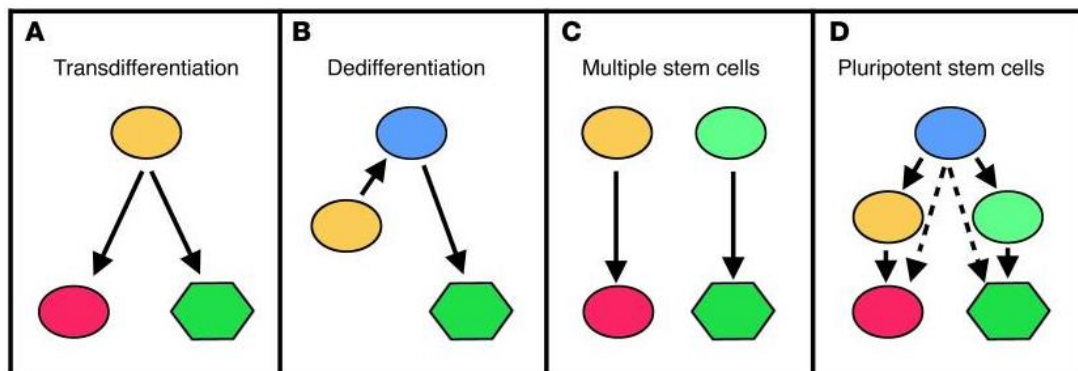


Figure 3 : Plasticité des cellules souches adultes (après (Fernandes et al., 2004)).

2. Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM)

2.1 La découverte des CSM

Il y a environ 130 ans, le pathologiste allemand Cohnheim a proposé l'existence de cellules souches non-hématopoïétiques dans la moelle osseuse. Il a suggéré que ces cellules pourraient contribuer à la cicatrisation de la plaie, car elles pouvaient être une source de

fibroblastes (Prockop, 1997). Les CSM ont été identifiées et isolées pour la première fois à partir de la moelle osseuse par l'équipe de A. Friedenstein. Quand les cellules de la moelle osseuse de rongeurs étaient ensemencées à faible densité dans des milieux liquides contenant du sérum, ils ont observé, après quelques jours, l'apparition de colonies de cellules adhérentes au plastique, allongées et d'apparence fibroblastique. Ces progéniteurs qui sont capables de produire des colonies de cellules d'allure fibroblastique ont été appelés CFU-F pour « Colony Forming Unit-Fibroblast ». Friedenstein fournit des preuves solides quant au potentiel d'auto-renouvellement des cellules souches en démontrant leur capacité à régénérer les tissus osseux hétérotopiques. Ces résultats ont été confirmés par de nombreuses études qui ont montré que les cellules isolées par Friedenstein pouvaient également être trouvées dans la moelle osseuse humaine et pouvaient se différencier en une variété de différentes cellules de la lignée mésenchymateuse, y compris les chondrocytes, les adipocytes, ostéoblastes et myoblastes (Prockop, 1997) (Bianco et al., 2008)(Caplan, 2007)(Kolf et al., 2007)(Pittenger et al., 1999). Ce n'est que très récemment que le concept de l'existence de CSM post-natales a émergé pour une utilisation thérapeutique. En 1991, le terme de « cellules souches mésenchymateuses » est introduit par A. Caplan (Caplan, 1991).

2.2 Identification des CSM

Les CSM sont une population de cellules souches multipotentes adultes, non-hématopoïétiques, présentes dans tous les tissus conjonctifs. Elles ont été identifiées initialement au sein de la moelle osseuse, où elles fournissent le microenvironnement approprié pour le soutien de l'hématopoïèse. *In vitro*, cette cellule est capable de se différencier en adipocyte, en ostéoblaste, en myoblaste, en chondrocyte (Pittenger et al., 1999). Dans des conditions de culture *in vitro* particulières, les CSM peuvent également se différencier en cellules des lignées endodermiques ou neuro-ectodermiques, comme les neurones, les hépatocytes, l'endothélium (Pittenger et al., 1999)(Dezawa et al., 2004)(Sanchez-Ramos et al., 2000)(Schwartz et al., 2002), en cardiomyocytes(Makino et al., 1999), en cellules productrices d'insuline (Oh et al., 2004). Les cellules stromales mésenchymateuses ont été nommées par différents termes : marrow stromal cells, mesenchymal stem cells, mesenchymal stromal cells, multipotent stromal cells. Dans un souci d'harmonisation, la Société internationale de thérapie cellulaire (ISCT) a proposé en 2006 de regrouper des populations cellulaires de phénotypes suffisamment proches sous une appellation unique : cellules stromales mésenchymateuses, et d'établir des critères minimums de définition (Dominici et al., 2006a) :

- (a) adhérence au plastique dans des conditions de culture standard ;
- (b) expression des marqueurs de surface CD105, CD73, CD90 et, absence d'expression des marqueurs hématopoïétique CD45, CD34, CD11a, CD19 et Human leukocyte antigen-DR(HLA-DR);

(c) différenciation en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes *in vitro*.

En fonction de ces critères, parallèlement à la moelle osseuse, des cellules très voisines des CSM ont été isolées dans différents tissus, comme le tissu adipeux, le cordon ombilical, la pulpe dentaire, le muscle squelettique, le liquide synovial, le ligament parodontal et même le cerveau (Bianco et al., 2001)(Kuhn and Tuan, 2010). Deux d'entre eux représentent des sources alternatives prometteuses : le tissu adipeux et la gelée de Wharton.

Le tissu adipeux est une source très importante de cellules multipotentes. Il contient au moins 100 fois plus de cellules multipotentes que la moelle osseuse. Au niveau de la multipotentialité et la capacité d'immunomodulation, les cellules stromales dérivées du tissu adipeux (ADSC) ont des potentialités au moins équivalentes à celles de la moelle osseuse (Zuk et al., 2001)(Puissant et al., 2005). Les ADSC ont montré des potentiels de différenciation dans les voies cardiomyocytaire et endothéliale (Planat-Benard et al., 2004)(Planat-Bénard et al., 2004). Leur phénotype est en partie différent des CSM puisqu'elles expriment l'antigène CD34 et pas l'antigène CD106 (Puissant et al., 2005)(Mitchell et al., 2006). Les sites de prélèvements les plus courants sont sous-cutanés. Le tissu adipeux peut être prélevé par lipoaspiration ou par dermolipectomie. Des travaux chez les animaux indiquent qu'il existe des différences qualitatives en fonction du site de prélèvement. Pour le tissu adipeux, la méthode de préparation avant la mise en culture est différente de la moelle osseuse. En effet une digestion enzymatique doit avoir lieu afin de libérer les cellules de la matrice extracellulaire.

Dès 1991, des cellules fibroblastiques ont été isolées et caractérisées au sein de la gelée de Wharton (McElreavey et al., 1991). Par la suite, des études ont montré que ces cellules possédaient les propriétés caractéristiques des CSM. Les CSM de la gelée de Wharton (CSM-GW) peuvent être isolées à partir de trois régions : la zone inter-vasculaire, la zone péri-vasculaire (Baksh et al., 2007) et au niveau du subamnios (Troyer and Weiss, 2008). Des travaux restent à mener pour définir précisément l'origine des CSM-GW. A l'instar de toutes les cellules souches, les CSM-GW sont douées d'autorenouvellement et sont capables de se différencier, *in vitro*, en adipocytes, chondrocytes, ostéocytes. Il y a les études ont été réalisées une large caractérisation des CSM issues de la gelée de Wharton, et en comparaison avec les CSM de la moelle osseuse (Margossian et al., 2012)(Reppel et al., 2014).

2.3 L'isolement et la culture initiale de CSM

L'isolement de CSM a été possible grâce à leur propriété d'adhésion au plastique, néanmoins ce procédé conduit à l'obtention d'une population hétérogène de cellules (les cellules souches ainsi que des cellules progénitrices)(Kassem et al., 1993)(Kuznetsov et al., 1997). Certaines études récentes ont montré la capacité d'isoler des populations de CSM sur des critères spécifiques (Houlihan et al., 2012)(Mabuchi et al., 2013), comme les marqueurs de surface (Tormin et al., 2011). La mise en place d'une procédure complète pour l'isolement,

la caractérisation et l'expansion de CSM est la clé du succès d'utilisation de ces cellules en médecine régénérative (Wu and Tao, 2012). Les CSM dérivées d'autres tissus que la moelle osseuse peuvent être facilement obtenues par des méthodes non invasives et leur prolifération peut être maintenue en culture *in vitro* (Pendleton et al., 2013)(Thirumala et al., 2009). Lors de l'isolement de CSM de la moelle osseuse, les cellules hématopoïétiques adhèrent également à la plaque de plastique, mais ces cellules disparaissent au cours du temps, ne laissant que des cellules adhérentes *fibroblast like* (Chamberlain et al., 2007). Diverses CSM issues de différentes sources de tissus (adipeux, dentaire, gelée de Wharton) ont été isolées après digestion avec de la collagénase puis cultivées à des densités variables (Schüring et al., 2011)(Rotter et al., 2008)(Wu and Tao, 2012). Des CSM ont été cultivées en utilisant des milieux conditionnés tels que Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM) (Rotter et al., 2008)(Wu and Tao, 2012), DMEM-F12 (Cai et al., 2010)(Schüring et al., 2011)(Bartsch et al., 2005), alpha MEM (Seifrtová et al., 2012)(Ab Kadir et al., 2012)(Morito et al., 2008), DMEM-LG (Jiao et al., 2012)(Raynaud et al., 2012) et DMEM-HG (Riekstina et al., 2008)(Kita et al., 2009). Le milieu de culture a été complété avec du sérum bovin fœtal (FBS) (Rotter et al., 2008)(Wu and Tao, 2012). De plus la concentration en oxygène affecte également l'expansion et la prolifération des CSM (Ranera et al., 2013).

2.4 Les marqueurs de surface

2.4.1 Les marqueurs généraux

Comme toutes les autres cellules, les CSM présentent de nombreux marqueurs de surface cellulaire. Mais, à ce jour, il n'existe aucun marqueur spécifique pour identifier les CSM provenant de diverses sources. Une étude réalisée par (P et al., 2011), résume les informations disponibles sur la caractérisation des cellules souches mésenchymateuses humaines adultes par des marqueurs de surface en identifiant et en évaluant toute la littérature publiée dans ce domaine. Ce travail a montré que les marqueurs positifs les plus fréquemment rapportés sont CD105, CD90, CD44, CD73, CD29, CD13, CD34, CD146, CD106, CD166 et CD54. Les marqueurs négatifs les plus fréquemment rapportés sont CD34, CD14, CD45, CD11b, CD49d, CD106, CD10 et CD31 (**Tableau 2**). Un certain nombre d'autres marqueurs de surface cellulaire, y compris STRO-1, SH2, SH3, SH4, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-I, DP, EMA, DQ (CMH de classe II), oct 4, , Nanog, Sox-2, TERT, Stat-3, l'antigène de surface des fibroblastes, le muscle lisse alpha-actine, vimentine, sous-unités alpha 4, alpha5 et beta1 des intégrines, les intégrines alphaVbeta3 et alphavbeta5 et ICAM-1 ont également été rapportés.

2.4.2 Sélection de CSM via des marqueurs de surface

Différents marqueurs ont été proposés pour la sélection des CSM (Frenette et al., 2013) comme une alternative à l'adhésion au plastique pour identifier ou purifier les CSM (Dominici

et al., 2006a). Les CSM sont identifiées principalement par l'expression de CD105 (endogline), CD73 (5' terminal nucleotidase) et CD90 (Thy-1), et sont négatives pour les marqueurs hématopoïétiques, notamment CD34 et CD45 (Noël et al., 2002). Cette propriété permet de distinguer aisément les CSM des CSH à partir d'un échantillon de la moelle osseuse. Mais, les CSM isolées directement de la moelle osseuse sont positives pour CD34, elles perdent cet antigène lors de la culture in vitro [Pittenger MF et al, 2004]. Actuellement, il y a une grande

A ce jour, plusieurs marqueurs ont été utilisés dans le but d'enrichir les populations de CSM(Calloni et al., 2013)(Lv et al., 2014). La sélection de cellules CD140b (Stro-1) positives permet d'obtenir dix à vingt fois plus de CFU-F qu'à partir de la moelle non sélectionnée (Simmons and Torok-Storb, 1991). Le degré d'homogénéité des cellules souches mésenchymateuses isolées par adhérence au plastique sélectionnées par Stro-1 a été 1000 fois supérieur à celui de CD106 (Psaltis et al., 2010). Ceci suggère que Stro-1 peut être impliqué dans la clonogénicité et qu'il joue un rôle dans la l'origine et l'angiogenèse des cellules souches mésenchymateuses. Cependant, Stro-1 n'est pas exprimé dans tous les types de cellules souches mésenchymateuses. Par exemple Stro-1 est exprimée dans les cellules souches dentales et synoviales (Huang et al., 2009)(Hermida-Gómez et al., 2011), par contre les CSM dérivées du sang périphérique sont négatives ou faibles pour l'expression de Stro-1 (Kuznetsov et al., 2001). Il est rapporté que les cellules souches mésenchymateuses dérivées de placenta perdent l'expression de Stro-1 progressivement au cours de la culture (Hiwase et al., 2009). Par contre, l'expression de Stro-1 chez les CSM-MO augmente avec le temps de culture (Lee et al., 2009).

Sacchetti et al ont montré qu' une sous-population de cellules CD146+ et CD45- peut être enrichie à partir de CSM humaines, cette population CD146+ pourrait constituer le stroma (Sacchetti et al., 2007). CD146+ pourrait donc être un marqueur caractéristique des CSM ou d'une sous-population de cellules progénitrices. D' autres études ont identifié CD146 comme un marqueur spécifique de CSM par rapport aux cellules souches hématopoïétiques (Delorme et al., 2008). De plus, une diminution de l'expression de CD146 liée à l'âge a été montrée (Maijenburg et al., 2012).

CD271 est un récepteur pour les neurotrophines, qui stimulent les cellules neuronales au niveau de la survie et de la différenciation. Les cellules sélectionnées *via* l'antigène CD271 ont un meilleur potentiel de prolifération et de différenciation par rapport à la population non sélectionnée (Quirici et al., 2002)(Flores-Torales et al., 2010). Les CSM-MO CD271+ ont été montrées pour avoir une capacité accrue dans la promotion de la prise de la greffe de CSH par rapport aux CSM isolées par adhérence au plastique (Kuçi et al., 2010). Il en est de même pour la réparation cartilagineuse induite qui est supérieure par rapport à celle induite avec des CSM-MO CD271- (Hermida-Gómez et al., 2010). Ceci suggère ainsi un rôle du CD271 dans le maintien de la clonogénicité et la fonction des cellules souches mésenchymateuses. De la même façon que Stro-1, CD271 n'est pas universellement exprimé dans toutes les CSM.

De même, les antigènes CD200, Stagespecific embryonic antigen-4(SSEA-4) et CD49a permettent d'enrichir significativement la population de cellules stromales mésenchymateuses issues de la moelle osseuse (Delorme et al., 2008)(Gang et al., 2007)(Rider et al., 2007). Récemment, des résultats semblent montrer que les cellules stromales mésenchymateuses possèdent des marqueurs de péricytes (Zannettino et al., 2008).

A l'état basal, les CSM expriment avec une faible densité les molécules HLA de classe I, mais n'expriment pas les antigènes HLA de classe II, ni les molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CD40.

Les CSM se caractérisent également par la synthèse de facteurs de croissance et de cytokines (M-CSF, IL-6, IL-11, IL-15, SCF, VEGF) impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse, les interactions cellulaires, l'angiogenèse et la modulation de la réponse immunitaire (Minguell et al., 2001).

Tableau 2 : Les marqueurs des cellules stromales mésenchymateuses les plus fréquents .

Les marqueurs positifs les plus fréquents	Les marqueurs négatifs les plus fréquents
CD105, CD90, CD44, CD73, CD29, CD13, CD34, CD146, CD106, CD166 et CD54.	CD34, CD14, CD45, CD11b, CD49d, CD106, CD10 et CD31

2.5 Morphologie cellulaire et capacité de prolifération des CSM

Pendant leur prolifération en monocouche in vitro, les CSM peuvent produire des colonies de cellules d'allure fibroblastique, sous le terme Colony-forming unit-fibroblasts (CFU-Fs). C'est un des critères pour l'identification des CSM cultivées in vitro(Friedenstein et al., 1970). Les CSM ont une forme de fuseau et ressemblent aux fibroblastes à l'état indifférencié (Roberts, 2004). Une propriété intéressante des CSM est leur capacité d'adhérence au plastique. Cette propriété en permet l'isolement à partir de la moelle osseuse, contrairement aux CSH (Kassem, 2004)(Rickard et al., 1996). De plus, les CSM ont un pouvoir de prolifération élevé. Les CSM se développent rapidement sous l'influence de mitogènes tels que le PDGF, le bFGF et l'IGF-1(Colter et al., 2000)(Bianco et al., 2001). Ceci permet de créer facilement « une banque » de cellules souches. De plus, les CSM peuvent garder leur phénotype en culture sur plusieurs passages (Pittenger et al., 1999)(Leo and Grande, 2006) et conserver leur capacité à se différencier (Pereira et al., 1995)(Bhatia et al., 2005).

2.6 La capacité de multipotence

Les CSM sont capables de se différencier, dans des conditions de culture appropriées, non seulement en adipocytes (A)(Dennis et al., 1999), chondrocytes (C)(Kadiyala et al., 1997) et

ostéoblastes (O)(Bruder et al., 1997)(Bruder et al., 1998), mais aussi en cellules musculaires vasculaires lisses (Kashiwakura et al., 2003)(Fernandes et al., 2004)(Delorme et al., 2009)(Kurpinski et al., 2010).

2.6.1 Lignées mésodermiques

L'une des propriétés des CSM est de se différencier en cellules des différentes lignées mésodermiques (**Figure 4**). Pour l' adipogenèse, les CSM ont été cultivées dans un milieu de croissance supplémenté avec de la dexaméthasone, de l'indométhacine, de l'insuline et de l'isobutyle de méthyle xanthine pendant 21 jours, puis l'expression des gènes du *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*(PPAR γ) et de la lipoprotéine lipase (LPL) ont été analysées (Pittenger et al., 1999)(Rosen and MacDougald, 2006). PPAR- γ joue un rôle essentiel dans la différenciation adipocytaire par la régulation de la fonction des nombreux gènes spécifiques d'adipocytes (Rosen and Spiegelman, 2000). Il s'agit d'un facteur de transcription indispensable pour la différenciation adipogénique des CSM (Tontonoz et al., 1994)(Nuttall et al., 2013). *In vitro* les CSM traitées avec les thiazolidinediones (TZD), qui sont des agonistes de ligands de PPAR γ ont conduit à une meilleure adipogenèse et à l'inhibition de l'ostéoclastogenèse des CSM. Parmi les régulateurs de PPAR γ , c'est la voie Wnt- β -caténine canonique qui inhibe l'expression du PPAR γ (Takada et al., 2009).

La méthode classique pour la différenciation de CSM en ostéocytes repose sur la culture des cellules avec de l'acide ascorbique, du β -glycérophosphate et de la dexaméthasone pendant 21 jours dans un milieu de croissance conditionné. L'induction ostéogénique des CSM a montré une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline pendant la dernière semaine de différenciation (Pittenger et al., 1999). Runx2 est le régulateur maître de l'ostéogenèse, il a également un rôle dans la formation du cartilage (Ducy et al., 1997)(Hinoi et al., 2006). Pendant le développement du squelette, l'expression de Runx2 commence au niveau de sites concentrés en CSM et son expression est détectable dans les différentes étapes de la formation osseuse (Franceschi et al., 2007). En outre, le rôle de Runx2 est contrôlé par des modifications post-traductionnelles (telles que la phosphorylation, l'acétylation) et par des interactions avec d'autres co-activateurs et co-répresseurs (Franceschi et al., 2003)(Huang et al., 2007)(Wang et al., 2013)(Xiao et al., 2000). L'expression de Runx2 est régulée par plusieurs facteurs de transcription, tels que *beta-catenine* (β -catenin), *msh homeobox 2* (Msx2), et *distal-less homeobox 5* (Dlx5)(Huang et al., 2007). Runx2 agit sur la différenciation de CSM en réduisant l'adipogenèse tout en favorisant la différenciation ostéoblastique et chondrocytaire (Enomoto et al., 2004). Alors que Runx2 agit sur la différenciation ostéoblastique à des stades précoces, Osterix, un autre inducteur ostéogénique important, supprime la chondrogenèse et favorise la différenciation ostéoblastique à un stade ultérieur.

Les CSM ont également le potentiel de se différencier en chondrocytes. Les cellules sont

cultivées dans un milieu supplémenté avec de l'insuline-transferrine-selenium, du pyruvate, de l'ascorbate 2-phosphate, de la dexaméthasone et du *transforming growth factor-β* III (TGF-β III)(Mackay et al., 1998). La différenciation chondrocytaire est réalisée en culture 3D où les cellules se retrouvent en agrégats appelées pellets. Sox9 est un facteur de transcription essentiel et indispensable pendant la chondrogenèse (Shen et al., 2008)(Tsuchiya et al., 2003) et l'expression des gènes de la matrice extracellulaire du cartilage, incluant la chaîne α de collagène de type II (Col2α1), le collagène de type II (Col11) et l'aggrécane (de Crombrughe et al., 2001)(Lefebvre et al., 1997)(McDowall et al., 1999)(Akiyama et al., 2002). Sox9, avec en aval les protéines Sox5 et Sox6, favorise la prolifération de chondrocytes, la maturation et la formation de la matrice extracellulaire (Akiyama et al., 2002)(Akiyama, 2008)(Ikeda et al., 2004). En outre, TGF-β joue un rôle important dans la différenciation chondrogénique, l'expression de collagène de type I, du collagène de type II et d'autres molécules dépend de la présence de TGF-β (Chimal-Monroy and Díaz de León, 1999). De plus, il a un effet renforcé de manière synergique avec la BMP-2(Shen et al., 2008)(Mehlhorn et al., 2006)(An et al., 2010).

Les CSM peuvent se différencier en d'autres lignées mésodermiques. Les CSM de rat cultivées avec 5-aza peuvent se différencier en myotubes multinucléés. Les CSM humaines se différencient également en cellules du muscle squelettique lorsqu'elles sont transfectées avec domaine intracellulaire notch (NICD)(Wakitani et al., 1995)(Dezawa et al., 2005).

2.6.2 Lignées ectodermiques

Malgré leur origine mésodermique, les CSM sont connues pour leur capacité de différenciation en lignées ectodermiques (**Figure 4**). Les CSM isolées provenant de différentes sources ont montré une différenciation en cellules neuronales. Plusieurs facteurs de croissance comme le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) ou le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) ont été utilisés dans le milieu de différenciation neuronal avec succès. Des phénotypes neuronaux spécifiques ont été obtenus (Naghdi et al., 2009)(Datta et al., 2011)(Barzilay et al., 2008)(Safford et al., 2002)(Kang et al., 2003).

2.6.3 Lignées endodermiques

Les CSM humaines ont été différenciées en β-cellules productrices d'insuline *in vitro* et transplantées à des souris diabétiques pour corriger l'état hyperglycémique (Tang et al., 2012)(Gabr et al., 2013). La capacité de CSM de se différencier en hépatocytes a également été mise en évidence.

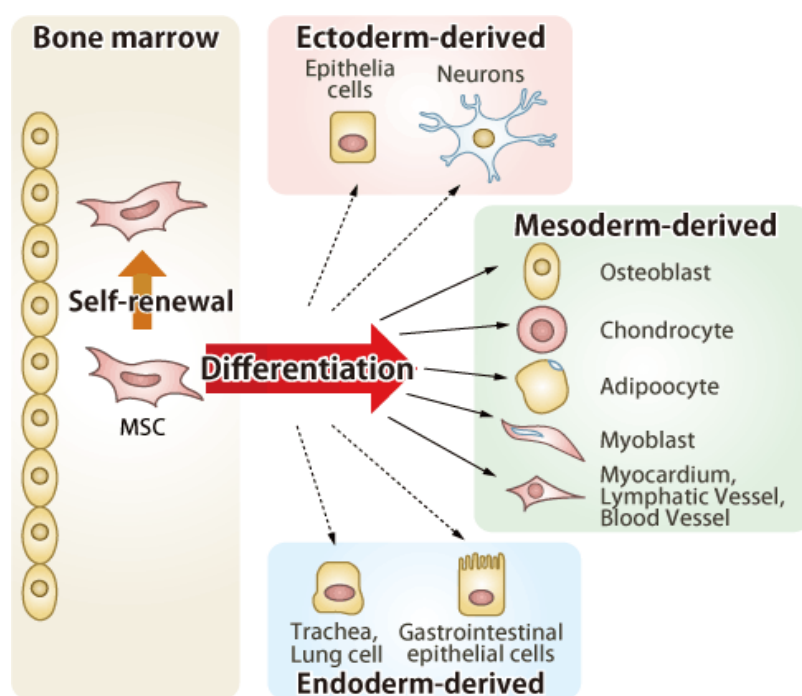


Figure 4 : La capacité de différenciation des cellules souches (<http://www.ncmr.co.jp/en/technology/#tch01>).

2.7 Une capacité de trans-différenciation *in vitro*

Cette propriété désigne la possibilité qu'aurait une cellule déjà engagée dans une voie de différenciation de changer de cap et d'emprunter une autre route. Par exemple, Des ostéoblastes obtenus après différenciation de CSM de moelle osseuse ont été capables de subir une trans-différenciation en adipocytes et en chondrocytes (Song and Tuan, 2004)(Deng et al., 2005).

2.8 Immunomodulation

In vitro, les cellules stromales mésenchymateuses possèdent un effet direct sur les lymphocytes T ou B et les cellules *natural killer* (Figure 5). Les cellules stromales mésenchymateuses inhibent la prolifération des lymphocytes T stimulés avec des mitogènes, par des cellules allogéniques ou par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (Nicola et al., 2002)(Le Blanc et al., 2003)(Tse et al., 2003)(Maitra et al., 2004)(Bhatia et al., 2005). Par ailleurs, les cellules stromales mésenchymateuses induiraient *in vitro* une population de lymphocytes T régulateurs CD4⁺ CD25⁺ Forkhead Box P3⁺ (FOXP3) dans des co-cultures avec des cellules mononuclées du sang périphérique ou par un mécanisme dépendant de HLA-G5 (Prevosto et al., 2007)(Selmani et al., 2008). Les mécanismes moléculaires responsables des propriétés immunosuppressives des CSM sont encore mal connus. Au moins en partie, l'inhibition de la prolifération T semble dépendre de contacts entre les deux populations cellulaires, conduisant à la production de cytokines inflammatoires comme l'IFN- γ (Krampera et al., 2006) ou l'IL-1 β

(Groh et al., 2005). L'IFN- γ est une cytokine capitale dans les défenses anti-infectieuses, l'inflammation et l'auto-immunité. En présence d' IFN- γ , les cellules stromales mésenchymateuses semblent renforcer leur propriétés immunosuppressives sur les lymphocytes T en augmentant l'expression de molécules inhibitrices, telle que l'indoleamin 2,3-dioxygénase (IDO), *l'human B7 homolog 1* (B7-H1) ou *l'inducible nitric oxide synthase* (iNOS)(Meisel et al., 2004)(Ren et al., 2008).

Les premières études réalisées dans les modèles murins ont démontré que les CSM étaient capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes B, stimulés par un anti-CD40L et par l'IL-4 (Aggarwal and Pittenger, 2005). Chez l'homme, Corcione et al.(Corcione et al., 2006) ont évalué et montré les capacités immunosuppressives des CSM vis-à-vis de cellules B stimulées par des anticorps anti-IgG, du CD40L soluble et des cytokines(IL-2 et IL-4).

Les cellules stromales mésenchymateuses ont été décrites comme inhibant la prolifération et la cytotoxicité des cellules *natural killer* (NK) induites par l'IL-2 ou l'IL-15 (Krampera et al., 2006)(Sotiropoulou et al., 2006)(Maccario et al., 2005)(Aggarwal and Pittenger, 2005)(Rasmusson et al., 2003).

L'effet immunomodulateur des CSM peut également s'expliquer par leur capacité à inhiber la différenciation des monocytes ou des progéniteurs CD34 en cellules dendritiques (CD)(Nauta et al., 2006). En effet, en présence de cellules stromales mésenchymateuses, les marqueurs CD11c, CD83, CD80, CD86 et le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II sont diminués, de même, une diminution de la production de cytokines(TNF- α , IFN- γ et IL-12) et une augmentation de la production d'IL-10 ont été observées (Beyth et al., 2005)(Aggarwal and Pittenger, 2005)(Jiang et al., 2005)(Zhang et al., 2004).

2.9 Les CSM et leurs applications cliniques

Par leur potentiel de différenciation, leur production de cytokines, de facteurs trophiques et leurs actions immuno-suppressives, les CSM sont un outil thérapeutique tant en médecine régénérative que dans le traitement des pathologies immunitaires et inflammatoires. Une revue à ce sujet a été rédigée dans le cadre de ma thèse et publiée début 2015 (Stoltz et al, Bio-Medical Materials and Engineering 2015;25(1 Suppl):3-26).

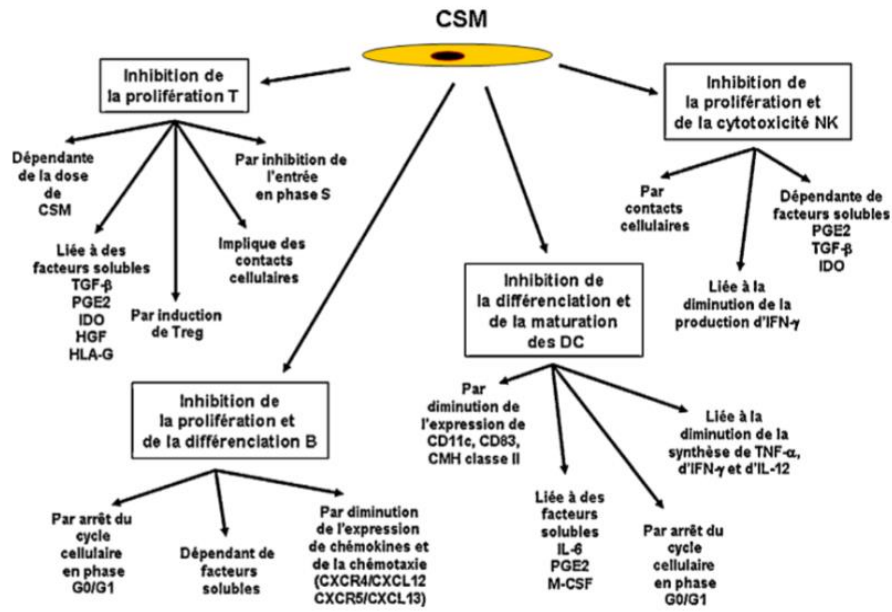


Figure 5 : Immunomodulation induite par les CSM. (d'après J.Larghero et al. 2009).

3. Le vieillissement des CSM

Les cellules souches mésenchymateuses adultes constituent un outil intéressant pour les thérapies cellulaires autologues et/ou allogéniques. Bien que différentes sources de CSM soient aujourd'hui proposées, la moelle osseuse reste l'une des plus utilisées. De plus, la population âgée représente une grande partie de patients concernés. Par conséquent, les effets de l'âge des donneurs sur les propriétés des CSM *in vivo* sont des considérations importantes à tenir compte, en particulier dans le cadre des thérapies autologues. Par ailleurs, les CSM représentent une faible fraction des cellules mononuclées de la moelle osseuse, l'isolement et l'expansion sont des étapes essentielles pour obtenir une quantité suffisante de cellules pour leur utilisation en clinique, leur vieillissement *in vitro* est donc également un aspect important à tenir compte.

3.1 Les CSM et le vieillissement *in vivo*

Avec l'âge, l'homéostasie et les activités de régénération des tissus diminuent et ceci peut être attribué, entre autres, au dysfonctionnement des cellules souches. Il est ainsi important de comprendre la relation entre la fonction des cellules souches et les propriétés des tissus âgés. Selon la littérature, les CSM seraient sensibles au vieillissement de leur environnement *in vivo* et également le vieillissement de CSM pourraient contribuer au développement des maladies liées à l'âge. Par exemple, il a été supposé que l'ostéoporose serait en partie due à un déficit de la différenciation ostéogénique de CSM (Turgeman et al., 2002)(Rodríguez et al., 1999). Un autre exemple concerne le syndrome métabolique, qui pourrait être lié à une perturbation de la fonction des CSM (Mansilla et al., 2011). En effet, les demandes importantes d'adipogenèse dans ce syndrome peuvent contribuer à l'épuisement de CSM. De plus, le diabète de type 2 qui est observée dans le syndrome métabolique peut également provoquer un dysfonctionnement CSM par la génération de AGEs (*advanced glycation end products*)(Mansilla et al., 2011).

