



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>  
Eprints ID : 17462

**To cite this version :**

Dordolo, Alizée. *Validation de la production et de la caractérisation des cellules souches mésenchymateuses canines dérivées de tissu adipeux*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2017, 114 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

# VALIDATION DE LA PRODUCTION ET DE LA CARACTERISATION DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES CANINES DERIVEES DU TISSU ADIPEUX (ASC)

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**DORDOLO Alizée**

Née, le 28 avril 1991 à Le Havre (76)

---

**Directeur de thèse : Mme Isabelle RAYMOND-LETRON**

---

## JURY

PRESIDENT :

**M. Philippe KEMOUN**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS :

**Mme Isabelle RAYMOND-LETRON**  
**Mme Patricia MEYNAUD-COLLARD**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

**Mme Valérie PLANAT-BENARD**

Maître de Conférences à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE



*Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.*

Mise à jour : 06/09/2016

**DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN**

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p><b>Responsable : M. SANS</b></p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>EPIDEMIOLOGIE :</u> Mme Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>MALADIES REGLEMENTEES-ZOONOSES-MEDECINE PREVENTIVE DES CARNIVORES DOMESTIQUES-DROIT VETERINAIRE :</u> M. PICAUVET Dominique, PR</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIERE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, MC M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMELIORATION GENETIQUE ECONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p><b>Responsable : Mme GAYRARD</b></p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, MC Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Héléne, MC</p> <p><u>BIostatISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THERAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p><b>Responsable : Mme CADIERGUES</b></p> <p><u>ANESTHESIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MEDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MEDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES EQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme PRADIER Sophie, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>



# REMERCIEMENTS

A Monsieur Philippe KEMOUN  
Professeur des Universités, Praticien hospitalier en Odontologie  
Lauréat de l'Université

*Qui m'a fait l'honneur de présider ce Jury.*

A Madame le Docteur Isabelle RAYMOND LETRON  
Maître de Conférences en histologie à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
Service d'anatomie pathologique

*Ma directrice de thèse, pour m'avoir proposé ce sujet qui m'a beaucoup intéressé, pour sa patience et sa disponibilité.*

*Remerciements sincères.*

A Madame le Docteur Patricia MEYNAUD-COLLARD  
Maître de Conférences en Chirurgie à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pour avoir accepté d'être assesseur de ce jury, et pour son aide lors de la mise en place des protocoles de prélèvement au bloc opératoire.*

A Madame Valérie PLANAT-BENARD  
Maître de Conférences à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

*Pour faire partie de ce jury, pour son encadrement, sa confiance et tout le temps qu'elle m'a accordé pour la réalisation de ce travail,*

*Remerciements sincères*

*A toute l'équipe de STROMALab pour leur aide et leur encadrement pendant la réalisation de mes manipulations.*

*En particulier un grand remerciement à Marion Taurand qui m'a formée aux techniques de culture cellulaire, puis qui a participé et qui m'a encadrée pour la réalisation de tous mes protocoles ; merci pour sa pédagogie, sa patience et sa disponibilité.*

# Table des matières

INTRODUCTION.....	10
PREMIERE PARTIE: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....	11
I.    Généralités sur les cellules souches : sources, caractérisation et mécanismes d'action .....	11
A.    Sources de cellules souches mésenchymateuses et notions de niches .....	11
B.    Caractéristiques des MSCs .....	11
C.    Mécanisme d'action des MSCs .....	13
II.   Etude des ASCs canines.....	15
A.    Intérêts et applications .....	15
1)  Travaux réalisés sur les ASCs canines .....	15
2)  Perspectives .....	16
3)  Limites actuelles des études réalisées .....	17
B.    Caractérisation et production des MSCs canines .....	17
1)  Caractérisation des MSCs canines .....	17
a)  Type de MSCs canines utilisées.....	17
b)  Caractérisation des MSCs canines .....	18
2)  Etude comparative de la production des ASCs canines dérivées de tissu adipeux .....	21
PARTIE EXPERIMENTALE : PRODUCTION ET CARACTERISATION DES ASCs CANINES A STROMALAB. .	26
I.    Matériel et méthodes .....	26
A.    Chiens et prélèvements de tissu adipeux .....	26
B.    Cultures cellulaires.....	27
1)  Extraction des cellules : préparation de la Fraction Stromale Vasculaire (SVF) .....	27
2)  Mise en culture .....	27
3)  Colony Forming Units fibroblastics (CFU-f).....	27
4)  Prolifération .....	28
5)  Potentiels de différenciation adipocytaire et ostéoblastique .....	28
a)  Potentiel de différenciation adipocytaire .....	28
b)  Potentiel de différenciation ostéoblastique .....	30
6)  Potentiel de différenciation chondrocytaire.....	32
7)  Méthode d'analyse par q PCR.....	33
8)  Caractérisation des cellules par cytométrie en flux.....	33
9)  Congélation des cellules.....	33
10)  Analyse des données.....	33
II.   Résultats.....	34
A.    Multiplication.....	34

1)	Rendements et temps de doublement des ASCs de tissu adipeux sous cutané .....	34
2)	CFU-f des ASCs de tissu adipeux sous cutané .....	36
3)	Prolifération des ASCs de tissu adipeux sous cutané .....	37
a)	Tendance .....	37
b)	Passages successifs .....	41
4)	Comparaison de la prolifération des ASC de tissu adipeux sous cutané et viscéral .....	42
a)	Rendement et temps de doublement .....	42
b)	CFU-f .....	43
c)	Prolifération .....	44
B.	Potentiel de différenciation .....	45
1)	Potentiel adipocytaire .....	45
a)	Aspect qualitatif au cours de la différenciation .....	45
b)	Coloration .....	47
c)	qPCR .....	49
2)	Potentiel ostéoblastique .....	51
a)	Aspect qualitatif au cours de la différenciation .....	51
b)	Coloration .....	52
c)	qPCR .....	53
3)	Potentiel chondrocytaire .....	54
a)	Appréciation qualitative de la formation des pellets .....	54
b)	Coloration .....	54
c)	qPCR .....	54
C.	Cytométrie en flux .....	55
III.	Discussion .....	58
A.	Production .....	58
B.	Caractérisation .....	59
1)	Potentiel de différenciation .....	59
a)	Potentiel adipocytaire .....	59
b)	Potentiel ostéoblastique .....	61
c)	Potentiel chondrocytaire .....	61
2)	Marqueurs de surface .....	62
C.	PERSPECTIVES .....	63
1)	Production .....	63
2)	Caractérisation .....	63
	CONCLUSION .....	65
	BIBLIOGRAPHIE .....	66

ANNEXES .....	70
Annexe 1 : indice de score corporel canin .....	70
.....	71
Annexe 2 : références des milieux de culture utilisés.....	71
Annexe 3 : références des flasques et des plaques de culture utilisées.....	72
Annexe 4 : protocoles de comptage à la lame de malssez .....	72
Annexe 5 : Protocole de trypsination .....	72
Annexe 6 : Protocole de récupération des ARN.....	73
Annexe 7 : Protocole de coloration des CFU.....	73
Annexe 8 : protocole de fixation au PFA.....	73
Annexe 9 : coloration à l'huile rouge O des vésicules de triglycérides à la fin des différenciations adipocytaires.....	74
Annexe 10 : coloration au rouge Alizarine suite aux différenciations ostéoblastiques....	74
Annexe 11 : protocoles de fixation des pellets de la différenciation chondrocytaire .....	75
Annexe 12: extraction et dosage des ARN totaux .....	76
Annexe 13 : protocole de marquage des cellules pour la cytométrie .....	78
Annexe 14 : liste des ASCs canines congelées .....	80
Annexe 15: Courbes de tendance des proliférations.....	81
Annexe 16: résultats des qPCR .....	84
a) Adipocytaire .....	84
b) Ostéoblastique .....	94
c) Chondrocytaire .....	100
Annexe 17: résultats des analyses par cytométrie de flux .....	105
a) Résultats sur la SVF de la chienne 8.....	105
b) Résultats sur la SVF de la chienne 9.....	107
c) Résultats sur la SVF de la chienne 10.....	109
d) Résultats sur les ASCs P0 de la chienne 10 (4 <sup>ème</sup> jour).....	111
e) Résultats sur les ASCs P1 de la chienne 10 (8 <sup>ème</sup> jour).....	113

## FIGURES

<b>Figure 1</b> : Plan de plaque pour les différenciations adipocytaires.....	30
<b>Figure 2</b> : Plan de plaque pour les différenciations ostéoblastiques.....	31
<b>Figure 3</b> : Microphotographies d'ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané de passage 1 à différents jours de culture (ensemencées à 2000 cellules/cm <sup>2</sup> ) .....	34
<b>Figure 4</b> : comparaison des temps de doublement entre le chien et l'humain.....	35
<b>Figure 5</b> : Photographie des CFU-f d'ASC dérivées de tissu adipeux sous cutané de passage 1 après 7 jours (ensemencées à 200 cellules/T25).....	356
<b>Figure 6</b> : Pourcentage de CFU-f pour les ASCs canines et humaines aux passages 0 (P0) et 1 (P1) ....	37
<b>Figure 7</b> : Prolifération des ASCs P1 de la chienne 2 .....	38
<b>Figure 8</b> : Prolifération des ASCs P1 de la chienne 4 .....	38
<b>Figure 9</b> : Prolifération des ASCs P1 de la chienne 6 sur 14 jours .....	39
<b>Figure 10</b> : Prolifération des ASCs P1 de la chienne 7 sur 16 jours .....	40
<b>Figure 11</b> : Prolifération moyenne des ASCs P1 dérivées de tissu adipeux sous cutané canin .....	40
<b>Figure 12</b> : Microphotographie des ASCs P1 dérivées de tissu adipeux sous cutané de la chienne 6 au 6 <sup>ème</sup> jour.....	41
<b>Figure 13</b> : Evolution au cours des passages des rendements et temps de doublement d'ASCs canines dérivées de tissu adipeux sous-cutané .....	42
<b>Figure 14</b> : Temps de doublements des ASCs dérivées de tissu adipeux viscéral et sous cutané de la chienne 7 comparé à la moyenne des temps de doublement des ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané. ....	43
<b>Figure 15</b> : CFU-f pour les ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané et viscéral pour les prélèvements de la chienne 7 comparé à la moyenne des CFU-f dérivées de tissu adipeux sous cutané.....	43
<b>Figure 16</b> : Prolifération des ASCs P1 dérivées de tissu adipeux viscéral de la chienne 7.....	44
<b>Figure 17</b> : Prolifération des ASCs P1 dérivées de tissu adipeux sous cutané de la chienne 7.....	44
<b>Figure 18</b> : Photographie du puit différencié et du puit témoin après fixation au PFA et coloration à l'huile rouge O au 14 <sup>ème</sup> jour de différenciation pour les ASCs P1 dérivées de tissu adipeux sous cutané canin de la chienne 6 pour la condition 1.....	47
<b>Figure 19</b> : Microphotographies des ASCs P2 dérivées de tissu adipeux sous cutané de la chienne 3, au 14 <sup>ème</sup> jour de test de différenciation adipocytaire pour les conditions 1, 2 et 3.....	48
<b>Figure 20</b> : Diagrammes montrant l'expression des gènes de la différenciation adipocytaire pour les puits différenciés et les puits témoins pour les conditions 1, 2 et 3 au 14 <sup>ème</sup> jour. ....	50
<b>Figure 21</b> : Photographie du puit différencié et du puit non différencié des ASCs P2 de la chienne 2 pour la condition 4 .....	52
<b>Figure 22</b> : Microphotographies des ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané du passage 1 de la chienne 4, au dernier jour de la différenciation ostéoblastique pour chaque condition.....	53
<b>Figure 23</b> : Expression du gène aggrecan en fin de différenciation pour les ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané et viscéral. ....	55
<b>Figure 24</b> : Marquage CD90 des cellules de la SVF des chiennes 8, 9 et 10. ....	57
<b>Figure 25</b> : Isotype Alexa700 couplé au xenon. Le marquage présente une traînée ce qui ne permet pas de valider la spécificité de CD31.....	57

## TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Différenciation des MSCs canines dérivées de tissu adipeux ou de moelle osseuse: milieu utilisé et méthode d'attestation de la différenciation.....	20
<b>Tableau 2</b> : Chiens donateurs et type de prélèvement de tissu adipeux pour la production d'ASC canines dans différentes études .....	22
<b>Tableau 3</b> : Comparaison de la préparation de la SVF pour différentes études sur les ASCs canines et pour la préparation de la SVF pour isoler des ASCs humaines à STROMALab .....	25
<b>Tableau 4</b> : Caractéristiques des chiennes et des prélèvements de tissu adipeux .....	26
<b>Tableau 5</b> : Les 4 conditions de différenciation adipocytaire et les ASCs utilisées .....	29
<b>Tableau 6</b> : Primers canins des gènes de la différenciation adipocytaire .....	30
<b>Tableau 7</b> : Les 3 conditions testées pour la différenciation ostéoblastique et les ASCs utilisées .....	31
<b>Tableau 8</b> : Primers canins des gènes de la différenciation ostéoblastique.....	32
<b>Tableau 9</b> : Primers canins des gènes marqueurs de la différenciation chondrocytaire .....	32
<b>Tableau 10</b> : Rendements et Temps de doublement des ASC de tissu adipeux sous cutané de chaque chienne à chaque passage. ....	35
<b>Tableau 11</b> : Pourcentage de CFU-f pour les ASC canines aux passages 0 et 1.....	37
<b>Tableau 12</b> : Prolifération des ASCs canines de tissu adipeux sous cutané .....	39
<b>Tableau 13</b> : Résultats des comptages de surnageant de deux puits de prolifération .....	41
<b>Tableau 14</b> : Rendements et temps de doublement pour les ASCs dérivées du tissu adipeux sous cutané et du tissu viscéral de la chienne 7. ....	42
<b>Tableau 15</b> : Résultats disponibles pour la différenciation adipocytaire en fonction des conditions et des ASCs utilisées.....	46
<b>Tableau 16</b> : Expression relative des gènes marqueurs de la différenciation adipocytaire $2^{\text{exp}(-\Delta\text{Ct})}$ normalisée, à la fin de la différenciation pour les conditions 1, 2 et 3 .....	49
<b>Tableau 17</b> : Résultats disponibles pour la différenciation ostéoblastique en fonction des ASCs utilisées et des conditions.....	51
<b>Tableau 18</b> : Pourcentage dans la SVF de la population cellulaires présentant l'immunophénotype (CD45- / CD31-, CD34 +/ CD90 +) et pourcentage de chacun des marqueurs dans la SVF et à la fin des passages.....	56

## TABLE DES ABREVIATIONS

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire

**AINS** : Anti-inflammatoire non stéroïdien

**ARN** : Acide ribonucléique

**ASCs** : Cellules souches mésenchymateuses dérivées de tissu adipeux

**ASCs Px** : Cellules souches dérivées de tissu adipeux de passage  $x$  (*pour  $x$  supérieur ou égale à 1*) ; ASCs de primo-culture *pour  $x=0$*

**ASP** : Amphotéricine streptomycine pénicilline

**BM-MSCs** : Cellules souches mésenchymateuses dérivées de moelle osseuse

**Cx**: Condition  $x$

**C-EBP**: CCAT Enhancer Binding Protein

**CFU-f**: Colony Forming Units – *fibroblastics*

**DAPI**: 4', 6-diamidino-2-phénylindole

**DMEM**: Dulbecco's modified Eagle's media

**DMEM-HG**: Dulbecco's modified Eagle's media – High Glucose

**DMEM-LG**: Dulbecco's modified Eagle's media – low Glucose

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**EDTA** : Ethylène diamine tétra-acétique

**ERK** : Extracellular Signal-Related Kinase

**Exp** : Exponentielle

**FABP4** : Fatty Acid Binding Protein 4

**FACS** : Fluorescence activated cellular sorting

**FBS**: Fetal bovine serum

**FCS**: Fetal calf serum

**HBSS**: Hank's balanced salt solution

**IBMX**: Isobutylméthylxanthine

**Jx**: Jour  $x$

**LPL**: Lipoprotéine lipase

**MCDh**: Micro chromatic detection for haematology

**MEM** : Minimum Essential Medium

**MSCs** : Cellules souches mésenchymateuses

**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : Dihydrogénophosphate de sodium

**Px** : Passage x ( $x= 1$  ou  $2$ ) ou primo-culture si  $x=0$

**PBS** : Phosphate buffered saline

**PFA** : Paraformaldéhyde

**PPARY**: Peroxisome Proliferator Activater Receptor  $\gamma$

**qPCR** : Quantitative polymerase chain reaction

**SC** : Sous cutanée

**SNC** : Système nerveux central

**SVF** : Stromal Vascular Fraction (Fraction Stromale Vasculaire)

**T3**: Triiodothyronine

**TA**: Tissu adipeux

**TGF $\beta$ 3**: Transforming growth factor  $\beta$ 3

**Vi** : Viscérale

## INTRODUCTION

Les cellules souches mésenchymateuses sont étudiées dans de nombreux domaines d'applications en médecine humaine et vétérinaire. Leur potentiel ouvre des perspectives thérapeutiques multiples et prometteuses. De très nombreux essais cliniques sont en cours pour des applications médicales variées qui s'appuient à la fois sur la capacité des cellules souches mésenchymateuses à se différencier en différents types de lignages cellulaires, et sur leur activité de sécrétion de différents facteurs. Cette activité paracrine aide à la régénération tissulaire en promouvant l'angiogénèse, stimulant les cellules souches locales et modulant l'inflammation responsable de fibrose locale.

Les sources de cellules souches mésenchymateuses sont multiples (moelle osseuse, tissu adipeux, muscle entre autre). Le tissu adipeux constitue une source particulièrement attractive grâce à la facilité de prélèvement qu'il présente et la quantité disponible chez la plupart des individus. Les cellules souches dérivées du tissu adipeux sont très étudiées et présentent des perspectives thérapeutiques intéressantes en médecine humaine, par exemple dans les réparations cardio-vasculaires suite à un infarctus du myocarde ou dans la régénération du tissu parodontal. C'est pour cette raison que l'étude des ASCs canines et de leur utilisation dans cette race présente un double objectif :

- d'une part un développement de thérapies cellulaires innovantes en médecine vétérinaire, pour des pathologies pour lesquelles il n'existe pas de traitement satisfaisant (comme par exemple la coxarthrose, ou les dégénérescences de disques intervertébraux)
- d'autre part parce que le chien représente un modèle préclinique pertinent pour la médecine régénérative humaine. L'espèce canine exprime de nombreuses maladies spontanées similaires à celles de l'homme et le chien est un animal également pertinent par ses grandes similarités physiologiques et pathologiques, comparé aux espèces de rongeurs. Les ASCs canines ont par exemple été étudiées dans des modèles d'études de pathologies cardiaques en donnant des résultats prometteurs.

Les propriétés de caractérisation des ASCs canines couramment utilisées sont la capacité d'adhésion au plastique, de prolifération intrinsèque et le potentiel de différenciation en au moins trois lignages (adipeux, chondrocytaire et osseux). A la différence des ASCs humaines pour lesquelles un immunophénotype peut être défini, il n'existe pas de définition immunophénotypique uniforme et consensuelle parmi les publications pour l'espèce canine.

Au sein de l'UMR STROMALab (Université de Toulouse, CNRS ERL5311, EFS, INP-ENVT, Inserm U1031, UPS), des projets de recherche sont en cours de développement sur des modèles canins de pathologie spontanée. Un projet notamment est développé, en partenariat avec la faculté dentaire de Toulouse (Pr. P. Kemoun – ANR ASC-PARO), sur le traitement de chiens adultes et âgés atteints de parodontite, qui reproduisent de façon spontanée la maladie humaine et dont le traitement par des ASCs canines pourrait renforcer la preuve de concept et d'efficacité pour l'homme. Ces projets nécessitent donc d'approfondir les connaissances sur la production et la caractérisation des ASCs canines.

Le travail présenté s'est attaché, après un exposé bibliographique sur le sujet, à valider les protocoles de production et de caractérisation des ASCs canines en s'appuyant sur les protocoles déjà maîtrisés pour les ASCs humaines.

## PREMIERE PARTIE: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### I. Généralités sur les cellules souches : sources, caractérisation et mécanismes d'action

Les cellules souches présentent de nombreux domaines d'application en médecine régénérative humaine et vétérinaire au niveau expérimental et clinique. Actuellement, les principaux domaines d'application concernent les réparations cardio-vasculaires, les lésions de colonne vertébrale et les lésions osseuses et cartilagineuses (Bakker et al., 2013). Le terme de cellule souche désigne des cellules non différenciées qui sont capables de se multiplier et d'être à l'origine de plusieurs types de lignages cellulaires (Fortier, 2005). Les cellules souches peuvent être divisées en deux catégories : les cellules souches embryonnaires et les cellules souches adultes en référence au stade de développement auquel elles sont prélevées (Fortier, 2005). Les cellules souches embryonnaires sont originaires des masses cellulaires internes du blastocyte et les cellules souches adultes désignent toutes les cellules souches prélevées après la naissance, elles peuvent venir de tissu de lignages endodermiques, mésodermiques ou ectodermiques.

#### A. Sources de cellules souches mésenchymateuses et notions de niches

Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) sont les cellules souches adultes les plus utilisées, elles ont d'abord été étudiées au niveau de la moelle osseuse puis il a été mis en évidence qu'elles étaient présentes dans beaucoup voir tous les organes et types tissulaires adultes (Fortier, 2005 ; Bakker et al., 2013).

D'après la revue sur les MSCs de Stewart et son équipe (Stewart, Stewart, 2011) ; les MSCs ont besoin d'un système hautement régulé pour être maintenues dans un état indifférencié et proliférer à un taux approprié au besoin en cellules progénitrices des tissus et à leur renouvellement intrinsèque. Ce système régulateur est spatialement organisé en niches de MSCs contenant la population de MSCs et une ou plusieurs populations de cellules support qui apportent les signaux de contact cellulaire et les molécules nécessaires au fonctionnement des cellules souches. Les localisations précises des niches ne sont pas toutes exactement connues. Mais on sait qu'elles se situent dans le micro-environnement périvasculaire pour assurer la nutrition adéquate des cellules et faciliter la migration des cellules progénitrices. Les MSCs les plus utilisées sont dérivées de moelle osseuse ou de tissu adipeux mais elles peuvent aussi être dérivées de tendon et de synovie ; des MSCs circulantes dans le sang ont aussi été décrites. (Stewart, Stewart, 2011).

#### B. Caractéristiques des MSCs

Les critères utilisés pour identifier les MSCs sont leur habilité à adhérer aux surfaces plastiques, leur capacité d'expansion clonale et leur capacité à se différencier en différents lignages de cellules. L'adhérence au plastique est une propriété cellulaire non spécifique mais elle exclue les cellules des lignages hématopoïétiques. L'isolation d'une population de MSCs passe par la capacité des MSCs à l'expansion clonale *in vitro*. En effet les autres populations cellulaires qui pourraient être incluses dans les échantillons biologiques ne peuvent pas contribuer à l'expansion cellulaire. Les passages successifs des cellules permettent de sélectionner une population à forte prédominance de MSCs.

Les MSCs adultes ont une capacité de division limitée dans le temps par rapport aux cellules souches embryonnaires. La forte expansion cellulaire *in vitro* résulte en une sénescence répliquative des cellules car *in vivo* les divisions cellulaires sont des événements rares. Le taux et la persistance de la prolifération des MSCs dépendent de la localisation anatomique et du type tissulaire dont elles sont issues. La sénescence se traduit par la perte de la multipotence des cellules et la diminution de leur capacité à s'implanter sur les sites d'inflammation. (Stewart, Stewart, 2011)

La capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires est une composante du phénotype des MSCs. Les différenciations en lignages adipocytaire, ostéoblastique et chondrocytaire sont les plus étudiées *in vitro* car les conditions nécessaires et les tests de confirmation sont bien caractérisés chez l'humain et chez beaucoup d'autres espèces animales.

La différenciation ostéoblastique nécessite une culture en une seule couche de cellule dans un milieu contenant du sérum et complété principalement en  $\beta$ -glycérophosphate, en dexaméthasone et en acide ascorbique. Le phénotype ostéoblastique est confirmé par le dépôt d'une matrice minéralisée extra-cellulaire mise en évidence par une coloration von Kossa ou au rouge Alizarine. L'étude de l'expression de gènes spécifiques des ostéoblastes comme osterix, Runx2, osteopontin, osteonectin, bone sialic protein et ALP peut aussi mettre en évidence une augmentation de leur expression (Stewart, Stewart, 2011).

La différenciation adipocytaire passe par une culture en mono-couche dans un milieu contenant du sérum et complété avec de la dexaméthasone, de l'isobutylméméthylxanthine (IBMX), de l'insuline et de l'indométhacine dans certains protocoles. Le phénotype adipocytaire est caractérisé par la formation de gouttelettes lipidiques mises en évidence par la coloration à l'huile rouge O. L'augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$ , CEBP $\alpha$ , FABP4, LPL peut aussi être étudiée (Stewart, Stewart, 2011).

La différenciation chondrogénique passe par un système de culture en 3 dimensions avec la formation de micro-masses de cellules appelées pellets, la plupart des protocoles utilisent un milieu sans sérum complété en insuline, acide ascorbique, transferrine, sélénium et des facteurs de croissance  $\beta$  ou des BMP. Le phénotype chondrocytaire se caractérise par le dépôt de collagène de type II et de glycosaminoglycanes sulfatés. Le dépôt de glycosaminoglycanes peut être mis en évidence par coloration au bleu alcian, au bleu de toluidine, ou à la safranine O ; la présence de collagène de type II se valide par immunohistochimie. La différenciation chondrocytaire peut aussi être étudiée avec le profil d'expression de certains gènes spécifiques des chondrocytes comme Sox9, Collagène type II et Aggrecan (Stewart, Stewart, 2011).

Le profil des marqueurs de surface cellulaire est aussi étudié chez les MSCs afin de pouvoir identifier une population sur la base de ces marqueurs. Ceci permettrait d'isoler rapidement une population de MSCs dans une préparation de plusieurs types cellulaires et de standardiser les protocoles de préparation de MSCs. Une gamme de marqueurs négatifs a été développée pour exclure les populations de type non-MSCs : les clusters de différenciation CD34 et CD117 des cellules souches hématopoïétiques, la glycophorine A des précurseurs érythroïdes, CD11b des cellules immunitaires myéloïdes, CD19 et CD45 de la lignée cellulaire B, CD31 des cellules endothéliales, CD14 des monocytes et le complexe majeur d'histocompatibilité II des lymphocytes. Il est difficile de définir un ou des marqueurs cellulaires positifs pour les MSCs, du fait d'une grande variabilité interspécifique, de plus il a été démontré que l'immunophénotype des MSCs évoluait avec les stades de culture. (Stewart, Stewart, 2011). Plusieurs études ont montré l'expression simultanée de plusieurs marqueurs de surface chez les MSCs : par exemple Stro1, CD73 et CD106 permettraient de sélectionner les MSC humaines (Stewart, Stewart, 2011). Pour les autres espèces il est difficile de déterminer un

immunophénotype car il y a un manque d'anticorps validés spécifiques de chaque espèce. De plus il a été montré que des populations de MSCs présentant des immunophénotypes similaires, mais originaires de différents types tissulaires, avaient pourtant des propriétés de différenciation très différentes (Stewart, Stewart, 2011). Des études récentes ont montré l'expression simultanée de CD29, CD44 et CD90 chez le cheval (Stewart, Stewart, 2011) et la présence simultanée de plusieurs marqueurs (CD29, CD73, CD105, CD44, Thy 1 et CD90) a aussi été mise en évidence pour les ASCs canines (Bakker et al., 2013). Ces données suggèrent qu'il pourrait exister des marqueurs cellulaires interspécifiques pour les MSCs.

### C. Mécanisme d'action des MSCs

Les mécanismes d'action des MSCs sont décrits dans une revue de Stewart et son équipe (Stewart, Stewart, 2011) :

Au départ, l'intérêt porté aux MSCs était lié à leur capacité à se différencier dans le type cellulaire approprié à la régénération directe d'un tissu endommagé. L'idée était d'implanter directement des MSCs sur le site de la lésion et qu'elles se trans-différencieraient dans le type cellulaire approprié.

Le mécanisme d'action des MSC est loin de se résumer à cette propriété. En effet beaucoup d'études montrent que les aptitudes de différenciation des MSCs *in vitro* ne corrélient pas forcément leur comportement *in vivo*. Par exemple il a été montré que des MSCs dérivées de tissu adipeux et de moelle osseuse avaient un potentiel de différenciation chondrocytaire très différent lorsqu'elles étaient placées *in vivo* par rapport à leur différenciation *in vitro* (Park et al., 2006). Il a aussi été observé que les MSCs différenciées en chondrocytes déposent moins de matrice extra cellulaire *in vivo* que des chondrocytes articulaires bien que le niveau d'expression des gènes spécifiques soit beaucoup plus élevé chez les MSCs différenciées que chez les chondrocytes. (Stewart, Stewart, 2011). Une autre étude a prouvé que des MSCs dérivées de moelle osseuse de chèvre implantées sur des lésions de cartilagineuses ou tendineuses ne restaient pas sur le site (Quintavalla et al., 2002). Les preuves de la capacité de différenciation *in vitro* des MSCs ne sont donc pas une garantie de l'utilité de cette performance *in vivo* lors des essais cliniques.

Cependant, dans certains cas, les MSCs sont directement impliquées dans la réparation des tissus : il a été montré chez des rats présentant des lésions de la colonne vertébrale que les MSCs implantées se sont différenciées en types cellulaires nerveux variés participant ainsi directement à la régénération de la moelle épinière (Hill et al., 2004).

L'action des MSCs passe par une activité paracrine très importante comme il a été montré dans des travaux de recherches sur la protection, la réparation et la régénération du myocarde ou du système nerveux central (SNC) suite à des ischémies. En effet elles sécrètent une variété importante de cytokines, de facteurs de croissance, de chémokines et de protéines immunomodulatrices.

Dans les modèles d'infarctus du myocarde, plusieurs mécanismes d'action des MSCs ont été mis en évidence. Premièrement les MSCs stimulent la néo-vascularisation dans laquelle la grande majorité des nouvelles cellules endothéliales sont dérivées de l'hôte bien que certaines soient des MSCs implantées. Elles sécrètent en effet la chémokine SDF-1 et le facteur angiogénique facteur VEGF stimulant la néovascularisation (Sadat et al., 2007). De plus les MSCs exogènes diminuent la fibrose de l'infarctus, protègent les cardiomyocytes viables d'une apoptose post-ischémique et activent les cellules souches myocardique intrinsèques pour la régénération tissulaire (Kuraitis et al., 2011).

Les effets des thérapies par les MSCs sur les lésions du SNC sont similaires. En effet, chez des rats il a été montré que les MSCs protègent les neurones en stimulant le néo-angiogénèse par la production

de VEGF et en réduisant l'apoptose des cellules sur les sites de lésions ischémiques cérébrales (Li et al., 2005 ; Harms et al., 2010). De plus il a été montré que du milieu de culture de MSCs dérivées de tissu adipeux protège aussi des neurones cérébelleux contre des stimuli d'apoptose, l'effet des MSCs passe par la sécrétion d'un médiateur soluble : IGF1 (Wei et al., 2009).

L'identification des effets paracrines des MSCs a conduit à de nombreuses applications ciblant des problèmes immuns et auto-immuns. En effet les MSCs exposées à des cytokines inflammatoires comme  $TNF\alpha$ , IFN $\gamma$  et IL-1 $\beta$  ont des activités immunosuppressives telles que la réduction de la prolifération des lymphocytes T, de l'expression d'antigènes et de la sécrétion de cytokines inflammatoires (Shi et al., 2010 ; Stewart, Stewart, 2011). Ceci suggère une boucle de rétrocontrôle négatif sur les réactions inflammatoires dont les MSCs sont le médiateur.

En conclusion, le rôle principal des MSCs au niveau des lésions tissulaires n'est donc pas la régénération directe mais les facteurs qu'elles sécrètent promouvant l'angiogénèse, protégeant les cellules des tissus lésés de l'apoptose, stimulant le recrutement des cellules souches locales et inhibant les réponses inflammatoires et la fibrose tissulaire qu'elle entraîne (Stewart, Stewart, 2011).

## II. Etude des ASCs canines

### A. Intérêts et applications

#### 1) Travaux réalisés sur les ASCs canines

La revue sur les MSCs canines de Bakker et son équipe (Bakker et al., 2013) synthétise beaucoup de données sur les travaux concernant les MSCs canines :

Les cellules souches intéressent particulièrement les scientifiques dans le domaine de la médecine régénérative et des études concernant des pathologies humaines (lésions cardiovasculaires, de la colonne vertébrale, osseuses et cartilagineuses) ont fait appel à de nombreux modèles animaux. Une majorité de ces modèles a été réalisée sur des espèces de rongeurs mais les tests pré-cliniques concernant l'efficacité et la sécurité d'un traitement humain doivent être effectués sur au moins deux espèces : le plus souvent une espèce de rongeur et une espèce non rongeur qui présente des similarités plus importantes avec l'humain. Pour la recherche sur les MSCs les chiens sont un meilleur modèle que les rongeurs car ils ont plus de similarités anatomiques (plus de surfaces articulaires par exemple), les pathologies et les performances athlétiques se rapprochent plus. L'espèce canine permettrait donc d'avoir une meilleure évaluation des effets thérapeutiques. De plus elle est elle-même affectée par des maladies articulaires, orthopédiques ou nerveuses pour lesquelles les options thérapeutiques actuelles n'apportent pas les réponses cliniques espérées chez le patient. Les MSCs canines apportent donc des espoirs prometteurs pour la médecine vétérinaire mais aussi pour la médecine humaine (Bakker et al., 2013).

Un des grands domaines d'application des MSCs est les lésions ostéo-articulaires : des expériences de 1998 par Bruder et son équipe ont été menées sur des lésions expérimentales créées sur des fémurs de chiens. Le groupe traité avec des BM-MSCs autologues obtenues après culture avait montré des néo-formations osseuses alors que les fémurs non traités présentaient une non-union résultant de l'atrophie osseuse (Bruder et al., 1998).

Un autre domaine d'application des MSCs canines concerne des modèles canins de dégénérescence des disques intervertébraux impliqués dans des douleurs lombaires. Cette dégénérescence des disques impliquerait les cellules du noyau pulpeux du disque mais la pathogénie n'est encore pas exactement connue. La plupart des études portant sur ce sujet étaient réalisées à partir de petits animaux de laboratoire. Mais une étude a utilisé un modèle canin en prenant deux groupes de chiens : chondro-dystrophiques et non chondro-dystrophiques pour comparer les profils moléculaires associés à la maintenance des cellules notocordales dans le noyau pulpeux et étudier la pathogénie de cette maladie (Smolders et al., 2012). Une autre étude a testé une option de traitement envisagée pour les humains sur les chiens : il s'agit de la réalisation d'une nucléotomie du disque intervertébral suivie d'une injection de BM-MSCs. Les chiens ayant bénéficié de cette intervention ont montré une dégénérescence du disque intervertébral moins importante que les chiens ayant seulement subi la nucléotomie (Hiyama et al., 2008). Une autre équipe a étudié les effets d'une thérapie de MSCs autologues et allogéniques sur des lésions sévères de la moelle épinière créées expérimentalement par introduction chirurgicale et gonflement d'un ballon en silicone dans le canal vertébral. Il a été montré que les deux groupes traités avec des MSCs (soit autologues, soit allogéniques) présentaient une amélioration significative au niveau des membres pelviens au bout d'une semaine après le traitement en comparant avec le groupe contrôle non traité. La thérapie par transplantation de MSCs autologues ou allogéniques présente donc des résultats cliniques dans le cadre des lésions de la colonne vertébrale (Jung et al., 2009).

L'effet thérapeutique des MSCs a aussi été testé pour des défauts cartilagineux : des MSCs autologues non différenciées ont été injectées en intra-articulaire au niveau d'articulation présentant des lésions cartilagineuses. Les deux groupes de chiens ayant reçu le traitement soit le lendemain de la création de la lésion soit un mois après la lésion ont montré une guérison clinique et histologique significativement plus satisfaisante que le groupe contrôle n'ayant pas reçu le traitement. L'équipe a donc conclu que l'injection de MSCs autologues intra-articulaire était une option thérapeutique intéressante pour les lésions cartilagineuses (Mokbel et al., 2011).

D'autres études se sont penchées sur l'arthrose des articulations coxo-fémorales et de l'articulation huméro-radiale fréquentes chez le chien. Une thérapie avec des MSCs sur un mois aurait engendré une amélioration clinique satisfaisante aussi bien au niveau de la boiterie qu'au niveau des signes de douleurs d'après une évaluation du propriétaire et du vétérinaire, mais il n'y avait pas de groupe contrôle pour cette étude (Guercio et al., 2012).

Les MSCs canines se sont aussi montrées efficace dans le domaine de la régénération musculaire avec les cardiomyocytes. Une évaluation avait été réalisée sur les chiens avec succès avant que cette option thérapeutique soit appliquée sur des patients humains présentant des infarctus du myocarde (Bakker et al., 2013).

Les MSCs canines dérivées de moelle épinière ou de tissu adipeux présentent donc de nombreux domaines d'applications en cours d'exploration dont une grande partie concerne les pathologies locomotrices.

## 2) Perspectives

Plusieurs perspectives d'utilisation des MSCs canines sont soulevées dans la revue de Bakker et son équipe (Bakker et al., 2013) :

Les MSCs canines ont été utilisées comme modèle pour l'humain dans la régénération musculaire myocardique suite à des infarcti. L'intérêt de cette recherche pour la médecine vétérinaire est limité car les chiens ne souffrent pas de cette pathologie spontanément. Cependant, des thérapies par les MSCs pourraient être envisagées dans d'autres pathologies cardiaques ayant une grande incidence dans certaines races canines comme par exemple la cardiomyopathie dilatée des Cavaliers King Charles.

Les MSCs canines sont beaucoup étudiées pour les pathologies ostéo-articulaires mais actuellement aucun essai de thérapie régénérative par les MSCs n'a été réalisé pour les lésions des tendons et des ligaments d'origine traumatique ou dégénérative alors que ce domaine est très exploré chez les humains et les chevaux. Pourtant les ruptures partielles ou totales des ligaments sont fréquentes dans l'espèce canine et les options thérapeutiques actuelles sont relativement décevantes puisque la réparation ligamentaire ou tendineuse nécessite la formation d'un tissu cicatriciel important présentant une moins bonne élasticité ce qui conduit à une réduction importante des performances et un risque de récurrence important.

Les MSCs canines présentent donc des perspectives dans d'autres domaines comme les pathologies cardiaques, ou les lésions tendineuses encore peu explorés.

### 3) Limites actuelles des études réalisées

Les données que nous possédons actuellement sur les MSCs canines présentent certaines limites. En effet les thérapies basées sur les MSCs peuvent être difficiles à évaluer en raison des groupes contrôles inappropriés qui ne correspondent pas au gold standard de l'evidence based medicine reposant sur des essais cliniques randomisés aléatoirement. Ceci est cependant difficile à obtenir en médecine vétérinaire du fait des moyens logistiques et économiques : on dispose en effet d'échantillons de population de taille réduite et une variabilité inter-animal importante. De plus dans ces essais thérapeutiques, les MSCs sont parfois combinés avec d'autres facteurs biologiques comme du surnageant de moelle osseuse, du sérum autologue ou encore du plasma enrichi en plaquettes ce qui rend l'évaluation de l'effet propre aux cellules souches mésenchymateuses difficiles. (Bakker et al., 2013).

Par ailleurs peu de données sont disponibles sur la sécurité à court et à long terme des thérapies par cellules souches en médecine vétérinaire. Seulement quelques études ont étudié les possibles effets indésirables chez le chien et le cheval comme les réactions au point d'injection des MSCs et les éventuels effets tumoraux (Bakker et al., 2013).

Aucune étude dose – réponse n'a été réalisée concernant les MSCs canines, le nombre idéal de cellules à planter n'est donc pas connu pour l'instant. La convention actuelle est d'utiliser des grands nombres de cellules (1 – 5 millions de cellules/kg) aussi bien en médecine humaine que vétérinaire. De la même manière, on ne sait pas encore quelle est la source tissulaire de MSCs optimale pour chaque application clinique, ainsi que la voie d'administration, la fréquence et le moment d'administration idéal (Bakker et al., 2013).

## B. Caractérisation et production des MSCs canines

### 1) Caractérisation des MSCs canines

#### a) Type de MSCs canines utilisées

Les MSCs canines les plus étudiées et les mieux caractérisées sont les MSCs dérivées de tissu adipeux et de moelle osseuse. Ces deux types sont assez semblables, et peuvent être utilisés après expansion par culture cellulaire *in vitro* ou sans étape d'expansion directement en fraction stromale vasculaire (SVF) concentrée.

La SVF présente une hétérogénéité plus importante de population cellulaire mais elle a l'avantage d'être disponible quelques heures après le prélèvement à la différence des MSCs obtenues après culture cellulaire pour lesquelles il faut attendre une à plusieurs semaines ce qui est moins adapté aux lésions aiguës.

Les BM-MSCs sont obtenues le plus souvent par ponction de la tête proximale du fémur, de l'humérus ou du tuber coxis avec des aiguilles à biopsie. Il a été montré qu'elles avaient une meilleure aptitude à se différencier en tissu du système musculo-squelettique que les autres types de MSCs. Les cellules souches dérivées de tissu adipeux présentent une bonne alternative et sont très intéressantes étant donné leur disponibilité et leur facilité d'accès puisqu'elles peuvent être prélevées par biopsie, ou liposuction (Bakker et al., 2013).

## b) Caractérisation des MSCs canines

Les MSCs humaines sont maintenant bien caractérisées, avec des critères de sélection sur l'adhérence au plastique en culture *in vitro*, leur capacité à se différencier en au moins trois lignages et l'expression de marqueurs de surface spécifiques (CD73, CD90 et CD105) en l'absence d'autres marqueurs de surface (notamment CD11b, CD14, CD19, CD29 $\alpha$ , CD34, CD45 et HLA-DE) (Bakker et al., 2013).

Il n'existe pas encore de critère aussi uniforme pour la caractérisation des MSCs canines mais la publication de revue de Bakker et son équipe (Bakker et al., 2013) synthétise les données sur ce point.

Elles sont caractérisées morphologiquement par des cellules adhérentes aux surfaces plastiques en une seule couche et de forme fibroblastique (allongée en fuseau).

La caractérisation immunophénotypique est difficile car il existe peu d'anticorps spécifique de l'espèce canine, elle dépend donc des réactions croisées inter-spécifiques. Plusieurs études ont néanmoins montré l'expression simultanée de certains marqueurs (CD29, CD73, CD105, CD44, Thy-1, CD90 et MHC-I) en l'absence de marqueurs hématopoïétiques (CD34, CD45, CD14, CD117) de marqueurs spécifiques des cellules souches embryonnaires (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81), de MHC-II et de la glycoprotéine transmembranaire CD146 (Neupane et al., 2008 ; Vieira et al., 2010a ; Kisiel et al., 2012 ; Kang et al., 2012 ; Takemitsu et al., 2012).

Des facteurs de transcription associés avec la pluripotence cellulaire ont été identifiés chez les MSCs humaines : NanoG, Oct 4 et Sox 2 et les MSCs canines sont aussi positives pour ces marqueurs (Neupane et al., 2008 ; Guercio et al., 2013 ; Kisiel et al., 2012 ; Takemitsu et al., 2012).

La capacité de différenciation en au moins trois lignages, adipocytaire, ostéoblastique et chondrogénique est une des caractéristiques principales utilisées pour la caractérisation des MSCs canines. Cette capacité de différenciation a pu être obtenue par plusieurs équipes travaillant sur les MSCs canines (Vieira et al., 2010a ; Guercio et al., 2013). Une autre équipe a rencontré des problèmes pour cette différenciation en particulier avec la différenciation adipocytaire qui a nécessité un milieu optimisé par rapport au milieu de différenciation adipogénique utilisé pour les MSCs humaines (Neupane et al., 2008).

Le tableau 1 synthétise les milieux et les moyens de confirmer ces différenciations pour les MSCs canines dérivées de tissu adipeux pour plusieurs études.

Publications	Lignage	Milieu spécifique	Caractérisation morphologique	Caractérisation histologique	Gènes marqueurs	Amorce des gènes
(Kisiel et al., 2012) (Takemitsu et al., 2012) (Martinello et al., 2011) (Vieira et al., 2010a) (Neupane et al., 2008)	ostéogénique	DMEM high glucose complétementé avec 50 µM ascorbate-2-phosphate, 0,1 µM dexaméthasone, 10 µM β-glycérophosphate di-sodium	Apparence polygonale avec nodules	Coloration von kossa : Présence de dépôts de phosphate et de calcium	Runx 2 (100)	Forward GTCTCCTCCAGAATGCTTCC Reverse GGAAGTGGAGGATGAGGAGAC
					Osterix (285)	Forward ACGACTGGGCAAAGCAG Reverse CATGTCCAGGGAGGTGTAGAC
					BSP (295)	Forward TTGCTCAGCATTGTTGGGAATGG Reverse AACGTGGCCGATACTTAAAGAC
					COL2A (156)	Forward GAAACTCTGCCACCCTGAATG Reverse GCTCCACCAGTTCTTCTTGG
(Vieira et al., 2010a) (Neupane et al., 2008)	Chondrogénique	DMEM-low glucose complétementé avec 50 µM ascorbate-2-phosphate, 100 nM dexaméthasone, 1% ITS-Premix, 1 mM sodium pyruvate, 10 ng/ml, TGF-β1	Agrégats en 3 dimensions	Coloration à la safranine, au bleu alcian et au bleu de toluidine : Présence de mucosubstances acidiqes et de mucines acétiqes	Aggrecan (122)	Forward ATCAACAGTGCTTACCAAGACA Reverse ATAACCTCACAGCGATAGATCC
					COMP (120)	Forward GTGGTGGACAAGATTGATGTG Reverse CACCCAGTTGGGATCTATCTG
					COLL 10A (121)	Forward AGTAACAGGAATGCCGATGTC Reverse TCTTGGGTCATAATGCTGTTGC
					Sox 9 (60)	Forward GCTCGCAGTACGACTACACTGAC Reverse GTTCATGTAGGTGAAGGTGGAG

Publications	Lignage	Milieu spécifique	Caractérisation morphologique	Caractérisation histologique	Gènes marqueurs	Amorce des gènes
(Kisiel et al., 2012) (Takemitsu et al., 2012) (Martinello et al., 2011) (Vieira et al., 2010a) (Neupane et al., 2008)	Adipogénique	DMEM-high glucose complétement avec 1 µM dexaméthasone, 60 µM indométhacine, 5 µg/ml insuline, 500 µM isobutylméthylxanthine, 5% Sérum de lapin, 5 µM rosiglitazone	Cellules de forme rondes	Coloration à l'huile rouge O Présence de gouttelettes de triglycérides neutres	C-EBPα (151)	Forward AGTCAAGAAGTCGGTGGACAAG Reverse GCGGTCATTGTCCTGGTGAG
					PPAR γ2 (119)	Forward ACACGATGCTGGCGTCCTTGATG Reverse TGGCTCCATGAAGTCACCAAAGG
					FABP4 (117)	Forward ATCAGTGTAACGGGGATGTG Reverse GACTTTTCTGTCATCCGCAGTA
					LPL (134)	Forward ACACATTCACAAGAGGGTCACC Reverse CTCTGCAATCACACGGATGGC
(Martinello et al., 2011) (Vieira et al., 2010a)	myogénique	DMEM-high glucose complétement avec 0.1 µM dexaméthasone, 5% de sérum de cheval, 50 µM hydrocortisone	Alignement de myoblastes avec une fusion initiale et un début de formation de structures multinucléées	test nuclear Myf5 positif	Dystrophin (116)	Forward AAACACAGTGGTAGCCCAAGAT Reverse TGGTGACAGCCTGTGAAATC
					MyoD (118)	Forward GACGGCATGATGGACTACAG Reverse ACACCGCAGCACTCTTCC
					Myogenin (102)	Forward GACGGCATGATGGACTACAG Reverse ACACCGCAGCACTCTTCC
					Desmin	Forward TTGACCTGGAGCGCAGAATT Reverse TAAGCCAGACCTCACTGCCG

Tableau 1 : Différenciation des MSCs canines dérivées de tissu adipeux ou de moelle osseuse: milieu utilisé et méthode d'attestation de la différenciation. Adapté du tableau de la publication de Bakker (Bakker et al., 2013)

## 2) Etude comparative de la production des ASCs canines dérivées de tissu adipeux

Les sites de prélèvement de tissu adipeux peuvent être variés. A l'heure actuelle il n'existe pas d'étude comparatrice pour optimiser le site de prélèvement en fonction de l'application des MSCs. Il existe aussi peu d'études qui s'intéressent au type de chien donneur. Le tableau 2 compare les chiens utilisés et les prélèvements réalisés pour plusieurs études portant sur les ASCs canines.

L'étude de Guercio et son équipe est la seule qui s'intéresse au site de prélèvement et à l'âge des chiens donneurs. Elle compare les propriétés de cellules souches adipeuses dérivées de tissu adipeux sous cutané et dérivées de tissu adipeux viscéral et divise en deux groupes les chiens donneurs : les jeunes adultes (de 1 à 4 ans) et les adultes (de 8 à 14 ans). Cette étude montre que les ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané ont un potentiel prolifératif plus important à partir du deuxième passage que les cellules dérivées de tissu adipeux viscéral. De même à partir du deuxième passage, le potentiel proliférateur est plus élevé pour les ASCs provenant de chiens jeunes adultes que d'adultes (Guercio et al., 2013). Cette étude est aussi la seule parmi celles considérées qui s'appuie sur des analyses sanguines (protéines sanguines totales, hémoglobémie, comptages des globules rouges, des globules blancs et plaquettaire) pour sélectionner des donneurs en bonne santé.

Les autres études se basent sur le seul examen clinique. Les prélèvements de tissu adipeux ont été réalisés dans différentes régions anatomiques, mais les buts différents de chaque article ne permettent pas de comparer les caractéristiques des MSCs obtenues en fonction du lieu de prélèvement.

Pour notre étude nous allons sélectionner des chiens jeunes dans la mesure du possible (jusqu'à 5 ans environ) et en bonne santé. Pour ce faire nous envisageons de réaliser les prélèvements lors de chirurgies de convenance comme des stérilisations qui ne sont réalisées que sur des animaux en bon état général. Ceci étant établi par un examen clinique et des bilans sanguins pré-anesthésiques si nécessaire.

Suite aux prélèvements de tissu adipeux, différentes étapes de préparation de la SVF sont nécessaires avant de mettre les cellules en culture dans des flasques. Le tableau 3 présente les différentes étapes de préparation de la SVF pour différentes études produisant des ASCs canines ainsi que la méthode de préparation de la SVF dérivée de tissu adipeux sous cutané humain utilisée à STROMLab qui est celle que nous voudrions adapter à la préparation des ASCs canines.

Les méthodes utilisées dans les publications considérées et la méthode utilisée à STROMLab pour les ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané humain sont similaires. Elles incluent une étape de lyse tissulaire à base de collagénase, puis une étape de filtration et de centrifugation des produits obtenus. Dans la plupart des études sur les ASCs canines, la préparation de la SVF s'arrête ici. A STROMLab, pour les ASCs humaines la SVF subit une étape supplémentaire de lyse des globules rouges, puis une nouvelle centrifugation suivie d'une filtration facultative dépendant de la fibrosité de la préparation obtenue. Le but est d'obtenir une population prépondérante d'ASCs dans la SVF lors de son ensemencement en flasques.

Pour toutes les études la SVF est ensuiteensemencée dans des flasques en plastique et la sélection des ASCs se fait après l'adhésion de celles-ci. Les autres populations cellulaires sont éliminées avec des lavages au PBS réalisés 12 à 48 heures après l'ensemencement.

<b>(Kang et al., 2012)ETUDE</b>	<b>Chiens / données sur leur santé</b>	<b>Localisation prélèvement</b>	<b>Technique de prélèvement</b>
<b>(Vieira et al., 2010b)</b>	10 chiens 4 mois à 4 ans	Tissu adipeux sous-cutané au-dessus du muscle glutéale dorsal	Liposuction (~ 15 mL) Biopsie de tissu adipeux sous cutané
<b>(Guercio et al., 2013)</b>	20 chiens 9 mâles / 11 femelles Jeunes adultes (1 - 4 ans) Adultes (8 – 14 ans) Examen clinique Hématologie	Tissu adipeux sous cutané Tissu adipeux viscéral	Procédure chirurgicale indépendante de l'étude Echantillon de 5g
<b>(Villatoro et al., 2015)</b>	3 chiens mâles 2 ans	Tissu adipeux sous cutané glutéal de la hanche	Incision chirurgicale Echantillon 5g
<b>(Takemitsu et al., 2012)</b>	4 beagle femelle environ 1 an	Tissu adipeux sous cutané inguinal	Prélèvement 1g
<b>(Neupane et al., 2008)</b>	Chiens de 1 à 3 ans Bonne santé à l'examen clinique Chirurgie expérimentale non liée à l'étude	Tissu adipeux sous cutané, tissu adipeux sous cutané inguinal et tissu adipeux omental	
<b>(Martinello et al., 2011)</b>	Femelles de 1 à 5 ans ovariohystérectomie	Tissu adipeux viscéral	7 g
<b>(Kang et al., 2012)</b>	20 chiens beagle mâle et femelle 2 ans Bonne santé à l'examen clinique	Tissu adipeux sous cutané glutéal	1 g
<b>(Kisiel et al., 2012)</b>	7 chiens jeunes adultes (refuge) Mâle et femelle Euthanasie et tissu prélevé directement après	Tissu adipeux sous cutané collecté dans la région du dos et dans la région sacro-coccygienne	
<b>(Deimling et al., 2012)</b>	Chiens mâles Bonne santé à l'examen clinique	-	-

Tableau 2 : Chiens donateurs et type de prélèvement de tissu adipeux pour la production d'ASC canines dans différentes études

étude	prélèvement	digestion	Filtration Ajout milieu	centrifugation	Lyse GR et centrifugation	ensemencement	incubation
<b>Stromalab Cellules humaines</b>	Environ 10g/tube	1 mL de NB4 (collagénase) dans 33 mL (alpha-MEM + ASP) 45 min 37°C, agitation	100µm avec vide Répartir en 2 tubes de 50 mL Ajout milieu 10% FBS	583g 10 min Enlever surnageant, pooler culot	Ajout 4X volume culot de tampon de lyse 5 min 4°C Ajout PBS Centrifugation 583g 5 min	Retrait du surnageant, reprise culot dans 3 - 4 mL de milieu (Filtration 100µm) 4000 cells/cm2 MEM ASP 10%FBS	5% CO2 2 lavages PBS à partir de 5h après adhérence des cellules Changement de milieu tous les 2 - 3 jours
<b>(Vieira et al., 2010a)</b>	Environ 15 mL	Digestion : 0,075% collagénase (sigma) 15 minutes PBS + Antibiotiques (100 U/mL pénicilline + 100 g/mL streptomycine)	Arrêt : DMEM- HG 10% FBS Pas de filtration	1200g, 5 min	Pas de lyse Pas de deuxième centrifugation filtration	1200 – 3500 cellules/cm2 (DMEM-HG 10% FBS)	24 48h : lavage PBS Incubation :37°C, 5% CO2, GM- DMEM-HG 10% FBS
<b>(Guercio et al., 2013)</b>	5g	Digestion : 0,2% collagénase type IA 3 - 4h, 37°C (PBS 1% AB pénicilline, streptomycine amphotéricine)	Arrêt : + 10% FBS	300g 10 min Lavage du culot avec le milieu de culture		2g de tissu / flasque de 25 cm2	D-MEM LG 20% FBS 5% CO2 24h : lavage HBSS avec 1% AB Milieu renouvelé tous les 3 jours
<b>(Villatoro et al., 2015)</b>	5 g	20 mL HBSS à 0,1% collagénase type II 37°C, 90 min agitation	Filtre 100 µm	Centrifugation. 400g 5 min Lavage avec milieu de culture			DMEM, 10% FBS, 2,5 mM L- Glutamine, 100 U/mL pénicilline, 100µg/mL streptomycine, 1,25 µg/mL fungizone 2 Changement milieu /semaine

étude	prélèvement	digestion	Filtration ajout milieu	centrifugation	Lyse GR et centrifugation	ensemencement	lavage
<b>(Kisiel et al., 2012)</b>		Rinçage et hachage dans PBS 10mL de collagénase type I (2000 U/mL) 60 min 37°C	Arrêt : + 10 mL de milieu Filtre 100 µm puis filtre 70µm	377Xg 10 min	Récupération du culot et suspension dans milieu standard	2.2x10 <sup>4</sup> cellules/cm <sup>2</sup>	
<b>(Kang et al., 2012)</b>	1g lavage PBS	Collagénase type I (1g/mL) 37°C 1h Dans PBS	Filtre 100 µm	200Xg 10 min	Récupération pré-adipocytes dans SVF	Flasque T75 1x10 <sup>5</sup> cellules/cm <sup>2</sup>	
<b>(Martinello et al., 2011)</b>	7g	Collagénase type I (40 µg/mL) 2h 37°C Dans PBS	Filtre 100 µm	1400g 20 min Lavage du culot au PBS	1600 g 10 min	Culot dans flasque T25	DMEM 10% FBS, avec pénicilline, streptomycine et glutamine 5% CO <sub>2</sub>
<b>(Neupane et al., 2008)</b>		Collagénase type IA 37°C une nuit Dans MEM+ASP+ NAC (2mM) +ASC 2P (0,2mM)		Centrifugation et lavage du culot		8g de tissu/flasque 25 cm <sup>2</sup>	Même milieu + 10% FBS Lavage à 24h Cellules adhérentes dans K-NAC medium*
<b>(Takemitsu et al., 2012)</b>	1g	Collagénase 0.15% dans PBS 37°C 60 min	Filtre 100 µm			1 – 5 x 10 <sup>7</sup> cellules/flasque T 75	DMEM 10%FBS 1%ASP 5% CO <sub>2</sub> ; Changement de milieu tous les 3 jours

étude	prélèvement	digestion	Filtration ajout milieu	centrifugation	Lyse GR et centrifugation	ensemencement	lavage
(Deimling et al., 2012)		Collagénase type I 1 mg/MI 37°C 30 min , agitation dans PBS	Ajout DMEM 10% FBS	400 g 10 min	Culot repris dans tampon de lyse NH4Cl 10 min, Température ambiante Centrifugation 400g 10 min	Lavage de la fraction ADSC du culot avec HBSS Centrifugation 350g 5 min Reprise du culot dans DMEM 10% FCS	DMEM 10% FCS 5% CO2 Changement de milieu tous les 2 3 jours

Tableau 3 : Comparaison de la préparation de la SVF pour différentes études sur les ASCs canines et pour la préparation de la SVF pour isoler des ASCs humaines à STROMALab

\*K-NAC medium : Un milieu modifié MCDB 153 (Keratinocyte-SFM, GIBCO–Invitrogen, Carlsbad, CA) complémenté avec de la N-Acétyl-Cystéine (NAC) (2 mM) et de l'acide ascorbique 2P (0.2mM). Ce milieu à teneur en calcium faible (0.09 mM) contient du facteur épidermique recombinant (rEGF, 5 ng/mL), de l'extrait pituitaire bovin (BPE, 50 mg/mL), de l'insuline (5 mg/mL), de l'hydrocortisone (74 ng/mL), et de la 3, 30,5-triiodo-DL-thyronine (T3) (6.7 ng/mL)

# PARTIE EXPERIMENTALE : PRODUCTION ET CARACTERISATION DES ASCs CANINES A STROMALAB.

## I. Matériel et méthodes

### A. Chiens et prélèvements de tissu adipeux

Tous les prélèvements ont été réalisés avec l'accord préalable des propriétaires et suite à la signature d'un consentement éclairé. Les chiennes utilisées étaient de différentes races, âgées de 4 mois à 8 ans et de score corporel variant de 4/9 à 6/9 (*annexe 1*).

Les prélèvements de tissu adipeux ont été réalisés sur 10 chiennes présentées au bloc opératoire de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse pour des interventions chirurgicales indépendantes de notre étude dans des conditions d'asepsie chirurgicale. Les chirurgies se sont déroulées sous anesthésie générale avec une analgésie adaptée.

Le premier échantillon de tissu adipeux sous cutané a été prélevé sur des débris de bloc de l'exérèse d'une masse vulvaire d'une chienne. Les prélèvements de tissu adipeux sous cutané suivants ont été faits sur les marges d'incision lors d'ovariectomie ou d'ovariohystérectomie pour standardiser la procédure. Il s'agissait donc de tissu adipeux sous cutané de la région abdominale sous-ombilicale. Pour la septième chienne un prélèvement de tissu adipeux viscéral (prélevé juste sous le plan musculaire) a été effectué. Les prélèvements obtenus pesaient entre 0,6 g et 2,5 g, ils ont été placés dans du sérum physiologique stérile 24h maximum avant la préparation de la SVF.

Numéro chienne	Race	Age	Score corporel	Chirurgie	Date chirurgie	Caractéristiques prélèvement
1	Pinscher	Non fourni	Non fourni	Exérèse masse	9/11/2015	Sous cutané 1,5 g
2	Golden retriever	8 ans	5/9	Ovariohystérectomie	9/11/2015	Sous cutané 2,3 g
3	Rottweiler	4 ans	5/9	Ovariohystérectomie	19/11/2015	Sous cutané 2,5 g
4	Bouledogue français	4 ans	5/9	Ovariohystérectomie	7/12/2015	Sous cutané 2 g
5	Croisé Malinois	2 ans	6/9	Ovariectomie	10/12/2015	Sous cutané 1 g
6	Croisé Shiba Inu	6 mois	5/9	Ovariectomie	1/02/2016	Sous cutané 1 g
7	Croisé Border	2,5 ans	5/9	Ovariectomie	2/02/2016	Sous cutané 0,6 g Viscéral : 2,3 g
8	Setter	1 an	4/9	Ovariectomie	4/02/2016	Sous cutané 1 g
9	Cocker	4 mois	5/9	Ovariectomie	18/02/2016	Sous cutané 0,6 g
10	Croisé Griffon	6 mois	5/9	Ovariectomie	25/02/2016	Sous cutané 1 g

Tableau 4 : Caractéristiques des chiennes et des prélèvements de tissu adipeux

## B. Cultures cellulaires

Toutes les manipulations ont été réalisées sous hotte à flux d'air laminaire.