3.2 Le vieillissement de cellules souches

Les cellules souches adultes sont exposés aux mêmes facteurs qui conduisent à des changements liés à l'âge, cependant les cellules souches doivent résister à ces changements et s'auto-renouveler pour assurer le fonctionnement et l'homéostasie tissulaire normale pendant la vie (Rando, 2006)(Sharpless and DePinho, 2007)(Jones and Rando, 2011). A long terme, les cellules souches adultes, en particulier dans les renouvellement des tissus, vont subir de nombreux cycles de division cellulaire pour maintenir l'homéostasie tissulaire (Fuchs et al., 2001)(van der Flier and Clevers, 2009). Au cours de chaque cycle de réplication de l'ADN, différents processus, y compris le raccourcissement des télomères et les réarrangements chromosomiques peuvent conduire à la sénescence cellulaire (Ben-Porath and Weinberg, 2005)(Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007)(Baxter et al., 2004a).

3.2.1 Les propriétés de CSM-MO en fonction de l'âge du donneur

Différents travaux dans la littérature étudient les effets de l'âge des donneurs sur les propriétés des CSM. Les principaux résultats concernant les CSM humaines provenant de la moelle osseuse sont présentés dans le **Tableau 3**.

Le nombre de colonies produites à partir de moelle osseuse peut être utilisé pour déterminer la fréquence de CSM dans celle-ci. Ainsi, des nombreuses études ont utilisé cet essai (CFU-F) pour tester la fréquence CSM *in vivo*. En 2006, Sethe et al montrent une diminution de la fréquence de CFU-F avec l'âge des donneurs. Des études ultérieures sont en accord avec ce consensus et proposent que cet phénomène peut-être à la sensibilité accrue à la sénescence (Kasper et al., 2009)(Geißler et al., 2012). Néanmoins, des autres études montrent qu'il n'y aurait pas de différence concernant la fréquence de CFU-F entre les donneurs jeunes et les donneurs âgés.

D'ailleurs, il y existe également des désaccords sur l'effet de l'âge du donneur sur la capacité proliférative des CSM-MO. Bien que la majorité des études ait rapporté une diminution de la capacité de prolifération avec l'âge du donneur, certaines études n'ont trouvé aucune différence pour la capacité de prolifération entre les CSM-MO provenant de donneurs d'âges différents. Cependant, il faut souligner que ces dernières études ont comparé des groupes des donneurs avec des âges plus rapprochés par rapport aux études précédentes.

L'effet de l'âge des donneurs sur le potentiel de différenciation des CSM-MO a également été étudié. La plupart des études concernant ce point ont été réalisées *in vitro*. L'hypothèse selon laquelle avec l'âge les CSM-MO perdraient leur potentiel ostéogénique et augmenteraient leur potentiel adipogénique a été validé dans certaines études et contredit par d'autres. En effet, beaucoup d'études ont montré que les CSM-MO gardent leur potentiel de différenciation adipogénique pendant la vie. En revanche les résultats sur la capacité de différenciation ostéogénique et chondrogénique sont contradictoires.

La senescence des CSM-MO liée à l'âge des donneurs a été également étudié. Une diminution de la longueur des télomères des CSM-MO liée à l'âge a été trouvée dans certaines études, tandis que d'autres études montrent que l'âge du donneur n'influence pas la longueur de télomères des CSM-MO. En même temps une augmentation de l'activité β -Galactosidase dans les CSM-MO liée l'âge des donneurs a été retrouvée.

Des études se sont concentré sur l'expression génique des CSM-MO en fonction de l'âge des donneurs. Les analyses de l'expression génique des CSM-MO provenant des donneurs jeunes par rapport à celles provenant de donneurs âgés ont révélé des changements concernant des gènes impliqués dans la différenciation, la réponse inflammatoires, le cycle cellulaire et certains facteurs de croissance. Par exemple, une augmentation de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs p53 et p21 avec l'âge des donneurs a été montré.

D'autres données suggèrent également des changements de CSM-MO en fonction de l'âge dans l'adhésion, la migration, la résistance au stress oxydant et la sécrétion de cytokines. Ces modifications peuvent jouer un rôle important sur la guérison des tissus traités par les CSM-

MO.

Tableau 3 : études sur l'effet de l'âge du donneur sur le potentiel des CSM-MO d'origine humain (liste non exhaustive).

Propriétés	Effet de l'âge	Références
Fréquence de CSM-MO	↓	(Sethe et al., 2006a)(Nishida et al., 1999)(Baxter et al., 2004a)(Stolzing et al., 2008a)
	→	(Oreffo et al., 1998a)(Muschler et al., 2001)(Dexheimer et al., 2011a)
Prolifération	↓	(Baxter et al., 2004a) (Stenderup et al., 2003)(Nishida et al., 1999)(Phinney et al., 1999) (Mendes et al., 2002)(Zhou et al., 2008a)(Fickert et al., 2010)(Stolzing et al., 2008a)(Dexheimer et al., 2011a)(Fan et al., 2010a)(Sun et al., 2011)(Yu et al., 2011)(Han et al., 2012)(Zaim et al., 2012a)
	→	(Scharstuhl et al., 2007)(Stenderup et al., 2001)(Suva et al., 2004)(Payne et al., 2010)(Siegel et al., 2013a)(Wagner et al., 2009a)
CFU-F	↓	(D'Ippolito et al., 1999)(Oreffo et al., 1998a)(Baxter et al., 2004a)
	→	(Stenderup et al., 2001)(Beane et al., 2014)
Adipogénèse	→	(Murphy et al., 2002)(Stenderup et al., 2003)(Stolzing et al., 2008a)(Dexheimer et al., 2011a)
	↓	(Zaim et al., 2012a)
Osteogénèse	↓	(Baxter et al., 2004a)(D'Ippolito et al., 1999)(Nishida et al., 1999)(Oreffo et al., 1998a)(Phinney et al., 1999)(Zhou et al., 2008a)(Mueller and Glowacki, 2001)(Stolzing et al., 2008a)(Sun et al., 2011)(Zaim et al., 2012a)
	→	(Murphy et al., 2002)(Stenderup et al., 2003)(Leskelä et al., 2003)(Stenderup et al., 2001)(Mendes et al., 2002)(Siddappa et al., 2007)(Fickert et al., 2010)(Dexheimer et al., 2011a)
Chondrogénèse	→	(Murphy et al., 2002)(Scharstuhl et al., 2007)(Hermann et al., 2010)(Dexheimer et al., 2011a)(Zaim et al., 2012a)
	↓	(Payne et al., 2010)(Stolzing et al., 2008a)(Beane et al., 2014)
Longueur des télomères	↓	(Baxter et al., 2004a)
	→	(Hermann et al., 2010)
Activité β-gal (pH 6)	↑	(Stenderup et al., 2003)(Zhou et al., 2008a)
Apoptose, P53	↑	(Zhou et al., 2008a)(Stolzing et al., 2008a)

3.2.2 Les propriétés de CSM-MO selon l'expansion *in vitro*

Comme précédemment décrit, les CSM représentent une faible fraction des cellules mononuclées de la moelle osseuse, l'isolement et l'expansion *in vitro* sont des étapes essentielles pour obtenir une quantité suffisante pour des applications thérapeutiques. C'est donc important de considérer les effets de la culture à long terme *in vitro* sur la fonction des CSM-MO. Certains résultats des études réalisés à ce sujet sont rassemblés dans le **Tableau 4**. En générale, une diminution du potentiel de prolifération et de différenciation de CSM-MO en fonction du temps d'expansion *in vitro* est remarqué (Wagner et al., 2010a).

Dans les conditions actuelles de culture *in vitro*, les calculs montrent que la prolifération des CSM reste dans la limite de Hayflick de 50 doublements *in vitro*. Par contre, les CSM obtenues à partir de donneurs âgés présentent une diminution de leur prolifération avec un maximum de 25 doublements (Stenderup et al., 2003). La limite de Hayflick prend en compte le nombre total de divisions cellulaires qui ont eu lieu *in vivo* plus les divisions en culture. Ceci explique pourquoi les cellules en culture deviennent sénescences et pourquoi la sénescence peut survenir plus tôt dans les cultures de cellules des personnes âgées. Cette forme de sénescence est causée par plusieurs facteurs, notamment le raccourcissement progressif des télomères au cours de la culture continue *in vitro* (Stenderup et al., 2003)(Wagner et al., 2009a) (Bork et al., 2010) attribuable à l'absence d'activité télomérase (Simonsen et al., 2002). Les mécanismes conduisant à la sénescence des CSM-MO ont été explorées dans les cellules de patients avec lupus érythémateux disséminé (SLE) qui ont des capacités de prolifération diminuées. Dans ces cellules, l'expression de gènes p16 qui est lié à la sénescence a été augmentée (Gu et al., 2012). D'autres facteurs qui affectent la croissance CSM-MO *in vitro* comprennent la densité d'ensemencement, les substrats de culture et la tension ambiante d'oxygène (Kasper et al., 2009)(Geißler et al., 2012).

Tableau 4 : études sur l'effet de l'expansion *in vitro* sur le potentiel des CSM-MO d'origine humain (liste non exhaustive).

Propriétés	Effet du passage	Références
Prolifération	↓	(Baxter et al., 2004a)(Park et al., 2005)(Banfi et al., 2000)(Stenderup et al., 2003)(Baxter et al., 2004a)(Siddappa et al., 2007)(Dexheimer et al., 2011a)
Adipogénèse	↓	(Baxter et al., 2004a)(Park et al., 2005)(Banfi et al., 2000)(Stenderup et al., 2003)(Siddappa et al., 2007)
Osteogénèse	→ ↓	(Baxter et al., 2004a)(Banfi et al., 2000) (Stenderup et al., 2003)(Siddappa et al., 2007)(Fickert et al., 2010)
Chondrogénèse	→	(Banfi et al., 2000)
Longueur des télomères	↓	(Baxter et al., 2004a)(Stenderup et al., 2003)
Activité β-gal (pH 6)	↑	(Park et al., 2005)(Stenderup et al., 2003)
Inhibiteurs du cycle cellulaire (p16, p21)	↑	(Park et al., 2005)

3.2.3 L'effet du vieillissement sur de CSM d'autres sources

En parallèle, l'effet de l'âge du donneur et de l'expansion *in vitro* sur le potentiel de CSM adultes d'autres sources, comme les CSM du tissu adipeux ou les CSM du ligament parodontal, a été rapporté. Des études montrent qu'au cours de l'amplification *in vitro* les cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux gardent leur potentiel de prolifération (Chen et al., 2012), tandis que la capacité de prolifération et différenciation ostéogénique et chondrogénique diminue quand l'âge du donneur augmente (Choudhery et al., 2014)(Yang et al., 2014)(Alt et al., 2012)(Chen et al., 2012). Zhang et al ont montré une diminution de la capacité de prolifération et la multipotence de cellules souches du ligament parodontal en fonction de l'âge des donneurs (Zhang et al., 2012).

4. La sénescence

4.1 Le vieillissement

Le vieillissement est une caractéristique universelle des organismes biologiques. Parmi les organismes multicellulaires, le vieillissement est marqué par un déclin progressif de la fonction des cellules et des tissus. Dans les organismes avec des tissus renouvelables, le vieillissement est également marqué par une augmentation des hyperplasies, la plus grave est le cancer. Chez les mammifères, la dégénérescence liée à l'âge donne lieu à des pathologies bien connues, telles que l'arthrose, la sarcopénie, l'athérosclérose et l'insuffisance cardiaque, l'ostéoporose, la dégénérescence maculaire, l'insuffisance pulmonaire, une l'insuffisance rénale, la neurodégénérescence (tels que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson), et beaucoup d'autres.

Le vieillissement entraîne un autre phénomène : pour retrouver leur fonction, les cellules prolifèrent de façon inappropriée (hyperplasie). En outre, grâce à l'instabilité génomique, ces changements permettent aux cellules d'acquérir des phénotypes qui augmentent leurs capacités à proliférer, migrer et coloniser ; pour la survie dans un environnement hostile ; et d'échapper ainsi au système immunitaire. Ces phénotypes sont caractéristiques du cancer (Hanahan and Weinberg, 2011). Il y a de plus en plus d'études qui montrent que la sénescence cellulaire est en relation avec plusieurs pathologies du vieillissement, à la fois dégénératives et hyperplasiques. La sénescence cellulaire ne permet pas d'expliquer tous les phénotypes de vieillissement. Toutefois, un grand nombre de pathologies du vieillissement ont été liés directement ou indirectement à la sénescence cellulaire.

Ci-dessous nous allons discuter les caractéristiques de la sénescence, ses mécanismes et causes ainsi que les marqueurs de sénescence. Sont discutés également la régulation de la réponse de la sénescence et ses conséquences sur le vieillissement (Campisi, 2013).

4.2 La sénescence

4.2.1 Définition de la sénescence

La sénescence cellulaire est essentiellement un arrêt du cycle cellulaire. Le phénotype sénéscent est extrêmement stable, la sénescence est souvent décrite comme un état 'irréversible' ou 'permanent' d'arrêt du cycle cellulaire qui doit être distingué de l'état de repos ou quiescence qui est lui, réversible. Le phénotype de sénescence a tout d'abord été identifié dans des fibroblastes diploïdes (HDFS) génétiquement normaux, qui «refusaient» de proliférer indéfiniment en culture (Hayflick, 1998). Ce phénomène a été attribué à l'insuffisance de nutriments essentiels dans le milieu de culture. Ensuite il a été attribué aux limites imposées par les télomères. Lorsque les HDFS deviennent sénescents, outre le fait que le cycle cellulaire s'arrête, la morphologie cellulaire change drastiquement. Généralement, les cellules ont élargi leur cytoplasme et noyau, les nucléoles sont devenus proéminents et de nombreuses vacuoles

cytoplasmiques ont apparus.

4.2.2 Découverte de la sénescence

Les cellules normales possèdent une capacité de division limitée. A partir d'un point appelé « limite de Hayflick », les cellules se divisent de plus en plus lentement jusqu'à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Hayflick, 1998)(Shay and Wright, 2000). Les cellules somatiques ne peuvent se diviser qu'un nombre limité de fois (environ 50 fois chez l'homme) avant de mourir. A l'approche de cette limite, les cellules présentent un arrêt de la croissance puis un arrêt irréversible du cycle cellulaire associé à des modifications morphologiques et fonctionnelles des cellules (Goldstein, 1990). Ce phénomène appelé sénescence répllicative a été décrit pour la plupart des types cellulaires différenciés (Vojta and Barrett, 1995). Les cellules sénescents sont bloquées en phase G0 du cycle cellulaire et, contrairement à l'état quiescent, sont incapables d'entrer en phase S du cycle cellulaire en réponse à des mitogènes (Cristofalo et al., 1989)(Cristofalo et al., 2004). Ces cellules montrent des caractéristiques morphologiques particulières tel un cytoplasme plus grand et granulaire, un niveau élevé d'enzymes de la matrice extracellulaire associé à une diminution des inhibiteurs des métalloprotéinases matricielles (TIMP) (Cristofalo et al., 2004). Cet état est aussi associé à de nombreux changements du métabolisme cellulaire, notamment une activité accrue de l'activité β -galactosidase (Dimri et al., 1995) et une résistance à l'apoptose (Chang, 1997)(Hampel et al., 2005). Ce phénomène s'appuie sur l'organisation même du génome des cellules eucaryotes. L'horloge qui contrôle l'induction de ce processus est le raccourcissement des télomères (Blackburn, 2001) (Harley et al., 1990)(Holt et al., 1996). La sénescence peut également être causée par l'exposition aiguë ou chronique à d'autres signaux de stress physiologiques indépendamment de la longueur des télomères, ce phénomène est appelé sénescence prématurée (*stress induced premature senescence* SIPS).

Alors que la théorie selon laquelle les voies suppresseurs de tumeurs comme p53 et p16 / Rb sont impliquées dans la sénescence est largement acceptée, les mécanismes précis sont encore inconnus. Des études récentes supposent que la sénescence cellulaire est un phénomène complexe initié par des réseaux de programmes effecteurs. L'équilibre et la qualité des différents réseaux dépendent du type cellulaire, la nature du stress ainsi que de l'environnement.

4.3.3 Types de sénescence

La sénescence cellulaire peut être subdivisée en deux catégories. La première est la sénescence répllicative, observée après un certain nombre de cycles de division cellulaire comme une perte de la capacité répllicative des cellules diploïdes normales proliférantes («limite de Hayflick»). Ce type de sénescence est la conséquence d'un raccourcissement progressif des télomères à chaque division cellulaire jusqu'à ce qu'une cellule atteigne l'état de dysfonctionnement des télomères. La deuxième catégorie, indépendante du

raccourcissement des télomères ou de leur dysfonctionnement est appelée sénescence cellulaire prématurée (Sherr and DePinho, 2000a). Le stress cellulaire persistant, y compris des dommages oxydatifs de l'ADN menant au stress (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007)(Shay and Wright, 2000), l'activation des oncogènes (Di Micco et al., 2006) et la perte de gènes suppresseurs de tumeurs (Sherr and McCormick, 2002) sont parmi les facteurs et les mécanismes induisant la sénescence prématurée des cellules.

4.3.3.1 Sénescence répllicative

4.3.3.1.1 Télomères

4.3.3.1.1.1 Les télomères : structure et fonction

Les télomères sont des séquences nucléotidiques répétitives situées à l'extrémité des chromosomes linéaires qui se raccourcissent à chaque cycle de division, une situation connue sous le problème de réplication d'extrémité (**Figure 6**) (Gilson and Géli, 2007) (Verdun and Karlseder, 2007).

Les télomères peuvent être considérés comme des bouchons de protection pour les chromosomes, composés de séquences d'ADN répétées liées par une série de protéines spécialisés. Ils ont un rôle essentiel dans la stabilité et la protection des extrémités des chromosomes contre la dégradation enzymatique, la recombinaison et les fusions interchromosomiques.

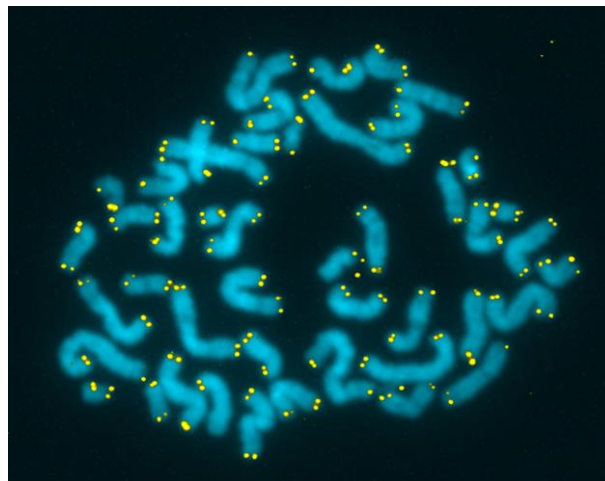


Figure 6 : Les télomères (en jaune) sont formés de complexes nucléoprotéiques qui coiffent l'extrémité des chromosomes (bleu). (d'après <http://medicalschooll.tumblr.com>)

La longueur des télomères varie entre des organismes, plusieurs centaines de paires de bases d'ADN dans la levure par rapport à des dizaines de kilobases (kb) chez les mammifères (Palm and de Lange, 2008a). Chez l'homme, les télomères contiennent entre 5000 et 15000 kb. Les télomères sont composés d'une région double-brin comportant la répétition du motif télomérique GGGTTA prolongée par un ADN simple-brin riche en guanine (brin G) (Nguyen et al., 2013)(Zimmermann et al., 2014). La structure des télomères forme une large boucle (T-

l'absence de la télomérase (*voir plus loin*), les télomères se raccourcissent jusqu'à atteindre une taille critique où toute réplication cellulaire devient impossible. Cette limite se situe pour les mammifères aux alentours de 5Kb (Harley et al., 1990)(Shalev et al., 2013). Le raccourcissement des télomères dépend du nombre de réplifications cellulaires et du nombre de bases perdues à chaque réplication (Blackburn, 2001)(Harley et al., 1990). Le nombre de réplifications cellulaires est spécifique à chaque tissu et à chaque type cellulaire ; il a en effet été montré que les tissus ayant une faible capacité répllicative (muscle, cerveau) ne présentent pas de réduction significative de la taille des télomères avec l'âge alors que l'on observe une diminution sur les cellules à forte activité répllicative (Chang and Harley, 1995).

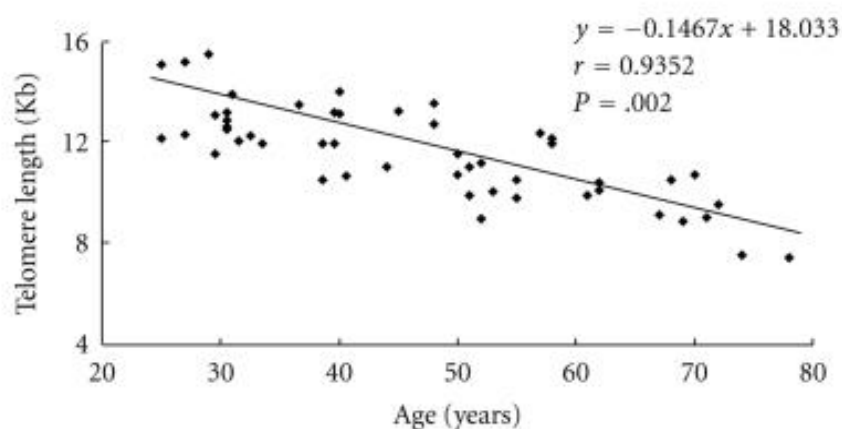


Figure 8 : Relation entre l'âge et la longueur des télomères dans le plasma humain mesurée par ELISA (d'après (Jiang et al., 2010)).

Cependant, dans certaines circonstances, comme l'embryogenèse ou chez les cellules souches, les cellules doivent être capables de se diviser sans raccourcissement des télomères. Dans ces situations, une transcriptase inverse spécialisée, appelée télomérase, ajoute de l'ADN à l'extrémité des chromosomes pour compenser la séquence perdue au cours de la réplication de l'ADN (Hiyama and Hiyama, 2007)(Osterhage and Friedman, 2009). Il s'agit d'un complexe ribonucléoprotéique comprenant une sous-unité protéique (TERT, Telomerase Reverse Transcriptase) qui possède l'activité catalytique et qui est associée à une sous-unité d'ARN (TR, Telomeric RNA) contenant le motif CCCCAA qui sert de matrice pour synthétiser les répétitions télomériques (Chan and Blackburn, 2004)(Nandakumar and Cech, 2013). Le nombre et le type de télomérase varient largement entre les espèces (Weng and Hodes, 2000)(Wright and Shay, 2000)(Zeng and Rao, 2007). Chez la souris, par exemple, de nombreuses cellules sont télomérase positive. Cependant, chez l'Homme, de telles cellules sont rares (Effros et al., 2003)(Masutomi et al., 2003). Par contre, les cellules de la lignée germinale et de nombreuses cellules cancéreuses expriment TERT. En outre, l'expression ectopique de hTERT est une

pratique courante *in vitro* ce qui empêche le raccourcissement des télomères et la sénescence causés par le problème de réplication. Il permet l'immortalisation de cellules humaines primaires (Shay and Bacchetti, 1997). Toutefois, la télomérase ne peut pas empêcher la sénescence causée par des dommages l'ADN non télomérique ou d'autres inducteurs de sénescence (Chen et al., 2001).

4.3.3.1.3 Réplication des télomères

L'ADN parental est répliqué par un mécanisme semi-conservatif. Les polymérases ne synthétisant l'ADN que dans une seule direction (de 5' vers 3'), les deux brins d'ADN de chaque chromosome doivent être répliqués par des processus différents. La réplication discontinue utilise des amorces ARN pour la synthèse de courts segments d'ADN appelés fragments d'Okazaki. Lorsque la fourche de réplication atteint l'extrémité d'un chromosome, la synthèse discontinue reste incomplète puisque l'amorce d'ARN du dernier fragment d'Okazaki est dégradée sans être remplacée (**Figure 9**). A chaque division cellulaire, une zone d'ADN non répliquée est donc créée aux extrémités des chromosomes, causant un raccourcissement progressif des télomères. Ce phénomène, associé à une dégradation nucléotidique des extrémités des chromosomes sur le brin retard se terminant en 5', entraîne chez l'homme un raccourcissement estimé à 100 pb par division cellulaire. Pour compenser la perte d'ADN télomérique durant la réplication, la télomérase est capable de synthétiser et d'ajouter de nouvelles séquences nucléotidiques à l'extrémité des chromosomes.

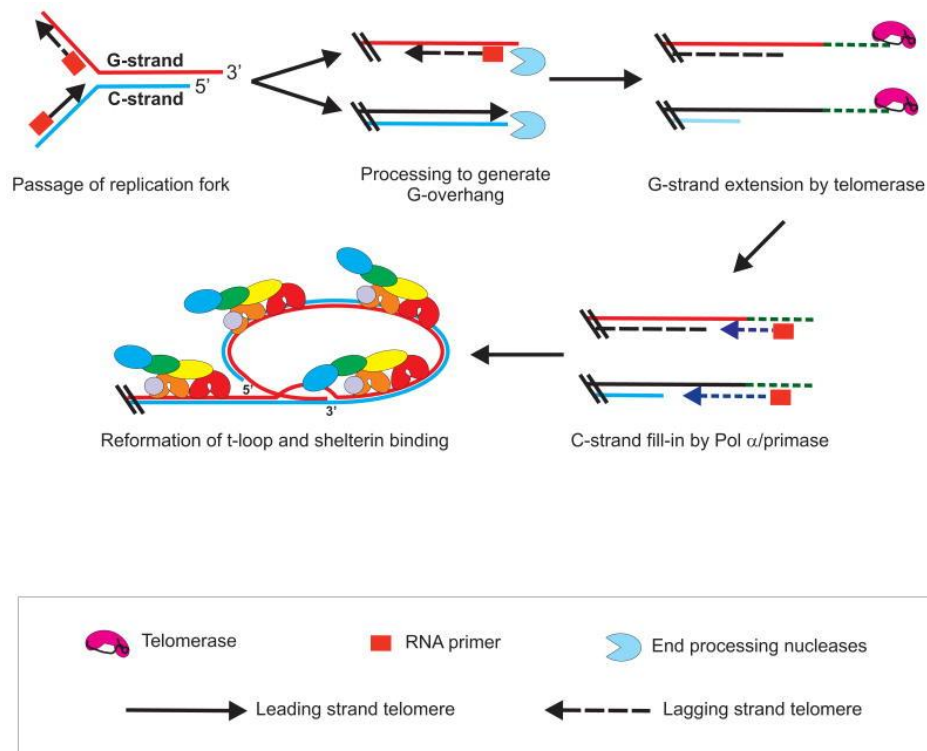


Figure 9 : Réplication semi-conservative de l'ADN.

4.3.3.1.2 Le raccourcissement des télomères induit la sénescence

Chez l'homme, il a été montré que le raccourcissement de télomères induisait la sénescence (Blackburn, 1991)(Rodier et al., 2005). Ainsi, la division cellulaire répétée en l'absence de télomérase aboutit finalement à un ou plusieurs télomères raccourcis et en conséquence non fonctionnels. Le dysfonctionnement de télomères provoque une réponse aux dommages de l'ADN (DDR pour DNA damage response) (Herbig et al., 2004) (Fagagna et al., 2003a)(Takai et al., 2003)(Gire et al., 2004a). La DDR est associée à l'apparition de foyers de la forme phosphorylée de l'histone H2AX (γ -H2AX), un marqueur de sites de cassures de l'ADN, et des protéines de DDR 53BP1, NBS1 et MDC1. En outre, les kinases ATM et ATR sont activés dans les cellules sénescents (Fagagna et al., 2003b). Après amplification du signal DDR, ces kinases activent les kinases CHK1 et CHK2. La communication entre les facteurs associés au DDR et la machinerie du cycle cellulaire est provoquée par phosphorylation et activation de plusieurs protéines du cycle cellulaire, y compris CDC25 (famille de phosphatases) et p53 (Fumagalli et al., 2012) (Zglinicki et al., 2005) (Hemann et al., 2001) (Fagagna et al., 2003c). Ensemble, ces changements peuvent induire un arrêt de la prolifération transitoire, permettant aux cellules pour réparer leur dommage. Toutefois, si les dommages de l'ADN dépassent un certain seuil, les cellules sont destinés soit à l'apoptose soit à la sénescence (Martens et al., 2000). Les facteurs entraînant ce résultat différentiel sont encore inconnus, mais le type de cellule et l'intensité et la durée du signal, ainsi que la nature des dommages, sont susceptibles d'avoir des rôles importants (d' Adda di Fagagna, 2008).

Autre p53, la sénescence répliquative est lié au suppresseur de tumeur RB et ses partenaires de signalisation, y compris p16INK4a. En effet, l'activation à la fois du voies p53 et p16Ink4a-RB est essentielle pour l'induction de la sénescence dans une variété de souches de cellules humaines (Ben-Porath and Weinberg, 2005)(Campisi, 2005).

4.3.3.2 Sénescence prématurée

La sénescence peut également être induite indépendamment du raccourcissement des télomères ou du dysfonctionnement télomérique, par une variété de conditions. Ce type de sénescence a été appelé sénescence prématurée. Divers stimuli peuvent ainsi induire un état sénescents comme la surexpression de certains oncogènes (Land et al., 1983), le stress oxydant (Sherr and DePinho, 2000b) (von Zglinicki et al., 1995) ou des conditions de culture inadéquates (Wright and Shay, 2002)(Forsyth et al., 2003)(Parrinello et al., 2003)(Benanti and Galloway, 2004). En effet, les cellules cultivées *in vitro* après leur obtention à partir des organes doivent s'adapter à un environnement artificiel qui est caractérisé par des concentrations anormales de nutriments et de facteurs de croissance et la présence de niveaux d'O₂, ainsi que l'absence de cellules environnantes et des composants de la matrice extracellulaire. Un ou plusieurs de ces conditions peuvent provoquer un stress, ce qui conduit à la sénescence induite

par stress (Sherr and DePinho, 2000b). Ce type d'arrêt du cycle cellulaire est indépendant de la longueur des télomères. Il est également présent dans les cellules de souris qui expriment la télomérase (Prowse and Greider, 1995) et qui ont de télomères longues (Kipling and Cooke, 1990). L'allongement de la durée de vie des cellules peut être obtenue en culture dans un milieu non supplémenté en sérum avec un certain nombre de facteurs de croissance (Loo et al., 1987) ou par la mise en culture dans des conditions physiologiques d'oxygène (Parrinello et al., 2003). De plus, le stress oxydant induit l'arrêt de la réplication dans les cellules humaines en culture (Packer and Fuehr, 1977)(Chen et al., 1995)(Yuan et al., 1995), tandis que le potentiel réplicatif des cellules épithéliales et mélanocytes humains est dépendent de la composition de la milieu de culture (Ramirez et al., 2001)(Bennett and Medrano, 2002)(Bennett, 2003).

La sénescence des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) a été éliminée par inactivation de p53 ou par ablation simultanée des gènes de la famille RB (Tanaka et al., 1994)(Dannenberg et al., 2000)(Sage et al., 2000). Ainsi, l'immortalisation des cellules de mammifères nécessite non seulement le maintien des télomères, mais aussi des conditions de culture optimales (Mathon et al., 2001)(Ramirez et al., 2001)(2002).

Oncogènes : la sénescence induite par Ras

En 1997 il a été montré que la protéine oncogénique Ras pouvait induire la sénescence prématurée, dans les cellules HDFs et MEF (Serrano et al., 1997). Dans la sénescence induite par Ras (RIS pour Ras induced senescence ou OIS pour oncogen induced senescence), les cellules initialement prolifèrent plus rapidement en raison de l'impact des stimuli mitogéniques anormales (Lin et al., 1998). Ce phénotype mitotique est alors remplacé progressivement par le phénotype de sénescence. *In vivo* l'OIS est retrouvée dans certaines tumeurs pré-néoplasiques ou bénignes, comme les adénomes du poumon et les néoplasies pancréatiques (Dench et al., 2005)(Braig et al., 2005)(Chen et al., 2005)(Collado et al., 2005)(Michaloglou et al., 2005a)(DeNicola et al., 2011). Ainsi l'OIS peut être un modèle d'étude pour les premières étapes de la tumorigenèse, qui comprennent une série de réponses d'après la première réaction des cellules au stress mitotique. Contrairement à la sénescence répllicative, l'OIS ne peut pas être contournée par l'expression de hTERT, ce qui confirme son indépendance du raccourcissement de télomères (Wei et al., 1999).