### 1) Extraction des cellules : préparation de la Fraction Stromale Vasculaire (SVF)

La préparation de la SVF a eu lieu le jour même ou le lendemain de la chirurgie. A partir du deuxième chien, les prélèvements ont été rincés deux fois au PBS-ASP, dilacérés au ciseau et à la pince dans une boîte de pétri, puis digérés par la collagénase NB4 (Serva référence 17454) en milieu alpha-MEM (Gibco) sous agitation au bain marie à 37°C pendant 50 minutes. Les volumes de milieux et de NB4 étaient calculés en fonction du poids du prélèvement pour obtenir une concentration finale à 0,4 U/mL. Les préparations ont ensuite été filtrées sous vide avec un filtre millipore de 100 µm et centrifugées 10 minutes à 550g. Après aspiration du surnageant, les culots ont été repris par du tampon de lyse et placés 3 minutes au réfrigérateur à 4°C. Le tampon de lyse était du chlorure d'ammonium et les volumes étaient compris entre 500 µL et 1,5 mL en fonction de l'appréciation qualitative de la taille des culots et de la quantité d'hématies. Environ 10 mL de PBS a été ajouté pour arrêter la lyse puis les préparations ont été centrifugées 5 minutes à 486g, après aspiration du surnageant les culots ont été repris par un petit volume (400 µL à 3,6 mL) de milieu alpha MEM 10% FBS (Gibco). Une étape finale de filtration sur filtre de 100 µm a été réalisée lorsque le culot était trop fibreux.

### 2) Mise en culture

Les cellules morphologiquement proches des ASCs ont été comptées après coloration au bleu de Trypan à la lame de Malassez (*annexe 4*) en utilisant des critères de taille et de réfringence. Pour chaque prélèvement le rendement en cellules/gramme a été calculé.

Pour chaque prélèvement des flasques T75 ont étéensemencées à 4000 cellules/cm<sup>2</sup> en milieu alpha-MEM – ASP – 10% FBS (Gibco) avec renouvellement du milieu tous les 2 à 3 jours. Les cellules de la SVF capables de d'adhérer et de proliférer correspondent aux ASCs P0. A confluence, elles ont été récupérées par trypsination (*annexe 5*) et ré-ensemencées selon différents protocoles au cours des passages. A chaque passage les ASCs ont été comptées au compteur Countess (Invitrogen), le rendement en cellules/cm<sup>2</sup> et le temps de doublement ont été calculés.

$$\text{Formule temps de doublement} = [\text{nombre de jours de culture} \times \ln(2)] / [\ln(\text{rendement en c/cm}^2 \text{ fin de passage}) - \ln(\text{nombre c/cm}^2 \text{ ensemencées})]$$

### 3) Colony Forming Units fibroblastics (CFU-f)

Des flasques T25 pour compter les colonies fibroblastiques CFU-f ont été ensemencées en primoculture et en passage 1 en milieu alpha-MEM – ASP – 10% sérum foetal bovin (FBS) (Gibco) avec renouvellement du milieu tous les 2 à 3 jours. Pour les chiennes 2 et 3, 2 flasques T25 ont été ensemencées à 400 cellules/flasque comme pour les ASCs humaines. Pour la chienne 4 en primoculture, 2 flasques T25 ont été ensemencées à 200 cellules/flasque et 2 T25 à 100 cellules/flasque. Pour la chienne 4 au passage 1 et les chiennes 5 à 7 en primoculture et en passage 1, 2 flasques T25 ont été ensemencées à 200 cellules/flasque. Les CFU-f ont été arrêtées entre 7 et 11 jours en fonction du développement des colonies. Les flasques ont ensuite été rincées au PBS, laissées sécher pendant

une journée, puis colorées avec le kit de coloration RAL stainer MCDh (*annexe 6*) avant de les compter. Le pourcentage de CFU-f a été obtenu en divisant le nombre de colonies comptées par le nombre de cellulesensemencées dans la flasque. Une moyenne a été réalisée sur les 2 flasques pour chaque échantillon d'ASCs.

#### 4) Prolifération

Les ASCs P1 ont étéensemencées dans des plaques 12 puits à 2000 cellules/cm<sup>2</sup> en milieu alpha-MEM – ASP – 10% FBS (Gibco) avec renouvellement du milieu tous les 2 à 3 jours. Chaque jour 2 puits étaient trypsinnés et les cellules étaient comptées à la lame de Malassez après coloration au bleu de Trypan (*annexe 4*). On réalise ensuite une moyenne sur les deux puits prélevés. Les proliférations des ASCs P1 des chiennes 2 et 3 ont été réalisées sur six jours et celles des ASCs P1 des chiennes 6 et 7 sur douze jours. Pour cette dernière, les études de prolifération ont été réalisées pour les ASCs dérivées du tissu adipeux sous cutané et du tissu adipeux viscéral afin de comparer l'évolution.

Les ASCs P0 dérivées de tissu adipeux sous cutané de la chienne 9 ont étéensemencées à 2000 cellules/cm<sup>2</sup> et cultivées environ 6 jours jusqu'à confluence durant 10 passages successifs.

#### 5) Potentiels de différenciation adipocytaire et ostéoblastique

Les ASCs P1 ou P2 ont étéensemencées en plaque 6 puits en alpha-MEM – ASP – 10% SVF (Gibco) ; les différenciations ont été lancées deux jours après ou le lendemain de l'ensemencement. Le jour du lancement de la différenciation, un puit a été fixé au PFA 4% et un autre a servi à extraire les ARN (*annexes 7 et 8*).

##### a) Potentiel de différenciation adipocytaire

Pour la différenciation adipocytaire quatre conditions de différenciation ont été testées (voir tableau 5). Les cellules ont été cultivées 14 jours et le milieu a été changé tous les 2 à 3 jours. Pour chaque condition 4 puits ont étéensemencés (figure 1): 2 puits avec le milieu de différenciation et 2 puits témoins avec le milieu sans le cocktail de différenciation. Les ARN de chacune des conditions ont été récupérés et les autres puits ont été fixés au PFA 4% et colorés à l'huile rouge O (*annexes 7, 8 et 9*).

condition	C1	C2	C3	C4
<b>choix</b>	Même milieu que pour la souris	Milieu en fonction des articles	Milieu humain modifié	Même milieu que pour l'humain
<b>Milieu de base + ASP</b>	DMEM F12 (Gibco)	DMEM high glucose (Gibco)	Alpha-MEM (Gibco)	Alpha-MEM (Gibco)
<b>FBS</b>	2%	2%	0,1%	2%
<b>Ajout pour le milieu non différencié (témoin)</b>	-Biotine (16µM) - Acide Ascorbique (100µM) - Acide Pantothénique (18µM)	Pas d'ajout	-Biotine (16µM) - Acide Ascorbique (100µM) - Acide Pantothénique (18µM)	-Biotine (16µM) - Acide Ascorbique (100µM) - Acide Pantothénique (18µM)
<b>Ajout pour le milieu différencié</b>	-Biotine (16µM) - Acide Ascorbique (100µM) - Acide Pantothénique (18µM)  - Insuline (5µg/ml) -Dexaméthasone (1µM) -Rosiglitazone (1µM) - Transferine 10 mg/mL - T3 20 µg/ML - IBMX (450µM) <b>seulement les 3 premiers jours</b>	- Insuline 5µg/ml -Dexaméthasone (1µM) -Rosiglitazone (1µM) - Indométacine (60µM)	-Biotine (16µM) - Acide Ascorbique (100µM) - Acide Pantothénique (18µM)  - Insuline (5µg/ml) -Dexaméthasone (1µM) -Rosiglitazone (1µM) - Indométacine (60µM) - IBMX 3j (450µM)	-Biotine (16µM) - Acide Ascorbique (100µM) - Acide Pantothénique (18µM)  - Insuline (5µg/ml) -Dexaméthasone (1µM) -Rosiglitazone (1µM) - Indométacine (60µM) -IBMX (450µM) <b>seulement les 3 premiers jours</b>
<b>ASC utilisées</b>	- Chienne 3: ASC P2 - Chienne 4: ASC P1 - Chienne 5: ASC P1	- Chienne 3: ASC P2 - Chienne 4: ASC P1 - Chienne 5: ASC P1 - Chienne 6: ASC P1 - Chienne 7 : ASC P1 viscérales et sous cutanées	- Chienne 3: ASC P2 - Chienne 4: ASC P1 - Chienne 5: ASC P1 - Chienne 6: ASC P1 - Chienne 7 : ASC P1 viscérales et sous cutanées	- Chienne 2: ASC P1 et P2 - Chienne 3 : ASC P1

Tableau 5 : Les 4 conditions de différenciation adipocytaire et les ASCs utilisés

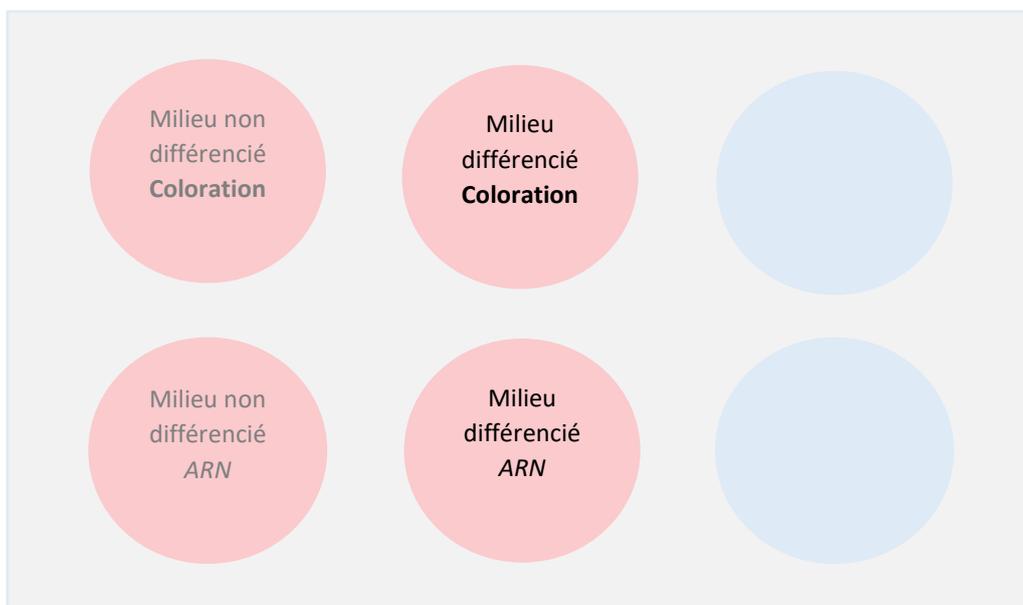


Figure 1 : Plan de plaque pour les différenciations adipocytaires

A partir des ARN extraits, le niveau d'expression de gènes marqueurs de la différenciation adipocytaire a été mesuré par qPCR, ces gènes sont présentés dans le tableau 6.

Gène	Séquence forward	Séquence réverse	Date de réception / Fournisseur
<b>GADPH</b>	CCATCTTCCAGGAGCGAGAT	TTCTCCATGGTGGTGAAGAC	14/12/15
<b>PPARY</b>	ACACGATGCTGGCGTCCTTGATG	TGGCTCCATGAAGTCACCAAAGG	14/12/15
<b>C-EBP</b>	AGTCAAGAAGTCGGTGGACAAG	GCGGTCATTGTCACTGGTGAG	14/12/15
<b>FABP4</b>	ATCAGTGTAACGGGGATGTG	GACTTTTCTGTCATCCGCAGTA	14/12/15
<b>LPL</b>	ACACATTCACAAGAGGGTCACC	CTCTGCAATCACACGGATGGC	14/12/15

Tableau 6 : Primers canins des gènes de la différenciation adipocytaire

#### b) Potentiel de différenciation ostéoblastique

Pour la différenciation ostéoblastique 3 conditions ont été testées (voir tableau 7), le but de la différenciation était d'obtenir une minéralisation extra-cellulaire se colorant au rouge Alizarine (*annexe 10*) après fixation au PFA. En revanche cette minéralisation ne permet pas de récupérer les ARN. Pour chaque condition, les milieux étaient différents pour les puits destinés à la coloration ou à l'extraction d'ARN. Pour les conditions 3 et 4, les milieux de différenciation pour extraire les ARN ont été testés avec et sans BMP7 (figure 2). Pour les conditions 3 et 4, le milieu de différenciation pour la minéralisation change au quatorzième jour pour induire la minéralisation. Les cellules ont été cultivées 21 jours et le milieu a été changé tous les 2 à 3 jours.

Condition	1	3	4
<b>choix</b>	Même milieu que pour la souris	Milieu utilisé pour l'humain modifié	Même milieu que pour l'humain
<b>Milieu de base + ASP</b>	DMEM F12 (Gibco)	Alpha-MEM (Gibco)	Alpha-MEM (Gibco)
<b>FBS</b>	2%	0,1%	2%
<b>Ajout milieu non différencié</b>	1% L-Glutamine	1% L-Glutamine	1% L-Glutamine
<b>Ajout milieu différencié</b>	1% L-Glutamine Pour ARN - Acide Ascorbique (100mM) - Dexaméthasone 0,1 µM	1% L-Glutamine Pour ARN - β-glycérophosphate (10mM) - Acide Ascorbique (50µM) - +/- BMP7 (50ng/ml)	1% L-Glutamine Pour ARN - β-glycérophosphate (10mM) - Acide Ascorbique (50µM) - +/- BMP7 (50ng/ml)
	Pour minéralisation - Acide Ascorbique (100mM) - Dexaméthasone 0,1 µM - Phosphate inorganique 0,9 mM	<u>Pour minéralisation</u> <b>J0 à J14</b> -Acide ascorbique (50µM) -Dexaméthasone (0.1µM) - NaH2PO4 (3mM) <b>J14 à J21:</b> -Acide Ascorbique (50µM) -Dexaméthasone (0.1µM) - βglycérophosphate (10mM)	<u>Pour minéralisation</u> <b>J0 à J14</b> -Acide ascorbique (50µM) -Dexaméthasone (0.1µM) - NaH2PO4 (3mM) <b>J14 à J21:</b> -Acide Ascorbique (50µM) -Dexaméthasone (0.1µM) - βglycérophosphate (10mM)
<b>ASC utilisées</b>	- Chienne 3: ASC P2 - Chienne 4: ASC P1 - Chienne 5: ASC P1	- Chienne 3: ASC P2 - Chienne 4: ASC P1 - Chienne 5: ASC P1 - Chienne 6: ASC P1 - Chienne 7 : ASC P1 viscérales et sous cutanées	- Chienne 2: ASC P1 et P2 - Chienne 3 : ASC P1 - Chienne 6 : ASC P1 - Chienne 7 : ASC P1 viscérales et sous cutanées

Tableau 7 : Les 3 conditions testées pour la différenciation ostéoblastique et les ASCs utilisées

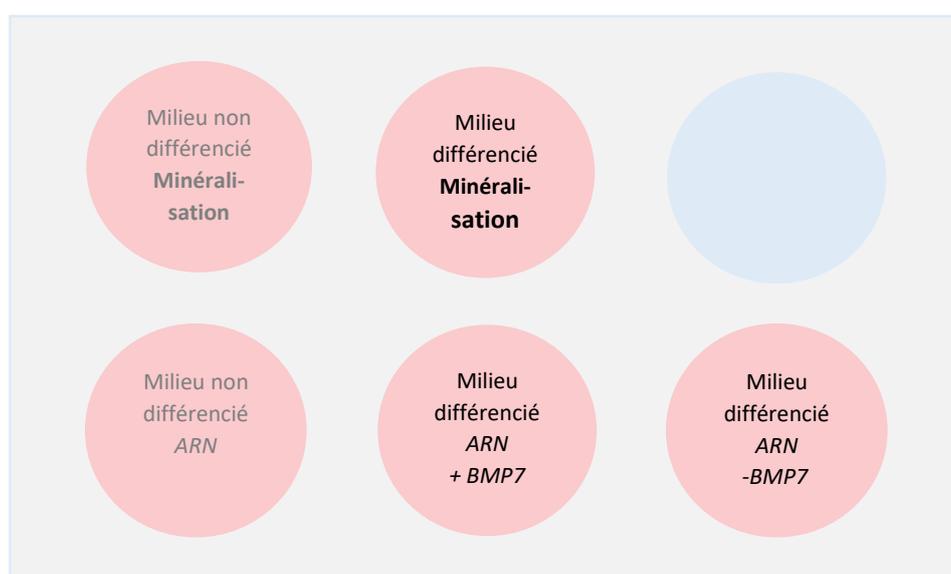


Figure 2 : Plan de plaque pour les différenciations ostéoblastiques

Le niveau d'expression des gènes marqueurs de la différenciation ostéoblastique a été mesuré par qPCR (tableau 8)

Gène	Séquence Forward	Séquence Reverse	Date/ Fournisseur
Osterix	ACGACACTGGGCAAAGCAG	CATGTCCAGGGAGGTGTAGAC	14/12/2015
BSP	TTGCTCAGCATTTTGGGAATGG	AACGTGGCCGATACTTAAAGAC	14/12/2015
COL2A	AGTAACAGGAATGCCGATGTC	:AGTAACAGGAATGCCGATGTC	14/12/2015

Tableau 8: Primers canins des gènes de la différenciation ostéoblastique

## 6) Potentiel de différenciation chondrocytaire

Les différenciations chondrocytaires ont été réalisées sur les ASCs P2 des chiennes 2, 3, 6 et 7 (prélèvement de tissu adipeux sous cutané et viscéral) car elles nécessitent un nombre de cellules important. En effet la différenciation chondrocytaire nécessite la formation d'agglomérats de 250000 cellules réalisés à partir de gouttes de 12,5 µL d'une solution à 20.10<sup>6</sup> cellules/mL de DMEM high glucose – ASP – 10%SVF (Gibco).

Le milieu de différenciation était composé de de DMEM high glucose – ASP – 10%SVF (Gibco) complémenté avec de la dexaméthasone à 0,1 µM, du Sodium pyruvate à 1 mM, de l'acide ascorbique à 0,17 mM, de la L-Proline à 0,35 mM, le facteur TGFβ3 à 0,01 µg/mL et de l'ITS dilué au centième (1,0 mg/ml insuline bovine, 0,55 mg/ml transferrine humaine, 0,5 µg/ml sélénite de sodium, 50 mg/ml sérum albumine bovine et 470 µg/ml acide linoléique). Le milieu utilisé pour les pellets témoins était le milieu de base : de DMEM high glucose – ASP – 10%SVF (Gibco).

Pour chaque chien 16 gouttes ont été réalisées suivant le protocole suivant. Après trypsination et comptage au compteur Countess (Invitrogen) le volume correspondant à 4.10<sup>6</sup> cellules a été prélevé, centrifugé cinq minutes à 550g puis repris par 200µL de DMEM high glucose – ASP – 10%SVF (Gibco). Les gouttes de 12,5 µL ont été déposées individuellement dans chaque puit et ont été incubées pendant 2 heures à 37°C sans milieu supplémentaire. Le regroupement des cellules a ensuite été évalué subjectivement en regardant l'étalement de la goutte dans le puit, 8 gouttes par chien ont été sélectionnées pour déposer 500 µL de milieu : 4 pour le milieu de base et 4 pour le milieu de différenciation. Pour chaque condition 2 seront utilisées pour la coloration et 2 pour l'extraction des ARN. Les différenciations ont été arrêtées à 14 jours, le milieu était changé tous les 2 à 3 jours. Pour arrêter les différenciations, le milieu surnageant était retiré, puis les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS.

Les ARN ont été traités comme pour les autres différenciations puis le niveau d'expression de gènes marqueurs de la différenciation chondrocytaire (tableau 9) a été mesuré par qPCR.

Gène	Séquence forward	Séquence reverse	Date/fournisseur
Col 10A	AGTAACAGGAATGCCGATGTC	TCTTGGGTCATAATGCTGTTGC	14/12/15
Aggrecan	ATCAACAGTGCTTACCAAGACA	ATAACCTCACAGCGATAGATCC	14/12/15
Sox9	GCTCGCAGTACGACTACACTGAC	GTTTCATGGTGAAGGTGGAG	14/12/15
PPARγ2	ACACGATGCTGGCGTCCTTGATG	TGGCTCCATGAAGTCACCAAAGG	14/12/15

Tableau 9 : Primers canins des gènes marqueurs de la différenciation chondrocytaire

Pour la coloration des tests de différenciation chondrocytaire des chiennes 2 et 3, les cellules ont été reprises en histogel (*annexe 11*) pour réaliser des coupes à l'école vétérinaire et des colorations au bleu de toluidine.

Les différenciations des ASCs des chiennes suivantes ont été reprises en agarose car la trame histogel fixait aussi le bleu de toluidine.

## 7) Méthode d'analyse par q PCR

Pour extraire les ARN, les cellules ont à chaque fois été reprises avec 350 µL de RLT puis placées au congélateur à -4°C pendant 3 à 4 jours avant d'être conservées à -20°C.

Les ARN totaux ont été extraits des ASCs canines en utilisant le kit RNeasy Micro (Quiagen Réf 74106) puis le dosage des ARN a été réalisé au Nanodrop (*annexe 12*). Les ARN sont ensuite transcrit en ADNc à partir du kit transcriptase reverse (life technologies). Les échantillons d'ADNc ont été analysés par qPCR en utilisant un mélange de SYBR green Master Mix et de chacun des primers (2µM) des gènes d'intérêts, marqueurs de la différenciation chondrocytaire, adipocytaire ou ostéoblastique.

L'efficacité des séquences amorces ont préalablement été testées à partir de dilutions des ADNc. De plus l'analyse des courbes de fusion a permis de valider la spécificité des primers.

L'analyse des données de qPCR est réalisée par la méthode des  $-\Delta\Delta Ct$ , le gène de référence est le gène GAPDH (un delta Ct entre la moyenne des deux Ct obtenus par échantillon et le Ct de référence de chaque condition est calculé). On utilise la formule  $2^{\exp(-\Delta Ct)}$  pour refléter l'expression des gènes. On normalise cette expression par rapport à l'expression du gène au J0 en fixant le  $2^{\exp(-\Delta Ct)}$  lui correspondant à 1.

## 8) Caractérisation des cellules par cytométrie en flux

Les cellules de la SVF des chiennes 8, 9 et 10, des ASCs P0 des chiennes 9 et 10 et des ASCs P1 de la chienne 10 ont été phénotypées à l'aide des anticorps rat anti-dog CD45 APC (Serotec), mouse anti-dog CD34 PE (BD), mouse anti-human réaction croisée chien CD90 FITC (BD), mouse anti-dog CD31 uncoupled (Clinisciences) couplé au Zenon Alexa 700 (Thermofisher). Pour chaque échantillon des tubes avec des isotypes portant le même fluorochrome que celui des anticorps testés ont aussi été réalisés servant de contrôle pour les analyses des données. Les cellules étaient marquées au DAPI pour exclure les cellules mortes (*annexe 13*). Elles ont ensuite été analysées au FACS (LSRFortessa), l'acquisition des données et leur analyse s'est faite avec le logiciel (Kaluza software Beckman).

## 9) Congélation des cellules.

Lors des passages successifs, les cellules non utilisées ont été centrifugées 5 minutes à 485g puis reprises par du milieu 90% FBS – 10%DMSO, de façon à réaliser des ampoules de 1mL contenant 1 à 4 millions de cellules conservées à -4°C pendant 3 à 4 jours puis stockées à -20°C (*annexe 14*).

## 10) Analyse des données

Les moyennes arithmétiques sur les mesures ont été calculées lorsque cela était nécessaire puis la SEM mesurant l'incertitude de nos mesures a été calculée selon la formule :

$$SEM = \frac{1}{\sqrt{n}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

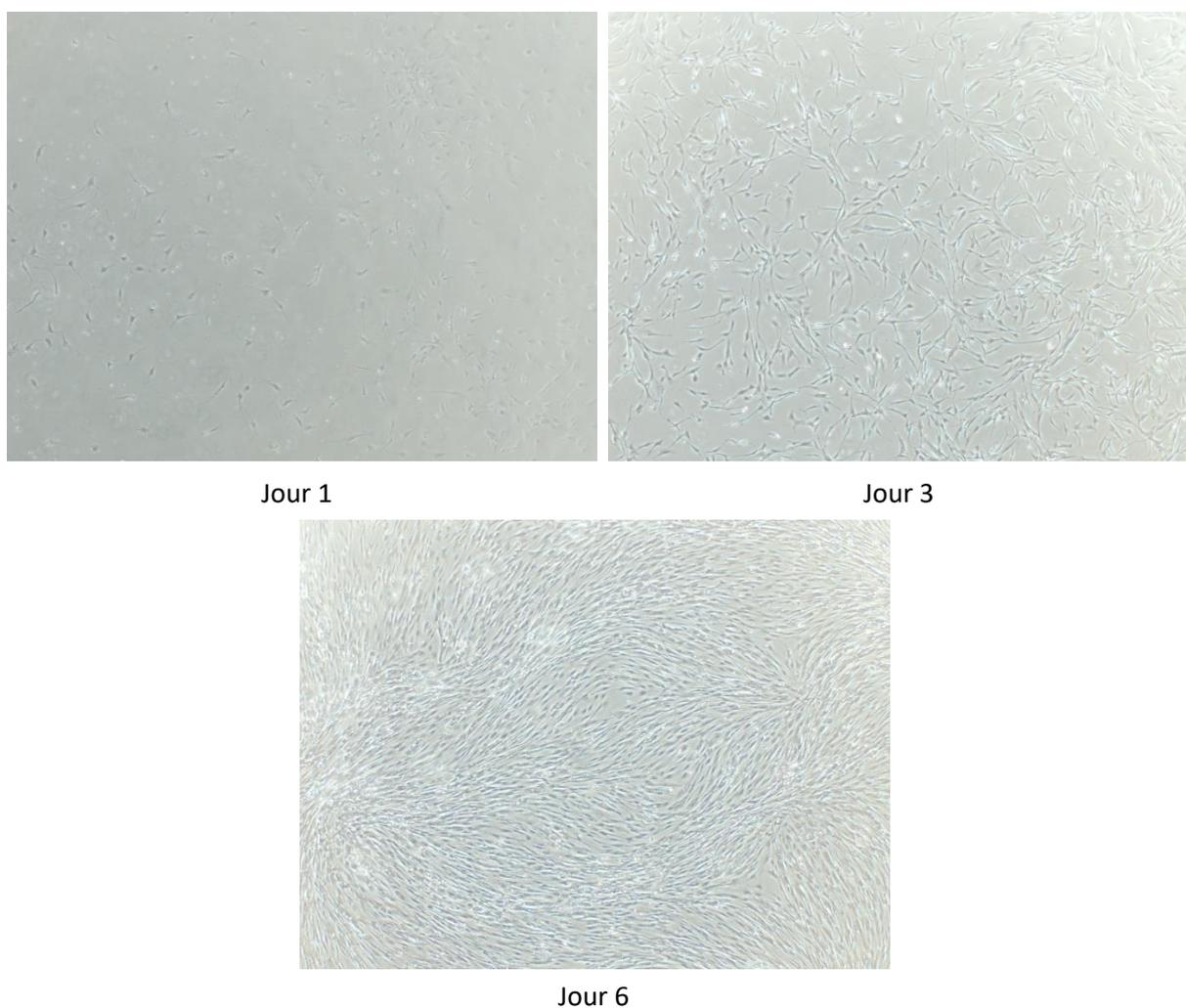
## II. Résultats

### A. Multiplication

#### 1) Rendements et temps de doublement des ASCs de tissu adipeux sous cutané

Les cellules de la SVF ont étéensemencées à 4000 cellules/cm<sup>2</sup> sur des flasques T75 puis à 2000 cellules/cm<sup>2</sup> sur des flasques T150 pour les passages suivants et cultivées environ 7 jours, les rendements (cellules/cm<sup>2</sup>) et les temps de doublement (jours) ont ensuite été calculés. Ces résultats sont présentés dans le tableau 10.

Les ASCs ont formé une population adhérente au plastique avec des cellules à la forme fibroblastique dont les extensions cytoplasmiques semblaient s'étendre avec les jours de culture (figure 3).



*Figure 3 : Microphotographies d'ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané de passage 1 à différents jours de culture (ensemencées à 2000 cellules/cm<sup>2</sup>)*

Le rendement moyen était de 750000 cellules de la SVF par gramme de tissu adipeux d'un ordre de grandeur équivalent au tissu adipeux humain. En revanche, les ASCs canines ont montré des rendements importants dès le premier passage et des temps de doublement faibles en comparaison aux ASCs humaines. En fin de primo-culture des ASCs canines, le temps de doublement était 2 fois plus faible que le temps de doublement des ASCs humaines ; puis les ASCs P1 canines avaient un temps de doublement 6 fois plus faible que les ASCs humaines (figure 4). Les données concernant les ASCs humaines ont été obtenues au laboratoire STROMALab pour des cellules cultivées dans les mêmes conditions que les ASCs canines de notre étude.

Chienne	Cellules SVF rdt (c/g)	ASCs P0		ASCs P1	
		rdt(c/cm <sup>2</sup> )	TD (jours)	rdt(c/cm <sup>2</sup> )	TD (jours)
CN2	565217	84000	1,82	166667	0,55
CN3	712000	37400	2,17	37644	0,38
CN4	624000	24300	2,69	37333	0,48
CN5	592000	33333	2,29	36500	0,48
CN6	832000	42050	1,77	90000	0,58
CN7 sc	156000	63333	1,22	66667	0,53
CN8	1100000				
CN9	1405333	25867	1,59		
CN10	980000	19200	1,77		
CN7 vi	556522	50000	1,92	73333	0,60
moyenne	774061	41185	1,92	72469	0,50
SEM	119933	7796	0,16	20781	0,03

Tableau 10: Rendements (rdt) et Temps de doublement (TD) des ASCs de tissu adipeux sous cutané de chaque chienne à chaque passage.

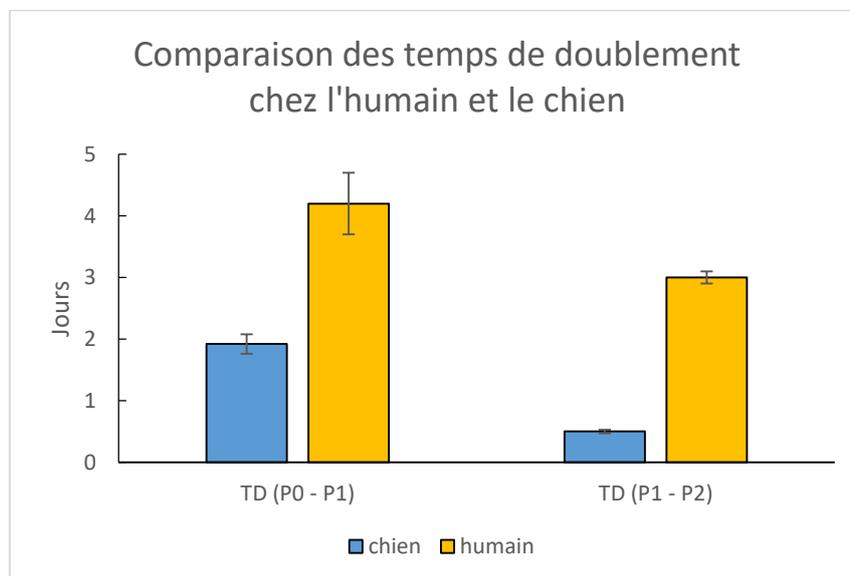


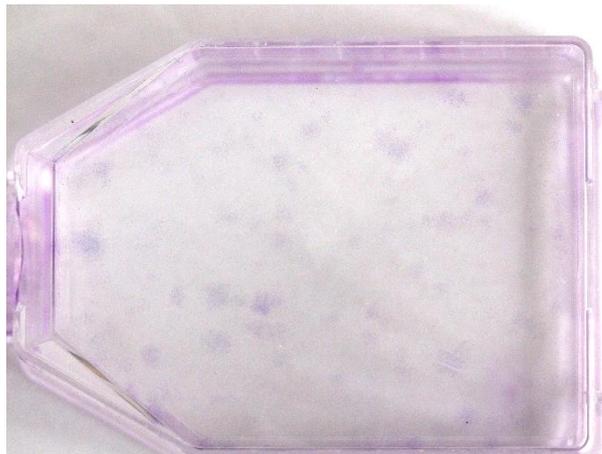
Figure 4: Comparaison des temps de doublement entre le chien et l'humain

## 2) CFU-f des ASCs de tissu adipeux sous cutané

La réalisation du test de CFU-f a pour objet de définir le potentiel clonogénique d'une population cellulaire. Des cellules sont ensemencées à des très faibles densités pour estimer le nombre de cellules isolées capables de développer une colonie. Une colonie était quantifiée lorsqu'elle était constituée d'un amas d'au moins cinquante cellules. On obtient le pourcentage de cellules à l'origine des populations clonales en divisant le nombre de colonies par le nombre de cellules ensemencées.

Par rapport au protocole suivi pour les ASCs humaines, les modalités de réalisation des CFU-f pour les ASCs canines ont dues être modifiées. Pour les ASCs humaines, les ASCs P0 ou P1 étaient ensemencées à 400 cellules/flasque. Elles étaient arrêtées entre 13 et 14 jours pour des ASCs P0 et à 8 jours pour les passages suivants. Ces conditions ont été utilisées pour les ASCs des chiennes 2 et 3 mais les colonies se chevauchaient rendant le comptage compliqué. Les tests CFU-f ont donc été arrêtés plus tôt (8 à 11 jours). Pour la chienne 4, nous avons essayé d'ensemencer les ASCs à 100 et 200 cellules/flasque qui ont bien pris, et les colonies ont été plus facilement comptables. Les tests CFU-f suivants ont donc été ensemencés à 200 cellules par flasque.

Concernant la morphologie des colonies, les CFU-f arrêtées à 11 jours, ont montré différentes tailles de colonies : il y avait des petites colonies de l'ordre de la centaine de cellules et on voyait se former des très grosses colonies avec un aspect de croissance en étoile qui avait tendance à venir masquer les plus petites. Pour les CFU-f arrêtées plus tôt ces différentes tailles n'étaient pas encore identifiables (figure 5).



*Figure 5 : Photographie des CFU-f d'ASC dérivées de tissu adipeux sous cutané de passage 1 après 7 jours (ensemencées à 200 cellules/T25)*

Le tableau 11 montre que les ASCs canines ont donné beaucoup de CFU-f: 27% de cellules à potentiel clonogénique pour les ASCs P0 et 38% pour les ASCs P1.

ASC P0				ASC P1			
Chienne	cellules/T25	Jours	%CFU-f	Chienne	cellules/T25	Jours	% CFU-f
CN2	400	9	25,63	CN2	400	9	28,88
CN3	400	11	18,38	CN3	400	6	26,88
CN 4	200	9	21,50	CN 4	200	8	52,25
CN 4	100	9	22,00				
CN 5	200	11	18,00	CN 5	200	11	41,50
CN 6	200	7	46,00	CN 6	200	7	38,00
CN7 sc	200	8	45,75	CN7 sc	200	6	39,25
		moyenne	28,18			moyenne	37,79
		SEM	4,67			SEM	3,76

Tableau 11: Pourcentage de CFU-f pour les ASC canines aux passages 0 (P0) et 1(P1)

Les résultats de notre étude ont été comparés aux pourcentages de CFU-f d'ASCs humaines dérivées de tissu adipeux sous cutané dans la figure 6 (travaux réalisés à STROMALab). Le pourcentage de cellules à potentiel clonogénique des ASCs canines est plus important que celui des ASCs humaines : 4 fois plus important pour les ASCs P0 et plus de 2 fois plus important pour les ASCs P1.

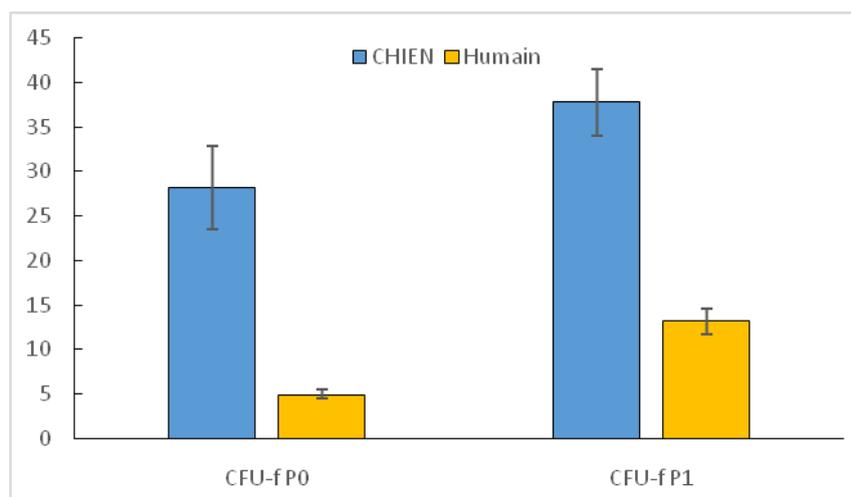


Figure 6: Pourcentage de CFU-f pour les ASCs canines et humaines aux passages 0 (P0) et 1 (P1)

### 3) Prolifération des ASCs de tissu adipeux sous cutané

#### a) Tendance

Les ASCs P1 de tissu sous cutané ont été ensemencées à 2000 cellules/cm<sup>2</sup> dans des plaques 12 puits, chaque jour une moyenne sur le comptage cellulaire de 2 puits a été calculée.

Pour les chiennes 2 et 3 les comptages ont été réalisés sur 7 jours en obtenant 6 valeurs car un jour n'était pas compté à cause du week-end (figure 7 et 8). Pour la première prolifération (ASCs P1 de la chienne 2) on a des nombres de cellules beaucoup moins importants que pour les autres proliférations au même stade (tableau 12). Comme il s'agissait de la première, cela peut être dû à des erreurs de manipulation : on remarque que le premier comptage donnait 1342 cellules/cm<sup>2</sup> or les cellules étaient

ensemencées à 2000 cellules/puit on peut donc se demander s'il y a eu une erreur lors de l'ensemencement ou si la technique de récupération des cellules n'était pas optimale.

Les proliférations montraient une croissance à l'allure exponentielle des cellules (*annexe 15*). Nous nous sommes donc demandés si la prolifération des cellules atteignait un plateau et dans ce cas en combien de temps.

Afin de voir la suite de l'évolution de la multiplication des cellules, les comptages ont été réalisés sur 16 jours (3 jours non comptés), pour les chiennes 6 et 7 (figure 9 et 10 et tableau 12). Les cellules prolifèrent jusqu'à atteindre une très forte confluence à 250000 cellules/cm<sup>2</sup> au bout de 6 jours de culture environ, puis le nombre de cellules est fluctuant autour de ce plateau.

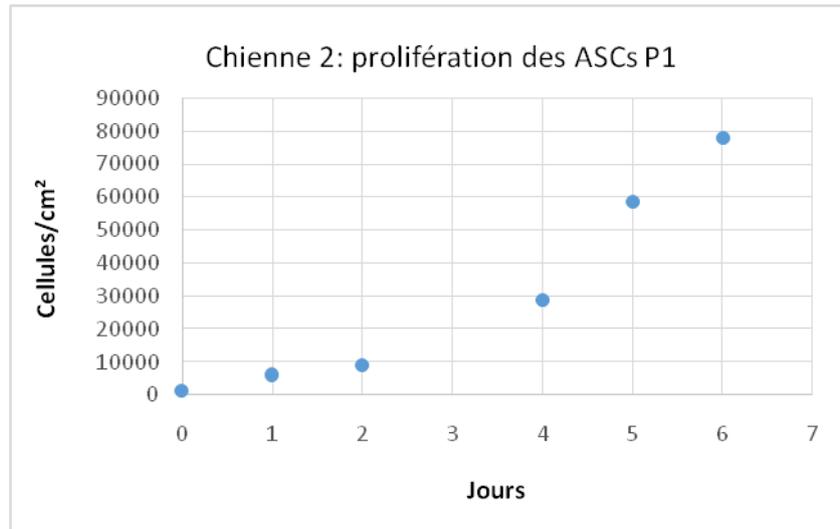


Figure 7: Prolifération des ASCs P1 de la chienne 2

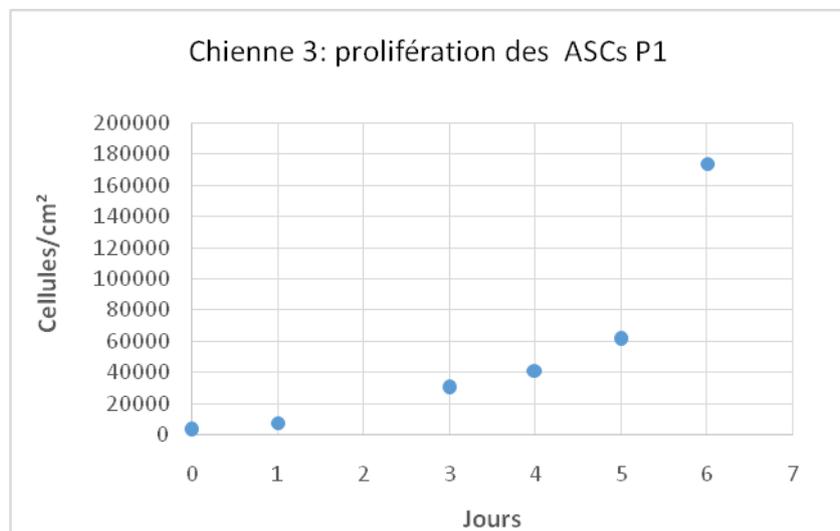


Figure 8: Prolifération des ASCs P1 de la chienne 4

jours	Chienne 2 (c/cm <sup>2</sup> )	Chienne 3 (c/cm <sup>2</sup> )	Chienne 6 (c/cm <sup>2</sup> )	Chienne 7 SC (c/cm <sup>2</sup> )	moyenne (c/cm <sup>2</sup> )	SEM (c/cm <sup>2</sup> )
0	1342	3421	3684	3053	2875	527
1	6079	7895	6632		6868	537
2	9053		19579		14316	5263
3		30211	37193	30526	32643	2277
4	28772	41316		68421	46170	11700
5	58333	61404	205263	106842	107961	34278
6	77632	173684	215789	241579	177171	36009
7			181053	252632	216842	35789
8			265263		265263	
9			258158		258158	
10				226316	226316	
11				210526	210526	
12			206579	230263	218421	11842
13			259211	194737	226974	32237
14			292105	192105	242105	50000
15						
16				202632	202632	

Tableau 12: Prolifération des ASCs canines de tissu adipeux sous cutané

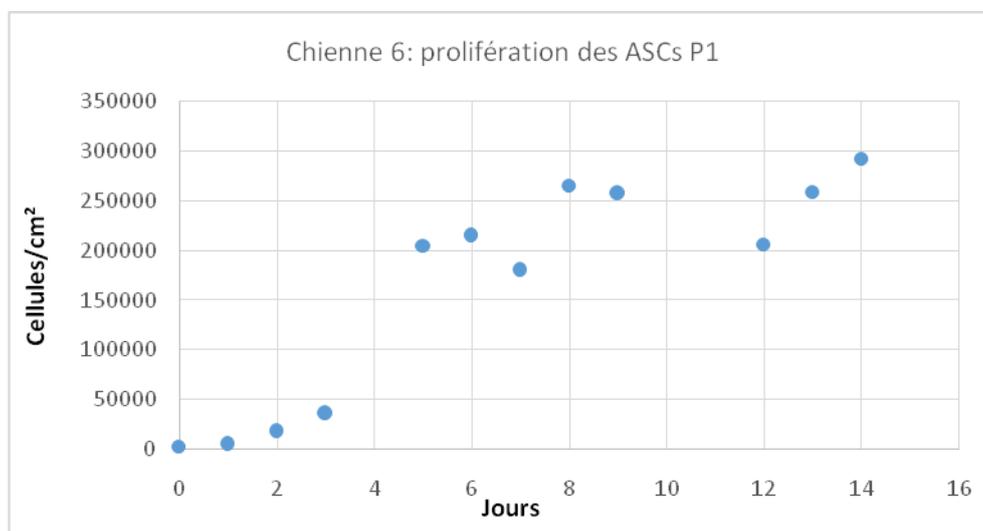


Figure 9: Prolifération des ASCs P1 de la chienne 6 sur 14 jours

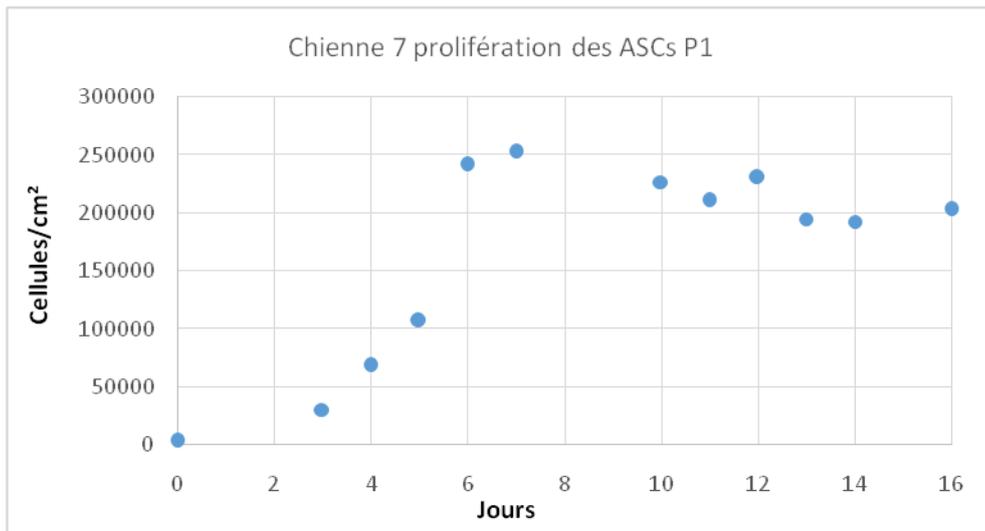


Figure 10: Prolifération des ASCs P1 de la chienne 7 sur 16 jours

Pour chaque jour la moyenne des comptages et la SEM sur l'ensemble des proliférations des ASCs P1 dérivées de tissu adipeux sous cutané ont été calculés (tableau 13 et figure 11). Les cellules prolifèrent de façon exponentielle jusqu'à atteindre un plateau autour de 250000 cellules au bout de 6 jours. Ce plateau peut s'expliquer par le niveau de très forte confluence atteint dans les puits. De plus, on pouvait observer beaucoup de cellules qui flottaient dans le surnageant à partir de ce moment (figure 12). Deux hypothèses concernaient ces cellules : elles meurent et se détachent, ou elles se détachent par inhibition de contact mais gardent leurs capacité à proliférer.

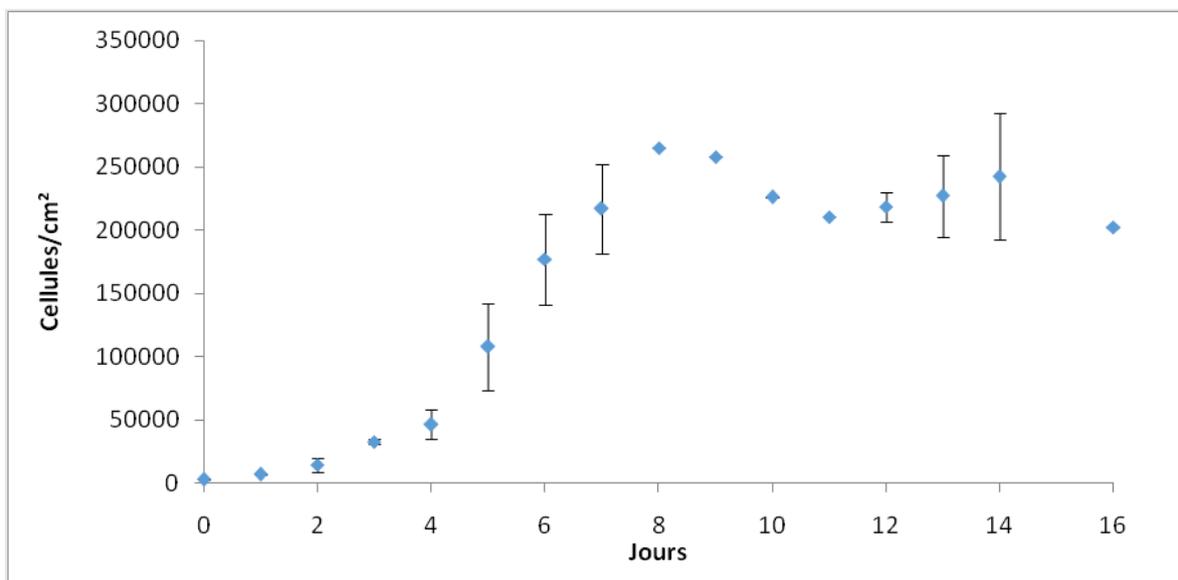


Figure 11: Prolifération moyenne des ASCs P1 dérivées de tissu adipeux sous cutané canin



Figure 12 : Microphotographie des ASCs P1 dérivées de tissu adipeux sous cutané de la chienne 6 au 6<sup>ème</sup> jour. Les ASCs de forme allongée arrivent à confluence forte. Des ASCs en suspension se sont détachées (petites et rondes) dont certaines sont indiquées par les flèches noires.

Les cellules du surnageant ont été récupérées, centrifugées et mises en culture dans de nouveaux puits en milieu alpha MEM – 10% FBS (Gibco) pour la chienne 6 au 12<sup>ème</sup> jour et pour la chienne 7 au 10<sup>ème</sup> jour (Tableau 13) le comptage des cellules du surnageant montre seulement 30% de cellules vivantes. Les cellules vivantes ont été réensemencées dans un puit et ont recommencé à proliférer, ainsi les cellules qui se détachent ne perdent pas leur capacité de prolifération. Lorsque l'on récupère le surnageant à J10 ou J12, on récupère les cellules qui se sont détachées sur les 3 derniers jours pendant lesquels la confluence était déjà atteinte. On peut donc penser que les cellules mortes correspondent à celles qui se sont détachées le plus anciennement.

CHIENNE	JOUR	Cellules vivantes/Puit	cellules mortes/Puit	% vivantes
6	J12	6300	14100	30,88
7	J10	6600	14400	31,43

Tableau 13: Résultats des comptages de surnageant de deux puits de prolifération

#### b) Passages successifs

Des ASCs de tissu adipeux sous cutané de la chienne 9 ont été cultivées sur 10 passages pour étudier le rendement et le temps de doublement au fil du temps (figure 13).

Le rendement des ASCs diminue très fortement à partir du 6<sup>ème</sup> passage et le temps de doublement augmente dès le 7<sup>ème</sup> passage avec une augmentation très nette entre le 8<sup>ème</sup> et le 9<sup>ème</sup> passage.

Les ASCs semblent donc progressivement perdre leur capacité à proliférer à partir du passage 7.

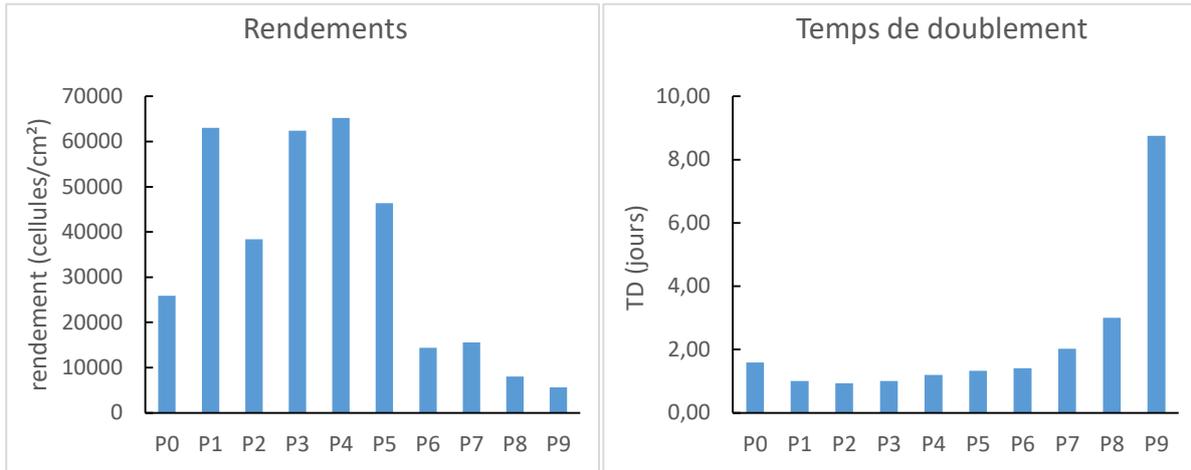


Figure 13: Evolution au cours des passages des rendements et temps de doublement d'ASCs canines dérivées de tissu adipeux sous-cutané

#### 4) Comparaison de la prolifération des ASC de tissu adipeux sous cutané et viscéral.

##### a) Rendement et temps de doublement

Pour la chienne 7, un prélèvement de tissu adipeux sous cutané de 0,6 grammes et un prélèvement de tissu adipeux viscéral de 2,3 grammes ont été effectués. Le rendement de la SVF a été calculé. Après culture dans des flasques ensemencées à 4000 cellules/cm<sup>2</sup> pour les ASCs P0 et à 2000 cellules/cm<sup>2</sup> pour les ASC P1 pendant 8 jours environ les rendements et les temps de doublement des ASCs ont été calculés pour les deux types de tissu adipeux (tableau 14 et figure 14).

	ASC P0 rdt (c/g)	Passage P0 P1 rdt(c/cm <sup>2</sup> ) TD (jours)	Passage P1 P2 rdt(c/cm <sup>2</sup> ) TD (jours)
<b>Moyenne SC</b>	774061	41185	72469
<b>SEM</b>	119933	7796	20781
<b>CN7 SC</b>	156000	63333	66667
<b>CN7 vi</b>	556522	50000	73333

Tableau 14 : Rendements (rdt) et temps de doublement (TD) pour les ASCs dérivées du tissu adipeux sous cutané (SC) et du tissu viscéral (vi) de la chienne 7.

Pour la SVF, le rendement du prélèvement de tissu adipeux sous cutané était moins important que celui du prélèvement de tissu adipeux viscéral. L'échantillon de tissu adipeux sous cutané était de très petite taille et proportionnellement les pertes de cellules durant les différentes étapes de la préparation sont plus importantes.

Après le premier passage, les ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané et de tissu adipeux viscéral avaient des rendements du même ordre de grandeur. Le temps de doublements des ASCs dérivées de tissu adipeux viscéral en fin de primo-culture était inférieur à celui des ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané si on compare les 2 échantillons de la chienne 7. En revanche lorsque l'on compare

l'échantillon de tissu adipeux viscéral à l'ensemble des prélèvements de tissu adipeux sous cutané, on ne peut pas confirmer cette tendance car les valeurs de temps de doublement sont dans la moyenne. Pour les ASCs en fin de passage 1, les temps de doublement sont similaires pour le sous cutané et le viscéral.

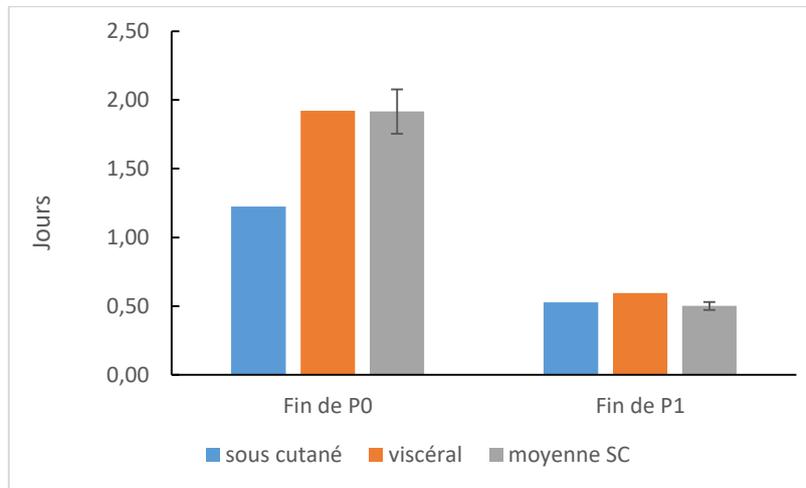


Figure 14 : Temps de doublement des ASCs dérivées de tissu adipeux viscéral et sous cutané de la chienne 7 comparé à la moyenne des temps de doublement des ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané.

#### b) CFU-f

Les cellules de la SVF ont étéensemencées à 200 cellules/T25 et cultivées environ 8 jours.

Le pourcentage de CFU-f pour les cellules de la SVF issues de tissu adipeux viscéral était inférieur aux cellules de tissu adipeux sous cutané. Par contre les ASCs P1 dérivées de tissu adipeux sous cutané et viscéral présentaient des pourcentages de cellules à potentiel clonogénique similaires (figure 15).

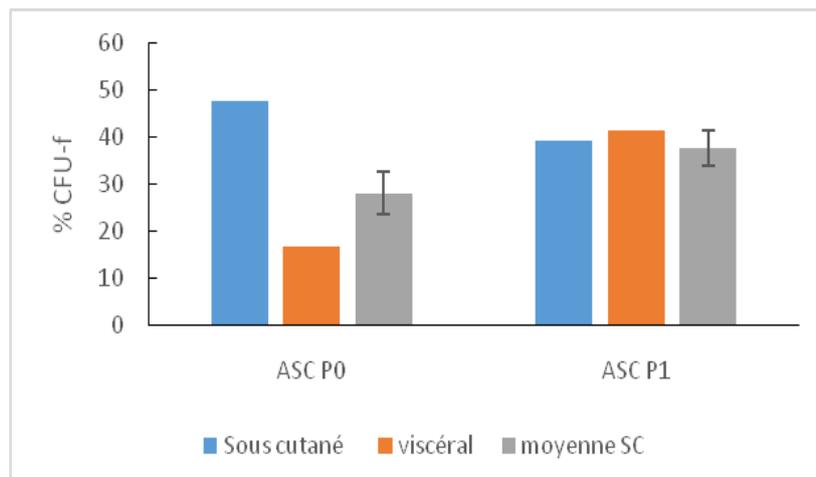


Figure 15 : CFU-f pour les ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané et viscéral pour les prélèvements de la chienne 7 comparé à la moyenne des CFU-f dérivées de tissu adipeux sous cutané.

### c) Prolifération

Le nombre de cellules a été suivi sur 16 jours pour les ASCs P1 dérivées de tissu adipeux sous cutané et de tissu adipeux viscéral ensemencées à 2000 cellules/cm<sup>2</sup> au départ (figure 16 et 17).

Les ASCs des différentes origines ont proliféré jusqu'à atteindre un nombre de cellules compris entre 200000 cellules/cm<sup>2</sup> et 250000 cellules/cm<sup>2</sup>. Ce nombre a été atteint plus tardivement pour les ASCs dérivées de tissu adipeux viscéral (14<sup>ème</sup> jour environ) que pour les ASCs dérivées de dépôt sous cutané (entre le 6<sup>ème</sup> jour et le 7<sup>ème</sup> jour). La courbe de prolifération des ASCs dérivées de tissu adipeux viscéral montre une phase de croissance linéaire et pas la phase de croissance exponentielle observée pour les ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané (*annexe 15*).