L'une des caractéristiques partagées par sénescence répllicative et l'OIS est la participation critique des voies p53 et RB-p16 et l'autre est la formation de SAHF (*voir plus loin*) (Narita et al., 2003a)(Ohtani et al., 2001)(Zhang et al., 2005a)(Haferkamp et al., 2009a). En outre, bien que la sénescence induite par oncogènes n'entraîne pas le raccourcissement des télomères, de nombreux oncogènes induisent une DDR robuste en raison de l'altération de l'ADN qui est causée par la réplication de l'ADN anormal. Cette DDR a un rôle causal dans l'initiation et à la fois le maintien de l'OIS, car sa régulation à la baisse empêche la sénescence, permet la

prolifération cellulaire et prédispose à la transformation oncogénique des cellules.

Dans les cellules murines, l'inactivation fonctionnelle de p53 ou de son régulateur directe en amont, p19ARF, est suffisante pour contourner la sénescence induite par RAS^{V12} (Kamijo et al., 1997)(Serrano, 1997). Dans les cellules humaines, p16^{Ink4a} semble jouer un rôle plus important que p53 dans l'OIS (Ben-Porath and Weinberg, 2005). Bien que p19ARF est activé par des signaux oncogéniques et provoque la sénescence dans les cellules murines, il ne semble pas jouer un rôle tout aussi dominante dans les cellules humaines (Wei et al., 2001)(Michaloglou et al., 2005a). En effet, les mécanismes d'OIS ne semblent pas être les mêmes pour tous les types de cellules (Michaloglou et al., 2005a)(Haferkamp et al., 2009b). Cela est également illustré par le fait que la sénescence induite par RAS^{V12} peut être contournée par l'abrogation de la voie p16-RB (Serrano et al., 1997), la sénescence déclenché par BRAF^{E600} ne peut pas être contournée par l'inactivation fonctionnelle de p16, soit seul (Michaloglou et al., 2005a) ou en combinaison avec l'inactivation de p14ARF (Haferkamp et al., 2009b).

4.3.3.3 Régulation transcriptionnelle dans la sénescence

Différents groupes ont mise en évidence des mécanismes impliqués dans la régulation transcriptionnelle de la sénescence. Ainsi, deux voies sont particulièrement impliquées, les voies p53 et p16pRB (Seshadri and Campisi, 1989)(Seshadri and Campisi, 1990) (Beauséjour et al., 2003)(Olsen et al., 2002)(Michaloglou et al., 2005a).

4.3.3.3.1 Le voie p53

Un premier rôle de la voie p53 a été montré dans la senescence induite par oncogènes. Cette voie est régulée en plusieurs points par des protéines telles que la protéine ubiquitine ligase E3 HDM2, et la protéine ARF (alternate-reading-frame), qui inhibe l'activité de HDM2 (Sherr and McCormick, 2002). p21 est une cible transcriptionnelle crucial de p53 et un médiateur de la sénescence p53-dépendante (Brown et al., 1997). Différents études montrent que la réduction des protéines p53, p21 ou liées au DDR (par exemple, ATM ou CHK2) empêchent la sénescence induite par érosion de télomères ou dommages de l'ADN, et dans certaines cellules (par exemple, celles qui expriment peu ou pas p16), ce phénomène peut même inverser la sénescence (Di Micco et al., 2006)(Beauséjour et al., 2003)(Fagagna et al., 2003c)(Gire et al., 2004b)(Brown et al., 1997)(Won et al., 2006). La réduction des protéines p53, p21 ou liées au DDR ne peuvent souvent pas être maintenus, cependant, les télomères deviennent finalement sévèrement érodées, conduisant à un état de grande instabilité génomique et à la mort cellulaire. La DDR et la voie p53 fournissent une première ligne de défense contre le cancer en empêchant les cellules avec de l'ADN endommagé, qui sont à

risque de développer des mutations oncogéniques, de proliférer (Bartkova et al., 2005)(Gorgoulis et al., 2005). Cependant, la perte de p53 conduit généralement à la mort cellulaire (Shay and Wright, 2005).

4.3.3.3.2 Le voie p16-pRB

Pour de nombreuses cellules, y compris de nombreuses souches de fibroblastes humains (Parrinello et al., 2005), la prolifération est spontanément limitée par le «stress», ce sénescence dépend du suppresseur de tumeurs p16, un inhibiteur de kinases cycline-dépendante (Ohtani et al., 2004). L'oncogène RAS induit également l'expression de p16 et ceci en activant des facteurs de transcription ETS (Ohtani et al., 2001)(Hara et al., 1994).

4.3.3.3.3 Sénescence contrôlée par les voies p53 et p16-pRB

Les signaux inducteurs de la sénescence, comme DDR ou le dysfonctionnement de télomères, engagent généralement soit la voie p53 soit la voie p16-pRB (**Figure 10**). Certains signaux, comme les oncogènes RAS, engagent les deux voies. p53 est régulée négativement par la protéine E3 ubiquitine ligase HDM2, ce qui facilite sa dégradation, HDM2 étant régulée négativement par la protéine ARF (alternate-reading-frame). p53 établit l'arrêt de la croissance lors de la sénescence par induction de l'expression de p21, un inhibiteur de kinases dépendantes de cyclines (CDK) qui supprime la phosphorylation et donc l'inactivation de pRB. Les signaux de sénescence qui engagent la voie p16-pRB agissent par induction de l'expression de p16, un autre inhibiteur de CDK qui empêche la phosphorylation et l'inactivation de pRB. pRB arrête la prolifération cellulaire par suppression de l'activité de E2F, un facteur de transcription qui stimule l'expression de gènes qui sont nécessaires pour la progression du cycle cellulaire. E2F peut également réduire la prolifération par induction de l'expression ARF, qui s'engage dans la voie p53. Il y a donc une régulation mutuelle entre la voie p53 et la voie p16-pRB.

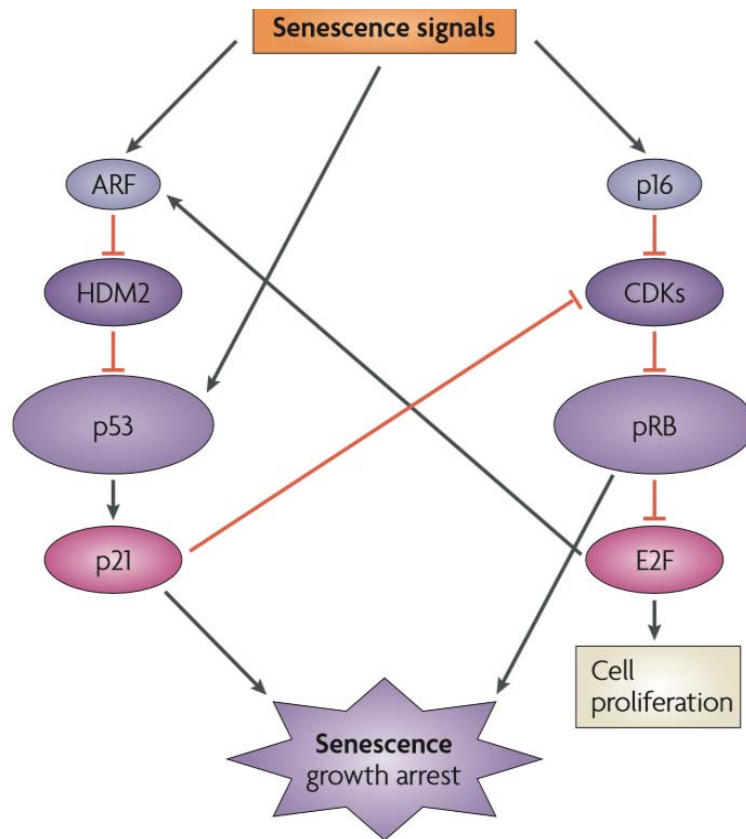


Figure 10 : Voies impliquées dans la sénescence (d'après (Campisi and d' Adda di Fagagna, 2007)).

4.3.3.4 Les marqueurs de sénescence cellulaire

Les cellules sénescentes présentent un phénotype particulier et caractéristiques moléculaires diverses, à la fois *in vitro* ou *in vivo*. Ces biomarqueurs pourraient soit être la cause soit être le résultat de la sénescence, mais pourraient également être des sous-produits des changements physiologiques. Ces marqueurs ne sont pas, cependant, ni uniques ni spécifiques de cellules sénescentes.

4.3.3.4.1 L'arrêt du cycle cellulaire

L'arrêt stable du cycle cellulaire est la caractéristique substantielle de la sénescence et également un signe indispensable pour identifier la sénescence *in vitro*. Cependant, ce phénomène n'est pas uniquement existant dans la sénescence cellulaire. Par exemple, l'inhibition de la prolifération apparaît aussi dans la différenciation terminale (Kuilman et al., 2010). Une différence essentielle est que la différenciation est habituellement déclenchée par des signaux physiologiques et généralement ne comporte pas les réseaux de suppresseurs de tumeurs. Ainsi, bien que l'arrêt du cycle cellulaire constitue un biomarqueur indispensable pour la sénescence, ne peut pas être utilisée tout seul pour identifier la sénescence cellulaire.

Afin de vérifier si les cellules sont sorties du cycle cellulaire, l'absence de l'antigène de prolifération Ki-67 peut être étudiée dans des cellules en culture ou sur des coupes de tissus. L'ajout du BrdU (bromodéoxyuridine, BrdU) dans le milieu de culture cellulaire, afin d'examiner la synthèse de l'ADN est une autre alternative. De plus, la proportion de cellules qui sont dans les différentes phases du cycle cellulaire peut être déterminée par cytométrie en flux (Wada et al., 2004)(Abdallah et al., 2009).

4.3.3.4.2 Transformation morphologique

La sénescence cellulaire est généralement accompagnée par des modifications morphologiques. Lors de la sénescence, le cycle cellulaire s'interrompt et la réplication de l'ADN s'arrête. Bien que le teneur d'ADN dans des cellules sénescents est similaire à celle des cellules normales, la quantité d'ARN et des protéines est significativement élevée (Schneider and Shorr, 1975)(De Cecco et al., 2011). En effet, bien que pendant le processus de la sénescence la vitesse de synthèse protéique diminue, les systèmes de dégradation de protéines faiblissent, résultant en une accumulation des protéines durablement dans les cellules (Kaftory et al., 1978)(Fred Dice, 1989). L'accumulation de macromolécules entraîne des changements morphologiques dans les cellules sénescents. Ainsi, les cellules deviennent larges, aplaties et multinuclées avec une augmentation significative de particules intracellulaires (Goldstein, 1990) (Mitsui and Schneider, 1976) (Kurz et al., 2000). Les caractéristiques morphologiques de cellules sénescents peuvent être évaluées quantitativement par imagerie ou cytométrie en flux.

4.3.3.4.3 L'activité beta-galactosidase associée à la senescence (SA-β-gal)

La SA-β-GAL est un biomarqueur de sénescence couramment utilisé (Dimri et al., 1995)(Debacq-Chainiaux et al., 2009a). L'enzyme lysosomale βD-galactosidase, codée par le gène Glb1, présente une activité accrue dans les cellules sénescents (Debacq-Chainiaux et al., 2009a). En outre, les cellules non sénescents présentent une activité β-galactosidase lysosomal qui fonctionne de façon optimale à pH 4 (Kurz et al., 2000). En conséquence, l'augmentation de l'activité β-GAL dans les cellules sénescents est probablement due à une augmentation des lysosomes, donnant lieu à une augmentation de l'activité β-galactosidase qui peut être mesurée aussi à pH 6 sous-optimale (Kurz et al., 2000)(Yang and Hu, 2005). La présence du biomarqueur SA- β gal est indépendante de la synthèse d'ADN. Cependant ce marqueur est aussi exprimé dans certaines cellules à prolifération rapide et chez les cellules en culture lorsqu'elles sont à confluence.

4.3.3.4.4 Activation des réseaux suppresseurs de tumeurs

Les cascades de signalisation médiées par p16INK4a et p53-RB activent le programme de sénescence (Lowe et al., 2004). Par conséquent, ces deux marqueurs ont été utilisés comme

biomarqueurs pour identifier les cellules sénescents. Dans les fibroblastes humains en sénescence répliquative ou prématurée, p53-RB s'accumule sur sa forme hypophosphorylée active (Stein et al., 1990)(Serrano, 1997)(Lin et al., 1998)(Atadja et al., 1995)(Vaziri, 1997)(Bunz et al., 1998). Un de ses activateurs primaires, p16Ink4a, est couramment induite dans les cellules sénescents dans de nombreux contextes *in vitro* (Serrano, 1997)(Campisi, 2005). L'induction de p16INK4a est souvent également observée chez les souris sénescents et des lésions humaines *in vivo* (Poele et al., 2002)(Collado and Serrano, 2005)(Michaloglou et al., 2005b)(Gray-Schopfer et al., 2006)(Dhomen et al., 2009).

4.3.3.4.5 Les foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF)

Une autre caractéristique de cellules sénescents est l'apparition dans leurs noyaux de foyers de chromatine condensée. Ces foyers sont appelés SAHF (senescence-associated heterochromatin foci) (Narita et al., 2003b). L'hétérochromatine correspond à des zones condensées de la chromatine et transcriptionnellement inactives. Les SAHF ne sont pas de l'hétérochromatine constitutive mais de l'hétérochromatine dite facultative car elle est induite au cours de la sénescence. Les SAHF contiennent des protéines caractéristiques de l'hétérochromatine : HP1 (heterochromatin protein 1), le variant d'histone macroH2A et l'histone 3 méthylée sur la lysine 9 (H3K9m) (Zhang et al., 2005b)

4.3.3.4.6 La résistance à l'apoptose

Il a été montré que les cellules sénescents expriment des protéines anti-apoptotiques. Une autre caractéristique importante des cellules sénescents est qu'elles sont résistantes à la mort programmée par apoptose via l'augmentation d'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2 (B-cell CLL/lymphoma 2) ou BCL-xL (BCL-2-related protein, long isoform) (Wang, 1995) (Rochette and Brash, 2008).

Objectifs

Le programme de recherche proposé dans ce travail consiste à étudier les propriétés des CSM-MO en fonction de l'âge des donneurs et de l'expansion *in vitro*. En effet ces cellules sont souvent proposées comme candidates à des autogreffes ou des allogreffes pour la médecine régénérative.

Ainsi, l'objectif de ce travail est de vérifier si l'âge des donneurs et l'expansion *in vitro* ont une influence sur les propriétés des CSM-MO en termes de prolifération, clonogénicité, phénotype, multipotence et expression génique. La connaissance de ces paramètres est nécessaire pour pouvoir utiliser les CSM-MO dans des projets d'applications cliniques. Nous allons nous intéresser également à l'étude de la fréquence de certaines sous-populations cellulaires ainsi qu'à l'apparition de cellules sénescents (**Figure 11**).

En fine cette étude devrait permettre de confirmer et de déterminer des paramètres de contrôle qualité à mettre en place pour l'utilisation des CSM-MO en médecine régénérative et de contribuer à la connaissance des mécanismes impliqués dans le vieillissement de CSM.

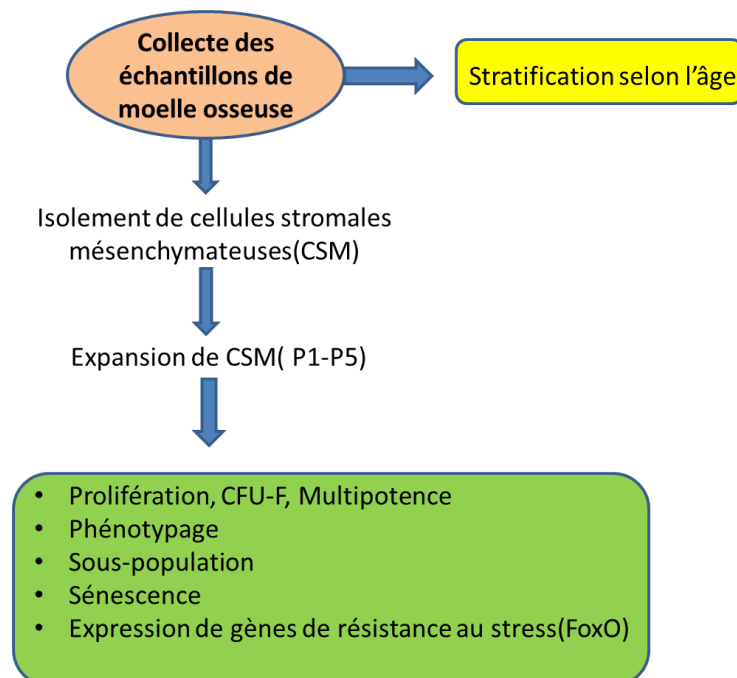


Figure 11 : Les différents objectifs de la thèse.

Résultats

1. Effet de l'âge du donneur et le temps d'expansion *in vitro* sur le potentiel de prolifération et de différenciation des CSM de moelle osseuse.

Cette partie du travail est constituée de deux articles. Le premier a permis de montrer le lien entre la diminution des capacités de prolifération de CSM-MO avec l'âge de donneurs et la diminution de la clonogenicité, cette étude étant réalisée après une subculture de cellules (passage 1). Le deuxième article présente un travail réalisé afin de comparer l'effet de l'âge des donneurs et du temps de culture (de passage 1 à passage 5) non seulement sur les propriétés de prolifération mais aussi de différenciation de CSM-MO. Un résumé de méthodes utilisées lors de ces deux études sera présenté pour continuer par la présentation des principaux résultats.

Culture des CSM issues de la moelle osseuse

Isolement des CSM-MO

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont isolées à partir d'échantillons de moelle osseuse (MO) prélevées chez des donneurs sains dans le cadre d'allogreffe au niveau de l'Unité de Thérapie Cellulaire et Tissulaire (UTCT) au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Nancy-Brabois ou lors de pose de prothèse de hanche au niveau du service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (COT) au CHU de Nancy. La MO est récupérée dans un tube de PBS (Phosphate Buffer Saline) (GIBCO, réf 14190) hépariné (SIGMA, H3393-50KU) (10 unités/mL) (U/mL) pour inhiber la coagulation plaquettaire. La liste des prélèvements utilisés dans cette étude est détaillée dans l'annexe.

20 mL de milieu complet α MED (Lonza, Réf BE12-169F) sont ajoutés à la suspension de moelle osseuse, ensuite centrifugée pendant 10 minutes (min) à 300 g pour séparer les cellules des liquides (milieu de culture et sérum). Le milieu α MED (Lonza, Réf BE12-169F) est dit complet après avoir été supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) (10 % V/V) (SIGMA, Réf F7524), en Pénicilline/Streptomycine (10 mU/mL) (GIBCO, Réf 15070-063) et en Amphotéricine B (2,5 μ g/mL) (GIBCO, Réf 15290-026). Du milieu complet α MED est à nouveau ajouté, puis seules les cellules mononuclées sont comptées sur cellule de Thoma et mises en culture. Pour cela, 190 μ L d'une solution de Leucoplate (SOBIODA, Réf W3102.002250) sont ajoutés à 10 μ L de la suspension cellulaire pour effectuer le comptage des cellules mononuclées en l'absence des globules rouges, qui sont lysés par cette solution après un temps d'incubation de 3 min à température ambiante (TA). Enfin les cellules sontensemencées à 50 000 cellules mononuclées/cm² en flasks 75 cm² (Corning, Réf 430641), puis cultivées avec du milieu complet α MED à 37°C, 90 % d'humidité et 5 % CO₂. Les CSM ont la propriété d'adhérer au plastique contrairement aux autres cellules de la moelle (telles que CSH) qui seront éliminées lors des changements de milieu. A ce stade les cellules sont à

passage 0. L'entretien de la culture se fait deux fois par semaine avec du milieu complet α MEM.

Expansion

Après 14 jours de culture les cellules sont trypsinées. Les cellules en flasks de 75 cm² sont rincées 2 fois avec 5 mL de PBS (GIBCO, réf 14190), puis, une solution de trypsine à 0,025% (GIBCO, Réf 25300-054) est ajoutée dans la boîte de culture et laissée au contact des cellules pendant 5 min à 37 °C, 90 % d'humidité et 5 % CO₂. Pour inhiber l'action de l'enzyme, 5 mL de milieu complet α MEM sont ajoutés. La suspension cellulaire est récupérée et centrifugée à 300 g pendant 10 min. Après avoir éliminé le surnageant, le culot cellulaire est repris dans 10 mL de milieu complet α MEM et les cellules sont dénombrées (*cf ci-dessous*) avant d'être remis en culture à une densité de 1000 cellules/cm² dans des Flasks 75 cm² (Corning, Réf 430641U) à passage 1 et permettre l'amplification des cellules. Cette étape est renouvelée jusqu'au P5. A chaque passage, les analyses sont réalisées après 14 jours de culture.

Dénombrement

60 μ L de suspension cellulaire sont mélangés à 20 μ L de bleu trypan (SIGMA, Réf T8154). 20 μ L sont déposés dans une cellule de Thoma. Le nombre de cellules comptées dans tout le quadrillage est multiplié par 10000 (car le volume du quadrillage est de 0,1 μ L) et par le facteur de dilution afin d'obtenir le nombre de cellules/mL.

Congélation

Après trypsination, une partie du culot cellulaire peut être repris à 4 °C dans du milieu de congélation composé de SVF-DMSO 10 % (V/V) (Dymethyl Sulfoxid, FISHER BioReagents, Réf BP 231-1) à une densité d'au moins 1 million par tube. La suspension cellulaire est ensuite déposée dans un cryotube que l'on place dans une boîte de congélation « Coolcell® » (PROTEIGENE, Réf BCS-136) pendant au moins 4 heures à -80°C permettant de descendre la température de 1 °C/minute. Les cryotubes sont ensuite conservés à -196 °C dans de l'azote liquide.

Décongélation

Pour remettre en culture les cellules conservées dans l'azote liquide, la suspension cellulaire est ramenée à 37°C en la mélangeant avec du milieu complet α MEM à cette même température. Après centrifugation pendant 10 min à 300 g, le culot cellulaire est remis en suspension dans du milieu complet et les cellules sontensemencées avec du milieu complet α MEM à une densité de 1000 ϕ /cm².

Clonogénicité

Les CSM sontensemencées dans des boîtes rondes de culture de 60 cm² (Nunc, Réf 150350) à raison de 100 cellules/boîte pour la détermination des CFU (Colony Forming Unit) de P1 à P5. Le nombre de CFU est obtenu après coloration au cristal violet (SIGMA, Réf HT90132-1L) des boîtes rondes de culture. Pour cela, les cellules sont lavées 3 fois avec 5 mL de PBS (GIBCO, réf 14190) et incubées pendant 15 min avec 3 mL de cristal violet (SIGMA, Réf HT90132-1L) (violet de cristal 2.3% - oxalate d'ammonium 0.1% - éthanol 20%). Les cellules sont ensuite rincées avec de l'eau distillée et les boîtes sont numérisées grâce au scanner GS-800 (BIORAD). La taille et le nombre de CFU sont analysés grâce au logiciel ImageJ (National Institutes of Health, USA).

Calcul de la prolifération

Le « Population Doubling » (PD)

Le « population doubling » ou PD est déterminé pour les passages P1 à P5. Il correspond au nombre de fois où la cellule a doublé depuis son isolement et est calculé à partir de la formule suivante :

$$PD = \log(N_i/N_x) / \log 2$$

N_i : le nombre de cellules initial

N_x : le nombre de cellules après trypsination

Le « doubling time » (DT)

Le « doubling time » ou le temps de doublement d'une population correspond au temps moyen dont a besoin cette population pour doubler son effectif. Il a été calculé selon la méthode de série temporelle en 2 point :

$$DT = t \cdot \ln(2) / (\ln(N_x) / \ln(N_i))$$

t : temps de culture

N_i : nombre de cellules initial

N_x : nombre de cellules après trypsination

Phénotypage par cytométrie en flux

Après avoir trypsiné et congelé les cellules à différents passages, celles-ci sont décongelées et lavées dans du PBS (GIBCO, réf 14190) pour ensuite être bloquées pendant 5 min à température ambiante (TA) dans du PBS-BSA 0,5 % (SIGMA-ALDRICH, Réf HT90132). Les cellules sont ensuite marquées avec des anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques couplés à la phycoérythrine (PE) ou au isothiocyanate de fluorescéine (FITC) pendant 45 min à TA. La liste des anticorps utilisés dans ce travail est présentée dans l'annexe. Pour chaque

échantillon des contrôles isotypiques sont réalisés en parallèle. Après un dernier lavage en PBS, 300 µL de PBS sont rajoutés et les cellules sont passées au cytomètre en flux (CMF) Gallios (BECKMAN COULTER).

Différenciation des CSM de MO

Culture

Après trypsination à P0 et P3, les CSM de MO sont ensemencées à P1 et P4 en plaques 24 puits (CORNING, Réf 3524) dans des milieux de culture spécifiques pour induire la différenciation ostéocytaire (O) (3100 cellules/cm²) (LONZA, Réf PT-3924) et adipocytaire (A) (21000 cellules/cm²) (LONZA, Réf PT-3102A et PT-3102B). Pour la différenciation chondrocytaire (C), les cellules seront ensemencées sous formes de pellets (150000 cellules/pellets) dans des tubes de culture de 15 mL (CORNING, Réf 430791) dans un milieu de culture spécifique (LONZA, Réf PT-3925) contenant le facteur de croissance *Transforming Growth Factor beta 3* (TGF-B3). Le détail de la procédure et des compositions des différents milieux est décrit dans le protocole fourni par la société Lonza (*cf annexe*). Les cellules sont cultivées pendant 21 jours pour la différenciation A et O et pendant 28 jours pour la différenciation C avant de procéder à la mise en évidence de la différenciation par la coloration. Conformément à la procédure fournie avec les milieux de la société Lonza, les milieux de culture des cellules pour la différenciation O et C sont changés 2 fois par semaine. En revanche pour la différenciation A, 3 cycles induction (3 jours)/maintenance (1 à 3 jours) sont réalisés dès que les cellules cultivées dans l' α MED (Lonza, Réf BE12-169F) complet sont arrivées à confluence. Des contrôles négatifs sont réalisés en parallèle pour chaque différenciation : milieu complet α MED pour la différenciation O et C et milieu de maintenance pour la différenciation A.

Coloration

Coloration rouge alizarine

La coloration rouge alizarine permet de mettre en évidence les sels calciques en rouge, spécifiques des ostéocytes. Après avoir lavé 3 fois les puits par 1 mL de PBS (GIBCO, réf 14190), les cellules sont fixées pendant une 1 heure à 4 °C par de l'éthanol 70 % froid à raison de 0,5 mL par puits. Les puits sont ensuite lavés 3 fois par 1 mL d'eau distillée. La coloration s'effectue ensuite pendant 30 min à température ambiante après ajout de rouge alizarine 40 mM à raison de 0,5 mL par puits. Après avoir lavé 3 fois les puits par 1 mL d'eau distillée, la plaque est séchée à TA.

Les puits colorés sont ensuite photographiés au microscope inversé (Leica, DMI 3000B) à l'objectif X10 afin d'avoir une appréciation qualitative de la différenciation. Les images sont aussi analysées par le logiciel Image J (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, USA) afin de quantifier la différenciation.

Un dosage après extraction du colorant rouge alizarine est réalisé afin d'estimer l'efficacité de la différenciation par une seconde méthode. Pour cela 0,5 mL par puits d'Hexadecylpyridinium chloride monohydrate (CPC) 10 % (V/V dans de l'eau) (SIGMA, Réf C9002-25G) est rajouté afin de dissoudre le colorant. 50 µL du surnageant sont ensuite prélevés et déposés dans une plaque 96 puits (GREINER BIO ONE, Réf 655101) afin de lire l'absorbance à 570 nm au spectrophotomètre (Varioskan Flash, THERMO SCIENTIFIC). Les puits différenciés sont comparés aux puits témoins non différenciés.

Coloration oil red

La coloration Oil red O permet de mettre en évidence les vésicules lipidiques en rouge spécifiques des adipocytes. Après avoir lavé 3 fois les puits par 1 mL de PBS (GIBCO, réf 14190), les cellules sont fixées pendant une heure à TA par formaldéhyde (VWR, Réf 20913.284) 10 % dilué dans du PBS à raison de 0,5 mL par puits. Les puits sont ensuite lavés 1 fois par 1 mL d'isopropanol 60% (CARLO ERBA, Réf 415213). La coloration s'effectue ensuite pendant 30 min à température ambiante après ajout de la solution de coloration à raison de 0,5 mL par puits. La solution de coloration est composée de 3 volumes d'oil red O (SIGMA, Réf O0625-25G) à 0,5 % (p/V) dans de l'isopropanol pur (CARLO ERBA, Réf 415213) pour 2 volumes d'eau distillée. Après avoir lavé 3 fois les puits par 1 mL d'eau distillée, la plaque est séchée à TA.

Les puits colorés sont ensuite photographiés au microscope inversé (Leica, DMI 3000B) à l'objectif X10 afin d'avoir une appréciation qualitative de la différenciation. Les images sont aussi analysées par le logiciel Image J (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, USA) afin de quantifier la différenciation.

Un dosage après extraction du colorant oil red est réalisé afin d'estimer l'efficacité de la différenciation. Pour cela 250 µL par puits de DMSO (FISHER BioReagents, Réf BP 231-1) sont rajoutés afin de dissoudre les vésicules lipidiques. 50 µL du surnageant sont ensuite prélevés et déposés dans une plaque 96 puits (GREINER BIO ONE, Réf 655101) afin de lire l'absorbance à 510 nm au spectrophotomètre (Varioskan Flash, THERMO SCIENTIFIC). Les puits différenciés sont comparés aux puits témoins non différenciés.

Coloration Bleu alcian/Kernechtrot

Le Bleu Alcian permet de mettre en évidence les mucopolysaccharides. A un pH acide (pH 1,3), il colore uniquement les polysaccharides sulfatés en bleu comme les GAG (sauf l'acide hyaluronique qui n'est pas sulfaté). Il met ainsi en évidence indirectement les protéoglycannes spécifiques de la matrice extracellulaire des chondrocytes. Pour visualiser plus précisément les cellules, le noyau est coloré en rouge avec une solution de Kernechtrot.

Les pellets sont fixés par de paraformaldéhyde 4% (PAF 4%) (Sigma, Réf P6148-500G) pendant 24 heures au moins et sont ensuite placés entre deux rectangles de mousse (BIOPSY FOAM PADS, SIMPORT, Canada, réf. M476-1) dans des cassettes en plastique (SIMPORT, Réf

M490-6). Les cassettes sont placées dans un appareil de déshydratation ASP 300S (LEICA, Allemagne) 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 après avoir été conservés à -20°C pendant au moins 24 heures de manière transversale en tranche d'une épaisseur de 5 µm, à l'aide d'un microtome (Leica, Réf RM 2135) et les coupes sont déposées sur des lames histologiques (Menzel-Gläser SUPERFROST®, Thermo Scientific, Réf LCSF02). Enfin les échantillons sont passés successivement dans différents bains d'alcool décroissants pour les réhydrater, puis sont colorés et déshydratés par un appareil de coloration comme décrits succinctement dans le Tableau 5 : .

Tableau 5 : Protocole de coloration Bleu Alcian

Bleu Alcian	
Réactifs	Temps (min)
Tissue Clear	10
Alcool 100°	5
Alcool 95°	5
Alcool 70°	5
Lavage	5
Bleu alcian	60
Bleu alcian	60
Lavage	5
Kernechtrot	5
Lavage	5
Alcool 95°	0,5
Alcool 100°	0,5
Tissue Clear	5
Total	171

Les échantillons seront colorés avec du Bleu Alcian (SEARLE DIAGNOSTIC, Réf M/N24) dilué à 0,1 %. à un pH de 1,3, solution de Kernechtrot (0,5 g de poudre de Kernechtrot (MERCK, 5189), 25 g de sulfate d'aluminium (PROLABO, Réf 21070297) dissous dans 500 mL d'eau distillée. Après la coloration, les lames histologiques sont montées sous lamelles avec une résine synthétique PERTEX (BALER, Réf 02407831) pour permettre l'observation des colorations avec un microscope optique (LEICA, DMD 108).

L'analyse des images par le logiciel Image J (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, USA) permet de quantifier la coloration et donc d'estimer l'efficacité de la différenciation chondrocytaire.