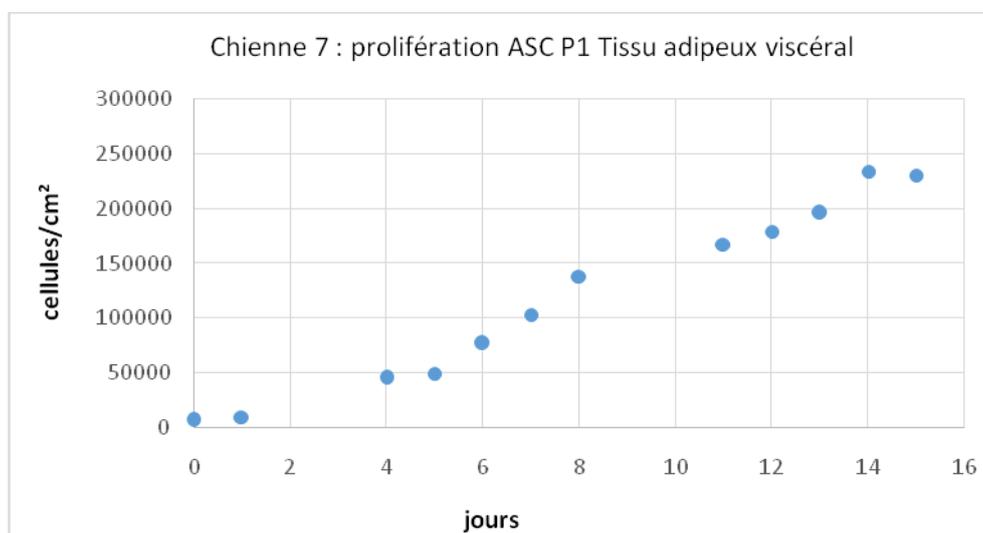


Figure 16 : Prolifération des ASCs P1 dérivées de tissu adipeux viscéral de la chienne 7

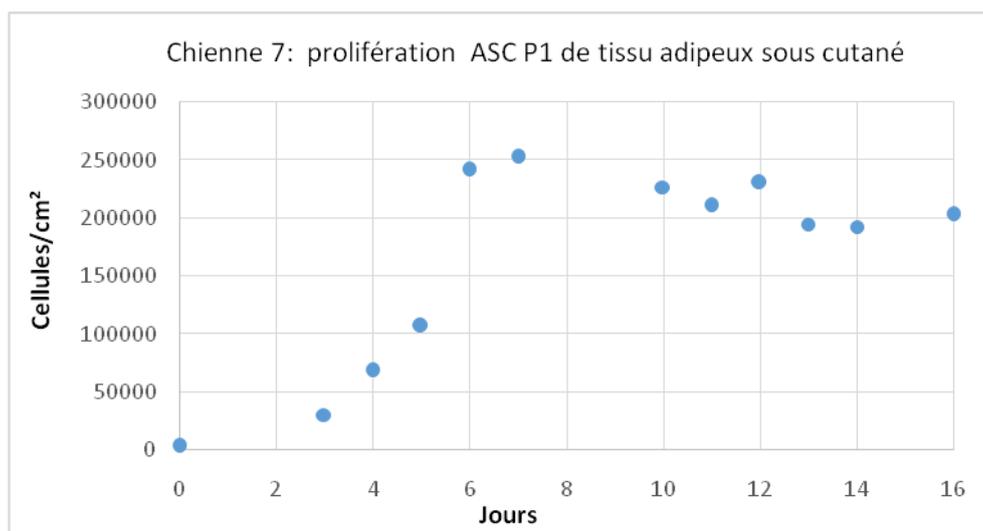


Figure 17 : Prolifération des ASCs P1 dérivées de tissu adipeux sous cutané de la chienne 7

## B. Potentiel de différenciation

### 1) Potentiel adipocytaire

#### a) Aspect qualitatif au cours de la différenciation

Pour la différenciation adipocytaire, quatre cocktails de différenciation ont été testés. En premier, le même protocole que pour l'humain (condition n°4) a été testé (avec les ASCs P1 dérivées de tissu adipeux sous cutané de la chienne 2) : les cellules ont étéensemencées à 10000 cellules/cm<sup>2</sup> et la différenciation a été lancée deux jours après. Les ASCs étaient à forte confluence lors de l'induction de la différenciation et elles n'ont pas arrêté de proliférer par la suite, ce qui a conduit au décollement du tapis lorsque la confluence était devenue trop importante.

Les différenciations suivantes ont été lancées lorsque les cellules étaient à moins forte confluence, afin qu'elles aient plus de place pour proliférer durant le délai d'engagement dans la voie de différenciation. La condition 4 a été conservée mais les ASCs ont étéensemencées à 5000 cellules/cm<sup>2</sup> et lancée deux jours (ASCs P2 de la chienne 2); ouensemencées à 10000 cellules/cm<sup>2</sup> et lancées 12h après (ASCs P1 de la chienne 3). Avec ces deux possibilités, les cellules étaient moins confluentes au moment du lancement, mais le milieu d'induction n'a pas permis un ralentissement suffisant de la prolifération et les cellules ont fini par se décoller juste avant le quatorzième jour (jour de l'arrêt).

Trois autres conditions ont donc été testées (conditions 1, 2 et 3 du tableau de matériel et méthode), enensemencant les cellules à 10000 cellules/cm<sup>2</sup> et en lançant la différenciation à 12h (détail des ASCs utilisées dans le tableau 15). Avec cette méthode les cellules n'ont pas complètement arrêté de proliférer mais la prolifération a été moins rapide ce qui a permis de conserver des cellules jusqu'à la fin des 14 jours de différenciation même si une proportion importante de cellule se détachait.

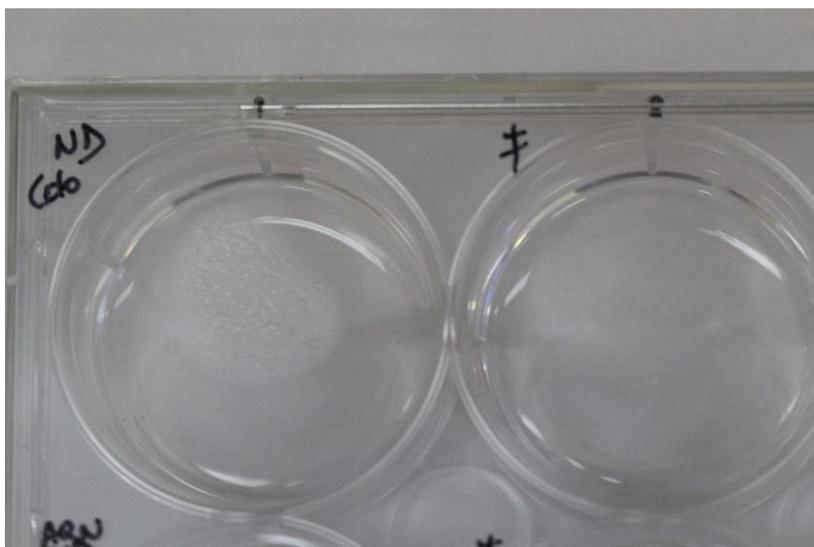
Le récapitulatif des ASCs et des conditions testées pour lesquelles on a pu obtenir des résultats est présenté dans le tableau 15.

			Condition 1		Condition2		Condition 3		Condition 4	
	Densité J0	lancement	DMEM F12	2% SVF	DMEM h.g	2% SVF	alpha MEM	0,1 % SVF	alpha MEM	2%SVF
nom	cellules/cm <sup>2</sup>	h	coloration	ARN	coloration	ARN	coloration	ARN	coloration	ARN
CN2 sc P1	10000	48							décollées	décollées
CN2 sc P2	5000	48							décollées	décollées
CN3 sc P1	10000	12							décollées	décollées
CN3 sc P2	10000	12	résultats	résultats	résultats	résultats	résultats	résultats		
CN4 sc P1	10000	12	résultats	résultats	résultats	résultats	résultats	résultats		
CN5 sc P1	10000	12	résultats	résultats	résultats	résultats	résultats	résultats		
CN6 sc P1	10000	12			résultats	résultats	résultats	résultats		
CN7 vi P1	10000	12			résultats	résultats	résultats	résultats		
CN7 sc P1	10000	12			résultats	résultats	résultats	résultats		

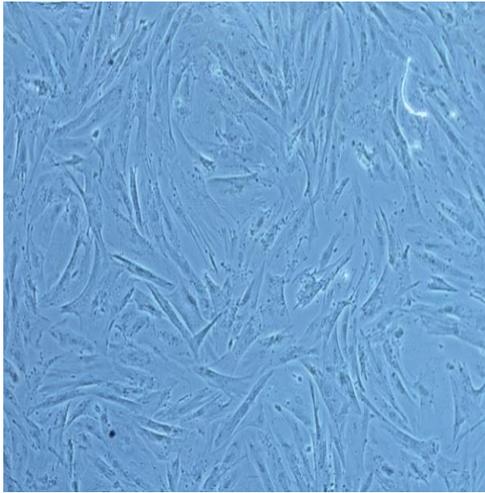
Tableau 15 : Résultats disponibles pour la différenciation adipocytaire en fonction des conditions et des ASCs utilisées

## b) Coloration

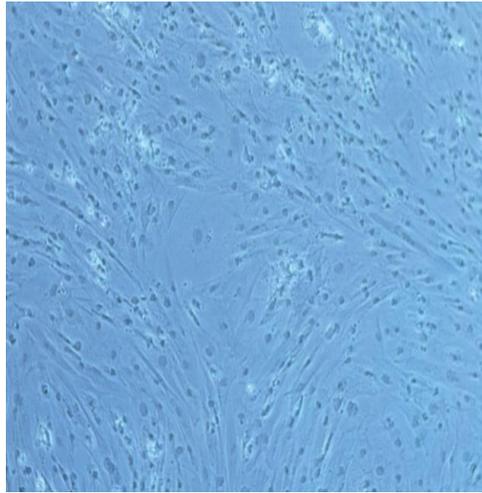
Après l'étape de différenciation de 14 jours, les cellules fixées au PFA étaient colorées à l'huile rouge O pour mettre en évidence les vésicules de triglycérides. Pour les ASCs humaines, des vésicules de triglycérides commençaient à être visibles à partir du 6<sup>ème</sup> jour de culture au microscope sans coloration, et la coloration était positive. Les colorations étaient négatives pour les 3 conditions testées (figure 18), et au cours de la différenciation, les cellules des puits de différenciation n'ont pas présenté de vésicule évoquant des triglycérides (figure 19).



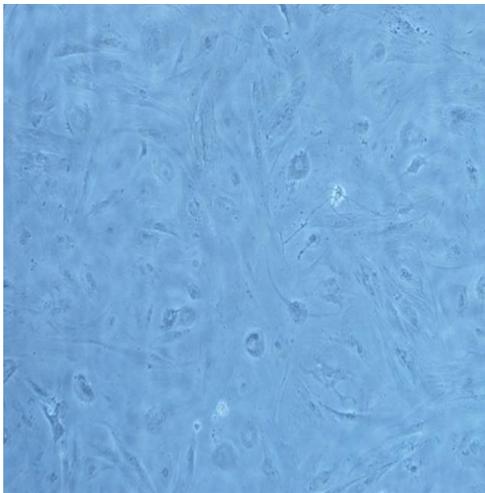
*Figure 18 : Photographie du puit différencié (à droite) et du puit témoin (ND à gauche) après fixation au PFA et coloration à l'huile rouge O au 14<sup>ème</sup> jour de différenciation pour les ASCs de passage 1 dérivées de tissu adipeux sous cutané canin de la chienne 6 pour la condition 1.*



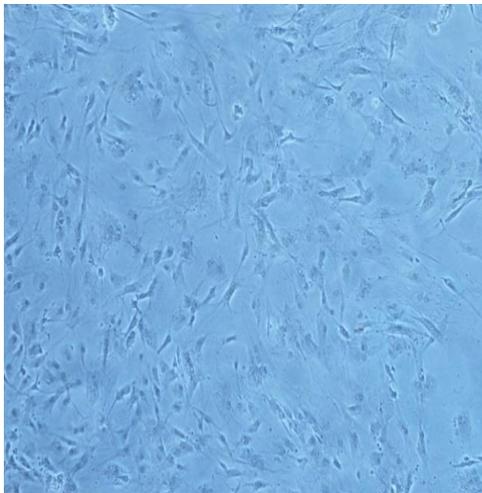
*Puit différencié condition 1 J14*



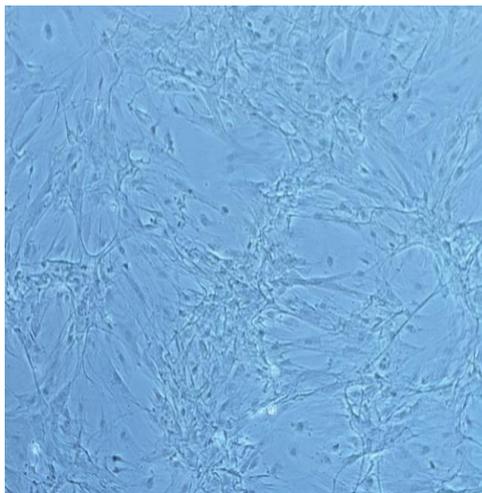
*Puit non différencié condition 1 J14*



*Puit différencié condition 2 J14*



*Puit non différencié condition 2 J14*



*Puit différencié condition 3 J14*

*Figure 19 : Microphotographies des ASCs P2 dérivées de tissu adipeux sous cutané de la chienne 3, au 14<sup>ème</sup> jour de test de différenciation adipocytaire pour les conditions 1, 2 et 3. La confluence n'est pas très importante car beaucoup de cellules se sont décollées à ce stade. Selon les milieux, les ASCs ont des morphologies différentes. Elles n'ont pas la forme allongée observée pour les ASCs cultivées en alpha-MEM 10%SVF (Gibco). En revanche elles ne présentent pas de vésicule de triglycérides.*

### c) qPCR

Après 14 jours de différenciation en condition 1, 2 ou 3, les ARN récupérés ont été testés par qPCR pour les gènes PPAR $\gamma$ , FABP4, C-EBP et LPL. Nous ne disposons pas d'ARN pour la condition 4 car les cellules s'étaient toutes décollées avant l'arrêt de la différenciation.

Les primers des gènes CEBP, FABP4 et PPAR ont été validés mais le primer du gène LPL reste à optimiser pour confirmer les résultats obtenus car les meltcurves présentaient deux pics.

Les moyennes des expressions de relatives de chaque gène pour chaque condition sont présentées dans le tableau 16 et la figure 20. Les valeurs des Ct sont répertoriées dans l'annexe 16 – a.

	C-EBP		FABP4		PPAR $\gamma$		LPL	
	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM
<b>J0</b>	1,000	0	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000
<b>Non différencié C1</b>	1,124	0,286	0,807	0,399	3,125	0,530	2,239	1,894
<b>Différencié C1</b>	2,834	1,009	41,940	28,813	1,841	0,635	63,687	60,302
<b>Non différencié C2</b>	1,619	0,419	0,665	0,568	18,500	3,463	0,567	0,394
<b>Différencié C2</b>	3,891	0,853	42,893	29,890	1,244	0,208	201,084	99,732
<b>Non différencié C3</b>	2,745	0,499	0,463	0,294	5,580	2,229	5,648	4,023
<b>Différencié C3</b>	5,887	0,515	26,505	14,893	1,238	0,288	82,082	39,164

Tableau 16 : Expression relative des gènes marqueur de la différenciation adipocytaire  $2exp(-\Delta Ct)$  normalisée, à la fin de la différenciation pour les conditions 1, 2 et 3 (C1, C2 et C3)

Pour les gènes C-EBP et FABP4, l'expression était plus importante pour les cellules des puits différenciés que pour les cellules des puits témoins pour les 3 conditions. L'expression du gène dans les puits différenciés était aussi plus importante au 14<sup>ème</sup> jour qu'au jour de lancement de la différenciation pour les trois conditions. C-EBP et FABP4 semblent donc montrer un engagement des ASCs dans la différenciation adipocytaire. Le gène LPL a montré la même tendance mais ces résultats devront être confirmés.

En revanche l'expression de PPAR $\gamma$  était plus importante pour les cellules des puits témoins que pour celles des puits différenciés pour les trois conditions. De plus le niveau d'expression des cellules du puit témoin était plus important au quatorzième jour qu'au jour de lancement de la différenciation.

FABP4 et CEB-P suggèrent donc un engagement dans la différenciation adipocytaire pour les 3 conditions ce qui est en contradiction avec les résultats obtenus pour PPAR $\gamma$ .

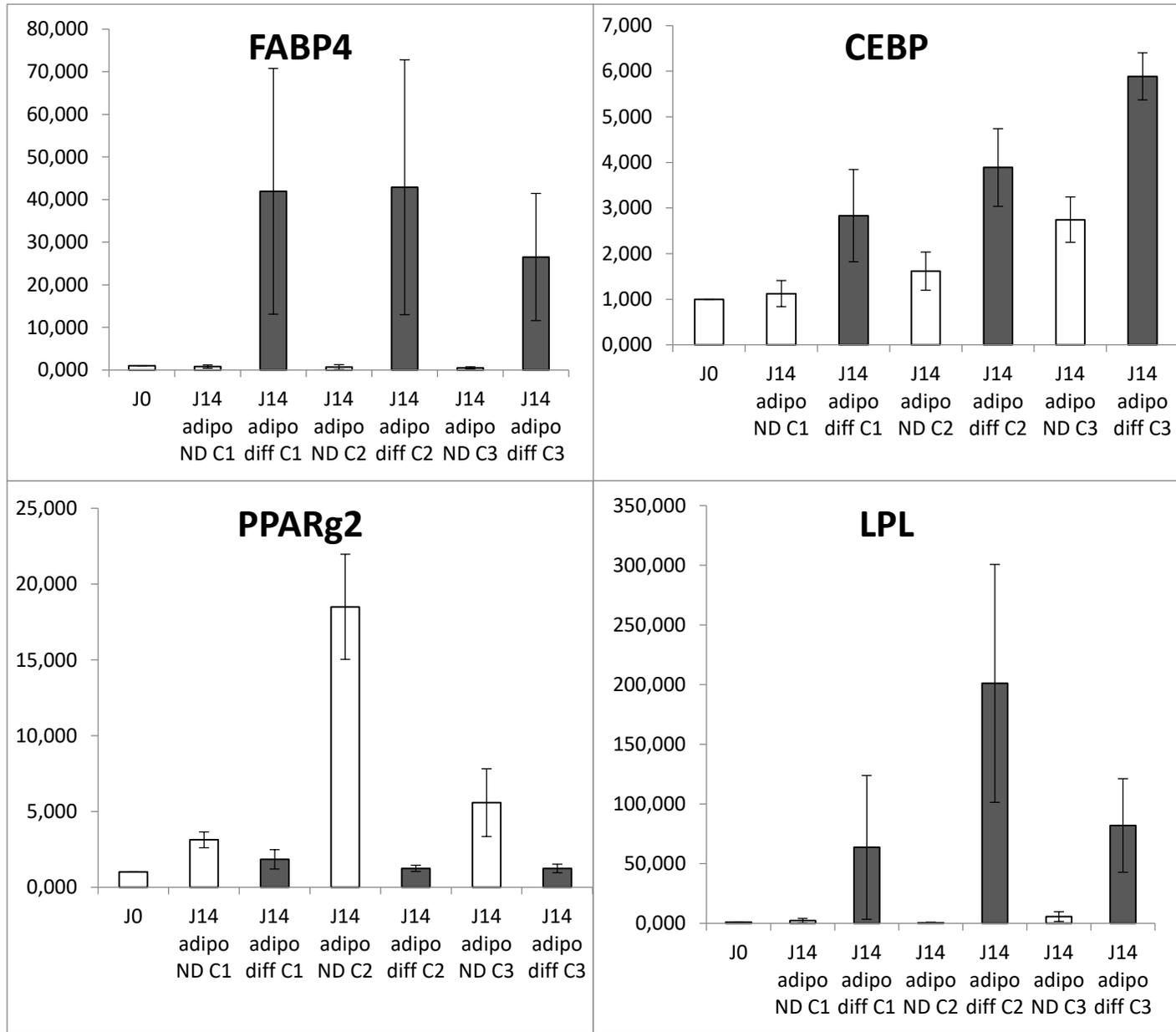


Figure 20 : Diagrammes montrant l'expression des gènes de la différenciation adipocytaire pour les puits différenciés (diff) et les puits témoins (ND) pour les conditions 1, 2 et 3 (C1, C2 et C3) au 14<sup>ème</sup> jour.

## 2) Potentiel ostéoblastique

### a) Aspect qualitatif au cours de la différenciation

Pour la différenciation ostéoblastique, 3 cocktails de différenciation ont été testés. En premier, le même protocole que pour l'humain (condition 4) a été testé (avec les ASCs P1 de la chienne 2) : les cellules ont étéensemencées à 10000 cellules/cm<sup>2</sup> et la différenciation a été lancée deux jours après. Les ASCs étaient à forte confluence lors de l'induction de la différenciation et elles n'ont pas arrêté de proliférer par la suite. Lorsqu'elles sont arrivées à très forte confluence elles se sont décollées et ont formé une boule de cellules.

Les différenciations suivantes ont été lancées lorsque les cellules étaient à moins forte confluence, afin qu'elles aient plus de place pour proliférer durant le délai d'engagement dans la voie de différenciation. La condition de différenciation 4 a été conservée mais les ASCs ont étéensemencées à 5000 cellules/cm<sup>2</sup> et lancée deux jours après (ASCs P2 de la chienne 2); ouensemencées à 10000 cellules/cm<sup>2</sup> et lancées 12h après (ASCs P1 de la chienne 3). Avec ces deux possibilités, les cellules étaient moins confluentes au lancement, elles ont continué à proliférer et se sont décollées dans les puits destinés à la PCR durant la troisième semaine de culture ; les cellules pour la coloration ont formé un tapis très épais qui a commencé à s'enrouler sur lui-même mais qui a pu être maintenu jusqu'à la fin de la différenciation.

Deux autres conditions ont ensuite été testées (conditions 1 et 3 du tableau de matériel et méthode), enensemencant les cellules à 10000 cellules/cm<sup>2</sup> et en lançant la différenciation à 12h, les ASCs n'ont pas arrêté de proliférer mais la prolifération a été moins rapide ce qui a permis de conserver des cellules jusqu'à la fin des 21 jours même si une proportion importante de cellules se détachait. Le récapitulatif des ASCs et des conditions testées pour lesquelles on a pu obtenir des résultats est présenté dans le tableau 17.

	densité J0	Lancement	Condition 1		Condition 3		Condition 4	
			DMEM F12	2% SVF	alphaMEM	0,1 % SVF	alphaMEM	2%SVF
			coloration	ARN	coloration	ARN	coloration	ARN
CN2 sc P1	10000	48					décollées	décollées
CN2 sc P2	5000	48					résultats	décollées
CN3 sc P1	10000	12					résultats	décollées
CN3 sc P2	10000	12	résultats	résultats	résultats	résultats		
CN4 sc P1	10000	12	résultats	résultats	résultats	résultats		
CN5 sc P1	10000	12	résultats	résultats	résultats	résultats		
CN6 sc P1	10000	12				résultats	résultats	résultats
CN7 vi P1	10000	12				résultats	résultats	résultats
CN7 sc P1	10000	12				résultats	résultats	résultats

Tableau 17 : Résultats disponibles pour la différenciation ostéoblastique en fonction des ASCs utilisées et des conditions

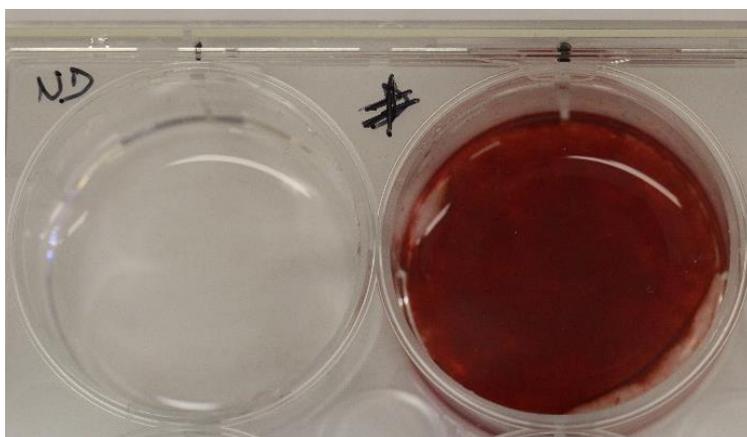
## b) Coloration

Après les trois semaines de différenciation, les puits différenciés et non différenciés ont été fixés au PFA et colorés au rouge Alizarine pour mettre en évidence un dépôt calcique extracellulaire.

Pour la condition 4, sur les deux premières différenciations (ASCs P1 de la chienne 3 et ASCs P2 de la chienne 2), les tapis d'ASCs des puits différenciés ont présenté une très forte coloration alors que les tapis des puits témoins n'ont pas pris la coloration (figure 21).

Le milieu de la condition 4 a donc été de nouveau testé pour les ASCs canines dérivées de tissu adipeux sous cutané (ASCs P1 de la chienne 6 et de la chienne 7) et sur des ASCs canines dérivées de tissu adipeux viscéral (ASCs P1 de la chienne 7) mais aucun des puits différenciés n'a présenté de coloration au rouge Alizarine. Le milieu de différenciation de la condition 4 semble être le seul capable d'induire un dépôt calcique extracellulaire mais cela n'a pas été reproductible (résultat positif pour deux prélèvements sur cinq). Les deux autres conditions n'ont entraîné aucun dépôt calcique extracellulaire.

Pour les deux autres conditions (1 et 3), testées sur 3 échantillons d'ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané (ASCs P2 de la chienne 3 et ASCs P1 des chiennes 4 et 5), aucun des puits différenciés n'a pris la coloration au rouge Alizarine. La figure 22 illustre l'aspect microscopique des tapis à la fin de la différenciation ostéoblastique, pour la condition 2 une grande partie des cellules se sont décollées dans le puit de différenciation mais pour la condition 1 la morphologie des cellules et leur organisation a évolué dans le puit différencié ce qui n'est pas le cas du puit témoin (figure 22).



*Figure 21: Photographie du puit différencié (à droite) et du puit non différencié (à gauche) des ASCs P2 de la chienne 2 pour la condition 4*



*Puit différencié Condition 1 J21*



*Puit non différencié Condition 1 J21*



*Puit différencié condition 2 J21*



*Puit non différencié condition 2 J21*

*Figure 22 : Microphotographies des ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané du passage 1 de la chienne 4, au dernier jour de la différenciation ostéoblastique pour chaque condition. Dans le puit différencié de la condition 2 la densité cellulaire est nettement moins importante car beaucoup se sont décollées. Pour la condition 1 les cellules ont une forme plus polygonale et semblent former des amas dans le puit différencié alors que leur répartition semble homogène dans le puit témoin.*

### c) qPCR

Après 3 semaines de différenciation, les ARN ont été récupérés puis analysés par qPCR pour les gènes Osterix et BSP.

Les résultats de cette analyse n'étaient pas interprétables, en effet le seuil de détection d'Osterix est trop élevé avec des Ct supérieurs à 32 pour plus de la moitié des échantillons. Pour BSP, les seuils n'étaient pas détectables ou trop élevés. (*Annexe 16 –b*).

### 3) Potentiel chondrocytaire

#### a) Appréciation qualitative de la formation des pellets.

La différenciation a été réalisée sur 4 échantillons d'ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané (ASCs P2 chiennes 2, 3, 6 et 7) et sur un échantillon d'ASCs dérivées de tissu adipeux viscéral (ASC P2 chienne 7).

Pour la différenciation chondrocytaire des pellets ont été formés puis cultivés 14 jours. En effet l'un des facteurs de la différenciation chondrocytaire est l'organisation des cellules en trois dimensions à très forte concentration afin de les placer en condition d'hypoxie. Lors de la réalisation des pellets, après deux heures de pause sans milieu supplémentaire, on voyait à l'œil nu l'agrégation des cellules, mais en plusieurs petits amas et non un seul.

#### b) Coloration

Les pellets ont ensuite été fixés en histogel ou en agarose dans le but de faire des coupes histologiques puis des colorations au bleu de toluidine. Pour les pellets fixés en histogel, la trame formée par celui-ci prenait la coloration, nous n'avons donc pas de résultat. Pour les pellets fixés à l'agarose, le nombre de cellules était trop insuffisant pour adapter les protocoles de coupe histologique et de coloration.

#### c) qPCR

Après les quatorze jours de différenciation, les ARN ont été récupérés puis analysés par qPCR pour les gènes aggrecan, COL10A, Sox 9 et PPARY.

Seuls les gènes Aggrecan et PPARY ont présenté des courbes de fusion permettant la validation des primers.

Pour PPARY le seuil de détection est trop élevé pour être interprétable dans beaucoup d'échantillons (*Annexe 16 –c*).

Concernant Aggrecan, il ne semble pas y avoir de différence sur l'expression du gène entre les pellets en condition de non différenciation et de différenciation (figure 23).

Le protocole de réalisation des pellets n'a pas permis d'étudier correctement la différenciation chondrocytaire et doit encore être optimisé.

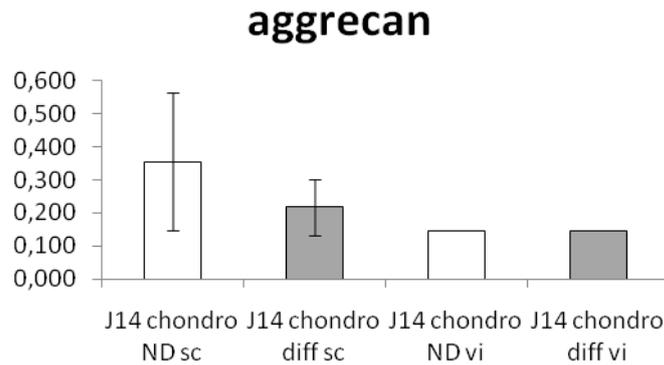


Figure 23 : Expression du gène aggrecan en fin de différenciation pour les ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané et viscéral.

### C. Cytométrie en flux

Les cellules de la SVF de tissu adipeux sous cutané des chiennes 8, 9 et 10, les ASCs P0 des chiennes 9 et 10 et les ASCs P1 de la chienne 10 ont été analysées par cytométrie en flux pour les anticorps CD45, CD31, CD34 et CD90.

Sur les cellules vivantes (DAPI négatif) le pourcentage de CD45, CD31, CD34 et CD90 a été étudié. Puis grâce au multi-marquage, la population correspondant aux ASCs CD45-, CD31- et CD34+ a été sélectionnée et au sein de cette population le pourcentage de CD34+ et CD90+ a été analysé (*annexe 17*). Les résultats sont présentés dans le tableau 18. Pour la chienne 9 des cellules ont été récupérées à la fin du passage P0 (6<sup>ème</sup> jour de culture), pour la chienne 10 des cellules ont été récupérées à la fin du passage P0 (4<sup>ème</sup> jour de culture) et à la fin du passage P1 (8<sup>ème</sup> jour).

On peut remarquer que le pourcentage de la population CD34+ est important sur la SVF et diminue en culture. Pour la chienne 9, il passe de 85% pour les cellules de la SVF à 53 % pour les ASCs P0. Pour la chienne 10, 86% des cellules sont CD34+ dans la SVF, contre 33% des ASCs P0 et 6% des ASCs P1.

Le pourcentage de la population CD90 varie beaucoup dans la SVF (entre 25% et 45%), nous avons suivi ce pourcentage aux différents passages de culture pour la dernière chienne et on observe qu'il reste stable avec les différents passages. Ce résultat est à nuancer car le marquage CD90 ne correspond pas à un pic mais à un épaulement qui est difficile à caractériser dont des exemples sont présentés dans la figure 24.

Les résultats de la cytométrie sont à relativiser car cette étude aurait nécessité une mise au point pour valider les anticorps. En effet, le marquage CD90 n'a pas marché sur tous les échantillons mais la cause n'a pas pu être déterminée sur ce nombre restreint d'échantillon. De plus l'isotype du couplage au zenon Alexa 700 a présenté une traînée ce qui ne permet pas de valider la spécificité du CD31 (exemple dans la figure 25). Il aurait fallu une titration de l'anticorps et avoir des contrôles supplémentaires par rapport au couplage de l'anticorps CD31.

Cette mise au point aurait nécessité un nombre plus important de cellules par lequel nous étions limités lors de la préparation de la SVF.

<b>SVF</b>	<b>Chienne 8</b>	<b>Chienne 9</b>	<b>Chienne 10</b>
<b>%Population étudiée</b>	19,10	36,60	31,00
APC CD45	2,19	7,81	9,50
PE CD34	76,23	85,06	86,97
FITC CD90	27,69	41,49	27,29
A700 CD31	14,77	6,30	25,37
<b>ASCs P0</b>		<b>Jour 6</b>	<b>Jour 4</b>
APC CD45		0,15	1,81
PE CD34		52,75	32,94
FITC CD90		41,21	56,00
A700 CD31		2,50	7,90
<b>ASCs P1</b>			<b>Jour 8</b>
APC CD45			2,27
PE CD34			6,01
FITC CD90			57,26
A700 CD31			6,06

*Tableau 18 : Pourcentage dans la SVF de la population cellulaire présentant l'immunophénotype (CD45- / CD31-, CD34 +/ CD90 +) et pourcentage de chacun des marqueurs dans la SVF et à la fin des passages*

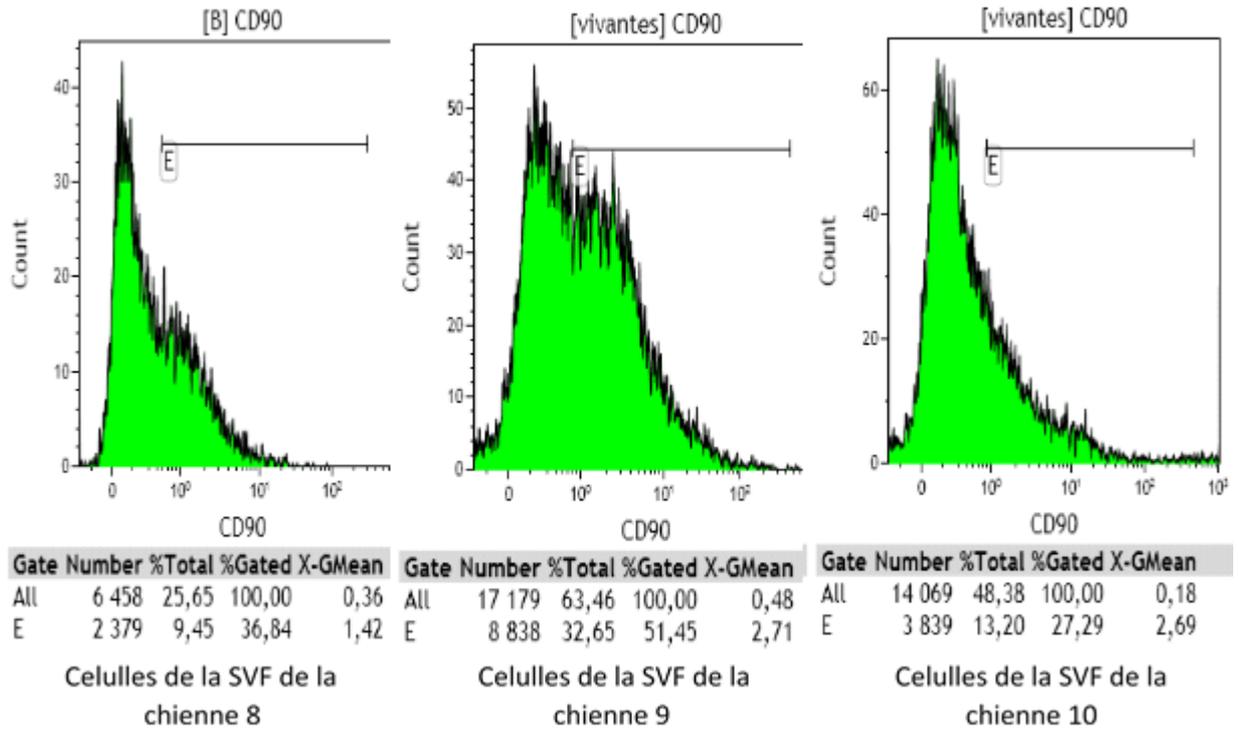


Figure 24 : Marquage CD90 des cellules de la SVF des chiennes 8, 9 et 10. L'épaulement est mal défini (en particulier pour la chienne 10). Les autres graphiques sont disponibles en annexe 17.

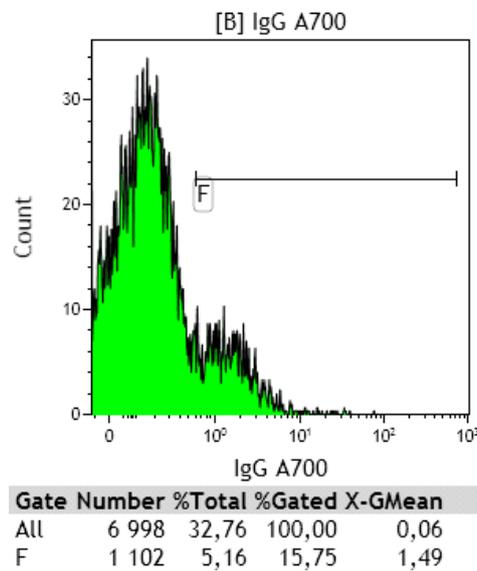


Figure 25 : Isotype Alexa700 couplé au xenon. Le marquage présente une traînée ce qui ne permet pas de valider la spécificité de CD31

### III. Discussion

#### A. Production

Le but de cette étude était de produire des ASCs canines dérivées de tissu adipeux en adaptant les protocoles de productions utilisés à STROMALab pour les ASCs humaines. Le protocole utilisé pour la préparation de la SVF a permis la sélection d'une population d'ASCs adhérentes sur le plastique à la morphologie semblable à celle de cellules fibroblastiques.

Lors des passages successifs, les ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané ont présenté une prolifération très importante avec des temps de doublement très inférieurs à ceux de l'humain. Les ASCs canines avaient des temps de doublement de 1,9 jours en primo-culture et 0,5 jours pour les passages suivants contre 4,2 jours pour les ASCs P0 et 3 jours pour les ASCs P1 humaines. Les courbes de prolifération mettent ce phénomène en évidence en montrant une phase de croissance exponentielle jusqu'à ce que les ASCs atteignent une très forte confluence à 6 jours, le nombre d'ASCs reste alors fluctuant autour de ce maximum. Guercio et son équipe décrivent une semi – confluence à trois quatre jours à partir de cultures primaires ce qui correspond à nos observations (Guercio et al., 2013). Beaucoup de cellules se trouvent alors en suspension, semblant s'être décrochées par manque de place, nous avons montré qu'elles conservent leur potentiel de prolifération.

Les résultats obtenus sur la prolifération sont en concordance avec ceux obtenus sur les CFU-f : le pourcentage de CFU-f est beaucoup plus important à partir de SVF canines que pour les ASCs humaines. En primo-culture les ASCs canines présentaient 28% de CFU-f alors que les ASCs humaines présentaient seulement 5% de CFU-f. Les ASCs P1 canines avaient 38% de cellules à potentiel clonogénique contre 13% pour les ASCs humaines. Un plus grand pourcentage de cellules à capacité proliférative clonale explique que les ASCs se multiplient plus rapidement.

Du fait de ces caractéristiques, les modalités de réalisation des CFU-f à partir de cellules de SVF canines ont dû être adaptées, l'ensemencement doit être fait à 200 cellules de SVF/flasque de 25 cm<sup>2</sup> avec un arrêt à 7 jours pour permettre de compter correctement les colonies. Ce protocole convenait également pour la réalisation des CFU-f après le premier passage bien que le pourcentage de CFU-f soit plus élevé qu'en primo-culture (38% pour les ASCs P1 contre 28% pour les ASCs P0).

Afin de déterminer si ces différences étaient propres à l'espèce canine ou juste liées à l'origine du dépôt nous avons comparé du tissu adipeux canin sous-cutané et viscéral. Les ASCs dérivées de tissu adipeux viscéral ont ainsi été étudiées, mais nous n'avons eu qu'un seul prélèvement pour ce type de tissu. Les ASCs dérivées de tissu adipeux viscéral arrivent au même niveau de confluence avec des rendements, des temps de doublement et des pourcentages de CFU-f du même ordre que pour les ASCs canines issues de dépôt adipeux sous cutané. Cependant sur la courbe de prolifération, la phase de croissance de la population est plus lente pour les ASCs dérivées de tissu adipeux viscéral (environ 14 jours) avec une courbe qui semble linéaire. De plus une étude montre que le potentiel de prolifération est plus important pour les ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané que pour les ASCs dérivées de tissu adipeux viscéral (Guercio et al., 2013). Une autre étude montre que les ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané deviennent semi-confluentes en 6 jours alors qu'il faut 10 à 12 jours pour les ASCs dérivées de tissu adipeux viscéral (Neupane et al., 2008). Il sera intéressant de réaliser plus de prélèvements de tissu adipeux viscéral pour pouvoir confirmer cette tendance sur les courbes de proliférations en accord avec ces données bibliographiques.

Tous les prélèvements de tissu adipeux sous cutané ont été réalisés sur le même site anatomique pour des raisons d'accessibilité du tissu (pas d'ouverture chirurgicale supplémentaire par rapport à celles

prévues pour la chirurgie programmée) mais il pourrait aussi y avoir des résultats différents au sein des ASCs dérivées de tissu adipeux sous cutané ou viscéral en fonction de leur site de prélèvement. Peu d'études se sont intéressées à cette problématique (Bakker et al., 2013). L'étude de Neupane montre par exemple que le tissu adipeux inguinal présente de moins bons rendements que le tissu adipeux sous cutané prélevé dans d'autres régions anatomiques comme la région sacro-coccygienne (Neupane et al., 2008). Selon le type de tissu adipeux sous cutané, il y aurait donc des différences importantes pour la prolifération.

Il serait intéressant de poursuivre cette étude en réalisant des prélèvements de tissu adipeux sous cutané et viscéral dans différentes régions. Le problème de la mise en place de telles expériences est technique : en effet l'accessibilité du tissu adipeux était aisée car les prélèvements étaient réalisés lors de chirurgie de convenance et n'avaient aucune conséquence pour les chiens. Dans l'espèce canine beaucoup de chirurgies se déroulent au niveau abdominal, pour standardiser des prélèvements dans d'autres sites il faudrait probablement envisager des sites chirurgicaux supplémentaires spécifiquement dédiés aux prélèvements.

## B. Caractérisation

A la différence de l'humain, il n'existe pas de critère précis de caractérisation des ASCs canines. L'un des critères est l'adhésion sur le plastique en culture *in vitro* et la capacité intrinsèque de la population d'ASCs à se multiplier par expansion clonale (Takemitsu et al., 2012), ceci a été validé lors de la production des ASCs.

### 1) Potentiel de différenciation

Un deuxième critère de caractérisation des ASCs est leur capacité à se différencier vers les lignages adipocytaires, ostéoblastiques et chondrocytaires (Bakker et al., 2013). La différenciation a été testée sur de ASCs après le premier ou le deuxième passage (ASCs P1 ou P2) mais nous n'avons pas obtenu de résultats convaincants en faveur d'une quelconque différenciation.

Tout d'abord pour les différenciations adipocytaires et ostéoblastiques, les mêmes conditions d'ensemencement et de cocktails de différenciation que pour l'humain ont été testées. Les cellules étaient trop confluentes au moment du lancement de la différenciation et elles continuaient de proliférer sans s'engager dans la voie de différenciation. Une première adaptation du protocole consiste donc à lancer les différenciations 12 heures après l'ensemencement (au lieu de 48h pour les cellules humaines).

#### a) Potentiel adipocytaire

Pour la différenciation adipocytaire, cet ajustement des paramètres lié à la prolifération importante des ASCs canines n'a pas permis d'engagement dans la voie de différenciation puisque les cellules ont continué à proliférer et se sont détachées. Les cocktails de différenciation comprennent les éléments couramment utilisés pour la différenciation adipocytaire en concentrations respectives du même ordre : insuline, dexaméthasone, rosiglitazone, indométhacine et IBMX (Bakker et al., 2013).

En effet l'adipogénèse se fait par l'induction d'une sensibilité à l'insuline et l'activation de gènes adipogéniques notamment PPAR $\gamma$  dont le rôle est prépondérant dans le métabolisme lipidique (Wilson-Fritch et al., 2003). La Rosiglitazone, faisant partie de la famille des Thiazolidinediones, a un effet sensibilisant à l'insuline sur les cellules et induit une différenciation adipocytaire chez les cellules souches mésenchymateuses humaines grâce à un rôle activateur de PPAR $\gamma$  (Benvenuti et al., 2007 ; Wilson-Fritch et al., 2003). L'indométhacine est un AINS inhibiteur des cyclooxygénase qui active aussi

PPARY (Lehmann et al., 1997). L'IBMX a un rôle dans la différenciation adipocytaire car elle supprime la production endogène de TNF qui est un facteur paracrine inhibiteur du développement des cellules adipocytaires (Hube et al., 1999). La dexaméthasone agit sur le programme de différenciation cellulaire que prennent les cellules en fonction de sa concentration: lorsqu'elle est forte, la dexaméthasone a une action inhibitrice des ERK ayant un rôle dans la voie de différenciation ostéogénique (Liu et al., 2009).

Trois autres milieux ont donc été testés. La condition 1 est le milieu utilisé pour la différenciation des ASCs murines et contient de l'insuline, de la Rosiglitazone, de l'IBMX, de la dexaméthasone, de l'IBMX, de la T3 et de la transferrine (médiateurs de la différenciation adipocytaire). La condition 3 correspond au milieu de différenciation pour les ASCs canines décrit par Vieira et son équipe (Vieira et al., 2010a) : le milieu de base alpha-MEM (Gibco) est remplacé par du DMEM high glucose (Gibco). La condition 4 correspond au même milieu de différenciation que le milieu utilisé pour les ASCs humaines mais en diminuant la concentration de FBS DE 2% à 0,1%. L'intérêt de ce dernier milieu était de diminuer la concentration en FBS pour ralentir la prolifération cellulaire importante.

Pour ces trois conditions, la différenciation adipocytaire n'a pas eu lieu. En effet aucune gouttelette lipidique n'a été formée à la fin des quatorze jours. En revanche le profil d'expression de C-EBP et de FABP4 était en faveur d'un engagement dans la différenciation adipocytaire mais ceci est remis en cause par le profil d'expression de PPARY qui n'augmente pas. En effet PPARY a un rôle prépondérant à la fois dans la phase de détermination et de différenciation terminale adipocytaire puisque son induction conduit à une augmentation de l'expression des gènes caractérisant le phénotype adipocytaire comme FABP4 et LPL. Les C-EBPs ont aussi un rôle déterminant dans la différenciation adipocytaire mais en agissant par des voies PPARY – dépendantes (Muruganandan et al., 2009). L'absence d'augmentation de l'expression de PPARY montre donc l'échec de la différenciation adipocytaire pour les milieux testés.

Une étude utilise sensiblement le même milieu que celui de la condition 2 et les ASCs présentaient un engagement avec l'apparition de gouttelettes lipidiques de petite taille et en petite quantité associée à l'augmentation de l'expression de protéines présentes dans l'adipocyte mature FABP4 et LPL (Vieira et al., 2010a). Dans une autre étude, les ASCs canines ne s'engageaient pas dans la différenciation adipocytaire et le remplacement de la complémentation en FBS par du sérum de lapin a permis une différenciation adipocytaire marquée avec une augmentation de la taille et du nombre de gouttelettes lipidiques, et un profil d'expression de FABP4, C-EBP, LPL et PPARY montrant l'engagement dans la voie de différenciation adipocytaire (Neupane et al., 2008). Une étude suivant l'étude de Neupane, a utilisé du sérum de lapin dans le milieu de différenciation des ASCs canines qui se sont engagées sur la voie adipocytaire mais plus tardivement que les ASCs humaines ou murines auxquelles elles étaient comparées (Kisiel et al., 2012). Le sérum de lapin n'a pas été testé dans notre étude car le rôle de celui-ci dans la différenciation n'est pas expliqué. Vieira et son équipe n'ont pas utilisé de sérum de lapin et ont pu attester l'engagement des ASCs dans la différenciation adipocytaire mais les ASCs étaient dérivées de tissu adipeux sous cutané provenant de la région sacro-coccygienne, on peut penser que le potentiel de différenciation des cellules varie en fonction du site de prélèvement.

Ainsi les ASCs dans notre étude ne se sont pas différenciées en adipocyte mais il faudrait commencer par essayer d'utiliser le sérum de lapin qui semble avoir été un ingrédient déterminant dans plusieurs études pour pouvoir conclure.

## b) Potentiel ostéoblastique

Pour la différenciation ostéoblastique, trois conditions ont été testées, la même condition de différenciation que pour les ASCs humaines (condition 4), la condition de différenciation des ASCs murines (condition 1) et la même condition de différenciation que pour les ASCs humaines mais en diminuant le pourcentage de FBS de 2% à 0,1% (condition 3) comme pour la différenciation adipocytaire dans le but d'empêcher les cellules de proliférer.

Les ingrédients de ces milieux étaient principalement la dexaméthasone (en concentration inférieure à la concentration utilisée pour la différenciation adipocytaire), l'acide ascorbique et une source de phosphate : dihydrogénophosphate de sodium puis  $\beta$ -glycérophosphate (conditions 1 et 4) ou phosphate inorganique (condition 2). La dexaméthasone est à cette concentration la dexaméthasone est un activateur, par son action sur plusieurs médiateurs, d'un gène important de la différenciation ostéoblastique : Runx2 et un inhibiteur de PPAR $\gamma$  (Langenbach, Handschel, 2013). L'acide ascorbique augmente la sécrétion en Collagène de type I nécessaire à la liaison des ostéoblastes dans la matrice extra-cellulaire (Langenbach, Handschel, 2013).

Sur toutes les différenciations lancées, seulement deux différenciations ont présenté une coloration fortement positive au rouge Alizarine attestant d'un dépôt calcique extra-cellulaire. Il s'agissait d'ASCs traitées avec le même milieu que les ASCs humaines. Trois différenciations sur d'autres cultures d'ASCs ont été lancées avec cette même condition pour lesquelles il n'y a pas eu de minéralisation extra-cellulaire. Les analyses par qPCR des gènes Osterix et BSP, marqueurs de la différenciation ostéoblastique n'étaient pas interprétables. On peut penser que la minéralisation extra-cellulaire déposée par les ASCs des deux prélèvements positifs ne serait pas spécifique d'une différenciation ostéoblastique.

Les milieux utilisés semblables à celui pour les ASCs humaines (condition 3 et 4) sont complétés en acide ascorbique, dexaméthasone et en sodium di-phosphate les deux premières semaines; le sodium di-phosphate est remplacé par de la  $\beta$ -glycérophosphate pour la dernière semaine de différenciation. Dans plusieurs études, la différenciation ostéoblastique a été obtenue avec des ASCs canines en utilisant l'acide ascorbique, la dexaméthasone et la  $\beta$ -glycérophosphate durant toute la différenciation (trois semaines) ; les ASCs canines se différencient en ostéocytes avec un dépôt de matrice extra-cellulaire et une augmentation de l'expression des gènes marqueurs : BSP, RunX2, Osterix, et COL1A (Neupane et al., 2008 ; Vieira et al., 2010a ; Kisiel et al., 2012).

Par ailleurs Kisiel et son équipe décrivent une morphologie des ASCs qui passent de fibroblastique à polygonale et une organisation en agrégats au cours de la différenciation ostéoblastique (Kisiel et al., 2012). A la fin de la période de différenciation, pour la condition utilisant le milieu de différenciation ostéoblastique des ASCs murines, nos cellules présentent aussi une forme plus polygonale qu'en début de différenciation et elles semblent s'organiser en amas de façon reproductible. Cela pourrait correspondre à un début de différenciation avant le dépôt de la matrice extra-cellulaire. De plus la différenciation ostéoblastique des ASCs canines est parfois testée sur 6 à 8 semaines (Neupane et al., 2008). Il serait donc intéressant de tester ce milieu sur une plus longue période de différenciation et de tester une condition avec un traitement au  $\beta$ -glycérophosphate sur 3 semaines.

## c) Potentiel chondrocytaire

Nous n'avons pas obtenu de différenciation chondrocytaire des ASCs canines dans nos conditions. Les pellets produits n'ont pas été interprétables pour la coloration car nos protocoles de fixation n'étaient pas adaptés et les profils d'analyses des gènes marqueurs de la différenciation chondrocytaire montraient une absence d'engagement dans cette voie.

Dans les études incluant de la différenciation chondrocytaire sur des ASCs canines, les protocoles de réalisation des pellets sont variés mais et les résultats obtenus aussi. Kisiel et son équipe ont obtenu des pellets mais les cellules les composant ne présentaient pas les caractéristiques phénotypiques de chondrocytes, et une nécrose centrale des pellets avaient eu lieu (Kisiel et al., 2012). En revanche d'autres équipes ont eu des résultats positifs pour la différenciation en chondrocytes (Guercio et al., 2013 ; Vieira et al., 2010a ; Neupane et al., 2008). Les protocoles passent le plus souvent par la préparation d'une solution d'ASCs très concentrée dont des petits volumes sont déposés dans des contenants individuels pour obtenir une organisation des cellules en 3 dimensions.

Dans notre cas, l'absence de différenciation peut s'expliquer par la réalisation des pellets qui n'a pas correctement fonctionné : en effet nous avons observé la formation d'amas de cellules dans les deux premières heures de pose avant l'ajout du milieu de différenciation ou du milieu de base. Guercio et son équipe obtiennent une différenciation chondrocytaire des ASCs, mais les pellets se formaient en 24 à 48h et seulement dans la condition du milieu de différenciation (Guercio et al., 2013 ; Kisiel et al., 2012). Dans une autre étude les pellets se forment aussi en 24h avec le milieu de différenciation, et dans les témoins. Les pellets traités avec le milieu de différenciation et les pellets contrôles ont tous présenté une coloration positive au bleu alcian et une augmentation des gènes spécifiques des chondrocytes (Neupane et al., 2008). Ceci suggère que le facteur prépondérant de la différenciation chondrocytaire est l'organisation en micromasses des cellules.

Nos ASCs ne se sont pas différenciées dans les conditions que nous avons testées mais il faudrait essayer d'autres conditions de formation des pellets pour pouvoir conclure sur leur potentiel de différenciation.

#### *Conclusion sur la différenciation des ASCs :*

Les ASCs canines ne se sont engagées dans aucune des trois voies de différenciation testée. Il faudra modifier et optimiser nos protocoles expérimentaux pour conclure quant à leur potentiel de différenciation.

La plupart des publications étudient l'expression des gènes Oct4, NanoG, Sox 2 marqueurs de la pluripotente cellulaire. Ces gènes sont exprimés dans les ASCs canines (Guercio et al., 2013 ; Kisiel et al., 2012 ; Takemitsu et al., 2012 ; Neupane et al., 2008). Il pourrait être intéressant d'étudier le profil d'expression de ces gènes pour les ASCs que nous avons produites afin de vérifier leur aptitude à se différencier dans différentes lignages.

## 2) Marqueurs de surface

Il n'existe pas de caractérisation immunophénotypique précise des ASCs canines.

Nous avons analysé la population d'ASCs canines pour l'immuno-phénotype CD31- / CD45- / CD90+ / CD34+. La population CD34+ est importante dans la SVF et diminue en culture. La plupart des études caractérisent les ASCs canines négatives pour CD34 (Kisiel et al., 2012 ; Vieira et al., 2010a ; Takemitsu et al., 2012) mais il est possible que la caractérisation a été effectuée sur des cellules cultivées *in vitro* et non sur la SVF fraîche.

Le marqueur CD34 est en effet un marqueur des cellules endothéliales (Scherberich, 2013) mais nos résultats suivent la même tendance que les ASCs humaines concernant CD34 pour lesquelles on peut caractériser une population positive dans la SVF, qui se distingue des cellules des lignages hématopoïétiques par le marqueur CD45 pour lequel elles sont négatives. Lorsque ces cellules sont placées en culture elles perdent progressivement le marqueur CD34 (Traktuev et al., 2008).

Dans une expérience préliminaire nous avons testé le marqueur CD90 sur des ASCs P0 dérivées de tissu adipeux sous cutané qui avaient été congelées, et nous n'avions pas d'expression de ce marqueur. Ceci pouvait remettre en question la cross-réactivité du CD 90 entre l'humain et le chien ou être lié à des mauvaises conditions de marquage. Différentes conditions de marquage en faisant varier le temps d'incubation, la température et le tampon de marquage ont été testées sur cette même culture d'ASCs sans avoir de marquage positif. Lors de l'analyse sur la SVF fraîche, le marqueur CD90 a été détecté sur les cellules canines mais le résultat reste difficile à analyser car le pic de cellules positives ne présentait pas un décalage net contrairement au décalage du pic CD90+ observé pour les ASCs humaines. Ceci peut être dû à une cross-réactivité imparfaite des anticorps humains anti-CD90 avec l'espèce canine (bien que cette cross-réactivité soit décrite).

Dans les études de Kiesel et Vieira des populations d'ASCs canines positives pour CD90 sont retrouvées (Kiesel et al., 2012 ; Vieira et al., 2010a) mais l'étude de Takemitsu décrit une population d'ASCs canines comprenant seulement 20% d'ASCs positives pour ce marqueur (Takemitsu et al., 2012).

Le fait que le CD90 était présent dans la population cellulaire de la SVF fraîche mais pas dans la population d'ASCs P0 testée dans l'étude préliminaire nous a amené à nous demander si les ASC perdaient le marqueur CD90 dans nos conditions de culture. A la fin des cultures P0 et P1 la population CD90+ était stable par rapport à la SVF mais ceci n'a pu être réalisé que pour un chien. Pour répondre plus précisément à cette question il faudrait caractériser la SVF puis ensemercer plusieurs flasques afin de caractériser l'immunophénotype à différents jours de culture au cours de passages successifs.

La caractérisation immunophénotypique des ASCs canines reste donc à préciser, le rendement de la préparation de la SVF est le facteur limitant puisqu'il restreint la réalisation des contrôles et des titrations.

## C. PERSPECTIVES

Nous allons brièvement synthétiser les travaux qu'il faudrait réaliser pour poursuivre cette étude.

### 1) Production

Pour la production des ASCs canines dérivées de tissu adipeux sous cutané nous avons eu des résultats répétables concernant l'allure des courbes de prolifération (avec une phase d'expansion exponentielle), les temps de doublement faibles et les rendements élevés associés à une population de cellules à capacité clonale importante.

En revanche nous n'avons réalisé qu'un prélèvement de tissu adipeux viscéral, pour lequel le rendement le temps de doublement et le pourcentage de cellules à capacité clonale étaient du même ordre mais qui présentait une courbe de prolifération avec une phase d'expansion linéaire.

Il serait donc intéressant de réaliser plus de prélèvements de tissu adipeux viscéral pour étudier la répétabilité de ce résultat.

De même il faudrait réaliser des prélèvements de tissu adipeux sous cutané au niveau d'autres sites anatomiques pour étudier la variabilité éventuelle en fonction de la région de prélèvement.

### 2) Caractérisation

Pour la caractérisation des ASCs, nous n'avons pas obtenu de différenciation et notre caractérisation immunophénotypique n'est pas assez précise.

- Pour la différenciation adipocytaire :
  - La première piste consiste à étudier la différenciation avec un milieu complété en sérum de lapin.
  - Il faudrait étudier le potentiel de différenciation d'ASCs dérivées de tissu adipeux d'autres sites anatomiques (tissu adipeux sous-cutané de la région sacro-coccygienne par exemple).
  
- Pour la différenciation ostéoblastique :
  - Une piste consiste à tester la différenciation sur 6 à 8 semaines avec les milieux de la condition 2 qui avaient présenté les résultats les plus encourageants.
  - On pourrait également tester la différenciation avec un milieu complété en  $\beta$ -glycérophosphate pendant trois semaines.
  
- Pour la différenciation chondrocytaire : Il faudrait tester d'autres protocoles de réalisation de micromasses.
  - Etude de Guercio et son équipe (Guercio et al., 2013) : ils ont réalisé des micromasses de cellules de 1 millions de cellules dans 1 mL placé dans des tubes de 15 mL qui se formaient en 24 48h après ajout d'un milieu *NH ChondroDiff Medium (Mylteny Biotech)*.
  - Etude de Neupane et son équipe (Neupane et al., 2008) : les micromasses étaient formées par dépôt de 10  $\mu$ L contenant 100 000 cellules dans des plaques 24 puits et ajout du milieu de différenciation 2 heures et 30 minutes plus tard.
  
- Pour la caractérisation immunophénotypique :
  - Il faudrait avoir des prélèvements de tissu adipeux de taille plus importante car nous sommes limités par le rendement de la SVF pour la réalisation des contrôles, en privilégiant des chiens de taille importante
  - Il faudrait augmenter le nombre de prélèvements pour avoir une meilleure idée de la répétabilité des résultats

## CONCLUSION

Le tissu adipeux canin est une source d'ASC accessible lors des chirurgies de convenance. Il permet facilement au laboratoire d'isoler et de produire des ASCs *in vitro* en culture cellulaire. Les principaux critères de caractérisation des ASCs canines sont leur capacité d'adhésion au plastique, une morphologie semblable aux fibroblastes, la capacité intrinsèque d'expansion cellulaire par multiplication et le potentiel de différenciation en au moins trois lignages.

Les ASCs canines de notre étude, principalement issues du tissu adipeux sous-cutané abdominal, sélectionnées par l'adhésion sur les flasques en plastiques, avaient la morphologie fibroblastique attendue et elles ont présenté un très fort potentiel de prolifération, avec des temps de doublement plus faibles que les ASCs humaines. Ces résultats pourraient s'expliquer par un pourcentage de cellules à potentiel clonogénique plus important que celui des ASCs humaines.

En revanche les ASCs canines ne se sont pas clairement engagées dans les voies de différenciation, adipocytaire, ostéoblastique ou chondrocytaire. Les protocoles expérimentaux que nous avons utilisés devront être optimisés. Pour la différenciation adipocytaire, l'étape suivante serait l'utilisation de sérum de lapin. Pour la différenciation chondrocytaire nous devons réviser le protocole de formation des pellets. Quant à la différenciation ostéoblastique il faudrait la tester sur une plus longue période.

Nous avons également étudié l'immunophénotype des cellules en cytométrie de flux, à partir des prélèvements de 3 chiennes, pour les marqueurs CD90, CD45, CD31 et CD34 en nous intéressant à la population CD45 négative, CD31 négative, CD34 positive, CD 90 positive. Nous avons observé une population CD34 positive dont le pourcentage diminuait au cours des passages et pour laquelle le marquage CD90 était mal défini. Les difficultés principales pour cette caractérisation était le faible nombre de chiennes pour lesquelles elle a été réalisée et le rendement limitée de de la SVF. Il sera donc nécessaire de de poursuivre cette caractérisation avec de nouveaux prélèvements et cultures pour disposer de plus de contrôles.

La production des ASCs canines s'avère donc de réalisation aisée et va permettre de poursuivre les études sur leur caractérisation fine. L'utilisation thérapeutique des ASCs chez le chien représente une stratégie déjà en marche en médecine vétérinaire, qui se développe au bénéfice des chiens traités, et qui représente aussi un modèle animal pertinent utile au développement de ces mêmes thérapies cellulaires innovantes pour l'homme.

## BIBLIOGRAPHIE

BAKKER, Evelien, VAN RYSSEN, Bernadette, DE SCHAUWER, Catharina et MEYER, Evelyne, 2013. Canine mesenchymal stem cells: state of the art, perspectives as therapy for dogs and as a model for man. In : *Veterinary Quarterly*. décembre 2013. Vol. 33, n° 4, p. 225-233.