ARTICLE 1:

Donor's age dependent proliferation decrease of human mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity

Yueying Li, Naceur Charif, Didier Mainard, Danièle Bensoussan, Jean-François Stoltz, Natalia de Isla.

Bio-Medical Materials and Engineering 2014;24(1 Suppl):47-52.

Ce travail a été réalisé lors de ma première année de thèse d'Université. Il avait pour objectif d'étudier l'effet de l'âge du donneur sur la capacité prolifération des cellules souches mésenchymateuses isolées à partir de moelle osseuse humaine. Nous avons réalisé cette étude à passage 1 et nous avons étudié la prolifération cellulaire *via* le temps de doublement, la clonogénicité et nous avons contrôlé le phénotype cellulaire. Ce travail représente la première étape de notre projet pour laquelle nous avons utilisé 17 échantillons (3-85 ans).

METHODOLOGIE :

Les CSM ont été obtenues à partir de la moelle osseuse de 17 donneurs. Ces donneurs ont été regroupés selon leur âge en 4 groupes (0-20 ans, 20-40 ans, 40-60 ans, > 60 ans). Le phénotype (CD45, CD34, CD73, CD90, CD105 et HLA-DR), la prolifération et la clonogénicité des cellules ont été évaluées.

RESULTATS ET CONCLUSIONS :

Les résultats ont montré que les CSM provenant de donneurs jeunes ont une capacité de prolifération supérieure aux CSM provenant de donneurs âgés, tandis que ce phénomène est accompagné par une diminution de la clonogénicité. En effet, il existe une corrélation négative entre le temps de doublement et le nombre de colonies par échantillon à P1 ($r = -0,893$ et $p < 0,05$) indiquant ainsi que les fortes capacités de proliférations sont liées au nombre de cellules capables de former des colonies. En revanche, aucun changement n'a été observé dans le phénotype cellulaire en lien avec l'âge de donneurs. En conclusion, cette étude a montré un effet de l'âge de donneurs sur la capacité de prolifération des cellules souches mésenchymateuses isolées à partir de la moelle osseuse qui a été corrélée à une diminution de clonogénicité. Cet étude a conduit ainsi à poursuivre ce travail afin d'élargir le nombre de prélèvements et d'étudier des autres propriétés de CSM et en particulier leur différenciation,

et ceci lors de l'expansion *in vitro*.

ARTICLE 2:

Human Bone marrow Mesenchymal stromal cells from aged donors show heterogeneity in proliferation capacity but homogenous diminished osteogenic and chondrogenic differentiation.

Yueying Li, Naceur Charif, Laila Benameur, Didier Mainard, Ying-Ping Li, Ghislaine Cauchois, Danièle Bensoussan, Jean-François Stoltz, Natalia de Isla.

Stem Cell and Development (Soumis).

Ce travail a été réalisé dans le but d'étudier l'effet de l'âge du donneur et le temps de l'expansion *in vitro* sur les différentes propriétés de base de CSM provenant de la moelle osseuse : capacité de prolifération, formation de CFU-F, phénotype et multipotence.

METHODOLOGIE :

Nous avons étudié dans cette partie du travail 24 échantillons de moelle osseuse provenant de donneurs d'âges différents. Les échantillons ont été séparé en 4 groupes en fonction de l'âge (<20 ans; 20-40 ans; 40-60 ans; >60 ans), puis en deux groupes ($\pm$ 40 ans). La stratégie expérimentale est présentée dans la **Figure 12**.

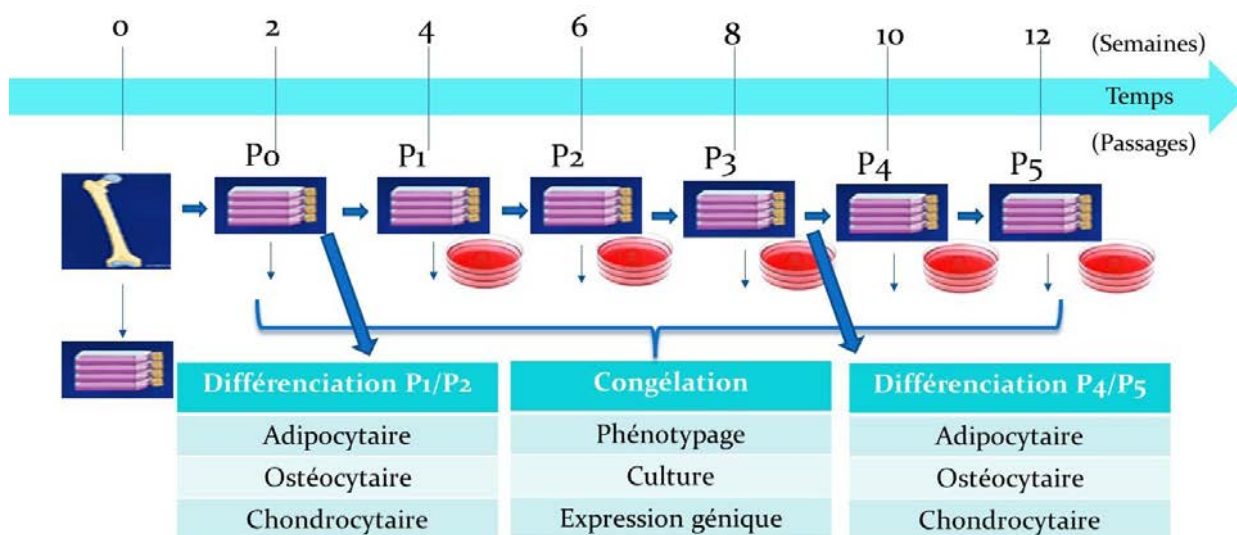


Figure 12 : Représentation schématique de la stratégie expérimentale.

RESULTATS ET CONCLUSIONS :

Prolifération des CSM-MO en fonction de l'âge des donneurs

Les résultats de l'expansion des CSM-MO depuis leur isolement à partir de la moelle osseuse montrent des capacités de prolifération différentes suivant l'âge des donneurs. Afin d'analyser les résultats, quatre tranches d'âge ont été choisies : <20 ans, 20-40 ans, 40-60 ans et >60 ans. Le choix a été réalisé à partir des données bibliographiques (Baker et al., 2015; Sethe et al., 2006b; Wagner et al., 2008). Les résultats présentés dans la **Figure 13** montrent une augmentation du nombre de PD cumulés en fonction des passages quel que soit la tranche d'âge. Cependant cette augmentation est différente selon la tranche d'âge. En effet la comparaison du nombre de PD cumulés après 5 passages montre une diminution progressive et significative de ce paramètre avec l'augmentation de l'âge (<20 ans-PD=20 ; 20-40 ans-PD=17 ; 40-60 ans-PD=12 et >60 ans-PD=8). **Ces résultats reflètent les capacités de prolifération des CSM-MO qui sont différentes selon l'âge des donneurs.**

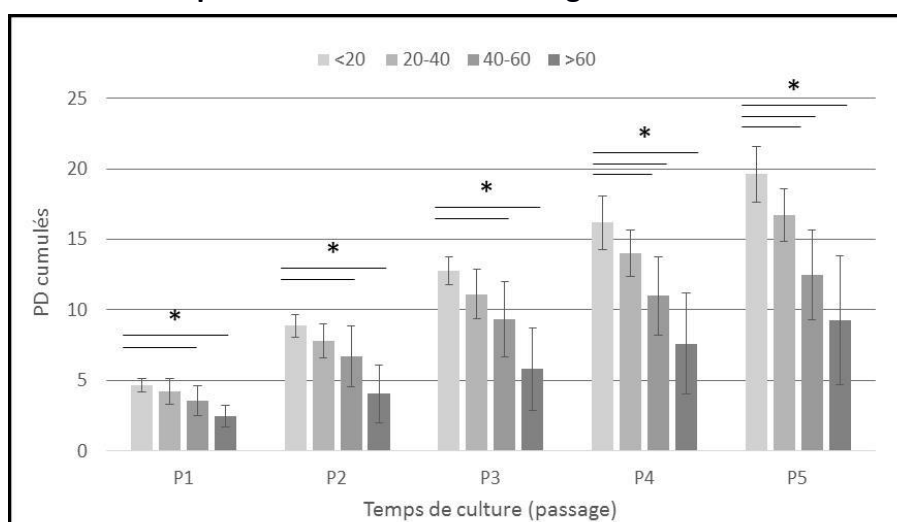


Figure 13 : Prolifération – Représentation graphique du nombre de « population doubling » (PD) cumulés en fonction du temps de culture (en passage) pour les 4 tranches d'âges.

Un passage a une durée de 14 jours. Pour chaque groupe, les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SD, $p < 0,05$.

Etant donné l'absence de différences significatives entre les PD cumulés des CSM-MO provenant des donneurs de moins de 20 ans par rapport à ceux de 20-40 ans la population de donneurs a été séparée au niveau de l'âge de 40 ans comme le montre le graphique de la **Figure 14**. Le PD cumulés des CSM-MO des deux tranches d'âges augmente mais différemment. Pour les CSM-MO provenant de donneurs âgés de moins de 40 ans le PD cumulé passe de 4 (P1) à 18 (P5) tandis que pour les CSM-MO provenant de donneurs âgés de plus de 40 ans il passe de 2,5 (P1) à 10 (P5). Les différences sont là aussi significatives. **Ces résultats montrent bien, encore une fois, que la capacité de prolifération des CSM-MO est corrélée à l'âge des donneurs.**

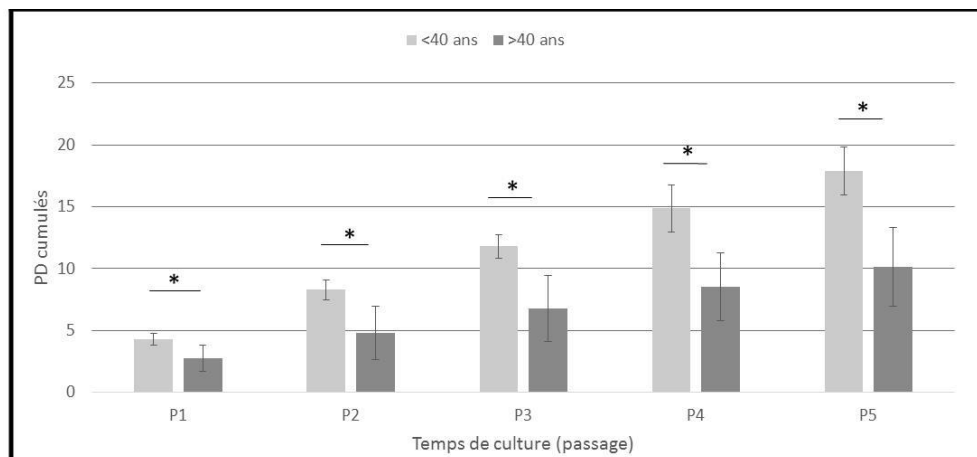


Figure 14 : Prolifération – Représentation graphique du nombre de « population doubling » (PD) cumulé en fonction du temps de culture (en passage) pour 2 tranches d'âges.

Un passage a une durée de 14 jours. Pour chaque groupe, les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SD, $p < 0,05$.

Contrôle qualité des CSM-MO

Clonogénicité en fonction de l'expansion et de l'âge des donneurs

Les résultats de l'étude de la clonogénicité des CSM-MO grâce au test des CFU représentés dans la **Figure 15** montrent que le nombre de colonies diminue en culture avec l'expansion *in vitro* de P1 à P5 pour les CSM-MO <40 ans. De plus une différence significative entre les deux tranches d'âge a été observée à P1, P2 et P3 (**Figure 15**). Concernant la taille des colonies, celle-ci diminue avec l'expansion *in vitro* pour les CSM-MO <40 ans mais est stable pour les CSM-MO >40 ans. De plus il existe une différence significative entre la taille des colonies à P1, P2 et P3 entre les CSM-MO provenant de donneurs âgés de plus ou moins 40 ans.

Le contrôle qualité de la clonogénicité des CSM-MO provenant de donneurs d'âges différents montre que le nombre et la taille des colonies diminue *in vitro* de P1 à P5 en particulier pour les CSM-MO <40 ans.

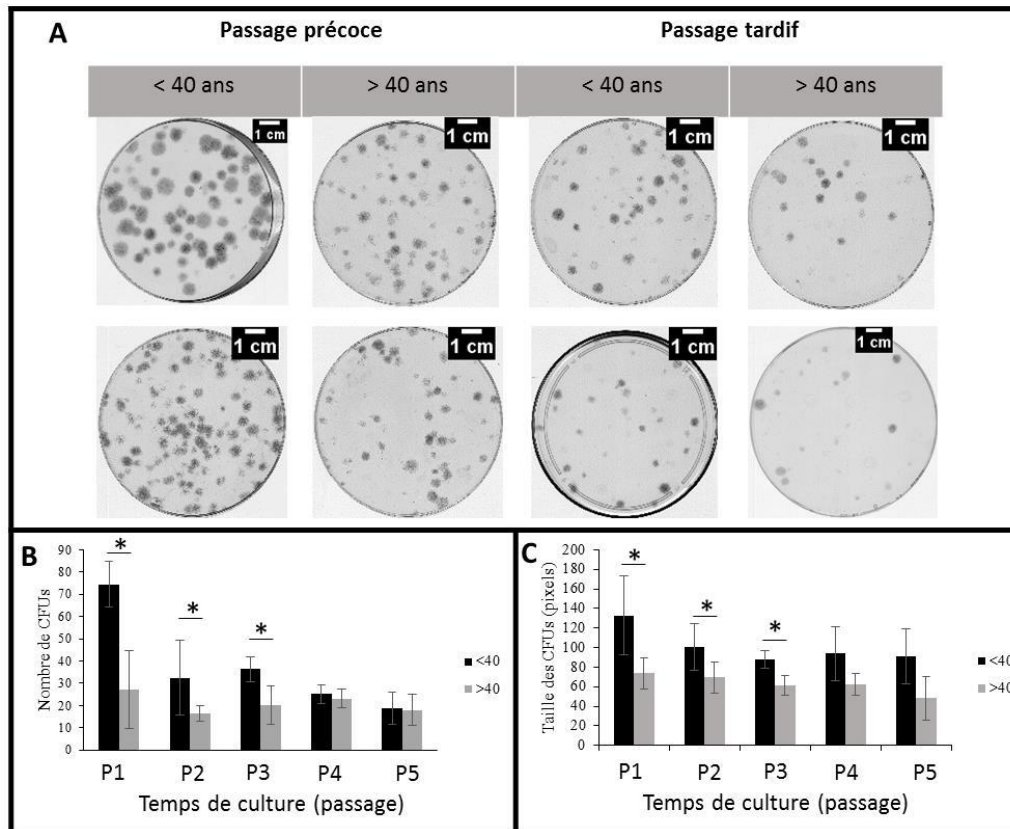


Figure 15 : Clonogénicité des CSM-MO de donneurs âgés de +/- 40 ans à du passage 1 à 5.

Les colonies formées à partir des CSM-MO<40 ans (n=13) et CSM-MO>40 ans (n=11) de passage 1 à passage 5 sont colorées au cristal violet et les plaques sont ensuite numérisées. Les images à passage précoce (P1) et tardif (P5) sont représentées (A). Une barre d'échelle représente 1 cm. Les colonies ont ensuite pu être comptées (B) et leur taille mesurée (C) grâce au logiciel d'analyse d'image ImageJ (National Institutes of Health, USA). Pour chaque groupe, les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SD, * $p < 0,05$.

Phénotypage des CSM-MO provenant de donneurs d'âges différents

L'analyse du phénotype a été réalisée pour tous les prélèvements et l'expression des marqueurs de surface est en accord avec les recommandations de l'ISCT (Dominici et al., 2006b). En effet les cellules sont toutes négatives pour les marqueurs CD34, CD45 et HLA-DR et toutes positives pour les marqueurs CD105, CD73 et CD90. De plus l'analyse de l'intensité moyenne de fluorescence des cellules positives ne montre pas de corrélation avec l'âge des donneurs. **Le contrôle qualité du phénotype des CSM-MO provenant de donneurs d'âges différents montre qu'ils expriment les marqueurs recommandés par l'ISCT (Dominici et al., 2006b), mais que cette expression n'est pas corrélée à l'âge des donneurs.**

L'analyse des capacités de différenciation mésodermique (adipocytaire-A, ostéocytaire-O et chondrocytaires-C) des CSM-MO de donneurs d'âges différents montre que toutes les CSM-MO peuvent se différencier en adipocytes, ostéocytes et chondrocytes. Néanmoins comme le montrent les images de coloration (**Figure 16, Figure 17, Figure 18**) les différenciations A, O et C sont plus importantes à passage précoce par rapport aux passages tardifs et diminuent pour les CSM-MO >40 ans par rapport aux CSM-MO <40 ans. Ces résultats ont été confirmés quantitativement par analyse d'images et extraction de colorants suivis d'une quantification par spectrophotométrie.

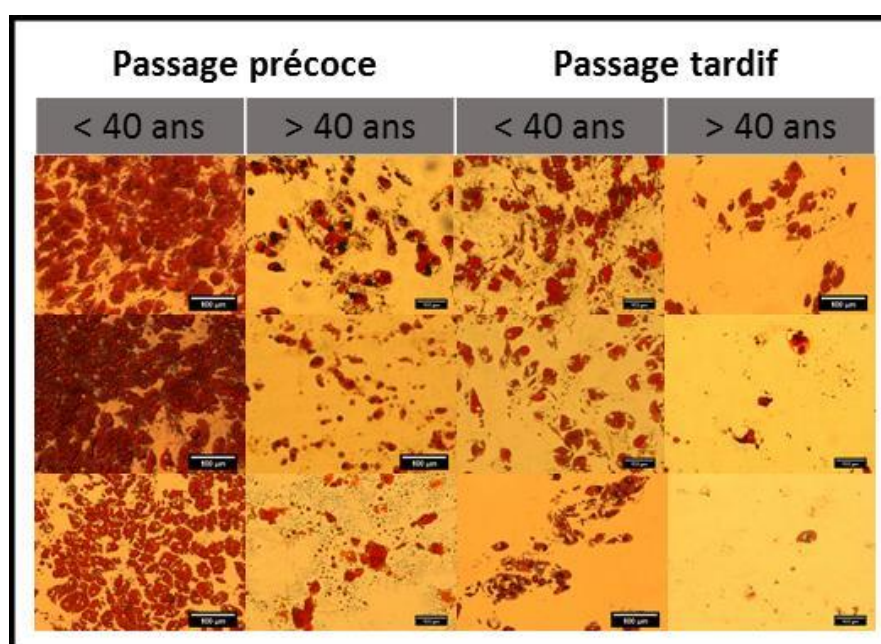


Figure 16 : Coloration oil red de CSM-MO de donneurs âgés de +/- 40 ans à passage précoce et tardif.

Après 21 jours de culture des CSM-MO dans du milieu de différenciation adipocytaire une coloration oil red O est réalisée afin de mettre en évidence les vésicules lipidiques spécifiques des adipocytes et les puits sont observés et photographiés grâce au microscope DMI 3000B (Leica) au grossissement x10. Pour chaque groupe, les images correspondent à 3 prélèvements différents. La barre d'échelle représente 100 µm.

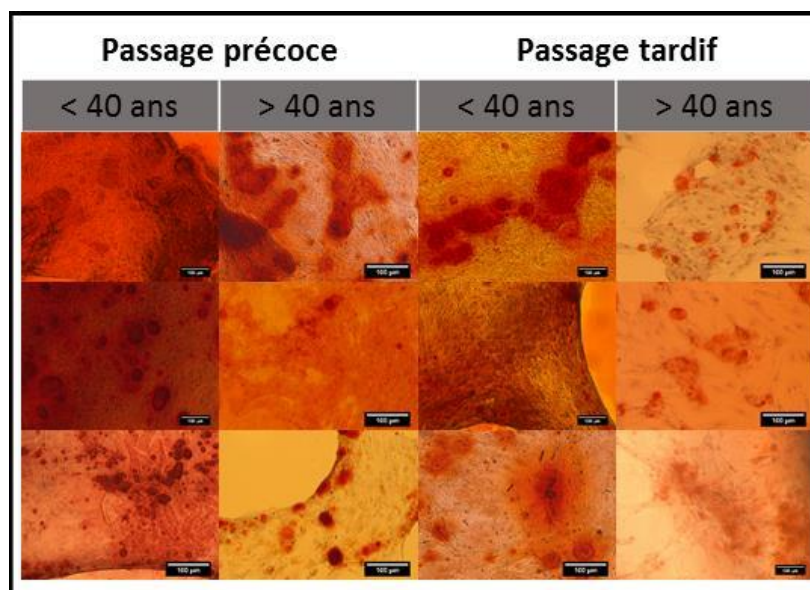


Figure 17 : Coloration rouge alizarine de CSM-MO de donneurs âgés de +/- 40 ans à passage précoce et tardif.

Après 21 jours de culture des CSM-MO dans du milieu de différenciation ostéocytaire une coloration alizarine red est réalisée afin de mettre en évidence les sels calciques spécifiques des ostéocytes et les puits sont observés et photographiés grâce au microscope DMI 3000B (Leica) au grossissement x10. Pour chaque groupe, les images correspondent à 3 prélèvements différents. Une barre d'échelle représente 100 μ m.

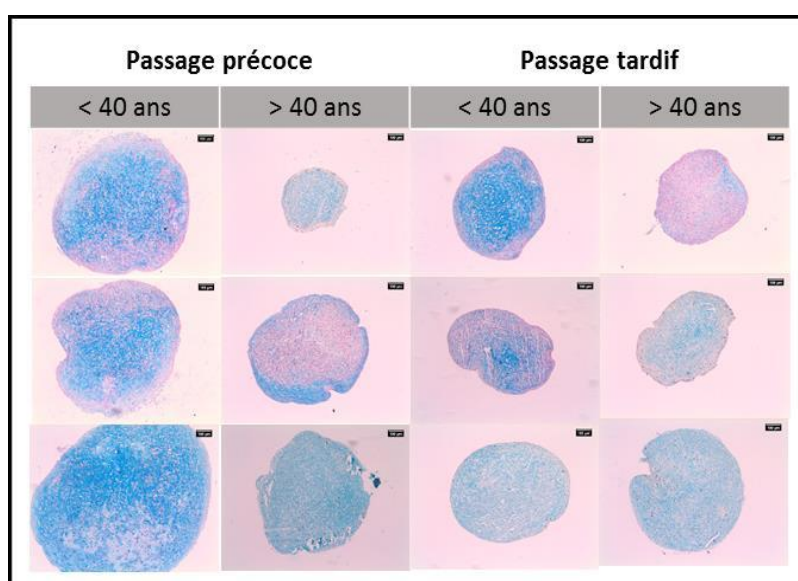


Figure 18 : Coloration bleu alcian de coupes histologiques de pellets de CSM-MO de donneurs âgés de +/- 40 ans à passage précoce et tardif.

Après 28 jours de culture des CSM-MO sous forme de pellets dans du milieu de différenciation chondrocytaire, les pellets sont inclus en paraffine, découpés et colorés au bleu alcian afin de mettre en évidence les protéoglycanes spécifiques de la matrice extra cellulaire des chondrocytes. Les lames sont observées et photographiées grâce au microscope optique (LEICA, DMD 108) au grossissement x10. Pour chaque groupe, les images correspondent à 3 prélèvements différents. Une barre d'échelle représente 100 μ m.

EXPRESSION GENIQUE DE FOXO1, FOXO3, P21 ET SOD2 SELON L'AGE DES DONNEURS

En parallèle des études précédentes, nous avons commencé une étude visant à étudier l'expression de certains gènes liés au vieillissement de CSM. L'extraction d'ARN a été réalisée selon la méthode classique utilisant le phénol/chloroforme sur des cellules récupérées après 14 jours de culture dans du qiazol. La qualité de chaque échantillon d'ARN a été vérifiée grâce aux puces « Agilent RNA 6000 Pico ». Les échantillons ont été sélectionnés en fonction de la qualité de prolifération à la fin de l'expansion à passage 5. Pour des échantillons ayant un PD cumulé à P5 >20 la prolifération sera considérée comme bonne, entre 15 et 20 elle sera moyenne et inférieure à 10 elle sera faible. L'analyse de l'expression génique a été réalisée par qPCR avec du Sybergreen dans un système de Applied.

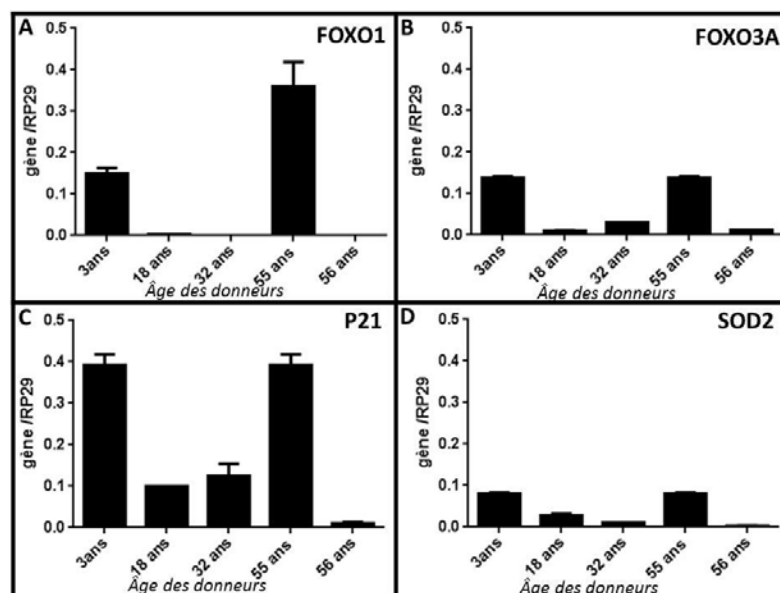


Figure 19 : Expression des gènes de longévité (FOXO1 et FOXO3A), inhibiteur du cycle cellulaire (P21) et de protection contre le stress oxydant (SOD2) dans les CSM-MO à passage 1 en fonction de l'âge des donneurs.

L'expression des différents gènes est rapportée à celle du gène codant pour la protéine ribosomale RP29. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SD duplicata technique pour chaque prélèvement.

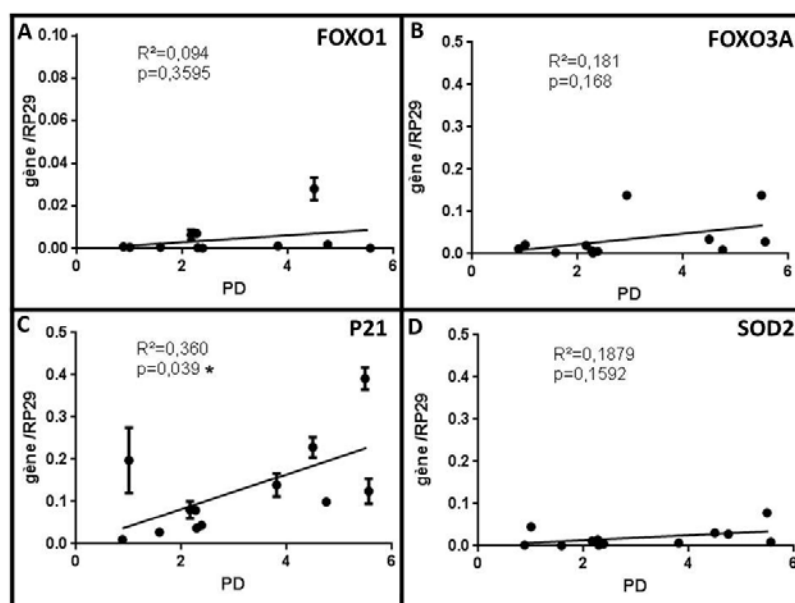


Figure 20 : Corrélation de l'expression des gènes de longévité (FOXO1 et FOXO3A), inhibiteur du cycle cellulaire (P21) et de protection contre le stress oxydant dans les CSM-MO à passage précoce en fonction de la prolifération, population doubling (PD).

L'expression des différents gènes est rapportée à celle du gène codant pour la protéine ribosomale RP29 et est corrélée à la prolifération via le population doubling (PD). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SD duplicata technique pour 5 prélèvements ($n=5$). La corrélation est calculée grâce au test de Pearson et les résultats sont considérés comme significatifs pour $p<0,05$ (*).

Les résultats de la **Figure 19** montrent que les CSM provenant de donneurs d'âges différents et appartenant au 2 tranches choisies (± 40 ans) à passage 1 expriment les gènes codant pour les facteurs de transcription FOXO1 et FOXO3A ainsi que celui codant pour l'enzyme de protection contre le stress oxydant SOD2 à des niveaux faibles par rapport au gène codant pour l'inhibiteur du cycle cellulaire P21. De plus les CSM provenant du donneur âgé de 56 ans n'expriment pas ou très peu FOXO1 et SOD2. Aucune différence significative n'est mise en évidence entre les différents âges quels que soient les gènes étudiés d'une part, et aucun lien évident ne peut être établi entre l'expression des marqueurs FOXO1, FOXO3A, P21 et SOD2 avec l'âge des donneurs d'autre part à passage 1 (**Figure 19**). Les mêmes conclusions sont faites à passage 3 (*résultats non montrés*).

C'est pourquoi la **Figure 20** représentant ces mêmes résultats d'expression génique à passage précoce (P1, P3) mais en fonction du PD qui reflète la prolifération, permettent de mettre en évidence une tendance pour chaque marqueur. Cependant seule l'expression de P21 est augmentée de manière significative en fonction du PD ($p=0,039$).

2. Effet de l'âge du donneur et le temps d'expansion *in vitro* sur les sous-populations des CSM.

Ce travail a permis d'étudier le devenir de l'expression de certains marqueurs de CSM en fonction de l'âge de donneurs et du temps de culture chez les CSM obtenues à partir de moelle osseuse. Certains de ces marqueurs pourraient caractériser des sous-populations fonctionnelles intéressantes en médecine régénérative.

METHODOLOGIE :

Les récepteurs exprimés à la surface des cellules sont reconnus spécifiquement par un anticorps directement couplé à un fluorochrome et analysées par cytométrie de flux. Le protocole a été présenté dans la partie précédente. Les caractéristiques des anticorps utilisés sont détaillées en annexe.

RESULTATS ET CONCLUSIONS :

Etant donné que les propriétés d'adhésion au plastique ne sont pas suffisantes pour caractériser les cellules souches mésenchymateuses, une étude phénotypique a été réalisée par cytométrie en flux. A ce jour aucun marqueur spécifique des CSM n'a été identifié et leur caractérisation est réalisée par l'absence et la présence des certains récepteurs. Nos résultats montrent que les cellules, cultivées en monocouche, possèdent un phénotype CD34-, CD45-, CD73+, CD90+, CD105+ et CD166+, et ceci pour tous les prélèvements étudiés. Il apparaît ainsi que les récepteurs spécifiques des cellules hématopoïétiques (CD34 et CD45) sont absents de la surface des cellules cultivées. En revanche, les cellules expriment les récepteurs CD73, CD90 et CD105. De plus, une absence d'expression de HLA-DR a été également constatée. Ce phénotype n'est pas altéré significativement lors de l'expansion de CSM *in vitro*.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression d'autres marqueurs proposés dans la littérature comme des candidats potentiels pour l'isolement de CSM, CD71, CD106, CD146 et CD200. Les résultats montrent une hétérogénéité dans l'expression de ces marqueurs dans les différents prélèvements (Figure 22 à 33). De plus, une corrélation négative entre l'âge des donneurs et le pourcentage d'expression ou l'IMF des marqueurs CD71 et CD146 a été mise en évidence (Figures 23, 24, 29 et 30). Une absence de corrélation entre l'âge des donneurs et le pourcentage d'expression ou l'IMF des marqueurs CD16 et CD200 a été observé (Figures 26, 27, 32 et 33).

Ces résultats mettent en évidence deux sous-populations de CSM-MO, CD71+ et CD146+, qui pourraient être étudiées et utilisées pour le contrôle qualité des prélèvements.