BENVENUTI, S., CELLAI, I., LUCIANI, P., DELEDDA, C., BAGLIONI, S., GIULIANI, C., SACCARDI, R., MAZZANTI, B., DAL POZZO, S., MANNUCCI, E. et OTHERS, 2007. Rosiglitazone stimulates adipogenesis and decreases osteoblastogenesis in human mesenchymal stem cells. In : *Journal of endocrinological investigation*. 2007. Vol. 30, n° 9, p. RC26–RC30.

BESSON, C., VERWAERDE, P., BRET-BENNIS, L. et PRIYMENKO, N., 2005. L'évaluation clinique de l'état nutritionnel chez les carnivores domestiques. In : *Revue de médecine vétérinaire*. 2005. Vol. 156, n° 5, p. 269–274.

BRUDER, Scott P., KRAUS, Karl H., GOLDBERG, Victor M. et KADIYALA, Sudha, 1998. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. In : *J Bone Joint Surg Am*. 1998. Vol. 80, n° 7, p. 985–96.

DEIMLING, Luiz I., FRANKE, Carolina, FAGANELLO, Sabrina B., WITZ, Maria Ines, CAMASSOLA, Melissa et NARDI, Nance B., 2012. Interaction of human, canine and murine adipose-derived stem cells with different biomaterials. In : *5th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering [en ligne]*. S.l. : Springer. 2012. p. 1315–1321.

FORTIER, Lisa A., 2005. Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applications. In : *Veterinary Surgery*. septembre 2005. Vol. 34, n° 5, p. 415-423.

GUERCIO, Annalisa, DI BELLA, Santina, CASELLA, Stefania, DI MARCO, Patrizia, RUSSO, Carmelo et PICCIONE, Giuseppe, 2013. Canine mesenchymal stem cells (MSCs): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site: Adipose-derived mesenchymal stem cells in dog. In : *Cell Biology International*. août 2013. Vol. 37, n° 8, p. 789-798.

GUERCIO, Annalisa, DI MARCO, Patrizia, CASELLA, Stefania, CANNELLA, Vincenza, RUSSOTTO, Laura, PURPARI, Giuseppa, DI BELLA, Santina et PICCIONE, Giuseppe, 2012. Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. In : *Cell Biology International*. 1 février 2012. Vol. 36, n° 2, p. 189-194.

HARMS, Kate M., LI, Lu et CUNNINGHAM, Lee Anna, 2010. Murine Neural Stem/Progenitor Cells Protect Neurons against Ischemia by HIF-1 $\alpha$ -Regulated VEGF Signaling. In : LINDEN, Rafael (éd.), *PLoS ONE*. 22 mars 2010. Vol. 5, n° 3, p. e9767.

HILL, Caitlin E., PROSCHEL, Christoph, NOBLE, Mark, MAYER-PROSCHEL, Margot, GENSEL, John C., BEATTIE, Michael S. et BRESNAHAN, Jacqueline C., 2004. Acute transplantation of glial-restricted precursor cells into spinal cord contusion injuries: survival, differentiation, and effects on lesion environment and axonal regeneration. In : *Experimental Neurology*. décembre 2004. Vol. 190, n° 2, p. 289-310.

HIYAMA, Akihiko, MOCHIDA, Joji, IWASHINA, Toru, OMI, Hiroko, WATANABE, Takuya, SERIGANO, Kenji, TAMURA, Futoshi et SAKAI, Daisuke, 2008. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. In : *Journal of Orthopaedic Research*. mai 2008. Vol. 26, n° 5, p. 589-600.

HUBE, F., LEE, Y.-M., RÖHRIG, K. et HAUNER, H., 1999. The phosphodiesterase inhibitor IBMX suppresses TNF- $\alpha$  expression in human adipocyte precursor cells: a possible explanation for its adipogenic effect. In : *Hormone and metabolic research*. 1999. Vol. 31, n° 06, p. 359–362.

JUNG, Dong-In, HA, Jeongim, KANG, Byeong-Teck, KIM, Ju-Won, QUAN, Fu-Shi, LEE, Jong-Hwan, WOO, Eung-Je et PARK, Hee-Myung, 2009. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. In : *Journal of the Neurological Sciences*. octobre 2009. Vol. 285, n° 1-2, p. 67-77.

KANG, Byung-Jae, RYU, Hak-Hyun, PARK, Sung Su, KOYAMA, Yoshihisa, KIKUCHI, Masanori, WOO, Heung-Myong, KIM, Wan Hee et KWEON, Oh-Kyeong, 2012. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. In : *Journal of Veterinary Science*. 2012. Vol. 13, n° 3, p. 299.

KISIEL, Agatha H., MCDUFFEE, Laurie A., MASAOUD, Elmabrok, BAILEY, Trina R., GONZALEZ, Blanca P. Esparza et NINO-FONG, Rodolfo, 2012. Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. In : *American journal of veterinary research*. 2012. Vol. 73, n° 8, p. 1305–1317.

KURAITIS, Drew, RUEL, Marc et SUURONEN, Erik J., 2011. Mesenchymal Stem Cells for Cardiovascular Regeneration. In : *Cardiovascular Drugs and Therapy*. août 2011. Vol. 25, n° 4, p. 349-362.

LANGENBACH, Fabian et HANDSCHEL, Jörg, 2013. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. In : *Stem cell research & therapy*. 2013. Vol. 4, n° 5, p. 1.

LEHMANN, Jürgen M., LENHARD, James M., OLIVER, Beverly B., RINGOLD, Gordon M. et KLIEWER, Steven A., 1997. Peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. In : *Journal of Biological Chemistry*. 1997. Vol. 272, n° 6, p. 3406–3410.

LIU, Qihai, CEN, Lian, ZHOU, Heng, YIN, Shuo, LIU, Guangpeng, LIU, Wei, CAO, Yilin et CUI, Lei, 2009. The role of the extracellular signal-related kinase signaling pathway in osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells and in adipogenic transition initiated by dexamethasone. In : *Tissue Engineering Part A*. 2009. Vol. 15, n° 11, p. 3487–3497.

LI, Yi, CHEN, Jieli, ZHANG, Chun Ling, WANG, Lei, LU, Dunyue, KATAKOWSKI, Mark, GAO, Qi, SHEN, Li Hong, ZHANG, Jing, LU, Mei et CHOPP, Michael, 2005. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. In : *Glia*. février 2005. Vol. 49, n° 3, p. 407-417.

MARTINELLO, T., BRONZINI, I., MACCATROZZO, L., MOLLO, A., SAMPAOLESI, M., MASCARELLO, F., DECAMINADA, M. et PATRUNO, M., 2011. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. In : *Research in Veterinary Science*. août 2011. Vol. 91, n° 1, p. 18-24.

MOKBEL, Abir N., EL TOOKHY, Omar S., SHAMAA, Ashraf A., RASHED, Laila A., SABRY, Dina et EL SAYED, Abeer M., 2011. Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model. In : *BMC musculoskeletal disorders*. 2011. Vol. 12, n° 1, p. 1.

MURUGANANDAN, S., ROMAN, A. A. et SINAL, C. J., 2009. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Cross talk with the osteoblastogenic program. In : *Cellular and Molecular Life Sciences*. janvier 2009. Vol. 66, n° 2, p. 236-253.

NEUPANE, Manish, CHANG, Chia-Cheng, KIUPEL, Matti et YUZBASIYAN-GURKAN, Vilma, 2008. Isolation and Characterization of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. In : *Tissue Engineering Part A*. 17 avril 2008. Vol. 0, n° 0, p. 080422095744451.

PARK, Jung, GELSE, Kolja, FRANK, Susi, VON DER MARK, Klaus, AIGNER, Thomas et SCHNEIDER, Holm, 2006. Transgene-activated mesenchymal cells for articular cartilage repair: a comparison of primary bone marrow-, perichondrium/periosteum- and fat-derived cells. In : *The Journal of Gene Medicine*. janvier 2006. Vol. 8, n° 1, p. 112-125.

QUINTAVALLA, Joseph, UZIEL-FUSI, Susan, YIN, Jianyun, BOEHNLEIN, Ernst, PASTOR, Gary, BLANCUZZI, Vincent, SINGH, Hem N., KRAUS, Karl H., O'BYRNE, Elizabeth et PELLAS, Theodore C., 2002. Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. In : *Biomaterials*. 2002. Vol. 23, n° 1, p. 109-119.

SCHERBERICH, Arnaud, 2013. A familiar stranger: CD34 expression and putative functions in SVF cells of adipose tissue. In : *World Journal of Stem Cells*. 2013. Vol. 5, n° 1, p. 1.

SHI, Yufang, HU, Gangzheng, SU, Juanjuan, LI, Wenzhao, CHEN, Qing, SHOU, Peishun, XU, Chunliang, CHEN, Xiaodong, HUANG, Yin, ZHU, Zhixin et OTHERS, 2010. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. In : *Cell research*. 2010. Vol. 20, n° 5, p. 510-518.

SMOLDERS, Lucas A., MEIJ, Björn P., RIEMERS, Frank M., LICHT, Ruud, WUBBOLTS, Richard, HEUVEL, Douwe, GRINWIS, Guy C.M., VERNOOIJ, Hans C.M., HAZEWINKEL, Herman A.W., PENNING, Louis C. et TRYFONIDOU, Marianna A., 2012. Canonical Wnt signaling in the notochordal cell is upregulated in early intervertebral disk degeneration. In : *Journal of Orthopaedic Research*. juin 2012. Vol. 30, n° 6, p. 950-957.

STEWART, Matthew C. et STEWART, Allison A., 2011. Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Sources, and Mechanisms of Action. In : *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. août 2011. Vol. 27, n° 2, p. 243-261.

TAKEMITSU, Hiroshi, ZHAO, Dongwei, YAMAMOTO, Ichiro, HARADA, Yasuji, MICHISHITA, Masaki et ARAI, Toshiro, 2012. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. In : *BMC veterinary research*. 2012. Vol. 8, n° 1, p. 150.

TRAKTUEV, D. O., MERFELD-CLAUSS, S., LI, J., KOLONIN, M., ARAP, W., PASQUALINI, R., JOHNSTONE, B. H. et MARCH, K. L., 2008. A Population of Multipotent CD34-Positive Adipose Stromal Cells Share Pericyte and Mesenchymal Surface Markers, Reside in a Periendothelial Location, and Stabilize Endothelial Networks. In : *Circulation Research*. 4 janvier 2008. Vol. 102, n° 1, p. 77-85.

VIEIRA, N. M., BRANDALISE, V., ZUCCONI, E., SECCO, M., STRAUSS, B. E. et ZATZ, M., 2010a. Isolation, Characterization, and Differentiation Potential of Canine Adipose-Derived Stem Cells. In : *Cell Transplantation*. 1 mars 2010. Vol. 19, n° 3, p. 279-289.

VIEIRA, N. M., BRANDALISE, V., ZUCCONI, E., SECCO, M., STRAUSS, B. E. et ZATZ, M., 2010b. Isolation, Characterization, and Differentiation Potential of Canine Adipose-Derived Stem Cells. In : *Cell Transplantation*. 1 mars 2010. Vol. 19, n° 3, p. 279-289.

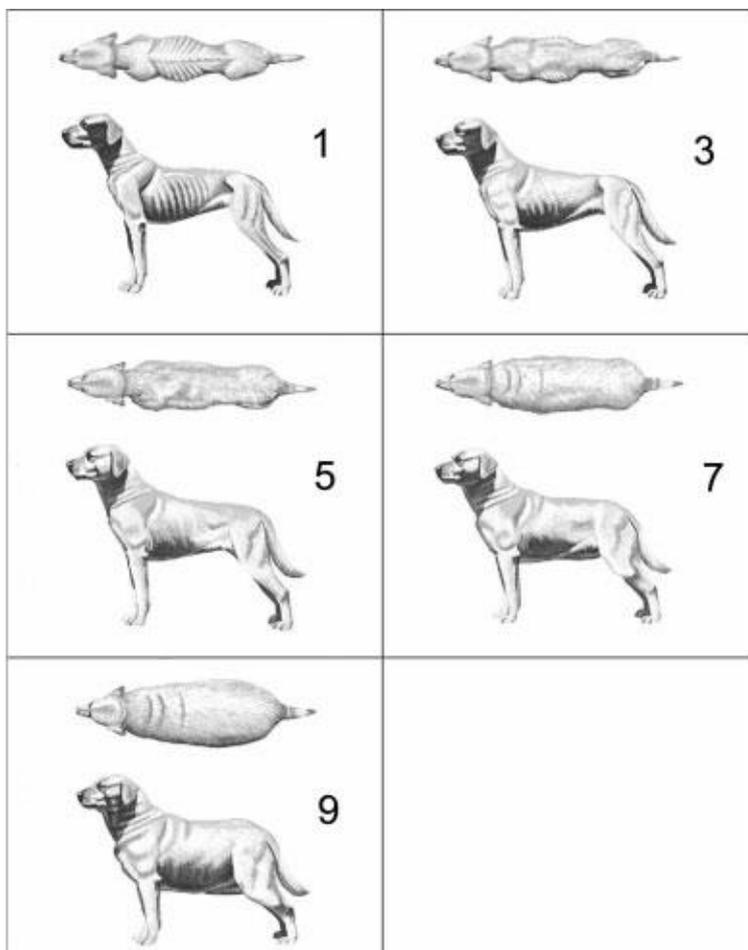
VILLATORO, Antonio J., FERNÁNDEZ, Viviana, CLAROS, Silvia, RICO-LLANOS, Gustavo A., BECERRA, José et ANDRADES, José A., 2015. Use of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Keratoconjunctivitis Sicca in a Canine Model. In : *BioMed Research International*. 2015. Vol. 2015, p. 1-10.

WEI, X., ZHAO, L., ZHONG, J., GU, H., FENG, D., JOHNSTONE, B.H., MARCH, K.L., FARLOW, M.R. et DU, Y., 2009. Adipose stromal cells-secreted neuroprotective media against neuronal apoptosis. In : *Neuroscience Letters*. septembre 2009. Vol. 462, n° 1, p. 76-79.

WILSON-FRITCH, L., BURKART, A., BELL, G., MENDELSON, K., LESZYK, J., NICOLORO, S., CZECH, M. et CORVERA, S., 2003. Mitochondrial Biogenesis and Remodeling during Adipogenesis and in Response to the Insulin Sensitizer Rosiglitazone. In : *Molecular and Cellular Biology*. 1 février 2003. Vol. 23, n° 3, p. 1085-1094.

## ANNEXES

### Annexe 1 : indice de score corporel canin



L'indice de score corporel a été développé pour évaluer la part de tissu maigre et gras chez le chien comme outil de diagnostic et de suivi de l'obésité. Des échelles de 1 à 9 ou de 1 à 5 ont été développées correspondant à un animal cachectique pour le 1 et à un animal très obèse pour le 5 ou le 9. L'indice de score corporel est attribué en observant la silhouette puis en palpant certaines saillies osseuses. L'échelle de score corporel allant de 1 à 9 est présentée ici (Besson et al., 2005).

Note	Palpation du squelette	Répartition du tissu adipeux observation de la silhouette	% graisse (mâles)	% graisse (femelles)
<b>1 (Emacié)</b>	Côtes, vertèbres, bassin, et saillies osseuses visibles à distance	Pas de graisse discernable, fonte musculaire extrême	ND	ND
<b>2 (Très maigre)</b>	Côtes, vertèbres, bassin bien visibles, autres saillies osseuses éventuellement visibles	Pas de graisse palpable, perte minime de muscle	3,7	2,6
<b>3 (Maigre)</b>	Côtes facilement palpables voire visibles, apophyses épineuses des vertèbres lombaires visibles, os du bassin proéminents	Pas de tissu adipeux sous-cutané recouvrant les côtes	8,2	8,4
<b>4 (Fin)</b>	Côtes facilement palpables	Graisse de couverture minimale	12,7	14,1
<b>5 (Optimal)</b>	Côtes palpables	Pas d'excès de graisse sous-cutanée recouvrant les côtes	17,2	19,9
<b>6 (Surcharge)</b>	Côtes palpables	Léger excès de graisse recouvrant les côtes	21,7	25,7
<b>7 (Gros)</b>	Côtes difficiles à palper	Graisse déposée sur les côtes, les lombes, la base de la queue	26,2	31,4
<b>8 (Obèse)</b>	Côtes palpables en exerçant une forte pression	Fort dépôt de graisse sur les côtes, les lombes, la base de la queue	30,7	37,2
<b>9 (Très obèse)</b>	Côtes non palpables	Dépôt majeur de graisse sur le thorax, rachis, base de la queue, encolure, membres, face...	35,1	43

Source : (Besson et al., 2005)

## Annexe 2 : références des milieux de culture utilisés

produit	composition	référence	fournisseur
<b>MEM alpha medium</b>	Ribonucleosides [-] Desoxyribonucleosides [-]	22561-021	Gibco (life technologies)
<b>DMEM/F12 (1 :1) (1X)</b>	L-Glutamine [+] HEPES 15 mM [+]	11039-021	Gibco (life technologies)
<b>DMEM (1X) (DMEM high glucose)</b>	D-Glucose 4,5 g/L [+] L-Glutamine [+] HEPES 25 mM [+]	21063-029	Gibco (life technologies)
<b>FBS</b>		10500-064	Gibco (life technologies)
<b>DPBS (Dulbecco's PBS)</b>	CaCl2 [-] MgCl2 [-]	14190-094	Gibco (life technologies)
<b>Trypsine-EDTA</b>		25200-056	Gibco (life technologies)
<b>Buffer RLT</b>			Qiagen

Antibiotiques utilisés : ASP (Invitrogen) dilué au centième dans le milieu

- Amphotéricine 0,25 µg/mL
- Streptomycine 100 µG/mL
- Pénicilline 100 U/mL

### Annexe 3 : références des flasques et des plaques de culture utilisées

Nom	Nombre de cm <sup>2</sup>	référence	fournisseur
T25	25	90026	TRP
T75	75	90076	TRP
T150	150	90151	TRP
Plaque 6 puits	9 cm <sup>2</sup> /puit	92006	TRP
Plaque 12 puits	3,4 cm <sup>2</sup> /puit	92012	TRP
Plaque 48 puits	1,1 cm <sup>2</sup> /puit	3548	Costar

### Annexe 4 : protocoles de comptage à la lame de malssez

*Lame de Malassez = grille de 10 lignes x 10 colonnes ; l'ensemble de la grille correspond à un volume de 1 µL*

- Protocole de dilution : Dilution à 50% de la solution de cellules en suspension avec du bleu de Trypan (10 µL de chaque), ce colorant rentre dans les cellules mortes.
- Mise entre lame et lamelle de Malassez de 10 µL de la solution obtenue
- Comptage cellulaire au microscope au grossissement x400 pour compter au moins 100 cellules (de 2 lignes à l'ensemble de la grille selon les suspensions)
- Obtention de la concentration cellulaire de l'échantillon en fonction du nombre de lignes comptées et en tenant compte de la dilution au bleu de Trypan.

### Annexe 5 : Protocole de trypsination

Pour récupérer les cellules mises en culture dans les flasques aux différents passages et pour les compter lors des proliférations de la trypsin – EDTA (Life technologies) a été utilisée.

- Les cellules sont lavées deux fois au PBS
- Répartition de la trypsin sur la surface
- Incubation 10 minutes à 37°C
- Vérification du décollement des cellules au microscope
- Reprise avec le milieu choisi, en réalisant plusieurs cycles d'aspiration – refoulement.
- Comptage de la suspension au compteur Countess (Invitrogen).

Les volumes de PBS, trypsin et milieu variaient en fonction de la flasque ou du stade des proliférations, voici quelques volumes indicatifs.

Volume	PBS	Trypsine	Milieu
Flasque T150	10 à 20 mL	1,5 mL	8 à 9 mL
1 puit en début de prolifération	1 mL	100 µL	200 µL
1 puit en fin de prolifération	1 mL	800 µL	1200 µL

## Annexe 6 : Protocole de récupération des ARN

- Retrait du milieu du puit
- Lavage au PBS (environ 1mL par puit)
- Ajout de 350 µL RLT
- Réalisation de plusieurs cycles aspiration-refoulement
- Mise en eppendorf placés au congélateur à -4°C pendant 2 à 4 jours puis stockés à -20°C

## Annexe 7 : Protocole de coloration des CFU

Arrêt des CFU :

- Aspiration du milieu puis rinçage avec 5 mL de PBS
- Séchage pendant 24h minimum

Coloration au kit RAL Stainer MCDH

MCDh = Micro Chromatique Detection for haematology, kit pour la coloration de frottis sanguins et médullaires

Cette coloration utilisé successivement 4 réactifs :

- MCDh 1 : fixation des cellules par un mélange d'alcool éthylique et de colorants neutres préparant la coloration des granulations basophiles.
- MCDh 2 : Solution permettant la libération des colorants neutres et la coloration des hématies, du cytoplasme des granulocytes neutrophiles et des granulations éosinophiles.
- MCDh 3 : Solution aqueuse de couleur bleue permettant la coloration du cytoplasme des monocytes et des lymphocytes et la coloration des granulations azurophiles en rouge (de métachromasie).
- MCDh 4 : Solution permettant l'élimination de l'excès de colorant par l'action d'agents de rinçage.

### **Mode opératoire**

*Pour une flasque T25 :*

Ajout et retrait des 4 réactifs suivant ces étapes :

- 3 mL de MCDh 1 à 7 minutes sans agitation
- 3 mL de MCDh 2 à 3 minutes avec agitation
- 3 mL de MCDh 2 à 30 secondes avec agitation
- 3 mL de MCDh 3 à 30 secondes avec agitation
- 3 mL de MCDh 4 (dilué à 12,5% avec de l'eau distillée) à 10 secondes avec agitation

Séchage de la flasque pendant au moins 24h avant le comptage.

## Annexe 8 : protocole de fixation au PFA

*Pour une puit de 9,6 cm<sup>2</sup> (plaque 6 puits)*

- Deux lavages avec 2 mL de PBS
- Fixation des cellules avec 1 mL de PFA 4% par puit pendant 15 minutes
- Deux lavages 2 mL de PBS
- Ajout de 2 mL de PBS pour le stockage

### Annexe 9 : coloration à l'huile rouge O des vésicules de triglycérides à la fin des différenciations adipocytaires

- 2 lavages au PBS (3 mL par puit)
- Fixation au PFA 3,7%: 1 mL par puit pendant 10 minutes
- 1 lavage au PBS (3 mL par puit)
- 1 lavage à l'isopropanol 60% (3 mL par puit)
- 500 µL de colorant Oil O Red : sous agitation lente à température ambiante pendant 2h
- 1 lavage à l'isopropanol 60% (3 mL par puit)
- 2 ou 3 mL de PBS puis conservation à 4°C

### Annexe 10 : coloration au rouge Alizarine suite aux différenciations ostéoblastiques

- 2 lavages au PBS (3 mL par puit)
- Fixation au PFA 3,7% : 1 mL par puit pendant 10 minutes
- 2 lavages au PBS : 2 mL par puit
- 1 mL d'Alizarin Red 1,5% : agitation douce à température ambiante pendant 20 minutes
- 4 lavages avec 4 mL d'eau distillée pendant 5 minutes sous agitation
- Ajout de 2 à 3 mL de PBS pour le stockage à 4°C

## Annexe 11 : protocoles de fixation des pellets de la différenciation chondrocytaire

### **a) Fixation en histogel**

- Reprise des cellules avec 500 µL d'éthanol par puit pour la fixation
- Placement dans un Eppendorf de 1 mL
- centrifugation 5 minutes à 453g
- reprise des culots par 40 µL d'histogel chauffé à 66°C au bain marie en réalisant plusieurs allers-retours dans la pipette de façon à ce que le mélange se solidifie
- dépôt des gouttes dans des cassettes
- fixation au PFA.

Ces cassettes ont ensuite été techniquées pour réaliser des coupes à l'école vétérinaire et des colorations au bleu de toluidine.

### **b) Fixation en aggarose**

#### *Reprise des cellules*

- Lavage des cellules avec PBS + 2 mM EDTA
- Grattage des puits et remise des cellules en suspension avec 1 mL de PBS par puit
- Poolage de 2 puits par tube eppendorf et centrifugation 4 minutes à 400g à 4°C

#### *Fixation des cellules*

- Suspension du culot obtenu avec 1mL de formol tamponné 4% : pendant 3 heures
- Centrifugation à 400g 5 minutes à 4°C
- Suspension du culot obtenu avec 400 µL de PBS puis placement au bain marie à 65°C pendant 5 minutes
- Mise dans une seringue de 2,5 mL bouchée par du parafilm
- Ajout de 400µL d'agarose à 5,5% (chauffé à 65°C) et réalisation de plusieurs allers-retours à la P1000 pour mélanger
- Attendre la polymérisation en laissant la seringue en position verticale sur le portoir

#### *Stockage dans le formol*

- Coupe du bout de la seringue avec un scalpel
- Placement du cylindre d'agarose obtenu entre deux mousses dans une cassette histologique
- Placement des cassettes dans des pots de PFA à 10%

## Annexe 12: extraction et dosage des ARN totaux

*Pour moins de 200 000 cellules*

### **Matériel et réactifs :**

- RNeasy Micro Kit : (Qiagen, ref 74106):
  - colonnes RNeasy micro spin (frigo)
  - tubes collecteurs (1,5 mL et 2 mL)
  - tampon RLT, RW1, RPE
  - eau RNase-free
- Rnase Free Dnase set QIAGEN N°79254
- éthanol absolu Sigma

### **Protocole :**

#### Préparation des solutions

- Tampon RPE : à la première utilisation du kit, diluer la totalité du flacon avec 4 volumes d'éthanol 96-100%, et noter la date sur le flacon
- Ethanol 70% : reconstituer à partir de 7 volumes d'éthanol absolu + 3 volumes d'eau RNase-free. (100 ml Ethanol 100% + 47.75 ml H<sub>2</sub>O stérile)
- Ethanol 80% : reconstituer à partir de 8 volumes d'éthanol absolu + 2 volumes d'eau RNase-free
- Préparer DNase : 10µl DNase + 70µl RDD : ne pas vortexer

#### Extraction des ARN totaux (à température ambiante)

- Ajouter 350 µL de tampon RLT dans le tube contenant le culot. (ou sur les cellules en culture après lavage au PBS) Attention : pas tp RLT Plus
- Mélanger en pipetant pour bien lyser les cellules.
- Transférer le lysat dans un tube eppendorf de 1,5mL.
  
- Ajouter 350 µL d'éthanol à 70%
- Mélanger doucement
- Transférer la totalité (maximum 700 µL) de l'échantillon dans une colonne micro spin (rose et orange) placée sur un tube collecteur de 2 mL
- Centrifuger 30 secondes à  $\geq 8000g$
- Vider le tube collecteur
  
- Ajouter 350 µL de tampon RW1 dans la colonne
- Centrifuger 30 secondes à  $\geq 8000g$
- Eliminer le tube collecteur
- Placer la colonne sur un tube collecteur de 2 mL neuf.
  
- Déposer 80µl de DNase (70µl RDD + 10µl DNase) et laisser 10 min à RT
- Ajouter 350 µL de tampon RW1 dans la colonne
- Centrifuger 30 secondes à  $\geq 8000g$
  
- Ajouter 500 µL de tampon RPE dans la colonne
- Centrifuger 30 secondes à  $\geq 8000g$
- Vider le tube collecteur, et le conserver pour l'étape suivante.

- Ajouter 500 µL d'éthanol 80% dans la colonne
- Centrifuger 2 minutes à  $\geq 8000g$  pour sécher la membrane et éliminer l'éthanol.
  
- Vider tube collecteur
- Centrifuger 2 min full speed pour sécher la mb
- Eliminer le tube collecteur
  
- Placer la colonne sur un tube collecteur de 1,5 mL neuf (C).
- Ajouter 14 µL d'eau RNase-free (du kit) dans la colonne
- Centrifuger 1 minute à  $\geq 8000g$  pour éluer l'ARN.
- Fermer le tube collecteur et le placer dans de la glace.
- Dosage Nanodrop

#### Dosage des ARN au Nanodrop

Nanodrop 2000c Thermo scientific

- Sélectionner le programme classic
  - o Nucleic Acid
  - o RNA
- Faire le blanc sur l'eau
- Vérifier avec 1µl eau
- Doser l'échantillon 1 µl
- 1 lavage à l'eau

Ratio	Value	Indication purification
260/280	2	ARN pur
	<1,8	Présence de protéines, phénol ou autres contaminants
260/230	2	ARN pur
	<1,8	Contamination par solvants, sel...

## Annexe 13 : protocole de marquage des cellules pour la cytométrie

*Protocole élaboré par Marion Taurand*

### **Méthode :**

- Tube 1 : isotype APC IgG2b (serotec)
- Tube 2 : isotype PE mouse IgG1 k (BD)
- Tube 3 : isotype FITC mouse IgG1 (BD)
- Tube 4 : isotype zenon alexa 700 sur IgG1 mouse
- Tube 5 : isotype multi
- Tube 6 : mono marquage marqué CD45 APC (serotec) rat
- Tube 7 : mono marquage marqué CD34 PE (BD)
- Tube 8 : mono marquage marqué CD90 FITC (BD)
- Tube 9 : mono marquage marqué CD31 zenon Alexa700
- Tube 10 : multimarquage
- Billes neg et 4 tubes pos
- Attention billes compensation rat pour tube CD45 APC
- Pour cytométrie prévoir 100 000 à 200 000 cellules par tube (x9)

### **Protocole de marquage :**

- Récupérer la quantité de SVF ou de cellules nécessaire pour avoir le bon nombre de cellules et faire un lavage tampon MACS
- Centrifuger 5min à 1500rpm
- Pendant ce temps préparer le couplage CD31- zenon Alexa700
  - o Pour 3 tubes (N°8-9 et bille) : 3µg d'anticorps soit 2.5µl de CD31 à 1.2mg/ml
  - o Ajouter 5µl x 3 = 15µl de zenon mouse IgG labeling reagent (component A)
  - o Incuber 5min à RT
  - o Ajouter 5µl x 3 = 15µl de Zenon blocking reagent (component B)
  - o Incuber 5min à RT
- Préparer le couplage Mouse IgG1 dako pour contrôle
  - o Pour tubes (N°4) : 1µg d'anticorps soit 4.6µl d'isotype à 219mg/L (x2 soit 9.2µl)
  - o Ajouter 5µl x 2 de zenon mouse IgG labeling reagent (component A)
  - o Incuber 5min à RT
  - o Ajouter 5µl x 2 de Zenon blocking reagent (component B)
  - o Incuber 5min à RT
- Ajouter 2µl de chaque anticorps pour CD45-APC, CD90-FITC et CD34-PE) et 10µl (1/3 dans chacun des 3 tubes) pour CD31-zenon alexa647 dans le tube de cellules marquées et 2µl de chaque isotype correspondant dans l'autre tube.
- Dans les 5 tubes de compensations : 2 gouttes de billes NEG dans le NEG, 1 goutte de billes NEG + 1 goutte de billes POSITIVES dans les mono marquages (2µl du marquage déposé préalablement dans le tube selon tableau des compensations et 1 µl pour CD31 zenon)
- Marquage 30min à 4°C
- Ajouter 2ml de Tp MACS puis centrifuger à 1500rpm 5min
- Vider les tubes par retournement
- Ajouter 200µl PBS1X-/-
- Lecture au FACS. Si pas immédiat conserver les tubes dans la glace à l'abri de la lumière.
- Ajout 100µl DAPI lors passage FACS

### **Passage au FACS**

Allumer le FACS 20min avant. Avant passage FACS

Ouvrir le cytometer statut

Ouvrir un nouvel experiment

Dans cytometer setting – Inspector : choisir les fluo et délaier ce qu'on ne veut pas cocher H et W pour FSC/SSC

Dans experiment : compensation -create compensation

Attention : penser à décocher le Pacific Blue pour les compensations

New Specimen

Tubes (les nommer)

Dans Exp layout mettre les correspondances du marquage pour chaque tube Ex : PerCP CD34 (créer la liste avant et cocher direct) puis copy du specimen et paste et renommer

Faire la global worksheet dans inspector choisir 2 pages, faire les graphs et histogrammes.