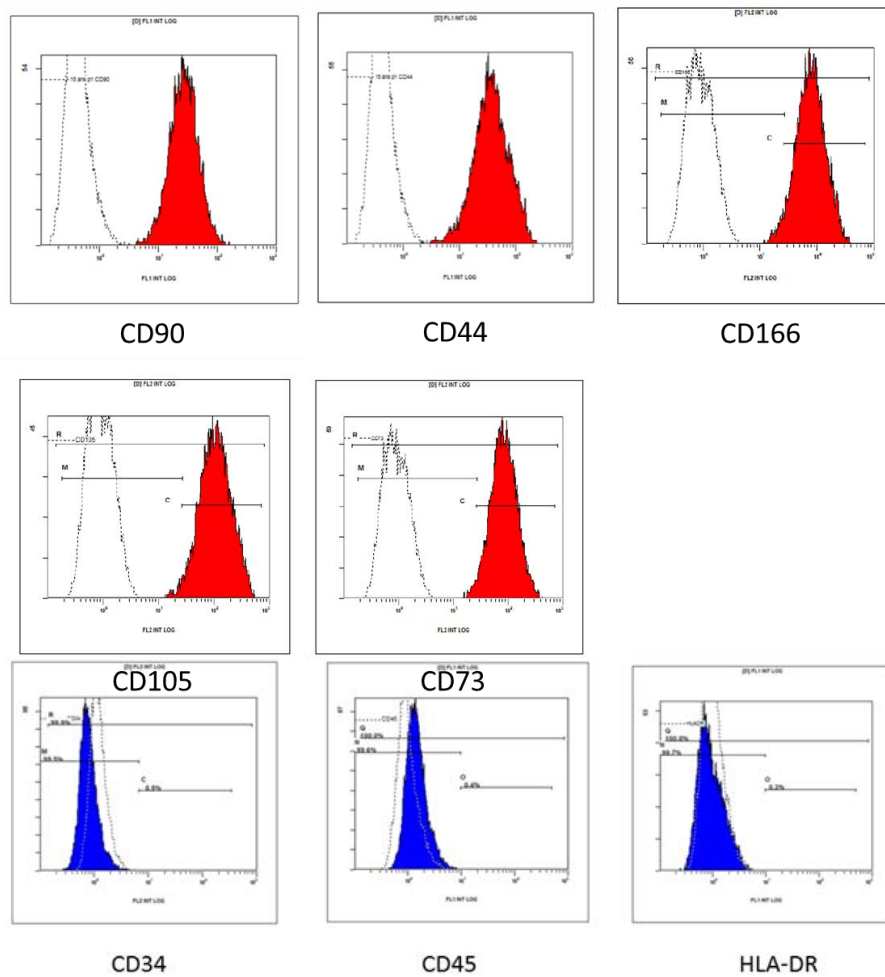


Figure 21 : Expression des marqueurs CD73, CD90, CD105, CD44 et CD166 à la surface de CSM humaines. Les marqueurs CD34, CD45 et HLA-DR sont négatifs.

Blanc : cellules marquées avec un anticorps isotypique, rouge ou bleu : cellules marquées avec les anticorps monoclonaux spécifiques des marqueurs de surface étudiés et couplés à un fluorochrome (PE ou FITC).

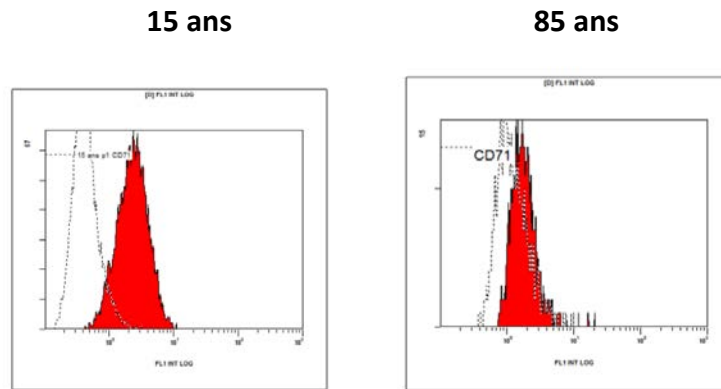


Figure 22 : Expression du marqueur CD71 à la surface de CSM humaines.

Blanc : cellules marquées avec un anticorps isotypique, rouge : cellules marquées avec l'anticorps monoclonaux spécifiques du marqueur CD71 couplé à FITC.

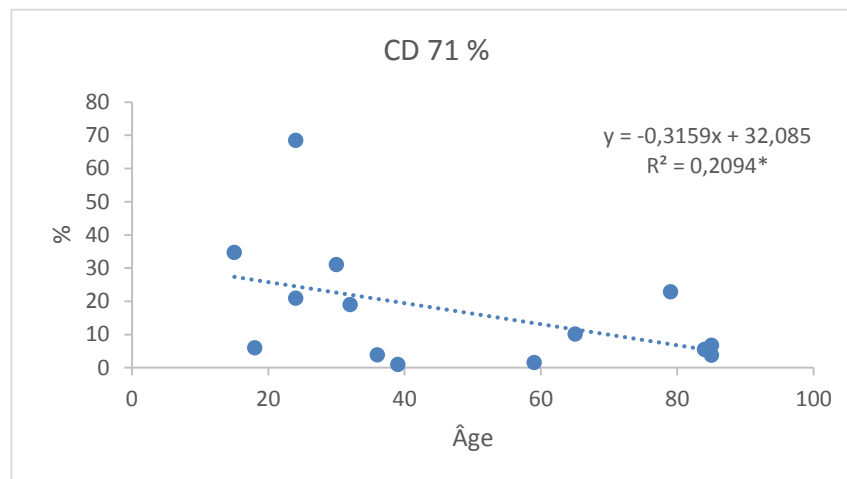


Figure 23 : Corrélation entre l'âge des donneurs et le pourcentage d'expression du marqueur CD71. *p < 0,05

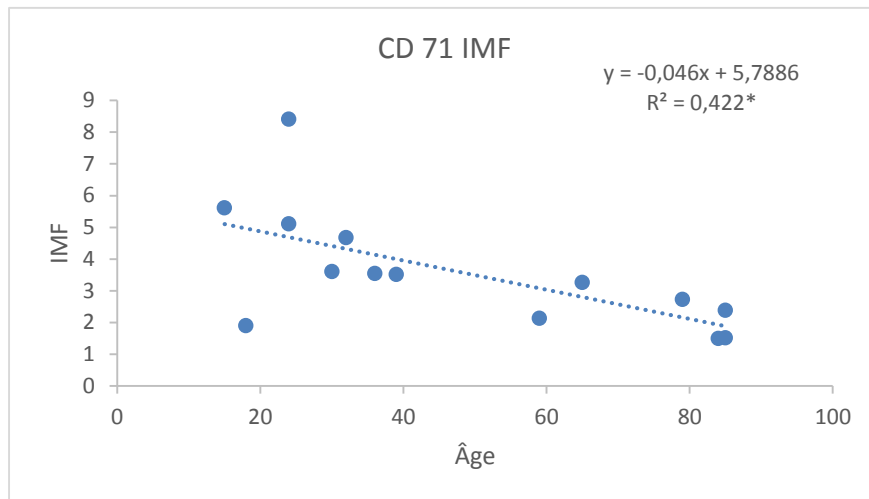


Figure 24 : Corrélation entre l'âge des donneurs et l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) du marqueur CD71. *p <0,05

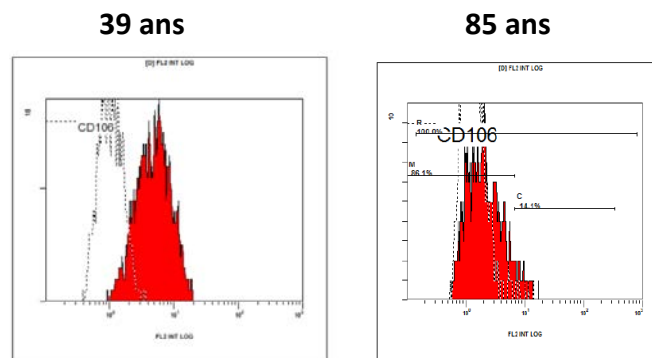


Figure 25 : Expression du marqueur CD106 à la surface de CSM humaines.

Blanc : cellules marquées avec un anticorps isotypique, rouge : cellules marquées avec l'anticorps monoclonaux spécifiques du marqueur CD106 couplé à PE.

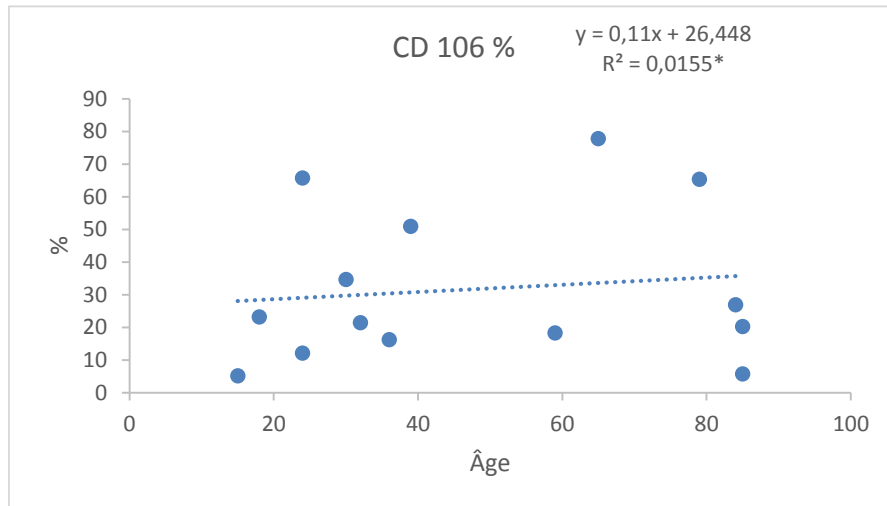


Figure 26 : Corrélation entre l'âge des donneurs et le pourcentage d'expression du marqueur CD106. *p >0,05

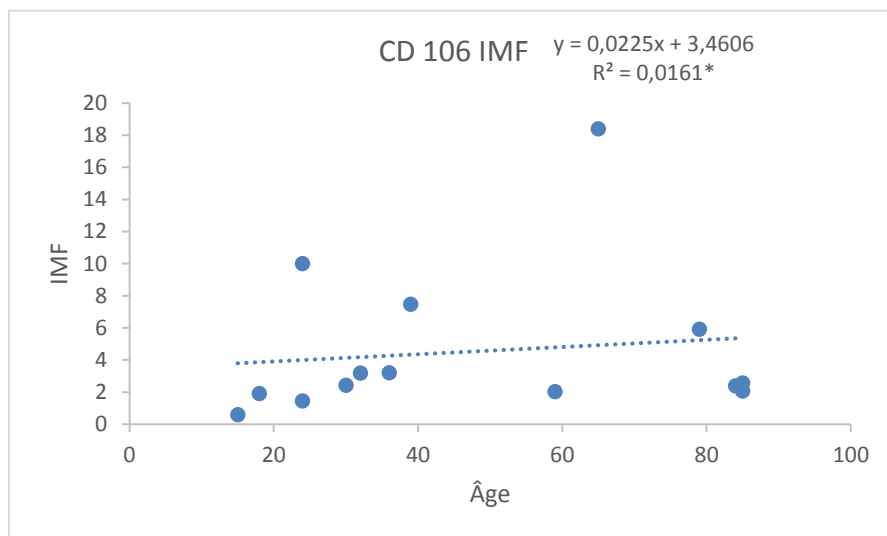


Figure 27 : Corrélation entre l'âge des donneurs et l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) du marqueur CD106. *p >0,05

15 ans

85 ans

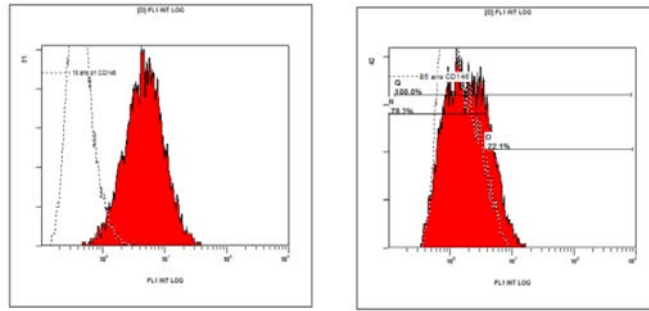


Figure 28 : Expression du marqueur CD146 à la surface de CSM humaines.

Blanc : cellules marquées avec un anticorps isotypique, rouge : cellules marquées avec l'anticorps monoclonaux spécifiques du marqueur CD146 couplé à FITC.

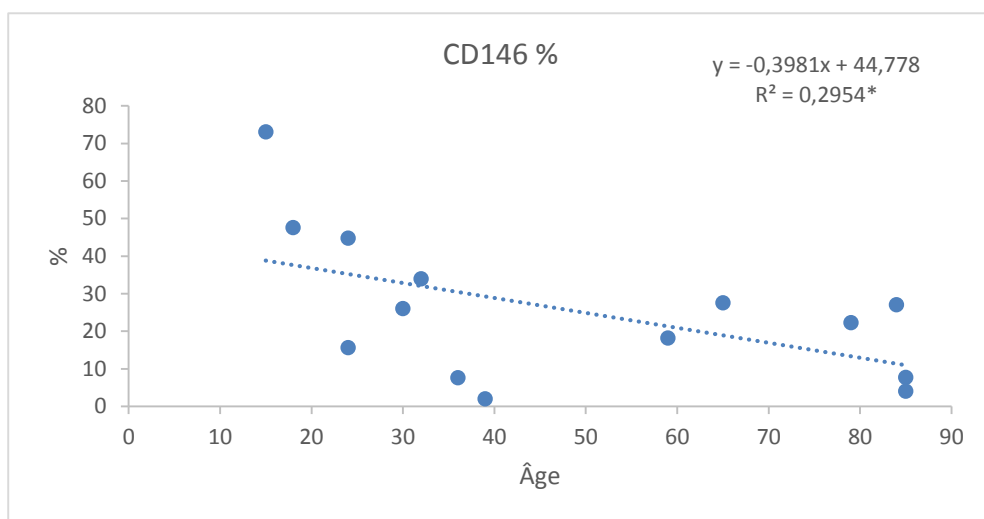


Figure 29 : Corrélation entre l'âge des donneurs et le pourcentage d'expression du marqueur CD146. *p < 0,05

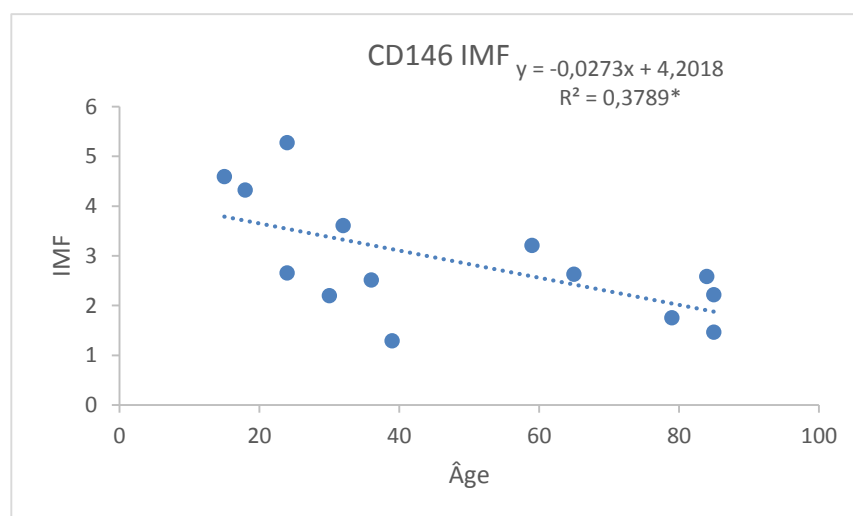


Figure 30 : Corrélation entre l'âge des donneurs et l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) du marqueur CD146. *p < 0,05

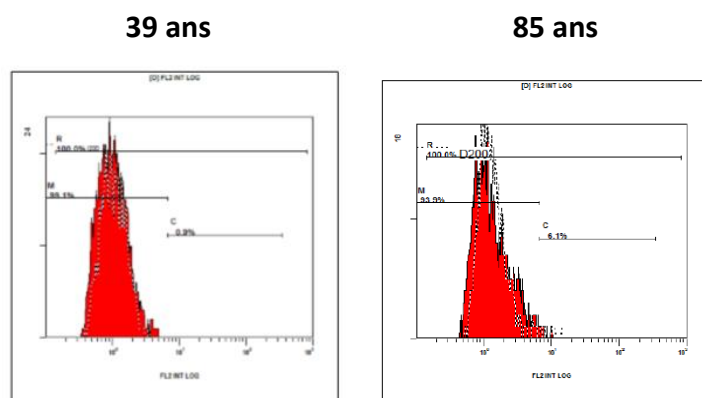


Figure 31 : Expression du marqueur CD200 à la surface de CSM humaines.

Blanc : cellules marquées avec un anticorps isotypique, rouge : cellules marquées avec l'anticorps monoclonaux spécifiques du marqueur CD200 couplé à PE.

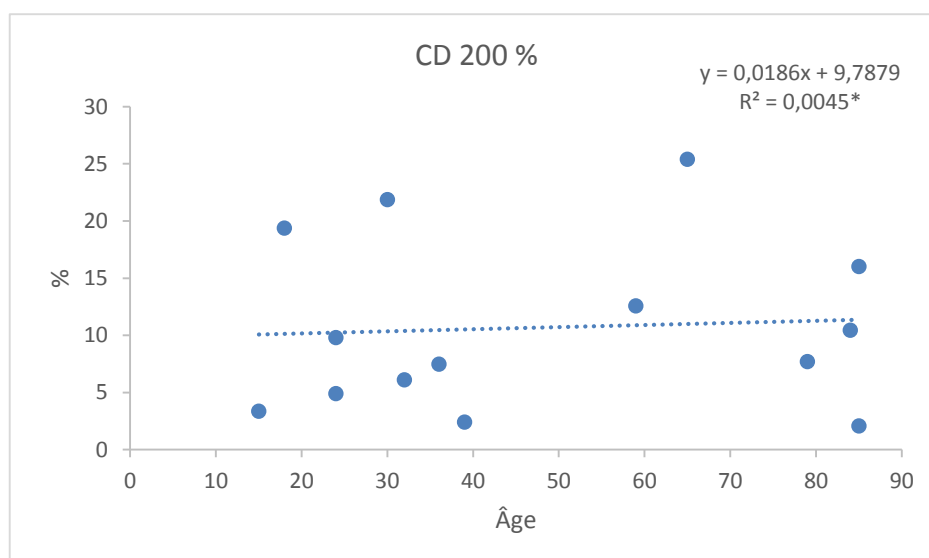


Figure 32 : Corrélation entre l'âge des donneurs et le pourcentage d'expression du marqueur CD200. *p >0,05

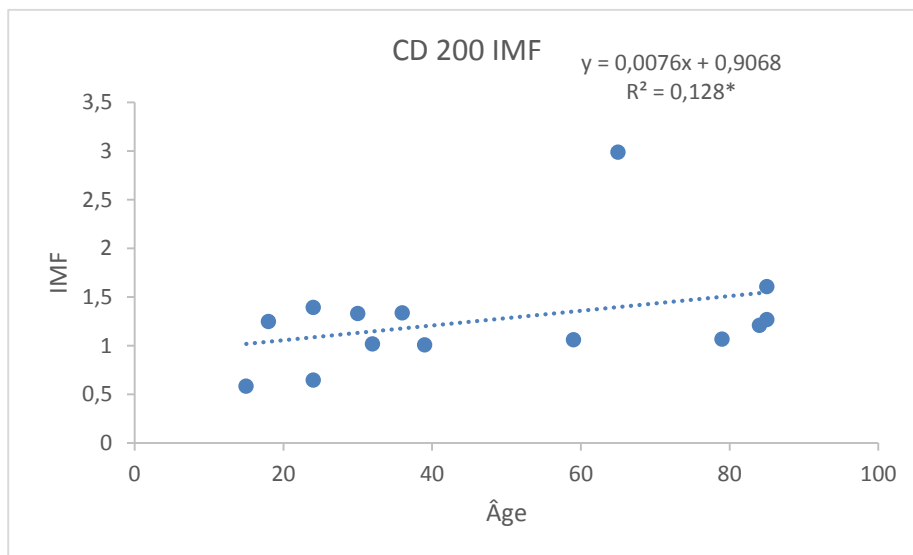


Figure 33 : Corrélation entre l'âge des donneurs et l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) du marqueur CD200. *p > 0,05

3. Effet de l'âge des donneurs et le temps d'expansion *in vitro* sur la senescence des CSM.

La senescence cellulaire, arrêt irréversible du cycle cellulaire concomitant au développement d'un phénotype sécrétoire particulier, survienne *in vitro* ou *in vivo* lors des divisions cellulaires successives mais peut également se produire de façon précoce en réponse à un stress. Nous avons ainsi étudié la survenue de la senescence chez les CSM selon l'âge de donneurs ou le temps de culture *in vitro*. Pour cela nous avons comparé le taux de cellules sénescents dans trois groupes de CSM : -40 ans, +40 ans et CSM de la gelée de Wharton (CSM-WJ) utilisées comme cellules jeunes témoins.

METODOLOGIE

Principe du test utilisé

Ce test repose sur le fait que les cellules en sénescence présentent une activité de la β -galactosidase résiduelle détectable à pH 6. La β -galactosidase est une enzyme lysosomale active à pH 4-4,5 qui hydrolyse le lactose en glucose dans toutes les cellules y compris les cellules sénescents, présénescents, quiescents ou immortelles. A pH 6, cette caractéristique n'est retrouvée que dans les cellules sénescents du fait de leur expression augmentée. Dans ce test la β -galactosidase hydrolyse son substrat chromogénique le X gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β D-galactopiranoside) libérant un produit indolique devenant bleu par oxydation et insoluble dans l'eau et précipitant au niveau du site de la réaction enzymatique. Néanmoins il est nécessaire de ne pas atteindre la confluence car les cellules à confluence sont positives pour ce test biaisant ainsi l'analyse (Debacq-Chainiaux et al., 2009b). La β -galactosidase hydrolyse ainsi son substrat chromogénique le X-Gal libérant un précipité bleu à pH 6 dans les cellules sénescents.

Méthode

Les cellules sont cultivées pendant 4 jours (J4) dans des plaques 12 puits (CORNING, Réf 3512) et lavées deux fois par 1 mL de PBS (GIBCO, Réf 14190) avant de réaliser le test de sénescence grâce au kit « Senescence β -Galactosidase Staining kit » (CELL SIGNALING, Réf 9860). Les cellules sont d'abord fixées pendant 15 min à température ambiante (TA) avec 500 μ L de solution de fixation (2% formaldéhyde-0,2% glutaraldéhyde dans du PBS). Les puits sont ensuite rincés 2 fois par 1 mL de PBS (GIBCO, Réf 14190) avant d'ajouter la solution de coloration (465 μ L de solution de coloration 1X, 5 μ L de solution de coloration supplément A, 5 μ L de solution de coloration supplément B et 25 μ L de X-gal à 20 mg/mL de diméthyl formamide (DMF (SIGMA, Réf 33120)). Les cellules sont incubées « overnight » (O/N) à 37 °C en absence de CO₂. Le lendemain matin les puits sont lavés deux fois par 1 mL de PBS (GIBCO, Réf 14190) avant de réaliser le marquage des noyaux au DAPI. 200 μ L/puits de DAPI (SIGMA

ALDRICH, Réf D9542-5MG) à 0,1 µg/ mL sont rajoutés aux cellules pendant 15 min à TA à l'abri de la lumière. Enfin les cellules sont lavées deux fois par 1 mL de PBS (GIBCO, Réf 14190) et 1 mL de PBS est rajouté par puits pour l'observation et la photographie des cellules à l'aide du microscope inversé à fluorescence Leica DMI 3000B (LEICA). Les cellules sénescents bleues sont observées en lumière transmise et le noyau de toutes les cellules marqué en bleu par le DAPI est observé en fluorescence grâce au filtre adéquat ($\lambda_{\text{excitation}} = 372 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 456 \text{ nm}$). Pour chaque puits, 5 photos représentatives du puits sont prises en lumière transmise et en fluorescence. Ainsi, il est possible de calculer un pourcentage de cellules sénescents à partir du nombre de cellules sénescents et noyaux à l'aide du logiciel d'analyse d'image ImageJ (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, USA). Les CSM issues de la gelée de Wharton (CSM-WJ) ont été utilisés dans cette partie du travail comme témoin de cellules jeunes. Ce test a été réalisé à passage précoce (passage 3, P3) et à passage tardive (passage 7, P7).

RESULTATS ET CONCLUSION

Les résultats montrent que pour les CSM-GW le pourcentage de cellules sénescents est faible à P3 et P7. Cependant, une augmentation significative de ce pourcentage est observée à P7 (23 %) par rapport à P3 (0 %) (**Figure 34** et **Figure 35**). Par ailleurs pour les CSM-MO<40 ans, le pourcentage de cellules sénescents est faible à P3 et à P7. Cependant, une augmentation significative de ce pourcentage est observée à P7 (23 %) par rapport à P3 (10 %). Aucune différence significative entre les pourcentages de cellules sénescents n'est constatée pour le même passage (P3 ou P7) par rapport aux CSM-GW (**Figure 34** et **Figure 35**). Enfin pour les CSM-MO>40 ans, le pourcentage de cellules sénescents est élevé à P3 (50 %) et à P7 (87 %) avec une augmentation significative à P7 par rapport à P3. De plus le pourcentage de cellules sénescents est significativement plus élevé à P3 et à P7 par rapport à P3 et/ou P7 des CSM-MO<40 ans et des CSM-GW (**Figure 34** et **Figure 35**).

Le pourcentage de cellules sénescents est donc plus important chez les CSM-MO>40 ans par rapport aux CSM-MO<40 ans et CSM-GW à P3 et P7 suggérant que la diminution de la prolifération des CSM-MO provenant de patient âgés est associée à l'apparition de cellules sénescents.

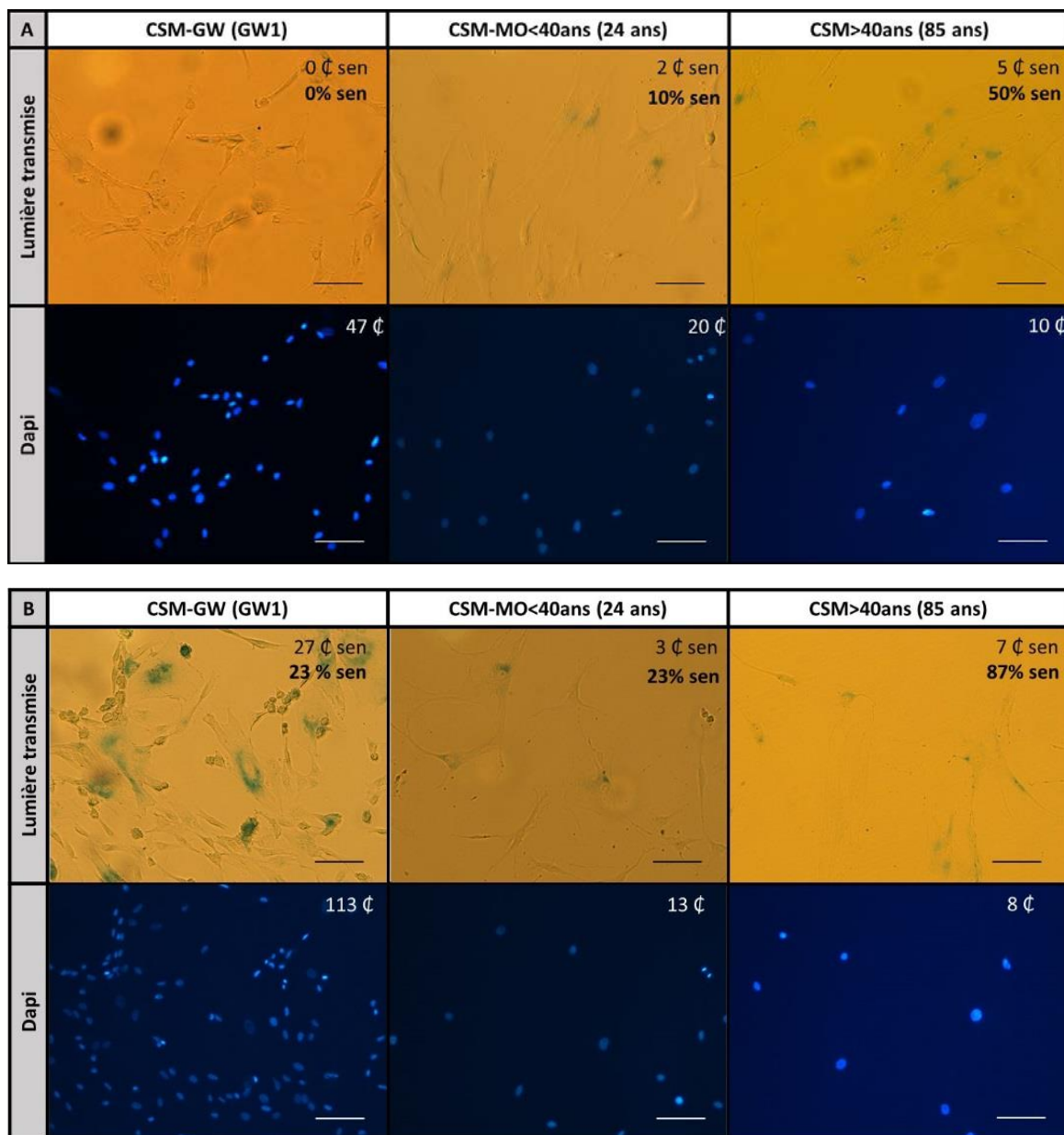


Figure 34 : Photographie des CSM-GW et CSM-MO de donneurs âgés de +/- 40 ans à passage précoce (P3) et tardif (P7) après le test de sénescence.

Le test de sénescence a été réalisé à passage 3 (A) et 7 (B) pour chaque groupe de CSM. Des images obtenues pour un prélèvement de chaque groupe ont été choisies : CSM-GW (GW1), CSM-MO<40ans (24 ans) et CSM-MO>40ans (85 ans). Les images en lumière transmise permettent d'observer le précipité bleu spécifique des cellules sénescentes (sen) et les images au DAPI permettent d'observer les noyaux des cellules. Les images sont prises grâce au microscope à fluorescence DMI 3000B (Leica) au grossissement x10. Les barres d'échelle représentent 100 μ m.

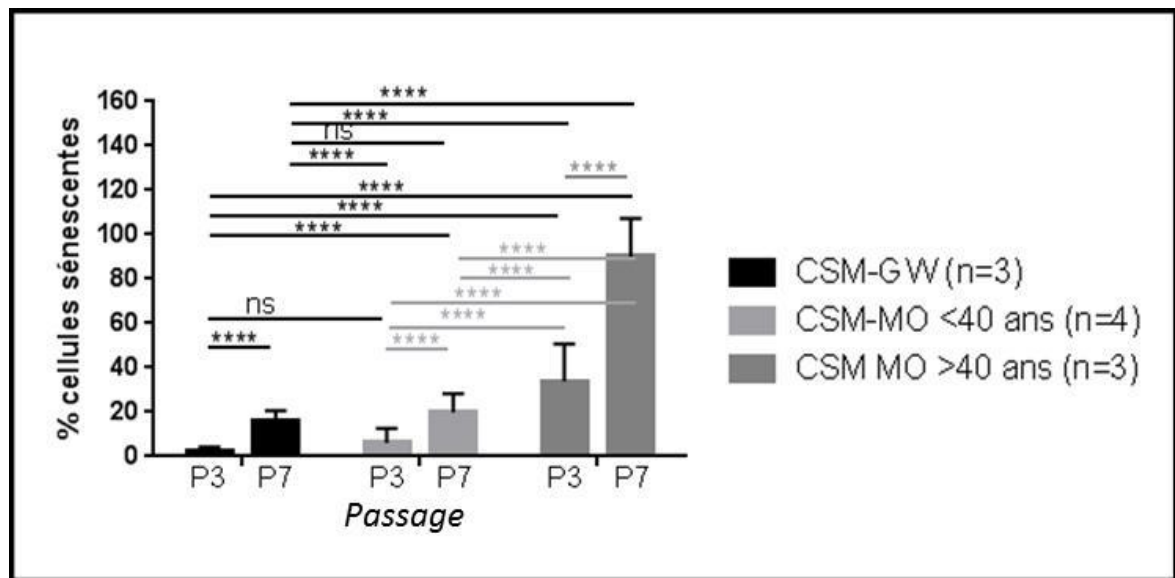


Figure 35 : Pourcentage de sénescence dans les CSM-GW et CSM-MO de donneurs âgés de +/- 40 ans à passage précoce (P3) et tardif (P7).

Pour chaque prélèvement, 18 images ont été prises (6 images de chacun de 3 expériences indépendantes). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ déviation standard, **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ et * $p < 0,05$.

Discussion générale

Dans ce travail nous avons montré que les capacités de prolifération sont plus importantes pour les CSM-MO <40 ans, mais aussi que la capacité à former des colonies diminue *in vitro* et que le nombre et la taille des colonies sont plus importants à P1, P2 et P3 pour les CSM-MO <40 ans, toujours en comparaison aux cellules provenant des donneurs âgés. De plus, la capacité de différenciation A, O et C des CSM-MO est maintenue aussi bien pour les CSM-MO<40 ans que pour les CSM-MO>40 ans. Néanmoins cette multipotence diminue avec l'expansion *in vitro* et avec l'augmentation de l'âge des donneurs. Malgré ces changements, l'expression des marqueurs phénotypiques recommandés par l'ISCT (Dominici et al., 2006b) est maintenue tout au long de la culture, quelque soit le prélèvement.

Les résultats de prolifération montrent ainsi des différences de capacités de prolifération des CSM-MO en fonction de l'âge des donneurs (Li et al., 2014). En effet les CSM-MO de donneurs âgés prolifèrent moins bien que celles provenant de donneurs plus jeunes. Ces résultats sont confirmés par la littérature (Baxter et al., 2004)(Baker et al., 2015)(Fan et al., 2010)(Mareschi et al., 2006)(Mendes et al., 2002) (Dexheimer et al., 2011)(Stolzing et al., 2008)(Zhou et al., 2008)(Sethe et al., 2006). Néanmoins certaines études montrent l'absence de différence de capacité de prolifération entre les cellules provenant de donneurs jeunes et âgés. Cela peut s'expliquer par l'âge assez proche des différents donneurs qui constituent ces études (Baker et al., 2015).

D'autre part la capacité à former des colonies est plus importante chez les CSM-MO<40 ans à P1, P2 et P3 mais diminue au cours de l'expansion *in vitro*. Chez les CSM-MO>40 ans la clonogénicité reste faible tout au long de la culture (**Figure 15**). Dans la littérature il est montré une baisse de la fréquence des CFU en fonction de l'âge des donneurs (Sethe et al., 2006)(Baxter et al., 2004)(Baker et al., 2015)(Fan et al., 2010)(Stolzing et al., 2008)(Russell et al., 2010) et certains travaux suggèrent que cela pourrait être dû à la sénescence (Baker et al., 2015). Cependant il existe un nombre beaucoup moins important d'études qui montrent que l'âge des donneurs de CSM-MO n'a aucune influence sur le nombre de colonies (Oreffo et al., 1998,) tandis que d'autres travaux suggèrent que le sexe des donneurs est un facteur qui pourrait influencer la clonogénicité des CSM-MO. En effet Siegel et al montrent que le nombre de colonies est plus important pour les CSM-MO provenant de donneurs femmes et jeunes par rapport aux hommes (Siegel et al., 2013). Enfin Digirolamo et al montrent qu'il existe un lien entre la taille des colonies et la multipotence des CSM-MO (DiGirolamo et al., 1999). Dans la littérature il est montré que les petites colonies seraient constituées de cellules larges et aplaties correspondant au phénotype sénescant (Sethe et al., 2006). Ces résultats iraient dans le sens de ce que nous observons, à savoir des colonies plus petites pour des CSM-MO>40 ans associées à une forte sénescence. Il faut tout de même noter qu'il est très important d'isoler les cellules pour pouvoir réaliser le test des CFU en réalisant des dilutions successives (Baker

et al., 2015)(Siegel et al., 2013) mais aussi d'optimiser la densité d'ensemencement des CSM afin d'avoir le meilleur compromis entre clonogénicité et prolifération (Sekiya et al., 2002)

Les CSM-MO des donneurs d'âges différents utilisées dans cette étude expriment les principaux marqueurs recommandés par l'ISCT mais le taux d'expression de ces marqueurs n'a pas pu être corrélée à l'âge des donneurs. Dans la littérature il n'y a pas de tendance évidente concernant l'expression des marqueurs de surface et l'âge des donneurs (Baker et al., 2015). En parallèle, nous avons montré que le taux d'expression des marqueurs CD146 et CD71 est corrélé de façon négative à l'âge des donneurs. D'autres études réalisées au sein de notre équipe montrent que le marqueur CD146 serait très fortement exprimé chez les CSM-GW. De plus l'expression de ce marqueur tendrait à disparaître *in vitro* lors de l'expansion de cellules. D'autres travaux de Siegel et al suggèrent que la population féminine de CSM-MO exprimerait plus de CD146 et que ces cellules CD146+ seraient plus petites et proliféreraient mieux (Siegel et al., 2013). D'autres travaux montrent que l'expression de CD146 diminuerait avec l'âge des donneurs (Maijenburg et al., 2012).

Les résultats obtenus lors de notre travail montrent que la capacité de différenciation A, O, et C des CSM-MO diminue à passage tardif par rapport au passage précoce et semblerait diminuer avec l'augmentation de l'âge des donneurs (**Figure 16**, **Figure 17** et **Figure 18**). Dans la littérature il n'y a pas de consensus sur le lien entre l'âge des donneurs des CSM-MO et leur capacité de différenciation *in vitro* (Baker et al., 2015). Même si la majorité des études montrent que l'âge des donneurs n'influence pas la multipotence des CSM (Baker et al., 2015)(Dexheimer et al., 2011)(Siegel et al., 2013)(Wagner et al., 2009)(Evans et al., 1990), certaines études comme la nôtre montrent que la capacité de différenciation A, O et/ou C diminue avec l'âge des donneurs (Stolzing et al., 2008)(Zhou et al., 2008)(Zaim et al., 2012) tandis qu'une étude de Dexheimer et al montre que ce n'est pas l'âge du donneur qui est corrélé à la capacité de différenciation, mais que ce serait plutôt la capacité de prolifération des CSM-MO au moment de l'induction qui influencerait la différenciation (Dexheimer et al., 2011). Néanmoins cette étude a été réalisée à passage 3 seulement contrairement à la nôtre pour laquelle les passages précoces et tardifs ont été analysés. Dans notre travail, les prélèvements de CSM-MO âgés et à passage tardif ont des capacités de prolifération diminuées au moment de l'induction et se différencient moins bien. Ces résultats vont donc dans le même sens des ceux de Dexheimer et al. Néanmoins parmi les cellules de prélèvements provenant de personnes âgées, même si certains ont une faible capacité de prolifération celle-ci est maintenue au cours de l'expansion. En effet, les cellules correspondant au groupe des donneurs âgés présentent une hétérogénéité inter-prélèvement très importante en termes de prolifération, bien que les capacités de différenciation soient diminuées par rapport aux cellules provenant des donneurs plus jeunes. De plus, quelques travaux montrent qu'avec l'âge la capacité de différenciation O diminuerait au profit d'une augmentation de la capacité de différenciation A. Certaines études *in vivo* chez la souris confirment cette hypothèse tandis que d'autres la contredisent (Baker et al., 2015). Enfin

Russel et al montrent qu'il existe un lien entre la multipotence des CSM-MO et leur capacité à proliférer et à former des clones (Russell et al., 2010).

Une donnée dont il faut tenir compte est le fait que les donneurs âgés ne sont pas des donneurs sains. En effet dans la majorité des études, y compris la nôtre (pour les CSM-MO provenant de la COT) les CSM-MO proviennent de patients pour lesquels une opération chirurgicale a été réalisée afin de poser une prothèse de hanche. Il est donc fort probable que ces patients atteints de pathologies liées à l'âge pourraient introduire un biais dans l'étude. En effet des pathologies comme le diabète ou des changements hormonaux sont directement impliqués dans les mécanismes du vieillissement *via* les voies de signalisation de l'insuline ou des facteurs de croissances comme montré précédemment (Greer and Brunet, 2008). Néanmoins dans notre cas, il a été difficile d'obtenir des prélèvements de CSM-MO >40 ans de donneurs volontaires « sains » auprès de l'UTCT car ils sont très rares d'autant plus que la limite d'âge est fixée à 50 ans pour ces donneurs volontaires. Il reste néanmoins nécessaire d'étudier les CSM-MO > 40 ans pour mieux comprendre les mécanismes du vieillissement des CSM-MO surtout si des allogreffes de CSM-MO de donneurs jeunes sont prévues pour des patients âgés. Il sera également important de tenir compte de certaines informations médicales (contexte hormonal, diabète par exemple) concernant les donneurs pour mieux comprendre ces mécanismes.

Enfin dans la première partie de notre travail, les résultats ont montré que l'expression des gènes liés à la longévité des CS (FOXO1 et FOXO3A), à l'inhibition du cycle cellulaire (P21) ou la protection contre le stress oxydant (SOD2) n'est pas corrélée à l'âge des donneurs à passage 1 (**Figure 19**). Cependant cela ne signifie pas que ces facteurs ne soient pas impliqués dans les mécanismes impliqués dans le vieillissement de CSM. En effet l'expression des ARNm codant pour FOXO1, FOXO3, SOD2 et P21 est corrélée à au nombre de PD mais seule la corrélation concernant P21 est significative ($p=0,039$). Ces résultats concernant P21 sont surprenants mais cela peut être expliqué par la confluence des cellules. Etant donné que l'analyse de l'expression génique a été réalisée à 14 jours de culture, un moment où les cellules avec de fortes capacités de prolifération sont proches de la confluence (**Figure 20**), d'où l'intérêt d'étudier l'expression génique à des temps de culture plus courts. L'hypothèse serait que l'expression génique de P21 serait induite pour inhiber le cycle cellulaire de ces CSM et donc la prolifération. Concernant la faible expression des gènes FOXO1 et FOXO3, les résultats vont dans le sens des ceux de Djouad et al (Djouad et al., 2009) qui montrent une augmentation du messenger FOXO3 au cours de la différenciation chondrocytaire à partir de CSM-MO humaines, l'impliquant ainsi dans la différenciation. De plus les auteurs montrent que FOXO3 est régulé négativement par le micro ARN miR29a dans les CSM-MO humaines pendant la différenciation chondrocytaire (Guérit et al., 2014). D'ailleurs Guérit et al montrent que l'inhibition de FOXO3 dans les CSM-MO entraîne une augmentation du pourcentage de cellules en phase S+G2M du cycle cellulaire et favoriserait ainsi la prolifération des CSM-MO humaines (Guérit et al., 2014). Les auteurs concluent que FOXO3 permet la différenciation

chondrocytaire des CSM-MO humaines en inhibant le cycle cellulaire (Guérit et al., 2014). Pris ensemble ces résultats suggèrent que l'expression de FOXO3 serait inhibée dans les CSM-MO humaines ce qui permettrait ainsi leur prolifération. De plus il est fort probable que l'expression d'autres gènes pourrait être corrélée à l'âge des donneurs. En effet des travaux de Wagner et al (Wagner et al., 2009) montrent que des CSM-MO provenant de 3 groupes de donneurs d'âges différents (21 à 25 ans, 44 à 55 ans, et 80 à 92 ans) à passage 2 présentaient une régulation positive de 67 gènes corrélée à l'âge des donneurs. La majorité de ces gènes sont liés à la régulation de la matrice extra cellulaire, au développement mésodermique dont le gène MEOX2 (mesenchyme homebox 2) qui réprime la prolifération des tissus mésodermiques. D'autre part, dans cette même étude (Wagner et al., 2009), les auteurs montrent une régulation négative de 60 gènes associés à la réparation de l'ADN, à la mitose et à la régulation transcriptionnelle. Aussi des travaux de Wilson et al sur les CSM-MO de souris montrent une baisse de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation, le cycle cellulaire et les facteurs de croissance chez les souris jeunes par rapport aux souris âgées. Ces gènes incluent les suppresseurs de tumeurs P53 et P21 (Wilson et al., 2010).

Tous ces résultats sont très encourageants car ils suggèrent que des mécanismes moléculaires et cellulaires sont impliqués dans le vieillissement des CSM-MO dont la compréhension est nécessaire pour des applications en médecine régénérative.

Conclusions et perspectives

Les CSM-MO présentent un réel intérêt en médecine régénérative mais il est nécessaire de savoir si les fonctions des CSM-MO sont maintenues au cours du vieillissement (Li et al., 2014b) étant donné leur implication dans le soutien de l'hématopoïèse (i), la réparation tissulaire (ii), la croissance et le remodelage du tissu osseux (iii) (Baker et al., 2015). L'effet du vieillissement sur les propriétés des CSM-MO est très important pour le choix des cellules en thérapie cellulaire (Li et al., 2014). L'objectif de ce travail était d'étudier l'effet du vieillissement sur les CSM-MO afin de déterminer des paramètres de contrôle qualité à mettre en place pour l'utilisation des CSM-MO en médecine régénérative.

Nous avons pu montrer que les CSM-MO perdaient leurs capacités de prolifération et de différenciation *in vitro* (vieillissement réplcatif) et que ce phénomène est augmenté dans les CSM-MO provenant de donneurs âgés par rapport aux donneurs jeunes (vieillissement lié à l'âge des donneurs). Ces deux types de vieillissement « réplcatifs » et « liés à l'âge des donneurs » sont associés à une baisse de la clonogénicité sans modification de l'expression des principaux marqueurs phénotypiques des CSM-MO (CD73, CD90 et CD105). Cependant, nos résultats ont mis en évidence deux sous-populations (CD146 et CD71) dont le pourcentage et l'IMF chez les CSM-MO diminuent avec l'âge des donneurs. Ces 2 types de vieillissement sont également associés à la sénescence des CSM entraînant une diminution des capacités de prolifération.

Ces résultats ont ainsi permis de confirmer et proposer des paramètres de contrôle qualité pour l'utilisation des CSM-MO en médecine régénérative.

1. **L'âge des donneurs** : Il serait préférable de faire appel à des donneurs volontaires sains et jeunes car d'après l'étude ils possèdent de meilleures capacités de différenciation et de prolifération.
2. **La prolifération** : évaluer les capacités de prolifération sur au moins 2 passages.
3. **Marqueurs phénotypiques** : Vérifier l'expression des marqueurs recommandés par l'ISCT à la surface des CSM-MO par cytométrie en flux, une technique d'analyse simple et rapide pouvant être réalisée sur cellules congelées ou en culture. Vérifier également l'expression des marqueurs CD146 et CD71.
4. **Multipotence** : Vérifier que les CSM-MO prélevées ont ces capacités de différenciation adipocytaire, ostéocytaire et chondrocytaire.
5. **Sénescence cellulaire** : Vérifier que le pourcentage de cellules sénescents est très faible au sein des CSM grâce au test colorimétrique de la β -galactosidase.

Malgré les résultats obtenus dans cette étude il reste d'autres pistes à exploiter afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le vieillissement des CSM-MO et de trouver d'autres contrôles qualités qui permettraient de choisir les meilleures CSM-MO candidates pour des applications en médecine régénérative.

Tout d'abord il existe des perspectives à court terme pour ces travaux. En effet dans la littérature il est montré qu'il existe une corrélation entre la longueur des télomères de CSM-MO et l'âge des donneurs. C'est pourquoi nous avons congelé des cellules pour chaque prélèvement et extrait l'ADN de certains prélèvements afin de réaliser l'étude de la longueur des télomères des CSM-MO provenant de donneurs d'âge différents. Cette étude est en cours et permettrait d'expliquer les résultats obtenus dans l'étude d'une part, et d'inclure éventuellement la mesure de la longueur des télomères au contrôle qualité des CSM-MO. En effet la mesure de la longueur des télomères permettrait de connaître le potentiel de division cellulaire (Wagner et al., 2010b) car l'état d'érosion télomérique permet d'anticiper l'entrée en sénescence des cellules (Robert and Raymond, 2013).

Ensuite, afin de faciliter l'analyse de la sénescence, la mesure de l'activité de la β -galactosidase par colorimétrie peut-être adaptée à la fluorescence et ainsi permettre une analyse par cytométrie en flux. Ceci permettra d'étudier en parallèle d'autres paramètres propres aux cellules sénescents tels que la taille et la structure voir même de trier les sous-populations de cellules non sénescents pour des études *in vitro* si le cytomètre est équipé de la fonction trieur en plus de la fonction analyseur.

Il serait également intéressant d'étudier les deux sous-populations mises en évidence dans ce travail dont l'expression est corrélée à l'âge des donneurs, CD71 et CD146. Cette étude des sous populations de CSM-MO fait actuellement l'objet d'un stage de master 2 dont l'objectif est d'isoler les CSM-MO et CSM-GW qui expriment le marqueur de surface CD146 et d'étudier les capacités de prolifération, la clonogénicité, la multipotence et la sénescence de ces CSM. En effet, dans la littérature, ce marqueur est décrit comme un marqueur de la multipotence. Si les résultats de l'étude sont concluants, ce marqueur pourrait faire partie des contrôles qualités des CSM-MO à utiliser en médecine régénérative.

Actuellement une collaboration est en cours avec l'équipe 1 de l'unité et a pour objectif de mettre en évidence l'implication de microARN dans le vieillissement des CSM-MO et ainsi choisir des microARN dans le contrôle qualité des CSM-MO à passage précoce pour des applications en médecine régénérative. Même si certains miR ont été identifiés comme le miR29-A qui est impliqué dans la différenciation chondrocytaire de CSM-MO (Guérit et al., 2014) (Sorrentino et al., 2008) l'implication des micro ARN dans le vieillissement des CSM-MO reste une piste à exploiter.

Enfin la résistance au stress oxydant des CSM-MO pourrait également être étudiée afin de mieux connaître les mécanismes du vieillissement des CSM et de mettre en évidence d'autres paramètres dans le contrôle qualité des CSM pour des applications en médecine régénérative comme par exemple le niveau d'expression génique et/ou protéique d'enzyme impliquée dans la protection contre le stress oxydant ou fixer un seuil limite de production d'ERO pour les CSM à utiliser.

A plus long terme, toutes ces connaissances et les paramètres de contrôle qualité choisis serviront à l'optimisation de l'utilisation des CSM en médecine régénérative. En effet des travaux de Schiavi et al de notre équipe ont montré qu'il était possible de pulvériser des CSM-MO (Schiavi et al., 2012) ou des chondrocytes de rat (Tritz et al., 2010) dans des biomatériaux d'alginate stratifiés pour des applications en ingénierie ostéo-articulaire. Ces connaissances et ces contrôles qualités pourraient être mis à profit dans d'autres applications de la médecine régénérative telles que l'ingénierie tissulaire du ligament, développé également au sein de l'équipe.

Références bibliographique

Abdallah, P., Luciano, P., Runge, K.W., Lisby, M., Géli, V., Gilson, E., and Teixeira, M.T. (2009). A two step model for senescence triggered by a single critically short telomere. *Nat. Cell Biol.* **11**, 988–993.

D'Adda di Fagagna, F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 512–522.

Aggarwal, S., and Pittenger, M.F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815–1822.

Akiyama, H. (2008). Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9. *Mod. Rheumatol.* **18**, 213–219.

Akiyama, H., Chaboissier, M.-C., Martin, J.F., Schedl, A., and Crombrughe, B. de (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* **16**, 2813–2828.

Alt, E.U., Senst, C., Murthy, S.N., Slakey, D.P., Dupin, C.L., Chaffin, A.E., Kadowitz, P.J., and Izadpanah, R. (2012). Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties. *Stem Cell Res.* **8**, 215–225.

Alvarez-Dolado, M., Pardo, R., Garcia-Verdugo, J.M., Fike, J.R., Lee, H.O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S.J., and Alvarez-Buylla, A. (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* **425**, 968–973.

An, C., Cheng, Y., Yuan, Q., and Li, J. (2010). IGF-1 and BMP-2 Induces Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells into Chondrocytes-Like Cells. *Ann. Biomed. Eng.* **38**, 1647–1654.

Atadja, P., Wong, H., Garkavtsev, I., Veillette, C., and Riabowol, K. (1995). Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 8348–8352.

Baker, N., Boyette, L.B., and Tuan, R.S. (2015). Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. *Bone* **70**, 37–47.

Baksh, D., Yao, R., and Tuan, R.S. (2007). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells Dayt. Ohio* **25**, 1384–1392.

Banfi, A., Muraglia, A., Dozin, B., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., and Quarto, R. (2000). Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp. Hematol.* **28**, 707–715.

Bartkova, J., Hořejší, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., et al. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**, 864–870.

- Bartsch, G., Yoo, J.J., De Coppi, P., Siddiqui, M.M., Schuch, G., Pohl, H.G., Fuhr, J., Perin, L., Soker, S., and Atala, A. (2005). Propagation, Expansion, and Multilineage Differentiation of Human Somatic Stem Cells from Dermal Progenitors. *Stem Cells Dev.* **14**, 337–348.
- Barzilay, R., Ben-Zur, T., Bulvik, S., Melamed, E., and Offen, D. (2008). Lentiviral Delivery of LMX1a Enhances Dopaminergic Phenotype in Differentiated Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev.* **18**, 591–602.
- Baur, J.A., Zou, Y., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2001). Telomere Position Effect in Human Cells. *Science* **292**, 2075–2077.
- Baxter, M.A., Wynn, R.F., Jowitt, S.N., Wraith, J.E., Fairbairn, L.J., and Bellantuono, I. (2004a). Study of Telomere Length Reveals Rapid Aging of Human Marrow Stromal Cells following In Vitro Expansion. *STEM CELLS* **22**, 675–682.
- Baxter, M.A., Wynn, R.F., Jowitt, S.N., Wraith, J.E., Fairbairn, L.J., and Bellantuono, I. (2004b). Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells Dayt. Ohio* **22**, 675–682.
- Beane, O.S., Fonseca, V.C., Cooper, L.L., Koren, G., and Darling, E.M. (2014). Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. *PloS One* **9**, e115963.
- Beauséjour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., and Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* **22**, 4212–4222.
- Benanti, J.A., and Galloway, D.A. (2004). Normal Human Fibroblasts Are Resistant to RAS-Induced Senescence. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 2842–2852.
- Bennett, D.C. (2003). Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene* **22**, 3063–3069.
- Bennett, D.C., and Medrano, E.E. (2002). Molecular Regulation of Melanocyte Senescence. *Pigment Cell Res.* **15**, 242–250.
- Beyth, S., Borovsky, Z., Mevorach, D., Liebergall, M., Gazit, Z., Aslan, H., Galun, E., and Rachmilewitz, J. (2005). Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* **105**, 2214–2219.
- Bhatia, R., Heijzen, K.V., Palmer, A., Komiya, A., Slovak, M.L., Chang, K.L., Fung, H., Krishnan, A., Molina, A., Nademanee, A., et al. (2005). Longitudinal Assessment of Hematopoietic Abnormalities After Autologous Hematopoietic Cell Transplantation for Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **23**, 6699–6711.
- Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., and Robey, P.G. (2001). Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. *STEM CELLS* **19**, 180–192.
- Bianco, P., Robey, P.G., and Simmons, P.J. (2008). Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and

Assays. *Cell Stem Cell* 2, 313–319.

Bjornson, C.R.R., Rietze, R.L., Reynolds, B.A., Magli, M.C., and Vescovi, A.L. (1999). Turning Brain into Blood: A Hematopoietic Fate Adopted by Adult Neural Stem Cells in Vivo. *Science* 283, 534–537.

Blackburn, E.H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature* 350, 569–573.

Blackburn, E.H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106, 661–673.

Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S.E., and Ringdén, O. (2003). Mesenchymal Stem Cells Inhibit and Stimulate Mixed Lymphocyte Cultures and Mitogenic Responses Independently of the Major Histocompatibility Complex. *Scand. J. Immunol.* 57, 11–20.

Bork, S., Pfister, S., Witt, H., Horn, P., Korn, B., Ho, A.D., and Wagner, W. (2010). DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells. *Aging Cell* 9, 54–63.

Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H.F.M., Schlegelberger, B., Stein, H., Dörken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C.A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660–665.

Brown, J.P., Wei, W., and Sedivy, J.M. (1997). Bypass of Senescence After Disruption of p21CIP1/WAF1 Gene in Normal Diploid Human Fibroblasts. *Science* 277, 831–834.

Bruder, S.P., Jaiswal, N., and Haynesworth, S.E. (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell. Biochem.* 64, 278–294.

Bruder, S.P., Jaiswal, N., Ricalton, N.S., Mosca, J.D., Kraus, K.H., and Kadiyala, S. (1998). Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin. Orthop.* S247–S256.

Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282, 1497–1501.

Cai, J., Li, W., Su, H., Qin, D., Yang, J., Zhu, F., Xu, J., He, W., Guo, X., Labuda, K., et al. (2010). Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Umbilical Cord Matrix and Amniotic Membrane Mesenchymal Cells. *J. Biol. Chem.* 285, 11227–11234.

Calloni, R., Cordero, E.A.A., Henriques, J.A.P., and Bonatto, D. (2013). Reviewing and Updating the Major Molecular Markers for Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 22, 1455–1476.

Campisi, J. (2005). Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbors. *Cell* 120, 513–522.

Campisi, J. (2013). Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 685–705.

Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729–740.

Canque, B., Camus, S., Dalloul, A., Kahn, E., Yagello, M., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Schmitt, C., and Gluckman, J.C. (2000). Characterization of dendritic cell differentiation pathways from cord blood CD34+CD7+CD45RA+hematopoietic progenitor cells. *Blood* 96, 3748–3756.

Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9, 641–650.

Caplan, A.I. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J. Cell. Physiol.* 213, 341–347.

De Cecco, M., Jeyapalan, J., Zhao, X., Tamamori-Adachi, M., and Sedivy, J.M. (2011). Nuclear protein accumulation in cellular senescence and organismal aging revealed with a novel single-cell resolution fluorescence microscopy assay. *Aging* 3, 955–967.

Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., and Middleton, J. (2007). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *STEM CELLS* 25, 2739–2749.

Chan, S.R.W.L., and Blackburn, E.H. (2004). Telomeres and telomerase. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 359, 109–121.

Chang, Z.F. (1997). Regulatory mechanisms of replication growth limits in cellular senescence. *J. Formos. Med. Assoc. Taiwan Yi Zhi* 96, 784–791.

Chang, E., and Harley, C.B. (1995). Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11190–11194.

Chen, H.-T., Lee, M.-J., Chen, C.-H., Chuang, S.-C., Chang, L.-F., Ho, M.-L., Hung, S.-H., Fu, Y.-C., Wang, Y.-H., Wang, H.-I., et al. (2012). Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from elderly patients with osteoporotic fractures. *J. Cell. Mol. Med.* 16, 582–593.

Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J.D., Yan, L.J., and Ames, B.N. (1995). Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 4337–4341.

Chen, Q.M., Prowse, K.R., Tu, V.C., Purdom, S., and Linskens, M.H. (2001). Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 265, 294–303.

Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.-K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., et al. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725–730.

Chimal-Monroy, J., and Díaz de León, L. (1999). Expression of N-cadherin, N-CAM, fibronectin and tenascin is stimulated by TGF-beta1, beta2, beta3 and beta5 during the formation of precartilaginous condensations. *Int. J. Dev. Biol.* 43, 59–67.

Choudhery, M.S., Badowski, M., Muise, A., Pierce, J., and Harris, D.T. (2014). Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J. Transl. Med.* 12, 8.

Clarke, D.L., Johansson, C.B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlström, H., Lendahl, U., and Frisén, J.

(2000). Generalized Potential of Adult Neural Stem Cells. *Science* 288, 1660–1663.

Collado, M., and Serrano, M. (2005). The Senescent Side of Tumor Suppression. *Cell Cycle* 4, 1722–1724.

Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguría, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., et al. (2005). Tumour biology: Senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642–642.

Colter, D.C., Class, R., DiGirolamo, C.M., and Prockop, D.J. (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 3213–3218.

Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G.L., Pistoia, V., et al. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107, 367–372.

Coulombel, L. (2003). [Adult stem cells: seing is not being]. *Médecine Sci. MS* 19, 683–694.

Coulombel, L. (2004). Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene* 23, 7210–7222.

Coulombel, L. (2005). [Adult stem cells: who are they, what do they do?]. *Bull. Académie Natl. Médecine* 189, 589–602; discussion 602–604.

Coulombel, L. (2007). [Adult stem cells: their scientific interest and therapeutic future]. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* 35, 806–810.

Cristofalo, V.J., Doggett, D.L., Brooks-Frederich, K.M., and Phillips, P.D. (1989). Growth factors as probes of cell aging. *Exp. Gerontol.* 24, 367–374.

Cristofalo, V.J., Lorenzini, A., Allen, R.G., Torres, C., and Tresini, M. (2004). Replicative senescence: a critical review. *Mech. Ageing Dev.* 125, 827–848.

De Crombrughe, B., Lefebvre, V., and Nakashima, K. (2001). Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 721–728.

Dalloul, A.H., Patry, C., Salamero, J., Canque, B., Grassi, F., and Schmitt, C. (1999). Functional and Phenotypic Analysis of Thymic CD34+CD1a– Progenitor-Derived Dendritic Cells: Predominance of CD1a+ Differentiation Pathway. *J. Immunol.* 162, 5821–5828.

Dannenberg, J.-H., Rossum, A. van, Schuijff, L., and Riele, H. te (2000). Ablation of the Retinoblastoma gene family deregulates G1 control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes Dev.* 14, 3051–3064.

Datta, I., Mishra, S., Mohanty, L., Pulikkot, S., and Joshi, P.G. (2011). Neuronal plasticity of human Wharton's jelly mesenchymal stromal cells to the dopaminergic cell type compared with human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 13, 918–932.

Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J.D., Campisi, J., and Toussaint, O. (2009a). Protocols to detect

senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat. Protoc.* **4**, 1798–1806.

Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J.D., Campisi, J., and Toussaint, O. (2009b). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat. Protoc.* **4**, 1798–1806.

Delorme, B., Ringe, J., Gallay, N., Vern, Y.L., Kerboeuf, D., Jorgensen, C., Rosset, P., Sensebé, L., Layrolle, P., Häupl, T., et al. (2008). Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood* **111**, 2631–2635.

Delorme, B., Ringe, J., Pontikoglou, C., Gaillard, J., Langonné, A., Sensebé, L., Noël, D., Jorgensen, C., Häupl, T., and Charbord, P. (2009). Specific Lineage-Priming of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Provides the Molecular Framework for Their Plasticity. *STEM CELLS* **27**, 1142–1151.

Denchi, E.L., Attwooll, C., Pasini, D., and Helin, K. (2005). Deregulated E2F Activity Induces Hyperplasia and Senescence-Like Features in the Mouse Pituitary Gland. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 2660–2672.

Deng, W., Han, Q., Liao, L., Li, C., Ge, W., Zhao, Z., You, S., Deng, H., Murad, F., and Zhao, R.C.H. (2005). Engrafted Bone Marrow-Derived Flk-1+ Mesenchymal Stem Cells Regenerate Skin Tissue. *Tissue Eng.* **11**, 110–119.

DeNicola, G.M., Karreth, F.A., Humpton, T.J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., Mangal, D., Yu, K.H., Yeo, C.J., Calhoun, E.S., et al. (2011). Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* **475**, 106–109.

Dennis, J.E., Merriam, A., Awadallah, A., Yoo, J.U., Johnstone, B., and Caplan, A.I. (1999). A Quadripotential Mesenchymal Progenitor Cell Isolated from the Marrow of an Adult Mouse. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 700–709.

Dexheimer, V., Mueller, S., Braatz, F., and Richter, W. (2011a). Reduced Reactivation from Dormancy but Maintained Lineage Choice of Human Mesenchymal Stem Cells with Donor Age. *PLoS ONE* **6**.

Dexheimer, V., Mueller, S., Braatz, F., and Richter, W. (2011b). Reduced Reactivation from Dormancy but Maintained Lineage Choice of Human Mesenchymal Stem Cells with Donor Age. *PLoS ONE* **6**, e22980.

Dezawa, M., Kanno, H., Hoshino, M., Cho, H., Matsumoto, N., Itokazu, Y., Tajima, N., Yamada, H., Sawada, H., Ishikawa, H., et al. (2004). Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J. Clin. Invest.* **113**, 1701–1710.

Dezawa, M., Ishikawa, H., Itokazu, Y., Yoshihara, T., Hoshino, M., Takeda, S., Ide, C., and Nabeshima, Y. (2005). Bone Marrow Stromal Cells Generate Muscle Cells and Repair Muscle Degeneration. *Science* **309**, 314–317.

Dhomen, N., Reis-Filho, J.S., da Rocha Dias, S., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., Larue, L., Pritchard, C., and Marais, R. (2009). Oncogenic Braf Induces Melanocyte Senescence and Melanoma in Mice. *Cancer Cell* **15**, 294–303.

DiGirolamo, C.M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D.G., Class, R., and Prockop, D.J. (1999). Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br. J. Haematol.* *107*, 275–281.

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 9363–9367.

D'Ippolito, G., Schiller, P.C., Ricordi, C., Roos, B.A., and Howard, G.A. (1999). Age-Related Osteogenic Potential of Mesenchymal Stromal Stem Cells from Human Vertebral Bone Marrow. *J. Bone Miner. Res.* *14*, 1115–1122.

Djouad, F., Bony, C., Canovas, F., Fromigué, O., Rème, T., Jorgensen, C., and Noël, D. (2009). Transcriptomic Analysis Identifies Foxo3A as a Novel Transcription Factor Regulating Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation. *Cloning Stem Cells* *11*, 407–416.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., and Horwitz, E.M. (2006a). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* *8*, 315–317.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., and Horwitz, E.M. (2006b). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* *8*, 315–317.

Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., and Karsenty, G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell* *89*, 747–754.

Effros, R.B., Dagarag, M., and Valenzuela, H.F. (2003). In vitro senescence of immune cells. *Exp. Gerontol.* *38*, 1243–1249.

Enomoto, H., Furuichi, T., Zanma, A., Yamana, K., Yoshida, C., Sumitani, S., Yamamoto, H., Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., and Komori, T. (2004). *Runx2* deficiency in chondrocytes causes adipogenic changes in vitro. *J. Cell Sci.* *117*, 417–425.

Evans, C.E., Galasko, C.S., and Ward, C. (1990). Effect of donor age on the growth in vitro of cells obtained from human trabecular bone. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* *8*, 234–237.

Fagagna, F. d'Adda di, Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003a). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* *426*, 194–198.

Fagagna, F. d'Adda di, Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003b). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* *426*, 194–198.

Fagagna, F. d'Adda di, Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003c). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence.

Nature 426, 194–198.

Fan, M., Chen, W., Liu, W., Du, G.-Q., Jiang, S.-L., Tian, W.-C., Sun, L., Li, R.-K., and Tian, H. (2010a). The Effect of Age on the Efficacy of Human Mesenchymal Stem Cell Transplantation after a Myocardial Infarction. *Rejuvenation Res.* 13, 429–438.

Fan, M., Chen, W., Liu, W., Du, G.-Q., Jiang, S.-L., Tian, W.-C., Sun, L., Li, R.-K., and Tian, H. (2010b). The effect of age on the efficacy of human mesenchymal stem cell transplantation after a myocardial infarction. *Rejuvenation Res.* 13, 429–438.

Fernandes, K.J.L., McKenzie, I.A., Mill, P., Smith, K.M., Akhavan, M., Barnabé-Heider, F., Biernaskie, J., Juneke, A., Kobayashi, N.R., Toma, J.G., et al. (2004). A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat. Cell Biol.* 6, 1082–1093.

Fickert, S., Schröter-Bobsin, U., Groß, A.-F., Hempel, U., Wojciechowski, C., Rentsch, C., Corbeil, D., and Günther, K.P. (2010). Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation during long-term ex vivo cultivation is not age dependent. *J. Bone Miner. Metab.* 29, 224–235.

Van der Flier, L.G., and Clevers, H. (2009). Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 241–260.

Flores-Torales, E., Orozco-Barocio, A., Gonzalez-Ramella, O.R., Carrasco-Yalan, A., Gazarian, K., and Cuneo-Pareto, S. (2010). The CD271 expression could be alone for establisher phenotypic marker in Bone Marrow derived mesenchymal stem cells. *Folia Histochem. Cytobiol.* 48, 682–686.

Forsyth, N.R., Evans, A.P., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2003). Developmental differences in the immortalization of lung fibroblasts by telomerase. *Aging Cell* 2, 235–243.

Franceschi, R.T., Xiao, G., Jiang, D., Gopalakrishnan, R., Yang, S., and Reith, E. (2003). Multiple Signaling Pathways Converge on the Cbfa1/Runx2 Transcription Factor to Regulate Osteoblast Differentiation. *Connect. Tissue Res.* 44, 109–116.

Franceschi, R.T., Ge, C., Xiao, G., Roca, H., and Jiang, D. (2007). Transcriptional Regulation of Osteoblasts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1116, 196–207.

Fred Dice, J. (1989). Altered intracellular protein degradation in aging: A possible cause of proliferative arrest. *Exp. Gerontol.* 24, 451–459.

Frenette, P.S., Pinho, S., Lucas, D., and Scheiermann, C. (2013). Mesenchymal Stem Cell: Keystone of the Hematopoietic Stem Cell Niche and a Stepping-Stone for Regenerative Medicine. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 285–316.

Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., and Lalykina, K.S. (1970). The Development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea-Pig Bone Marrow and Spleen Cells. *Cell Prolif.* 3, 393–403.

Fuchs, E., Merrill, B.J., Jamora, C., and DasGupta, R. (2001). At the Roots of a Never-Ending Cycle. *Dev. Cell* 1, 13–25.

Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D., Kaplunov, J.M., Bucci, G., Dobрева, M., Matti, V., Beausejour, C.M., et al. (2012). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA damage response activation. *Nat. Cell Biol.* **14**, 355–365.

Gabr, M.M., Zakaria, M.M., Refaie, A.F., Ismail, A.M., Abou-El-Mahasen, M.A., Ashamallah, S.A., Khater, S.M., El-Halawani, S.M., Ibrahim, R.Y., Uin, G.S., et al. (2013). Insulin-Producing Cells From Adult Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Control Streptozotocin-Induced Diabetes In Nude Mice. *Cell Transplant.* **22**, 133–145.

Gang, E.J., Bosnakovski, D., Figueiredo, C.A., Visser, J.W., and Perlingeiro, R.C.R. (2007). SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* **109**, 1743–1751.

Gardner, R. (2002). Stem cells: potency, plasticity and public perception. *J. Anat.* **200**, 277–282.

Geißler, S., Textor, M., Kühnisch, J., Könnig, D., Klein, O., Ode, A., Pfitzner, T., Adjaye, J., Kasper, G., and Duda, G.N. (2012). Functional Comparison of Chronological and In Vitro Aging: Differential Role of the Cytoskeleton and Mitochondria in Mesenchymal Stromal Cells. *PLoS ONE* **7**, e52700.

Gilson, E., and Géli, V. (2007). How telomeres are replicated. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 825–838.

Gire, V., Roux, P., Wynford-Thomas, D., Brondello, J.-M., and Dulic, V. (2004a). DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J.* **23**, 2554–2563.

Gire, V., Roux, P., Wynford-Thomas, D., Brondello, J.-M., and Dulic, V. (2004b). DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J.* **23**, 2554–2563.

Goldstein, S. (1990). Molecular genetic approaches to mechanisms of senescence. *Annu. Rev. Gerontol. Geriatr.* **10**, 97–116.

Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.-V.F., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., DiTullio, R.A., Kastrinakis, N.G., Levy, B., et al. (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **434**, 907–913.

Gray-Schopfer, V.C., Cheong, S.C., Chong, H., Chow, J., Moss, T., Abdel-Malek, Z.A., Marais, R., Wynford-Thomas, D., and Bennett, D.C. (2006). Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br. J. Cancer* **95**, 496–505.

Greer, E.L., and Brunet, A. (2008). Signaling networks in aging. *J. Cell Sci.* **121**, 407–412.

Groh, M.E., Maitra, B., Szekely, E., and Koç, O.N. (2005). Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp. Hematol.* **33**, 928–934.

Gu, Z., Cao, X., Jiang, J., Li, L., Da, Z., Liu, H., and Cheng, C. (2012). Upregulation of p16INK4A promotes cellular senescence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from systemic lupus erythematosus patients. *Cell. Signal.* **24**, 2307–2314.

Guérit, D., Brondello, J.-M., Chuchana, P., Philipot, D., Toupet, K., Bony, C., Jorgensen, C., and Noël, D. (2014). FOXO3A regulation by miRNA-29a Controls chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and

cartilage formation. *Stem Cells Dev.* 23, 1195–1205.

Guillot, P.V., O'Donoghue, K., Kurata, H., and Fisk, N.M. (2006). Fetal stem cells: betwixt and between. *Semin. Reprod. Med.* 24, 340–347.

Haferkamp, S., Tran, S.L., Becker, T.M., Scurr, L.L., Kefford, R.F., and Rizos, H. (2009a). The relative contributions of the p53 and pRb pathways in oncogene-induced melanocyte senescence. *Aging* 1, 542–556.

Haferkamp, S., Scurr, L.L., Becker, T.M., Frausto, M., Kefford, R.F., and Rizos, H. (2009b). Oncogene-Induced Senescence Does Not Require the p16INK4a or p14ARF Melanoma Tumor Suppressors. *J. Invest. Dermatol.* 129, 1983–1991.

Hampel, B., Wagner, M., Teis, D., Zwerschke, W., Huber, L.A., and Jansen-Dürr, P. (2005). Apoptosis resistance of senescent human fibroblasts is correlated with the absence of nuclear IGFBP-3. *Aging Cell* 4, 325–330.

Han, J., Mistriotis, P., Lei, P., Wang, D., Liu, S., and Andreadis, S.T. (2012). Nanog reverses the effects of organismal aging on mesenchymal stem cell proliferation and myogenic differentiation potential. *Stem Cells Dayt. Ohio* 30, 2746–2759.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.

Hara, E., Yamaguchi, T., Nojima, H., Ide, T., Campisi, J., Okayama, H., and Oda, K. (1994). Id-related genes encoding helix-loop-helix proteins are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 269, 2139–2145.

Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458–460.

Hayflick, L. (1998). A Brief History of the Mortality and Immortality of Cultured Cells. *Keio J. Med.* 47, 174–182.

Hemann, M.T., Strong, M.A., Hao, L.-Y., and Greider, C.W. (2001). The Shortest Telomere, Not Average Telomere Length, Is Critical for Cell Viability and Chromosome Stability. *Cell* 107, 67–77.

Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P.C., Chen, D.J., and Sedivy, J.M. (2004). Telomere Shortening Triggers Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, p53, and p21CIP1, but Not p16INK4a. *Mol. Cell* 14, 501–513.

Hermann, A., List, C., Habisch, H.-J., Vukicevic, V., Ehrhart-Bornstein, M., Brenner, R., Bernstein, P., Fickert, S., and Storch, A. (2010). Age-dependent neuroectodermal differentiation capacity of human mesenchymal stromal cells: limitations for autologous cell replacement strategies. *Cytotherapy* 12, 17–30.

Hermida-Gómez, T., Fuentes-Boquete, I., Gimeno-Longas, M.J., Muiños-López, E., Díaz-Prado, S., de Toro, F.J., and Blanco, F.J. (2010). Bone Marrow Cells Immunomagnetically Selected For CD271+ Antigen Promote In Vitro the Repair of Articular Cartilage Defects. *Tissue Eng. Part A* 17, 1169–1179.

Hermida-Gómez, T., Fuentes-Boquete, I., Gimeno-Longas, M.J., Muiños-López, E., Díaz-Prado, S., Toro, F.J.

de, and Blanco, F.J. (2011). Quantification of Cells Expressing Mesenchymal Stem Cell Markers in Healthy and Osteoarthritic Synovial Membranes. *J. Rheumatol.* 38, 339–349.

Hinoi, E., Bialek, P., Chen, Y.-T., Rached, M.-T., Groner, Y., Behringer, R.R., Ornitz, D.M., and Karsenty, G. (2006). Runx2 inhibits chondrocyte proliferation and hypertrophy through its expression in the perichondrium. *Genes Dev.* 20, 2937–2942.

Hiwase, S.D., Dyson, P.G., To, L.B., and Lewis, I.D. (2009). Cotransplantation of Placental Mesenchymal Stromal Cells Enhances Single and Double Cord Blood Engraftment in Nonobese Diabetic/Severe Combined Immune Deficient Mice. *STEM CELLS* 27, 2293–2300.

Hiyama, E., and Hiyama, K. (2007). Telomere and telomerase in stem cells. *Br. J. Cancer* 96, 1020–1024.

Holt, S.E., Shay, J.W., and Wright, W.E. (1996). Refining the telomere-telomerase hypothesis of aging and cancer. *Nat. Biotechnol.* 14, 836–839.

Houlihan, D.D., Mabuchi, Y., Morikawa, S., Niibe, K., Araki, D., Suzuki, S., Okano, H., and Matsuzaki, Y. (2012). Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR- α . *Nat. Protoc.* 7, 2103–2111.

Huang, G.T.-J., Gronthos, S., and Shi, S. (2009). Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources. *J. Dent. Res.* 88, 792–806.

Huang, W., Yang, S., Shao, J., and Li, Y.-P. (2007). Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 12, 3068–3092.

Ikeda, T., Kamekura, S., Mabuchi, A., Kou, I., Seki, S., Takato, T., Nakamura, K., Kawaguchi, H., Ikegawa, S., and Chung, U. (2004). The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum.* 50, 3561–3573.

Jackson, K.A., Mi, T., and Goodell, M.A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 14482–14486.

Jeanclous, E., Schork, N.J., Kyvik, K.O., Kimura, M., Skurnick, J.H., and Aviv, A. (2000). Telomere Length Inversely Correlates With Pulse Pressure and Is Highly Familial. *Hypertension* 36, 195–200.

Jiang, H., Chen, W., Qu, L., Chen, Y., He, Q., Wang, H., Wu, J., Shou, Z., Ju, Z., and Chen, J. (2010). ELISA for Aging Biomarkers Induced by Telomere Dysfunction in Human Plasma. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010.

Jiang, X.-X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S.-X., Wu, Y., Yu, X.-D., and Mao, N. (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105, 4120–4126.

Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., et al. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41–49.

Jiao, F., Wang, J., Dong, Z., Wu, M., Zhao, T., Li, D., and Wang, X. (2012). Human Mesenchymal Stem Cells Derived From Limb Bud Can Differentiate into All Three Embryonic Germ Layers Lineages. *Cell.*

Reprogramming *14*, 324–333.

Jones, D.L., and Rando, T.A. (2011). Emerging models and paradigms for stem cell ageing. *Nat. Cell Biol.* *13*, 506–512.

Ab Kadir, R., Zainal Ariffin, S.H., Megat Abdul Wahab, R., Kermani, S., and Senafi, S. (2012). Characterization of Mononucleated Human Peripheral Blood Cells. *Sci. World J.* *2012*, e843843.

Kadiyala, S., Young, R.G., Thiede, M.A., and Bruder, S.P. (1997). Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant.* *6*, 125–134.

Kaftory, A., Hershko, A., and Fry, M. (1978). Protein turnover in senescent cultured chick embryo fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* *94*, 147–160.

Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grosveld, G., and Sherr, C.J. (1997). Tumor Suppression at the Mouse INK4a Locus Mediated by the Alternative Reading Frame Product p19 ARF. *Cell* *91*, 649–659.

Kang, S.K., Lee, D.H., Bae, Y.C., Kim, H.K., Baik, S.Y., and Jung, J.S. (2003). Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp. Neurol.* *183*, 355–366.

Kashiwakura, Y., Katoh, Y., Tamayose, K., Konishi, H., Takaya, N., Yuhara, S., Yamada, M., Sugimoto, K., and Daida, H. (2003). Isolation of Bone Marrow Stromal Cell-Derived Smooth Muscle Cells by a Human SM22 α Promoter In Vitro Differentiation of Putative Smooth Muscle Progenitor Cells of Bone Marrow. *Circulation* *107*, 2078–2081.

Kasper, G., Mao, L., Geissler, S., Draycheva, A., Trippens, J., Kühnisch, J., Tschirschmann, M., Kaspar, K., Perka, C., Duda, G.N., et al. (2009). Insights into Mesenchymal Stem Cell Aging: Involvement of Antioxidant Defense and Actin Cytoskeleton. *STEM CELLS* *27*, 1288–1297.

Kassem, M. (2004). Mesenchymal Stem Cells: Biological Characteristics and Potential Clinical Applications. *Cloning Stem Cells* *6*, 369–374.

Kassem, M., Mosekilde, L., and Eriksen, E.F. (1993). 1,25-dihydroxyvitamin D₃ potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells. *J. Bone Miner. Res.* *8*, 1453–1458.

Kibe, T., Osawa, G.A., Keegan, C.E., and Lange, T. de (2010). Telomere Protection by TPP1 Is Mediated by POT1a and POT1b. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 1059–1066.

Kieffer, E., Kuntz, S., and Viville, S. (2010). [An overview of pluripotent stem cell lines]. *Médecine Sci.* *MS* *26*, 848–854.

Kipling, D., and Cooke, H.J. (1990). Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* *347*, 400–402.

Kita, K., Gauglitz, G.G., Phan, T.T., Herndon, D.N., and Jeschke, M.G. (2009). Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells From the Sub-Amniotic Human Umbilical Cord Lining Membrane. *Stem Cells Dev.*

19, 491–502.

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

Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., et al. (2006). Role for Interferon- γ in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS* 24, 386–398.

Krause, D.S., Theise, N.D., Collector, M.I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., and Sharkis, S.J. (2001). Multi-Organ, Multi-Lineage Engraftment by a Single Bone Marrow-Derived Stem. *Cell* 105, 369–377.

Kuçi, S., Kuçi, Z., Kreyenberg, H., Deak, E., Pütsch, K., Huenecke, S., Amara, C., Koller, S., Rettinger, E., Grez, M., et al. (2010). CD271 antigen defines a subset of multipotent stromal cells with immunosuppressive and lymphohematopoietic engraftment-promoting properties. *Haematologica* 95, 651–659.

Kuhn, N.Z., and Tuan, R.S. (2010). Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: Implications in tumorigenesis and metastasis. *J. Cell. Physiol.* 222, 268–277.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev.* 24, 2463–2479.

Kurpinski, K., Lam, H., Chu, J., Wang, A., Kim, A., Tsay, E., Agrawal, S., Schaffer, D.V., and Li, S. (2010). Transforming Growth Factor- β and Notch Signaling Mediate Stem Cell Differentiation into Smooth Muscle Cells. *STEM CELLS* 28, 734–742.

Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci.* 113, 3613–3622.

Kuznetsov, S.A., Krebsbach, P.H., Satomura, K., Kerr, J., Riminucci, M., Benayahu, D., and Robey, P.G. (1997). Single-Colony Derived Strains of Human Marrow Stromal Fibroblasts Form Bone After Transplantation In Vivo. *J. Bone Miner. Res.* 12, 1335–1347.

Kuznetsov, S.A., Mankani, M.H., Gronthos, S., Satomura, K., Bianco, P., and Robey, P.G. (2001). Circulating Skeletal Stem Cells. *J. Cell Biol.* 153, 1133–1140.

Land, H., Parada, L.F., and Weinberg, R.A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596–602.

De Lange, T. (2009). How Telomeres Solve the End-Protection Problem. *Science* 326, 948.

Lee, R.H., Seo, M.J., Pulin, A.A., Gregory, C.A., Ylostalo, J., and Prockop, D.J. (2009). The CD34-like protein PODXL and $\alpha 6$ -integrin (CD49f) identify early progenitor MSCs with increased clonogenicity and migration to infarcted heart in mice. *Blood* 113, 816–826.

Lefebvre, V., Huang, W., Harley, V.R., Goodfellow, P.N., and Crombrughe, B. de (1997). SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro $\alpha 1(\text{II})$ collagen gene. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2336–

2346.

Leo, A.J., and Grande, D.A. (2006). Mesenchymal stem cells in tissue engineering. *Cells Tissues Organs* 183, 112–122.

Leskelä, H.-V., Risteli, J., Niskanen, S., Koivunen, J., Ivaska, K.K., and Lehenkari, P. (2003). Osteoblast recruitment from stem cells does not decrease by age at late adulthood. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 1008–1013.

Li, Y., Charif, N., Mainard, D., Bensoussan, D., Stoltz, J.-F., and de Isla, N. (2014a). Donor's age dependent proliferation decrease of human bone marrow mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity. *Biomed. Mater. Eng.* 24, 47–52.

Li, Y., Charif, N., Mainard, D., Bensoussan, D., Stoltz, J.-F., and de Isla, N. (2014b). Donor's age dependent proliferation decrease of human bone marrow mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity. *Biomed. Mater. Eng.* 24, 47–52.

Lin, A.W., Barradas, M., Stone, J.C., Aelst, L. van, Serrano, M., and Lowe, S.W. (1998). Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev.* 12, 3008–3019.

Loo, D.T., Fuquay, J.I., Rawson, C.L., and Barnes, D.W. (1987). Extended culture of mouse embryo cells without senescence: inhibition by serum. *Science* 236, 200–202.

Lowe, S.W., Cepero, E., and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432, 307–315.

Lv, F.-J., Tuan, R.S., Cheung, K.M.C., and Leung, V.Y.L. (2014). Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS* 32, 1408–1419.

Mabuchi, Y., Houlihan, D.D., Akazawa, C., Okano, H., and Matsuzaki, Y. (2013). Prospective Isolation of Murine and Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Based on Surface Markers. *Stem Cells Int.* 2013, e507301.

Maccario, R., Podesta, M., Moretta, A., Cometa, A., Comoli, P., Montagna, D., Daudt, L., Ibatici, A., Piaggio, G., Pozzi, S., et al. (2005). Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 90, 516–525.

Mackay, A.M., Beck, S.C., Murphy, J.M., Barry, F.P., Chichester, C.O., and Pittenger, M.F. (1998). Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.* 4, 415–428.

Maijenburg, M.W., Kleijer, M., Vermeul, K., Mul, E.P., van Alphen, F.P.J., van der Schoot, C.E., and Voermans, C. (2012a). The composition of the mesenchymal stromal cell compartment in human bone marrow changes during development and aging. *Haematologica* 97, 179–183.

Maijenburg, M.W., Kleijer, M., Vermeul, K., Mul, E.P.J., van Alphen, F.P.J., van der Schoot, C.E., and Voermans, C. (2012b). The composition of the mesenchymal stromal cell compartment in human bone marrow changes

during development and aging. *Haematologica* 97, 179–183.

Maitra, B., Szekely, E., Gjini, K., Laughlin, M.J., Dennis, J., Haynesworth, S.E., and Koç, O.N. (2004). Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant.* 33, 597–604.

Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., Abe, H., et al. (1999). Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 103, 697–705.

Mansilla, E., Dí, az Aquino, V., Zambó, N, D., Marin, G.H., Má, Rtire, K., Roque, G., Ichim, T., et al. (2011). Could Metabolic Syndrome, Lipodystrophy, and Aging Be Mesenchymal Stem Cell Exhaustion Syndromes? *Stem Cells Int.* 2011, e943216.

Mareschi, K., Ferrero, I., Rustichelli, D., Aschero, S., Gammaitoni, L., Aglietta, M., Madon, E., and Fagioli, F. (2006). Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J. Cell. Biochem.* 97, 744–754.

Margossian, T., Reppel, L., Makdissy, N., Stoltz, J.-F., Bensoussan, D., and Huselstein, C. (2012). Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly: comparative phenotype analysis between tissue and in vitro expansion. *Biomed. Mater. Eng.* 22, 243–254.

Martens, U.M., Chavez, E.A., Poon, S.S.S., Schmoor, C., and Lansdorp, P.M. (2000). Accumulation of Short Telomeres in Human Fibroblasts Prior to Replicative Senescence. *Exp. Cell Res.* 256, 291–299.

Masutomi, K., Yu, E.Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J.L., Metz, G.B., Brooks, M.W., Kaneko, S., Murakami, S., DeCaprio, J.A., et al. (2003). Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 114, 241–253.

Mathon, N.F., Malcolm, D.S., Harrisingh, M.C., Cheng, L., and Lloyd, A.C. (2001). Lack of Replicative Senescence in Normal Rodent Glia. *Science* 291, 872–875.

McDowall, S., Argentaro, A., Ranganathan, S., Weller, P., Mertin, S., Mansour, S., Tolmie, J., and Harley, V. (1999). Functional and Structural Studies of Wild Type SOX9 and Mutations Causing Campomelic Dysplasia. *J. Biol. Chem.* 274, 24023–24030.

McElreavey, K.D., Irvine, A.I., Ennis, K.T., and McLean, W.H. (1991). Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem. Soc. Trans.* 19, 29S.

Mehlhorn, A. t., Schmal, H., Kaiser, S., Lepski, G., Finkenzeller, G., Stark, G. b., and Südkamp, N. p. (2006). Mesenchymal Stem Cells Maintain TGF- β -Mediated Chondrogenic Phenotype in Alginate Bead Culture. *Tissue Eng.* 12, 1393–1403.

Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W., and Dilloo, D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103, 4619–4621.

Mendes, S. c., Tibbe, J. m., Veenhof, M., Bakker, K., Both, S., Platenburg, P. p., Oner, F. c., de Bruijn, J. d., and van Blitterswijk, C. a. (2002). Bone Tissue-Engineered Implants Using Human Bone Marrow Stromal Cells: Effect of Culture Conditions and Donor Age. *Tissue Eng.* 8, 911–920.

Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre', M., Giovanni Nuciforo, P., Bensimon, A., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638–642.

Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M.A.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005a). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720–724.

Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M.A.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005b). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720–724.

Minguell, J.J., Erices, A., and Conget, P. (2001). Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 226, 507–520.

Mitchell, P. (2003). Europe dithers over stem cell patents. *Nat. Med.* 9, 154–154.

Mitchell, J.B., McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Floyd, Z.E., Kloster, A., Di Halvorsen, Y., Storms, R.W., Goh, B., Kilroy, G., et al. (2006). Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers. *STEM CELLS* 24, 376–385.

Mitsui, Y., and Schneider, E.L. (1976). Increased nuclear sizes in senescent human diploid fibroblast cultures. *Exp. Cell Res.* 100, 147–152.

Morito, T., Muneta, T., Hara, K., Ju, Y.-J., Mochizuki, T., Makino, H., Umezawa, A., and Sekiya, I. (2008). Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology* 47, 1137–1143.

Mueller, S.M., and Glowacki, J. (2001). Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J. Cell. Biochem.* 82, 583–590.

Murphy, J.M., Dixon, K., Beck, S., Fabian, D., Feldman, A., and Barry, F. (2002). Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 46, 704–713.

Muschler, G.F., Nitto, H., Boehm, C.A., and Easley, K.A. (2001). Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J. Orthop. Res.* 19, 117–125.

Naghdi, M., Tiraihi, T., Namin, S.A.M., and Arabkheradmand, J. (2009). Transdifferentiation of bone marrow stromal cells into cholinergic neuronal phenotype: a potential source for cell therapy in spinal cord injury. *Cytotherapy* 11, 137–152.

Nandakumar, J., and Cech, T.R. (2013). Finding the end: recruitment of telomerase to the telomere. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 69–82.

Narita, M., Nuñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003a). Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence. *Cell* *113*, 703–716.

Narita, M., Nuñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003b). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* *113*, 703–716.

Nauta, A.J., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E., Willemze, R., and Fibbe, W.E. (2006). Mesenchymal Stem Cells Inhibit Generation and Function of Both CD34⁺-Derived and Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J. Immunol.* *177*, 2080–2087.

Nelson, T.J., Behfar, A., Yamada, S., Martinez-Fernandez, A., and Terzic, A. (2009). Stem Cell Platforms for Regenerative Medicine. *Clin. Transl. Sci.* *2*, 222–227.

Nguyen, H.T.Q., Galea, A.M., and Murray, V. (2013). The interaction of cisplatin with a human telomeric DNA sequence containing seventeen tandem repeats. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *23*, 1041–1045.

Nicola, M.D., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S., and Gianni, A.M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* *99*, 3838–3843.

Nishida, S., Endo, N., Yamagiwa, H., Tanizawa, T., and Takahashi, H.E. (1999). Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J. Bone Miner. Metab.* *17*, 171–177.

Noël, D., Dazard, J.-E., Pelegrin, M., Jacquet, C., and Piechaczyk, M. (2002). Skin as a Potential Organ for Ectopic Monoclonal Antibody Production1. *J. Invest. Dermatol.* *118*, 288–294.

Nuttall, M.E., Shah, F., Singh, V., Thomas-Porch, C., Frazier, T., and Gimble, J.M. (2013). Adipocytes and the Regulation of Bone Remodeling: A Balancing Act. *Calcif. Tissue Int.* *94*, 78–87.

Oh, S.-H., Muzzonigro, T.M., Bae, S.-H., LaPlante, J.M., Hatch, H.M., and Petersen, B.E. (2004). Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab. Invest.* *84*, 607–617.

Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T.J.G., Stinson, J.A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., Sharrocks, A.D., Peters, G., and Hara, E. (2001). Opposing effects of Ets and Id proteins on p16^{INK4a} expression during cellular senescence. *Nature* *409*, 1067–1070.

Ohtani, N., Yamakoshi, K., Takahashi, A., and Hara, E. (2004). The p16^{INK4a}/RB pathway : molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J. Med. Invest.* *51*, 146–153.

Olsen, C.L., Gardie, B., Yaswen, P., and Stampfer, M.R. (2002). Raf-1-induced growth arrest in human

mammary epithelial cells is p16-independent and is overcome in immortal cells during conversion. *Oncogene* 21, 6328–6339.

Oreffo, R.O., Bennett, A., Carr, A.J., and Triffitt, J.T. (1998a). Patients with primary osteoarthritis show no change with ageing in the number of osteogenic precursors. *Scand. J. Rheumatol.* 27, 415–424.

Oreffo, R.O., Bennett, A., Carr, A.J., and Triffitt, J.T. (1998b). Patients with primary osteoarthritis show no change with ageing in the number of osteogenic precursors. *Scand. J. Rheumatol.* 27, 415–424.

Oreffo, R.O., Bord, S., and Triffitt, J.T. (1998c). Skeletal progenitor cells and ageing human populations. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 94, 549–555.

Osterhage, J.L., and Friedman, K.L. (2009). Chromosome end maintenance by telomerase. *J. Biol. Chem.* 284, 16061–16065.

P, M., S, H., R, M., M, G., and W.S, K. (2011). Adult Mesenchymal Stem Cells and Cell Surface Characterization - A Systematic Review of the Literature. *Open Orthop. J.* 5, 253–260.

Packer, L., and Fuehr, K. (1977). Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature* 267, 423–425.

Palm, W., and de Lange, T. (2008a). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu. Rev. Genet.* 42, 301–334.

Palm, W., and de Lange, T. (2008b). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu. Rev. Genet.* 42, 301–334.

Park, J.-S., Kim, H.-Y., Kim, H.-W., Chae, G.-N., Oh, H.-T., Park, J.-Y., Shim, H., Seo, M., Shin, E.-Y., Kim, E.-G., et al. (2005). Increased caveolin-1, a cause for the declined adipogenic potential of senescent human mesenchymal stem cells. *Mech. Ageing Dev.* 126, 551–559.

Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* 5, 741–747.

Parrinello, S., Coppe, J.-P., Krtolica, A., and Campisi, J. (2005). Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J. Cell Sci.* 118, 485–496.

Payne, K.A., Didiano, D.M., and Chu, C.R. (2010). DONOR SEX AND AGE INFLUENCE THE CHONDROGENIC POTENTIAL OF HUMAN FEMORAL BONE MARROW STEM CELLS. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 18, 705–713.

Pedram, M., Sprung, C.N., Gao, Q., Lo, A.W.I., Reynolds, G.E., and Murnane, J.P. (2006). Telomere Position Effect and Silencing of Transgenes near Telomeres in the Mouse. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1865–1878.

Pendleton, C., Li, Q., Chesler, D.A., Yuan, K., Guerrero-Cazares, H., and Quinones-Hinojosa, A. (2013). Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue vs Bone Marrow: In Vitro Comparison of Their Tropism towards Gliomas. *PLoS ONE* 8, e58198.

Pereira, R.F., Halford, K.W., O'Hara, M.D., Leeper, D.B., Sokolov, B.P., Pollard, M.D., Bagasra, O., and Prockop, D.J. (1995). Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 4857–4861.

Phinney, D.G., Kopen, G., Righter, W., Webster, S., Tremain, N., and Prockop, D.J. (1999). Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J. Cell. Biochem.* 75, 424–436.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147.

Planat-Benard, V., Silvestre, J.-S., Cousin, B., André, M., Nibbelink, M., Tamarat, R., Clergue, M., Manneville, C., Saillan-Barreau, C., Duriez, M., et al. (2004). Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109, 656–663.

Planat-Bénard, V., Menard, C., André, M., Puceat, M., Perez, A., Garcia-Verdugo, J.-M., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (2004). Spontaneous Cardiomyocyte Differentiation From Adipose Tissue Stroma Cells. *Circ. Res.* 94, 223–229.

Poele, R.H. te, Okorokov, A.L., Jardine, L., Cummings, J., and Joel, S.P. (2002). DNA Damage Is Able to Induce Senescence in Tumor Cells in Vitro and in Vivo. *Cancer Res.* 62, 1876–1883.

Ben-Porath, I., and Weinberg, R.A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 961–976.

Prevosto, C., Zancolli, M., Canevali, P., Zocchi, M.R., and Poggi, A. (2007). Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica* 92, 881–888.

Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71–74.

Prowse, K.R., and Greider, C.W. (1995). Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 4818–4822.

Psaltis, P. j., Paton, S., See, F., Arthur, A., Martin, S., Itescu, S., Worthley, S. g., Gronthos, S., and Zannettino, A. c. w. (2010). Enrichment for STRO-1 expression enhances the cardiovascular paracrine activity of human bone marrow-derived mesenchymal cell populations. *J. Cell. Physiol.* 223, 530–540.

Puissant, B., Barreau, C., Bourin, P., Clavel, C., Corre, J., Bousquet, C., Taureau, C., Cousin, B., Abbal, M., Laharrague, P., et al. (2005). Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br. J. Haematol.* 129, 118–129.

Quirici, N., Soligo, D., Bossolasco, P., Servida, F., Lumini, C., and Delilieri, G.L. (2002). Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp. Hematol.* 30, 783–791.

Ramirez, R.D., Morales, C.P., Herbert, B.-S., Rohde, J.M., Passons, C., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2001).

Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev.* 15, 398–403.

Rando, T.A. (2006). Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* 441, 1080–1086.

Ranera, B., Remacha, A.R., Álvarez-Arguedas, S., Castiella, T., Vázquez, F.J., Romero, A., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I., and Rodellar, C. (2013). Expansion under hypoxic conditions enhances the chondrogenic potential of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Vet. J.* 195, 248–251.

Rasmusson, I., Ringdén, O., Sundberg, B., and Le Blanc, K. (2003). Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 76, 1208–1213.

Raynaud, C.M., Maleki, M., Lis, R., Ahmed, B., Al-Azwani, I., Malek, J., Safadi, F.F., and Rafii, A. (2012). Comprehensive Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Human Placenta and Fetal Membrane and Their Response to Osteoactivin Stimulation. *Stem Cells Int.* 2012, e658356.

Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C., and Shi, Y. (2008). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell* 2, 141–150.

Reppel, L., Margossian, T., Yaghi, L., Moreau, P., Mercier, N., Leger, L., Hupont, S., Stoltz, J.-F., Bensoussan, D., and Huselstein, C. (2014). Hypoxic culture conditions for Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Wharton's jelly: a critical parameter to consider in a therapeutic context. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 9, 306–318.

Rickard, D.J., Kassem, M., Hefferan, T.E., Sarkar, G., Spelsberg, T.C., and Riggs, B.L. (1996). Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J. Bone Miner. Res.* 11, 312–324.

Rider, D.A., Nalathamby, T., Nurcombe, V., and Cool, S.M. (2007). Selection using the alpha-1 integrin (CD49a) enhances the multipotentiality of the mesenchymal stem cell population from heterogeneous bone marrow stromal cells. *J. Mol. Histo.* 38, 449–458.

Riekstina, U., Muceniece, R., Cakstina, I., Muiznieks, I., and Ancans, J. (2008). Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions. *Cytotechnology* 58, 153–162.

Robert, J., and Raymond, E. (2013). Les cibles nucléaires en oncologie (John Libbey Eurotext).

Roberts, I. (2004). Mesenchymal stem cells. *Vox Sang.* 87, 38–41.

Rochette, P.J., and Brash, D.E. (2008). Progressive Apoptosis Resistance Prior to Senescence and Control by the Anti-apoptotic Protein BCL-xL. *Mech. Ageing Dev.* 129, 207–214.

Rodier, F., Kim, S.-H., Nijjar, T., Yaswen, P., and Campisi, J. (2005). Cancer and aging: the importance of telomeres in genome maintenance. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 977–990.

Rodríguez, J.P., Garat, S., Gajardo, H., Pino, A.M., and Seitz, G. (1999). Abnormal osteogenesis in osteoporotic

patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics. *J. Cell. Biochem.* 75, 414–423.

Rogers, I., and Casper, R.F. (2004). Umbilical cord blood stem cells. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 18, 893–908.

Rosen, E.D., and MacDougald, O.A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 885–896.

Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2000). Molecular Regulation of Adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 145–171.

Rossant, J., and Tam, P.P.L. (2009). Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development* 136, 701–713.

Rotter, N., Oder, J., Schlenke, P., Lindner, U., Böhrnsen, F., Kramer, J., Rohwedel, J., Huss, R., Brandau, S., Wollenberg, B., et al. (2008). Isolation and Characterization of Adult Stem Cells from Human Salivary Glands. *Stem Cells Dev.* 17, 509–518.

Russell, K.C., Phinney, D.G., Lacey, M.R., Barrilleaux, B.L., Meyertholen, K.E., and O'Connor, K.C. (2010). In Vitro High-Capacity Assay to Quantify the Clonal Heterogeneity in Trilineage Potential of Mesenchymal Stem Cells Reveals a Complex Hierarchy of Lineage Commitment. *STEM CELLS* 28, 788–798.

Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P.G., Riminucci, M., et al. (2007). Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell* 131, 324–336.

Safford, K.M., Hicok, K.C., Safford, S.D., Halvorsen, Y.-D.C., Wilkison, W.O., Gimble, J.M., and Rice, H.E. (2002). Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 371–379.

Sage, J., Mulligan, G.J., Attardi, L.D., Miller, A., Chen, S., Williams, B., Theodorou, E., and Jacks, T. (2000). Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G1 control and immortalization. *Genes Dev.* 14, 3037–3050.

Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T.B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., et al. (2000). Adult Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neural Cells in Vitro. *Exp. Neurol.* 164, 247–256.

Scharstuhl, A., Schewe, B., Benz, K., Gaissmaier, C., Bühring, H.-J., and Stoop, R. (2007). Chondrogenic Potential of Human Adult Mesenchymal Stem Cells Is Independent of Age or Osteoarthritis Etiology. *STEM CELLS* 25, 3244–3251.

Schiavi, J., Charif, N., Isla, N. de, Bensoussan, D., Stoltz, J.-F., Benkirane-Jessel, N., and Huselstein, C. (2012). Does Making Method of Alginate Hydrogel Influence the Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells? *Engineering* 04, 110–113.

Schneider, E.L., and Shorr, S.S. (1975). Alteration in cellular RNAs during the in Vitro lifespan of cultured

human diploid fibroblasts. *Cell* 6, 179–184.

Schüring, A.N., Schulte, N., Kelsch, R., Röpke, A., Kiesel, L., and Götte, M. (2011). Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertil. Steril.* 95, 423–426.

Schwartz, R.E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W.-S., and Verfaillie, C.M. (2002). Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.* 109, 1291–1302.

Seifrtová, M., Havelek, R., Čmielová, J., Jiroutová, A., Soukup, T., Brůčková, L., Mokry, J., English, D., and Řezáčová, M. (2012). The response of human ectomesenchymal dental pulp stem cells to cisplatin treatment. *Int. Endod. J.* 45, 401–412.

Sekiya, I., Larson, B.L., Smith, J.R., Pochampally, R., Cui, J.-G., and Prockop, D.J. (2002). Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells Dayt. Ohio* 20, 530–541.

Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B., Gaiffe, E., Obert, L., Borg, C., Saas, P., Tiberghien, P., Rouas-Freiss, N., 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+CD25^{high}FOXP3⁺ Regulatory T Cells. *STEM CELLS* 26, 212–222.

Serrano, M. (1997). The Tumor Suppressor Protein p16INK4a. *Exp. Cell Res.* 237, 7–13.

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593–602.

Seshadri, T., and Campisi, J. (1989). Growth-factor-inducible gene expression in senescent human fibroblasts. *Exp. Gerontol.* 24, 515–522.

Seshadri, T., and Campisi, J. (1990). Repression of c-fos transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts. *Science* 247, 205–209.

Sethe, S., Scutt, A., and Stolzing, A. (2006a). Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res. Rev.* 5, 91–116.

Sethe, S., Scutt, A., and Stolzing, A. (2006b). Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res. Rev.* 5, 91–116.

Sethe, S., Scutt, A., and Stolzing, A. (2006c). Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res. Rev.* 5, 91–116.

Shalev, I., Entringer, S., Wadhwa, P.D., Wolkowitz, O.M., Puterman, E., Lin, J., and Epel, E.S. (2013). Stress and telomere biology: A lifespan perspective. *Psychoneuroendocrinology* 38, 1835–1842.

Sharpless, N.E., and DePinho, R.A. (2007). How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 703–713.

Shay, J.W., and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 33, 787–791.

- Shay, J.W., and Wright, W.E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 72–76.
- Shay, J.W., and Wright, W.E. (2005). Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* *26*, 867–874.
- Shen, B., Wei, A., Tao, H., Diwan, A.D., and Ma, D.D.F. (2008). BMP-2 Enhances TGF- β 3–Mediated Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Alginate Bead Culture. *Tissue Eng. Part A* *15*, 1311–1320.
- Sherr, C.J., and DePinho, R.A. (2000a). Cellular Senescence. *Cell* *102*, 407–410.
- Sherr, C.J., and DePinho, R.A. (2000b). Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* *102*, 407–410.
- Sherr, C.J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* *2*, 103–112.
- Siddappa, R., Licht, R., van Blitterswijk, C., and de Boer, J. (2007). Donor variation and loss of multipotency during in vitro expansion of human mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *J. Orthop. Res.* *25*, 1029–1041.
- Siegel, G., Kluba, T., Hermanutz-Klein, U., Bieback, K., Northoff, H., and Schäfer, R. (2013a). Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Med.* *11*, 146.
- Siegel, G., Kluba, T., Hermanutz-Klein, U., Bieback, K., Northoff, H., and Schäfer, R. (2013b). Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Med.* *11*, 146.
- Simmons, P.J., and Torok-Storb, B. (1991). Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* *78*, 55–62.
- Simonsen, J.L., Rosada, C., Serakinci, N., Justesen, J., Stenderup, K., Rattan, S.I.S., Jensen, T.G., and Kassem, M. (2002). Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat. Biotechnol.* *20*, 592–596.
- Smith, A.G. (2001). EMBRYO-DERIVED STEM CELLS: Of Mice and Men. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *17*, 435–462.
- Sohni, A., and Verfaillie, C.M. (2011). Multipotent adult progenitor cells. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* *24*, 3–11.
- Song, L., and Tuan, R.S. (2004). Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *18*, 980–982.
- Sorrentino, A., Ferracin, M., Castelli, G., Biffoni, M., Tomaselli, G., Baiocchi, M., Fatica, A., Negrini, M., Peschle, C., and Valtieri, M. (2008). Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Exp. Hematol.* *36*, 1035–1046.
- Sotiropoulou, P.A., Perez, S.A., Gritzapis, A.D., Baxevanis, C.N., and Papamichail, M. (2006). Interactions

Between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells. *STEM CELLS* 24, 74–85.

Stein, G.S., Lian, J.B., and Owen, T.A. (1990). Bone cell differentiation: a functionally coupled relationship between expression of cell-growth- and tissue-specific genes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, 1018–1027.

Stenderup, K., Justesen, J., Eriksen, E.F., Rattan, S.I.S., and Kassem, M. (2001). Number and Proliferative Capacity of Osteogenic Stem Cells Are Maintained During Aging and in Patients with Osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* 16, 1120–1129.

Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C., and Kassem, M. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells,. *Bone* 33, 919–926.

Stojković, M., and Daher, S. (2009). Celebrating 10 Years of hESC Lines: An Interview with Ariff Bongso. *STEM CELLS* 27, 275–277.

Stolzing, A., Jones, E., McGonagle, D., and Scutt, A. (2008a). Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. *Mech. Ageing Dev.* 129, 163–173.

Stolzing, A., Jones, E., McGonagle, D., and Scutt, A. (2008b). Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech. Ageing Dev.* 129, 163–173.

Sun, Y., Li, W., Lu, Z., Chen, R., Ling, J., Ran, Q., Jilka, R.L., and Chen, X.-D. (2011). Rescuing replication and osteogenesis of aged mesenchymal stem cells by exposure to a young extracellular matrix. *FASEB J.* 25, 1474–1485.

Suva, D., Garavaglia, G., Menetrey, J., Chapuis, B., Hoffmeyer, P., Bernheim, L., and Kindler, V. (2004). Non-hematopoietic human bone marrow contains long-lasting, pluripotent mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* 198, 110–118.

Takada, I., Kouzmenko, A.P., and Kato, S. (2009). Wnt and PPAR γ signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5, 442–447.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872.

Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003). DNA Damage Foci at Dysfunctional Telomeres. *Curr. Biol.* 13, 1549–1556.

Tanaka, N., Ishihara, M., Kitagawa, M., Harada, H., Kimura, T., Matsuyama, T., Lamphier, M.S., Aizawa, S., Mak, T.W., and Taniguchi, T. (1994). Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1. *Cell* 77, 829–839.

Tang, D.-Q., Wang, Q., Burkhardt, B.R., Litherland, S.A., Atkinson, M.A., and Yang, L.-J. (2012). In vitro generation of functional insulin-producing cells from human bone marrow-derived stem cells, but long-term culture running risk of malignant transformation. *Am. J. Stem Cells* 1, 114–127.

- Thirumala, S., Goebel, W.S., and Woods, E.J. (2009). Clinical grade adult stem cell banking. *Organogenesis* 5, 143–154.
- Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R.A., Budavari, A.I., and Spiegelman, B.M. (1994). mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 8, 1224–1234.
- Tormin, A., Li, O., Brune, J.C., Walsh, S., Schütz, B., Ehinger, M., Ditzel, N., Kassem, M., and Scheding, S. (2011). CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood* 117, 5067–5077.
- Tritz, J., Rahouadj, R., Isla, N. de, Charif, N., Pinzano, A., Mainard, D., Bensoussan, D., Netter, P., Stoltz, J.-F., Benkirane-Jessel, N., et al. (2010). Designing a three-dimensional alginate hydrogel by spraying method for cartilage tissue engineering. *Soft Matter* 6, 5165–5174.
- Troyer, D.L., and Weiss, M.L. (2008). Concise Review: Wharton’s Jelly-Derived Cells Are a Primitive Stromal Cell Population. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 591–599.
- Tse, W.T., Pendleton, J.D., Beyer, W.M., Egalka, M.C., and Guinan, E.C. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 75, 389–397.
- Tsuchiya, H., Kitoh, H., Sugiura, F., and Ishiguro, N. (2003). Chondrogenesis enhanced by overexpression of sox9 gene in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 338–343.
- Turgeman, G., Zilberman, Y., Zhou, S., Kelly, P., Moutsatsos, I.K., Kharode, Y.P., Borella, L.E., Bex, F.J., Komm, B.S., Bodine, P.V.N., et al. (2002). Systemically administered rhBMP-2 promotes MSC activity and reverses bone and cartilage loss in osteopenic mice. *J. Cell. Biochem.* 86, 461–474.
- Vaziri, H. (1997). Critical telomere shortening regulated by the ataxia-telangiectasia gene acts as a DNA damage signal leading to activation of p53 protein and limited life-span of human diploid fibroblasts. A review. *Biochem. Biokhimiia* 62, 1306–1310.
- Vera, E., and Blasco, M.A. (2012). Beyond average: potential for measurement of short telomeres. *Aging* 4, 379–392.
- Verdun, R.E., and Karlseder, J. (2007). Replication and protection of telomeres. *Nature* 447, 924–931.
- Vojta, P.J., and Barrett, J.C. (1995). Genetic analysis of cellular senescence. *Biochim. Biophys. Acta* 1242, 29–41.
- Wada, T., Joza, N., Cheng, H.M., Sasaki, T., Kozieradzki, I., Bachmaier, K., Katada, T., Schreiber, M., Wagner, E.F., Nishina, H., et al. (2004). MKK7 couples stress signalling to G2/M cell-cycle progression and cellular senescence. *Nat. Cell Biol.* 6, 215–226.
- Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., Benes, V., Blake, J., Pfister, S., Eckstein, V., et al. (2008). Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process.

PloS One 3, e2213.

Wagner, W., Bork, S., Horn, P., Kronic, D., Walenda, T., Diehlmann, A., Benes, V., Blake, J., Huber, F.-X., Eckstein, V., et al. (2009a). Aging and Replicative Senescence Have Related Effects on Human Stem and Progenitor Cells. *PLoS ONE* 4.

Wagner, W., Bork, S., Horn, P., Kronic, D., Walenda, T., Diehlmann, A., Benes, V., Blake, J., Huber, F.-X., Eckstein, V., et al. (2009b). Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PloS One* 4, e5846.

Wagner, W., Bork, S., Lepperdinger, G., Joussen, S., Ma, N., Strunk, D., and Koch, C. (2010a). How to track cellular aging of mesenchymal stromal cells? *Aging* 2, 224–230.

Wagner, W., Bork, S., Lepperdinger, G., Joussen, S., Ma, N., Strunk, D., and Koch, C. (2010b). How to track cellular aging of mesenchymal stromal cells? *Aging* 2, 224–230.

Wakitani, S., Saito, T., and Caplan, A.I. (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18, 1417–1426.

Wang, E. (1995). Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res.* 55, 2284–2292.

Wang, C.-Y., Yang, S.-F., Wang, Z., Tan, J.-M., Xing, S.-M., Chen, D.-C., Xu, S.-M., and Yuan, W. (2013). PCAF acetylates Runx2 and promotes osteoblast differentiation. *J. Bone Miner. Metab.* 31, 381–389.

Wei, S., Wei, W., and Sedivy, J.M. (1999). Expression of Catalytically Active Telomerase Does Not Prevent Premature Senescence Caused by Overexpression of Oncogenic Ha-Ras in Normal Human Fibroblasts. *Cancer Res.* 59, 1539–1543.

Wei, W., Hemmer, R.M., and Sedivy, J.M. (2001). Role of p14ARF in Replicative and Induced Senescence of Human Fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6748–6757.

Weissman, I.L., Anderson, D.J., and Gage, F. (2001). STEM AND PROGENITOR CELLS: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 387–403.

Weng, N.P., and Hodes, R.J. (2000). The role of telomerase expression and telomere length maintenance in human and mouse. *J. Clin. Immunol.* 20, 257–267.

Wilson, A., Shehadeh, L.A., Yu, H., and Webster, K.A. (2010). Age-related molecular genetic changes of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC Genomics* 11, 229.

Won, J., Kim, M., Kim, N., Ahn, J.H., Lee, W.G., Kim, S.S., Chang, K.-Y., Yi, Y.-W., and Kim, T.K. (2006). Small molecule-based reversible reprogramming of cellular lifespan. *Nat. Chem. Biol.* 2, 369–374.

Wright, W.E., and Shay, J.W. (2000). Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat. Med.* 6, 849–851.

Wright, W.E., and Shay, J.W. (2002). Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nat.*

Biotechnol. 20, 682–688.

Wu, X.-B., and Tao, R. (2012). Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 11, 360–371.

Xiao, G., Jiang, D., Thomas, P., Benson, M.D., Guan, K., Karsenty, G., and Franceschi, R.T. (2000). MAPK Pathways Activate and Phosphorylate the Osteoblast-specific Transcription Factor, Cbfa1. *J. Biol. Chem.* 275, 4453–4459.

Xin, H., Liu, D., and Songyang, Z. (2008). The telosome/shelterin complex and its functions. *Genome Biol.* 9, 232.

Yang, N.-C., and Hu, M.-L. (2005). The limitations and validities of senescence associated- β -galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Exp. Gerontol.* 40, 813–819.

Yang, H.J., Kim, K.-J., Kim, M.K., Lee, S.J., Ryu, Y.H., Seo, B.F., Oh, D.-Y., Ahn, S.-T., Lee, H.Y., and Rhie, J.W. (2014). The stem cell potential and multipotency of human adipose tissue-derived stem cells vary by cell donor and are different from those of other types of stem cells. *Cells Tissues Organs* 199, 373–383.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* 318, 1917–1920.

Yu, J.M., Wu, X., Gimble, J.M., Guan, X., Freitas, M.A., and Bunnell, B.A. (2011). Age-related changes in mesenchymal stem cells derived from rhesus macaque bone marrow. *Aging Cell* 10, 66–79.

Yuan, H., Kaneko, T., and Matsuo, M. (1995). Relevance of oxidative stress to the limited replicative capacity of cultured human diploid cells: the limit of cumulative population doublings increases under low concentrations of oxygen and decreases in response to aminotriazole. *Mech. Ageing Dev.* 81, 159–168.

Zaim, M., Karaman, S., Cetin, G., and Isik, S. (2012a). Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann. Hematol.* 91, 1175–1186.

Zaim, M., Karaman, S., Cetin, G., and Isik, S. (2012b). Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann. Hematol.* 91, 1175–1186.

Zannettino, A. c. w., Paton, S., Arthur, A., Khor, F., Itescu, S., Gimble, J. m., and Gronthos, S. (2008). Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J. Cell. Physiol.* 214, 413–421.

Zeng, X., and Rao, M.S. (2007). Human embryonic stem cells: long term stability, absence of senescence and a potential cell source for neural replacement. *Neuroscience* 145, 1348–1358.

Zglinicki, T. von, Saretzki, G., Ladhoff, J., Fagagna, F. d'Adda di, and Jackson, S.P. (2005). Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech. Ageing Dev.* 126, 111–117.

Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Döcke, W., and Lotze, C. (1995). Mild Hyperoxia Shortens Telomeres and Inhibits Proliferation of Fibroblasts: A Model for Senescence? *Exp. Cell Res.* 220, 186–193.

Zhang, J., An, Y., Gao, L.-N., Zhang, Y.-J., Jin, Y., and Chen, F.-M. (2012). The effect of aging on the pluripotential capacity and regenerative potential of human periodontal ligament stem cells. *Biomaterials* 33, 6974–6986.

Zhang, R., Poustovoitov, M.V., Ye, X., Santos, H.A., Chen, W., Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Serebriiskii, I.G., Canutescu, A.A., Dunbrack, R.L., et al. (2005a). Formation of MacroH2A-Containing Senescence-Associated Heterochromatin Foci and Senescence Driven by ASF1a and HIRA. *Dev. Cell* 8, 19–30.

Zhang, R., Poustovoitov, M.V., Ye, X., Santos, H.A., Chen, W., Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Serebriiskii, I.G., Canutescu, A.A., Dunbrack, R.L., et al. (2005b). Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev. Cell* 8, 19–30.

Zhang, W., Ge, W., Li, C., You, S., Liao, L., Han, Q., Deng, W., and Zhao, R.C.H. (2004). Effects of Mesenchymal Stem Cells on Differentiation, Maturation, and Function of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Stem Cells Dev.* 13, 263–271.

Zhou, S., Greenberger, J.S., Epperly, M.W., Goff, J.P., Adler, C., LeBoff, M.S., and Glowacki, J. (2008a). Age-Related Intrinsic Changes in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Their Differentiation to Osteoblasts. *Aging Cell* 7, 335–343.

Zhou, S., Greenberger, J.S., Epperly, M.W., Goff, J.P., Adler, C., LeBoff, M.S., and Glowacki, J. (2008b). Age-Related Intrinsic Changes in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Their Differentiation to Osteoblasts. *Aging Cell* 7, 335–343.

Zimmermann, M., Kibe, T., Kabir, S., and Lange, T. de (2014). TRF1 negotiates TTAGGG repeat-associated replication problems by recruiting the BLM helicase and the TPP1/POT1 repressor of ATR signaling. *Genes Dev.* 28, 2477–2491.

Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H. (2001). Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng.* 7, 211–228.

(2002). p16INK4a inactivation is not required to immortalize human mammary epithelial cells. *Publ. Online* 07 Novemb. 2002 Doi101038sjonc1205902 21.

Annexes

I. Annexe 1 : Liste des prélèvements utilisés dans l'étude

Tranche	Echantillon	Ordre n°	Âge	Sexe	Identifiant	Origine
< 40 ans	1	29	25 ans	F	140416MSC	UTCT
	2	23	10 ans	M	140213MSC	UTCT
	3	22	12 ans	M	131216MSC	UTCT
	4	26	12 ans	F	140318MSC	UTCT
	5	18	15 ans	M	130530MSC	UTCT
	6	12	18 ans	M	120515MSC	COT
	7	32	18 ans	M	140429MSC	UTCT
	8	44	20 ans	F	150327MSC	COT
	9	30	20 ans	F	140528MSC	UTCT
	10	6	22 ans	M	120207MSC	UTCT
	11	24	24 ans	F	140219MSC	COT
	12	27	24 ans	M	140319MSC	UTCT
	13	35	24 ans	F	140909MSC	UTCT
	14	31	25 ans	M	140530MSC	COT
	15	9	3 ans	F	120416MSC	UTCT
	16	28	30 ans	M	140325MSC	UTCT
	17	34	30 ans	F	140710MSC	COT
	18	8	32 ans	M	120411MSC	UTCT
	19	45	32 ans	F	150417MSC	COT
	20	33	33 ans	M	140513MSC	UTCT
	21	19	36 ans	F	130705MSC	COT
	22	39	37 ans	F	141114MSC	COT
	23	3	39 ans	F	111202MSCA	COT
> 40 ans	24	25	41 ans	F	140313MSC	UTCT
	25	5	44 ans	F	120203MSC	COT
	26	1	51 ans	M	111124MSC	COT
	27	11	55 ans	M	120424MSC	COT
	28	4	56 ans	M	111202MSCB	COT
	29	40	58 ans	M	141217MSC	COT
	30	43	59 ans	M	150331MSC	COT
	31	10	65 ans	F	120420MSC	COT
	32	41	66 ans	M	141218MSC	COT
	33	13	68 ans	M	121212MSC	COT
	34	38	68 ans	M	141105MSCB	COT
	35	2	70 ans	F	111130MSC	COT
	36	7	72 ans	F	120307MSC	COT
	37	37	73 ans	F	141105MSCA	COT
	38	15	75 ans	F	130328MSC	COT
	39	42	76 ans	M	141219MSC	COT
	40	14	79 ans	F	130116MSC	COT
	41	16	82 ans	F	130402MSC	COT
	42	17	84 ans	F	130410MSC	COT
	43	20	85 ans	F	130903MSC	COT
	44	21	85 ans	F	131204MSC	COT
	45	36	86 ans	M	141028MSC	COT

M= Masculin ; F=Féminin ; MSC= Cellules souches mésenchymateuses

UTCT=Unité de thérapie cellulaire et tissulaire du centre hospitalier universitaire de Nancy

COT=Chirurgie orthopédique et traumatologique du centre hospitalier universitaire de Nancy

II. Annexe 2 : Composition des milieux de culture utilisés pour la différenciation adipocytaire, ostéocytaire et chondrocytaire.

Fiche technique des milieux de différenciation de la société Lonza

Milieux utilisés pour la différenciation adipocytaire

Composants	Induction (Lonza, Réf PT-4135)	Maintien (Lonza, Réf PT-4122)
h-insuline (recombinante)	OK	OK
L-glutamine	OK	OK
MCGS	OK	OK
dexamethasone	OK	
indométhacine	OK	
IBMX (3-isobutyl-l-méthyl-xanthine)	OK	
GA-1000	OK	OK

Milieux utilisés pour la différenciation ostéocytaire

Composants	Induction (Lonza, Réf PT-3924)	Maintien (α MEM) (Lonza, Réf BE12-169F)
dexamethasone	OK	
L-glutamine	OK	OK
ascorbate	OK	
penicillin/streptomycin	OK	OK
MCGS	OK	
SVF		OK
Amphotéricine B		OK

Milieux utilisés pour la différenciation chondrocytaire

Composants	Induction (Lonza, Réf PT-3925)	Maintien (α MEM) (Lonza, Réf BE12-169F)
dexamethasone	OK	
ascorbate	OK	OK
ITS+supplement	OK	
GA-1000	OK	OK
sodium pyruvate	OK	
Proline	OK	
L-glutamine	OK	
TGF β 3	OK	
SVF		OK
Amphotéricine B		OK

III. Annexe 3 : Liste d'anticorps

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Isotype	Volume /test	Fournisseur	Référence
Anti-CD34/PE	Humain	IgG (Souris)	20 µL	BD Pharmingen	555822
Anti-CD90/FITC	Humain	IgG (Souris)	20 µL	Beckman Coulter	IM1839U
Anti-CD44/FITC	Humain	IgG (Souris)	20 µL	Beckman Coulter	IM1219U
Anti-CD105/PE	Humain	IgG (Souris)	20 µL	Beckman Coulter	A07414
Anti-CD45/FITC	Humain	IgG (Souris)	10 µL	DakoCytomation	F0861
Anti-CD166/PE	Humain	IgG (Souris)	20 µL	Beckman Coulter	A22361
Anti-HLA-DR/FITC	Humain	IgG (Souris)	20 µL	Beckman Coulter	IM0463U
Anti-CD73/PE	Humain	IgG (Souris)	20 µL	BD Pharmingen	550257
Anti-CD71/FITC	Humain	IgG (Souris)	20 µL	BD Pharmingen	555536
Anti-CD106/PE	Humain	IgG (Souris)	20 µL	BD Pharmingen	555647
Anti-CD146/FITC	Humain	IgG (Souris)	5 µL	BD Pharmingen	560846
Anti-CD200/PE	Humain	IgG (Souris)	20 µL	BD Pharmingen	552475
Anti-CD140b/PE	Humain	IgG (Souris)	20 µL	BD Pharmingen	558821
Anti-CD271/Alexa Fluor	Humain	IgG (Souris)	20 µL	BD Pharmingen	560326
Anti-CD274/PE	Humain	IgG (Souris)	20 µL	BD Pharmingen	561787
Contrôle isotipique/FITC	Humain	IgG (Souris)	10 µL	DakoCytomation	X0927
Contrôle isotipique/PE	Humain	IgG (Souris)	10 µL	DakoCytomation	X0928

Résumé : Grâce à leurs propriétés de prolifération, de différenciation et de sécrétion, les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) constituent aujourd'hui un outil intéressant en médecine régénérative. La moelle osseuse (MO) reste à ce jour une des plus utilisées. Une diminution de la capacité de prolifération et de différenciation des CSM-MO, au cours des passages, a été montrée. En parallèle, l'impact de l'âge du donneur sur les propriétés de CSM-MO reste encore controversé. Le but de notre étude était de mieux comprendre l'effet de l'âge du donneur mais aussi des passages en culture sur la capacité de prolifération et de différenciation des CSM de moelle osseuse. Les échantillons ont été séparés en 4 groupes en fonction de l'âge des donneurs (<20 ans; 20-40 ans; 40-60 ans; >60 ans) et les analyses ont été réalisées lors de la culture de cellules pendant 5 passages. Les résultats obtenus montrent que la capacité de prolifération de CSM-MO obtenues à partir de donneurs jeunes est supérieure à celle de cellules des donneurs âgés. De plus, cette capacité de prolifération diminue en fonction des passages en culture. En parallèle, la capacité des cellules à former des colonies, mesurée par le test CFU-F, diminue légèrement en fonction de l'âge des donneurs mais de façon importante en fonction du passage. Enfin, la capacité de différenciation des CSM-MO vers les trois types cellulaires étudiés, chondrocytes, ostéocytes et adipocytes, diminue en fonction des passages de cellules mais également en fonction de l'âge des donneurs. Notre étude montre que les propriétés des CSM issues de moelle osseuse sont modifiées lors de l'amplification *in vitro* mais aussi en fonction de l'âge des donneurs. En parallèle, nous avons montré que ce phénomène est accompagné par l'apparition de cellules sénescentes et la diminution de la sous-population CD146 au sein des prélèvements cellulaires. Ceci ouvre des perspectives intéressantes.

Mots clés : cellules stromales mésenchymateuses ; moelle osseuse ; vieillissement ; sénescence

Summary: Today with their proliferation, differentiation into specific cell types, and secretion properties, mesenchymal stromal cells (MSC) can be used in regenerative medicine. Bone marrow (BM) is the better characterized source. The researchers have proven that with increasing passage number in culture the proliferation and the differentiation potential of MSC decrease. In parallel many the impact of donor age on MSC properties remains controversial. The aim of our study was to better understand the effect of donor age but also culture passages on the proliferation and differentiation ability of bone marrow mesenchymal stromal cells. The samples were separated into 4 groups depending on the donor's age (<20 years; 20-40 years; 40-60 years; > 60 years) and the samples were cultured for 5 passages. The results obtained showed that the MSC proliferative capacity obtained from young donors is greater than that of cells from older donors. In addition, the proliferative capacity decreases with increasing passage number in culture. In parallel, the ability to form colony-forming unit-fibroblast, measured by the CFU-F assay, decreases slightly depending on the age of the donors but significantly depending on the passage in culture. Finally, the MSC differentiation ability decreases according to the passage of the cells but also depending on the donor age. Our study shows that the properties of bone marrow derived MSC are modified not only during amplification *in vitro* but also in terms of donor's age. In parallel, we showed the apparition of senescent cells and the decrease in the sub-population CD146 in the samples opening interesting research perspectives.

Keywords: mesenchymal stromal cells; bone marrow; aging; senescence