Dans population : show population hiérarchie pour créer fenêtrés

### Passage au FACS

Régler d'abord FSC et SSC et les autres PMT (nég donc vers  $10^2$ ) sur le tube contrôle contenant les isotypes IgG,( vérifier sur les tubes isotypes IgG des autres conditions rapidement). Mettre les marqueurs au bon niveau nég. Ne pas enregistrer l'acquisition.

Puis passer les tubes de compensation, NEG puis les autres

Enregistrer 5000 à 10000events, placer barres des marqueurs bien autour du pic positif, puis appliquer les compensations : Experiment – compensation set up- calculate compensation- link and save

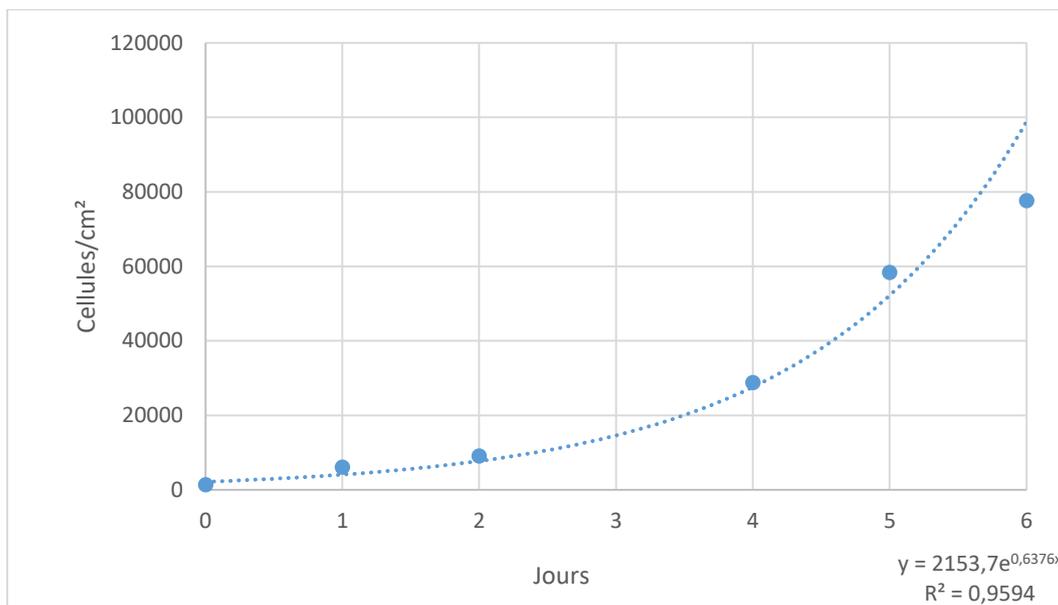
Régler le nombre d'événements et passer les tubes.

Ajouter 100µl de DAPI dans chaque tube et repasser les tubes restants

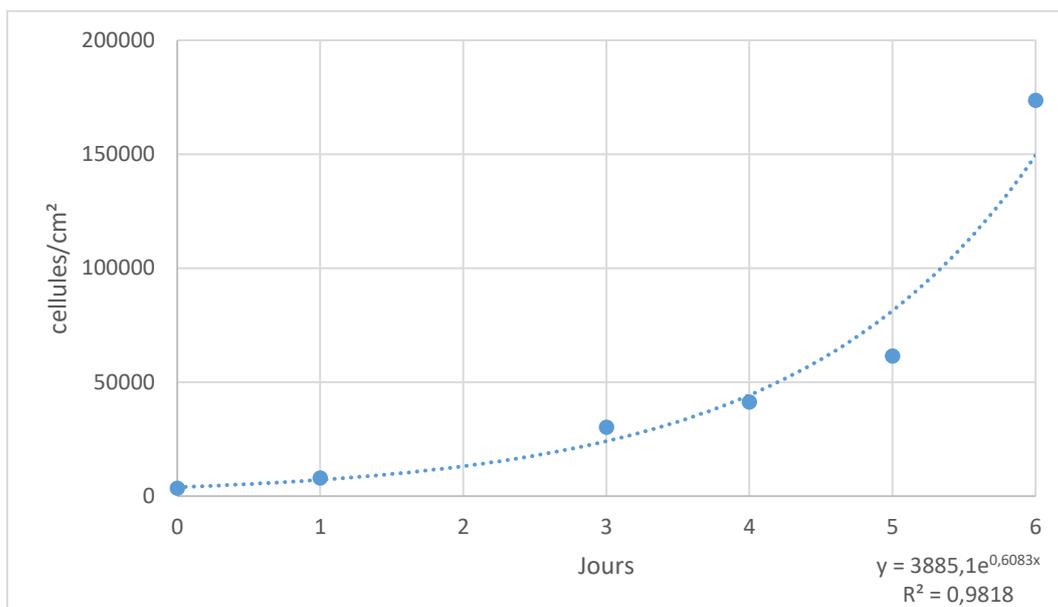
## Annexe 14 : liste des ASCs canines congelées

chienne	Type d'ASCs	Cellules/ampoule (millions)	Nombre d'ampoules
<b>2</b>	ASCs P0	4	5
	ASCs P1	7	2
	ASCs P2	4	2
<b>4</b>	ASCs P1	3,7	1
	ASCs P2	2,7	4
<b>5</b>	ASCs P0	1,5	1
	ASCs P1	2,5	3
<b>6</b>	ASCs P0	2,3	4
	ASCs P1	6	1
<b>7 TA Sous cutané</b>	ASCs P0	2	2
		5	2
<b>7 TA viscéral</b>	ASCs P0	5	2
	ASCs P1	2,5	4
<b>9</b>	ASCs P0	0,97	1
<b>10</b>	ASCs P0	0,45	1

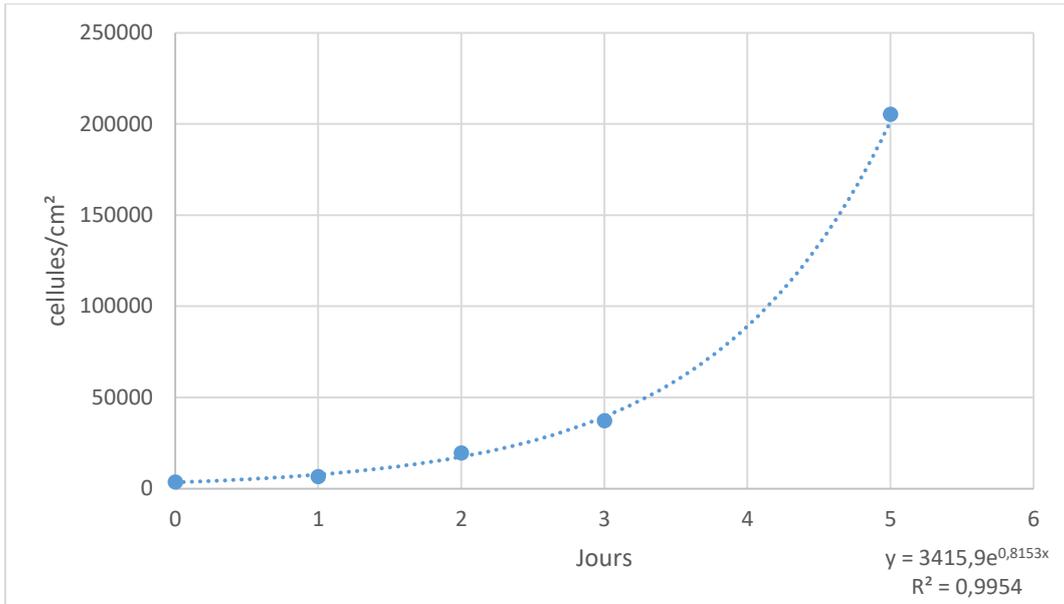
## Annexe 15: Courbes de tendance des proliférations



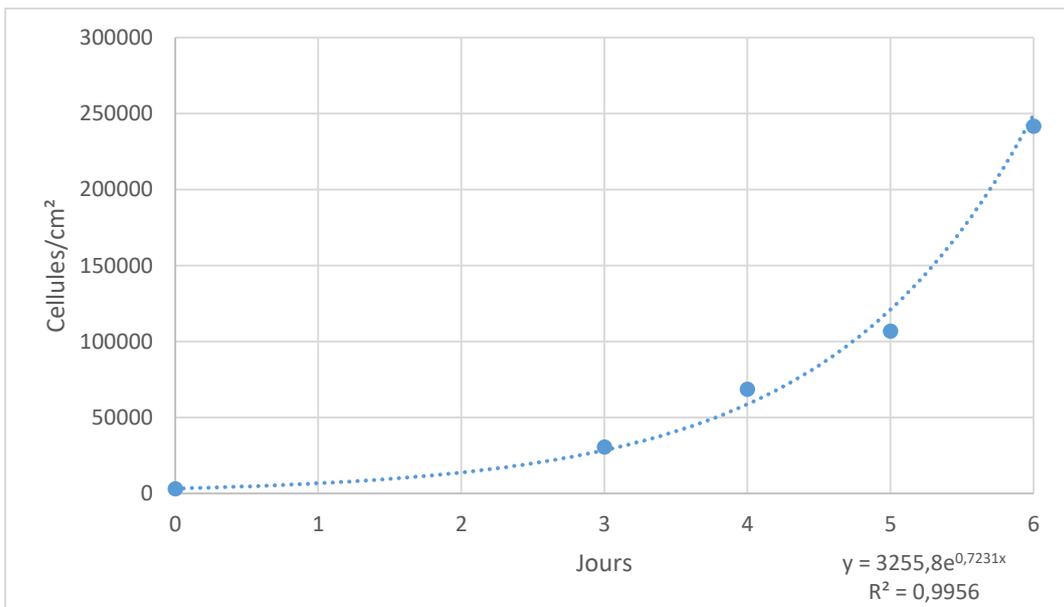
*Prolifération sur les 6 premiers jours des ASCs P1 dérivées de tissu adipeux sous cutané de la chienne 2 et la courbe de tendance exponentielle associée*



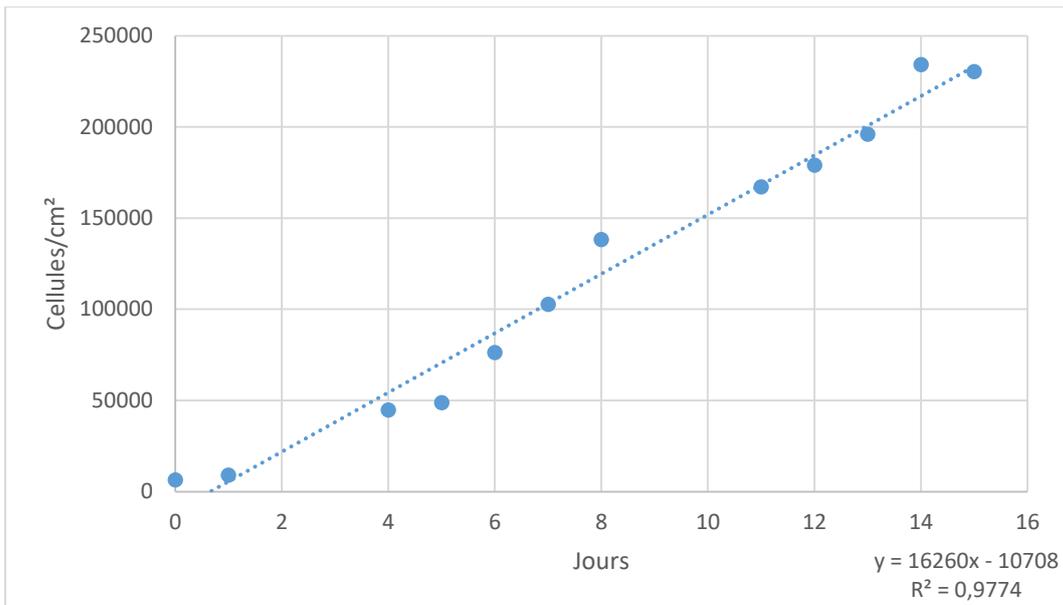
*Prolifération sur les 6 premiers jours des ASCs P1 dérivées de tissu adipeux sous cutané de la chienne 3 et la courbe de tendance exponentielle associée*



*Prolifération sur les 5 premiers jours des ASCs P1 dérivées de tissu adipeux sous cutané de la chienne 6 et la courbe de tendance exponentielle associée*



*Prolifération sur les 6 premiers jours des ASCs P1 dérivées de tissu adipeux sous cutané de la chienne 7 et la courbe de tendance exponentielle associée*



*Prolifération sur les 15 premiers jours des ASCs P1 dérivées de tissu adipeux viscéral de la chienne 7 et la courbe de tendance linéaire associée*

## Annexe 16: résultats des qPCR

### a) Adipocytaire

- C-EBP

	Echantillons	CT	Moyenne	Delta CT	2exp(-delta CT)	Norm
CN 3 P2 J0 adipo	1	28,8296261	28,537	11,021	0,000	1,000
	1	28,2448807				
CN3 P2 J14 adipo C°1 ND	4	28,2098045	27,991	10,259	0,001	1,696
	4	27,7721138				
CN3 P2 J14 adipo C°1 diff	3	26,8119164	26,789	10,182	0,001	1,789
	3	26,765379				
CN3 P2 J14 adipo C°2 ND	5	27,7113838	27,580	9,420	0,001	3,035
	5	27,4485855				
CN3 P2 J14 adipo C°2 diff	6	26,8682213	26,871	9,459	0,001	2,953
	6	26,8733101				
CN3 P2 J14 adipo C°3 ND	7	29,1642303	28,938	9,656	0,001	2,575
	7	28,7122002				
CN3 P2 J14 adipo C°3 diff	8	27,0776691	27,004	8,160	0,003	7,266
	8	26,9310818				
CN4 P1 J0 adipo	30	25,5492725	25,519	7,430	0,006	1,000
	30	25,4881973				
CN4 P1 J14 adipo C°1 ND	31	26,2113533	26,310	7,672	0,005	0,845
	31	26,4091759				
CN4 P1 J14 adipo C°1 diff	32	25,1005898	25,192	6,534	0,011	1,861
	32	25,282938				
CN4 P1 J14 adipo C°2 ND	33	26,7851238	27,093	8,727	0,002	0,407
	33	27,4009075				
CN4 P1 J14 adipo C°2 diff	34	25,7955856	25,641	7,235	0,007	1,145
	34	25,4860287				
CN4 P1 J14 adipo C°3 ND	35	25,4715424	25,546	5,506	0,022	3,795
	35	25,6206684				
CN4 P1 J14 adipo C°3 diff	36	24,7936497	24,967	5,254	0,026	4,518
	36	25,1396046				
CN5 P1 J0 Adipo	37	26,6419907	26,391	8,401	0,003	1,000
	37	26,1397934				
CN5 P1 J14 Adipo C°1 ND	38	27,3853264	27,380	8,669	0,002	0,831
	38	27,3755722				
CN5 P1 J14 Adipo C°1 diff	39	24,1546612	24,265	6,123	0,014	4,851
	39	24,3756046				

	Echantillons	Ct	Moyenne	Delta Ct	2exp(-delaCT)	Norm
CN5 P1 J14 Adipo C°2 ND	40	26,3449478	26,388	7,878	0,004	1,437
	40	26,4314766				
CN5 P1 J14 Adipo C°2 diff	41	24,0866985	24,083	6,187	0,014	4,639
	41	24,0794697				
CN5 P1 J14 Adipo C°3 ND	42	27,7751865	25,984	7,284	0,006	2,169
	42	24,1932545				
CN5 P1 J14 Adipo C°3 diff	43	24,3169231	24,345	5,781	0,018	6,149
	43	24,3721676				
CN6 J0 adipo	68	27,6957474	27,651	9,446	0,001	1,000
	68	27,6063862				
CN6 C°2 ND adipo	69	27,5557308	27,636	8,735	0,002	1,638
	69	27,715374				
CN6 C°2 Diff adipo	70	26,3508682	26,359	7,255	0,007	4,567
	70	26,3668175				
CN6 C°3 ND adipo	71	28,9423103	28,958	9,095	0,002	1,276
	71	28,9745312				
CN6 C°3 Diff adipo	72	26,4557133	26,467	7,150	0,007	4,911
	72	26,4780045				
CN7 vi J0 adipo	73	27,9058571	27,856	9,443	0,001	1,000
	73	27,8060665				
CN7 vi C°2 ND adipo	74	27,0905457	27,085	7,906	0,004	2,902
	74	27,0795021				
CN7 vi C°2 Diff adipo	75	27,5251274	27,525	8,285	0,003	2,233
	75	27,5251179				
CN7 vi C°3 ND adipo	76	28,7315998	28,765	9,127	0,002	1,245
	76	28,798769				
CN7 vi C°3 Diff adipo	77	28,4933529	28,411	9,004	0,002	1,356
	77	28,3288612				
CN7 sc J0 adipo	78	27,7385311	27,716	9,583	0,001	1,000
	78	27,6925793				
CN7 sc C°2 ND adipo	79	27,8311634	27,864	8,924	0,002	1,579
	79	27,8971481				
CN7 sc C°2 Diff adipo	80	26,6701279	26,742	6,962	0,008	6,150
	80	26,8132935				
CN7 sc C°3 ND adipo	81	27,7593021	27,715	7,616	0,005	3,908
	81	27,6703529				
CN7 sc C°3 Diff adipo	82	26,5602016	26,597	6,862	0,009	6,594
	82	26,6340351				

- FABP4

	Echantillons	CT	Moyenne	Delta CT	2exp(-delta CT)	Norm
<b>CN3 P2 J0 adipo</b>	1	31,65211487	31,574	14,058	0,000	1,000
	1	31,49557686				
<b>CN3 P2 J14 adipo C°1 ND</b>	4	31,30706406	31,113	13,382	0,000	1,598
	4	30,91954994				
<b>CN3 P2 J14 adipo C°1 diff</b>	3	26,63833427	26,568	9,962	0,001	17,105
	3	26,49855423				
<b>CN3 P2 J14 adipo C°2 ND</b>	5	31,0262146	30,895	12,735	0,000	2,502
	5	30,76401711				
<b>CN3 P2 J14 adipo C°2 diff</b>	6	28,05968475	27,406	9,994	0,001	16,721
	6	26,75177574				
<b>CN3 P2 J14 adipo C°3 ND</b>	7	33,08058167	32,662	13,380	0,000	1,600
	7	32,24245071				
<b>CN3 P2 J14 adipo C°3 diff</b>	8	30,4601326	30,652	11,808	0,000	4,755
	8	30,84486198				
<b>CN4 P1 J0 adipo</b>	30	27,77409363	27,639	9,550	0,001	1,000
	30	27,50328445				
<b>CN4 P1 J14 adipo C°1 ND</b>	31	29,63525009	29,189	10,551	0,001	0,500
	31	28,74303436				
<b>CN4 P1 J14 adipo C°1 diff</b>	32	24,79464722	24,987	6,329	0,012	9,325
	32	25,17925072				
<b>CN4 P1 J14 adipo C°2 ND</b>	33	30,21946526	30,826	12,460	0,000	0,133
	33	31,43313408				
<b>CN4 P1 J14 adipo C°2 diff</b>	34	22,82215881	23,008	4,602	0,041	30,870
	34	23,19379807				
<b>CN4 P1 J14 adipo C°3 ND</b>	35	30,83185959	30,727	10,687	0,001	0,455
	35	30,62307739				
<b>CN4 P1 J14 adipo C°3 diff</b>	36	23,39183044	23,380	3,667	0,079	59,000
	36	23,36758041				
<b>CN5 P1 J0 Adipo</b>	37	28,15245438	27,541	9,551	0,001	1,000
	37	26,92874527				
<b>CN5 P1 J14 Adipo C°1 ND</b>	38	30,49818039	29,894	11,182	0,000	0,323
	38	29,28900909				
<b>CN5 P1 J14 Adipo C°1 diff</b>	39	20,44754982	21,058	2,916	0,133	99,391
	39	21,66882515				
<b>CN5 P1 J14 Adipo C°2 ND</b>	40	29,00608444	28,989	10,479	0,001	0,526
	40	28,97109222				

	Echantillon	Ct	moyenne	Delta Ct	2exp(-deltaCt)	Norm
<b>CN5 P1 J14 Adipo C°2 diff</b>	41	20,00923538	20,119	2,223	0,214	160,634
	41	20,22852325				
<b>CN5 P1 J14 Adipo C°3 ND</b>	42	30,94748878	31,196	12,496	0,000	0,130
	42	31,44518089				
<b>CN5 P1 J14 Adipo C°3 diff</b>	43	22,46279716	22,056	3,492	0,089	66,640
	43	21,64955139				
<b>CN6 J0 adipo</b>	68	26,47781754	26,645	8,441	0,003	1,000
	68	26,81317902				
<b>CN6 C°2 ND adipo</b>	69	30,87344933	30,739	11,838	0,000	0,095
	69	30,60401726				
<b>CN6 C°2 Diff adipo</b>	70	25,07976913	25,060	5,956	0,016	5,598
	70	25,0394268				
<b>CN6 C°3 ND adipo</b>	71	31,50907516	31,357	11,494	0,000	0,121
	71	31,20427132				
<b>CN6 C°3 Diff adipo</b>	72	26,70401382	26,708	7,391	0,006	2,070
	72	26,71135712				
<b>CN7 vi J0 adipo</b>	73	25,90281105	25,951	7,538	0,005	1,000
	73	25,99935532				
<b>CN7 vi C°2 ND adipo</b>	74	25,30891037	25,342	6,163	0,014	2,594
	74	25,37472916				
<b>CN7 vi C°2 Diff adipo</b>	75	23,38904572	23,395	4,155	0,056	10,436
	75	23,40177727				
<b>CN7 vi C°3 ND adipo</b>	76	28,51216125	28,338	8,699	0,002	0,447
	76	28,16298676				
<b>CN7 vi C°3 Diff adipo</b>	77	26,70425987	26,689	7,281	0,006	1,195
	77	26,67315674				
<b>CN7 sc J0 adipo</b>	78	23,17509842	23,150	5,017	0,031	1,000
	78	23,12526703				
<b>CN7 sc C°2 ND adipo</b>	79	27,95437813	27,854	8,913	0,002	0,067
	79	27,75373459				
<b>CN7 sc C°2 Diff adipo</b>	80	25,46470833	25,440	5,661	0,020	0,640
	80	25,41571999				
<b>CN7 sc C°3 ND adipo</b>	81	31,48691177	31,524	11,425	0,000	0,012
	81	31,56018066				
<b>CN7 sc C°3 Diff adipo</b>	82	28,86497688	28,853	9,117	0,002	0,058
	82	28,84038544				

- LPL

	Echantillons	CT	Moyenne	Delta CT	2exp(-delta CT)	Norm
<b>CN3 P2 J0 adipo</b>	1	31,44146156	31,176	13,660	0,000	1,000
	1	30,91122818				
<b>CN3 P2 J14 adipo C°1 ND</b>	4	28,66547012	28,801	11,069	0,000	6,028
	4	28,935606				
<b>CN3 P2 J14 adipo C°1 diff</b>	3	22,93348122	22,742	6,135	0,014	184,246
	3	22,5500946				
<b>CN3 P2 J14 adipo C°2 ND</b>	5	31,03185272	30,724	12,563	0,000	2,139
	5	30,41555405				
<b>CN3 P2 J14 adipo C°2 diff</b>	6	21,40461349	21,930	4,519	0,044	564,852
	6	22,45558548				
<b>CN3 P2 J14 adipo C°3 ND</b>	7	28,03645897	28,506	9,225	0,002	21,643
	7	28,9760952				
<b>CN3 P2 J14 adipo C°3 diff</b>	8	25,02511597	24,891	6,047	0,015	195,811
	8	24,75740623				
<b>CN4 P1 J0 adipo</b>	30	25,22201729	25,403	7,314	0,006	1,000
	30	25,58298683				
<b>CN4 P1 J14 adipo C°1 ND</b>	31	28,03747749	27,512	8,874	0,002	0,339
	31	26,98611641				
<b>CN4 P1 J14 adipo C°1 diff</b>	32	26,69813347	26,799	8,141	0,004	0,564
	32	26,90008736				
<b>CN4 P1 J14 adipo C°2 ND</b>	33	28,59864044	28,714	10,348	0,001	0,122
	33	28,82912636				
<b>CN4 P1 J14 adipo C°2 diff</b>	34	20,91139221	21,059	2,652	0,159	25,304
	34	21,20582962				
<b>CN4 P1 J14 adipo C°3 ND</b>	35	25,74886894	25,772	5,732	0,019	2,994
	35	25,79460526				
<b>CN4 P1 J14 adipo C°3 diff</b>	36	22,23825455	22,293	2,581	0,167	26,593
	36	22,34813118				
<b>CN5 P1 J0 Adipo</b>	37	24,9950161	24,889	6,899	0,008	1,000
	37	24,78251076				
<b>CN5 P1 J14 Adipo C°1 ND</b>	38	27,30500221	27,123	8,411	0,003	0,351
	38	26,94053459				
<b>CN5 P1 J14 Adipo C°1 diff</b>	39	22,48932838	22,397	4,255	0,052	6,251
	39	22,30550575				
<b>CN5 P1 J14 Adipo C°2 ND</b>	40	27,91124725	27,944	9,434	0,001	0,173
	40	27,97613907				
<b>CN5 P1 J14 Adipo C°2 diff</b>	41	19,87443924	20,203	2,307	0,202	24,114
	41	20,53134346				

	Echantillon	Ct	moyenne	Delta Ct	2exp(-delatCt)	norm
<b>CN5 P1 J14 Adipo C°3 ND</b>	42	27,61005211	27,649	8,948	0,002	0,242
	42	27,68748665				
<b>CN5 P1 J14 Adipo C°3 diff</b>	43	23,10007477	23,133	4,569	0,042	5,027
	43	23,16605759				
<b>CN6 J0 adipo</b>	68	28,60471153	28,643	10,439	0,001	1,000
	68	28,68171883				
<b>CN6 C°2 ND adipo</b>	69	32,16641998	32,070	13,170	0,000	0,151
	69	31,97420502				
<b>CN6 C°2 Diff adipo</b>	70	22,2878685	22,322	3,219	0,107	149,068
	70	22,35701752				
<b>CN6 C°3 ND adipo</b>	71	29,44094276	29,398	9,535	0,001	1,871
	71	29,35568428				
<b>CN6 C°3 Diff adipo</b>	72	22,43125343	22,462	3,145	0,113	156,864
	72	22,49216843				
<b>CN7 vi J0 adipo</b>	73	27,04550552	27,043	8,630	0,003	1,000
	73	27,0395813				
<b>CN7 vi C°2 ND adipo</b>	74	29,66570091	29,400	10,221	0,001	0,332
	74	29,13425636				
<b>CN7 vi C°2 Diff adipo</b>	75	24,24285316	24,279	5,038	0,030	12,057
	75	24,31440544				
<b>CN7 vi C°3 ND adipo</b>	76	28,14565468	28,198	8,560	0,003	1,050
	76	28,25021553				
<b>CN7 vi C°3 Diff adipo</b>	77	24,92023277	24,936	5,528	0,022	8,582
	77	24,95181847				
<b>CN7 sc J0 adipo</b>	78	29,51761818	29,586	11,453	0,000	1,000
	78	29,65388298				
<b>CN7 sc C°2 ND adipo</b>	79	31,96344757	32,378	13,437	0,000	0,253
	79	32,79261017				
<b>CN7 sc C°2 Diff adipo</b>	80	23,27984047	23,313	3,533	0,086	242,081
	80	23,34628487				
<b>CN7 sc C°3 ND adipo</b>	81	30,74474525	30,977	10,879	0,001	1,489
	81	31,20997047				
<b>CN7 sc C°3 Diff adipo</b>	82	26,5344696	26,482	6,746	0,009	26,115
	82	26,42875099				

- **PPARY**

	Echantillons	CT	Moyenne	Delta CT	2exp(-delta CT)	Norm
CN3 P2 J0 adipo	1	31,92596626	31,829	14,313	0,000	1,000
	1	31,73200417				
CN3 P2 J14 adipo C°1 ND	4	30,22803497	30,766	13,034	0,000	2,427
	4	31,30319786				
CN3 P2 J14 adipo C°1 diff	3	31,23281479	31,641	15,035	0,000	0,606
	3	32,05008698				
CN3 P2 J14 adipo C°2 ND	5	28,46380234	28,470	10,310	0,001	16,035
	5	28,47678947				
CN3 P2 J14 adipo C°2 diff	6	32,06812668	32,225	14,813	0,000	0,707
	6	32,38161469				
CN3 P2 J14 adipo C°3 ND	7	32,60292053	31,900	12,618	0,000	3,237
	7	31,19699478				
CN3 P2 J14 adipo C°3 diff	8	33,31861496	32,620	13,775	0,000	1,452
	8	31,9206028				
CN4 P1 J0 adipo	30	29,00448418	29,072	10,983	0,000	1,000
	30	29,13889694				
CN4 P1 J14 adipo C°1 ND	31	27,72102737	27,562	8,925	0,002	4,165
	31	27,4036293				
CN4 P1 J14 adipo C°1 diff	32	28,27661514	28,501	9,843	0,001	2,204
	32	28,72506905				
CN4 P1 J14 adipo C°2 ND	33	27,51336861	27,406	9,040	0,002	3,845
	33	27,29920959				
CN4 P1 J14 adipo C°2 diff	34	28,84142876	28,771	10,365	0,001	1,534
	34	28,70131493				
CN4 P1 J14 adipo C°3 ND	35	28,74746513	29,113	9,073	0,002	3,759
	35	29,4781723				
CN4 P1 J14 adipo C°3 diff	36	29,45170784	29,530	9,817	0,001	2,243
	36	29,60795593				
CN5 P1 J0 Adipo	37	28,49071121	28,406	10,416	0,001	1,000
	37	28,32049561				
CN5 P1 J14 Adipo C°1 ND	38	27,52068329	27,651	8,939	0,002	2,784
	38	27,78047943				
CN5 P1 J14 Adipo C°1 diff	39	27,10861206	27,118	8,976	0,002	2,713
	39	27,12786293				
CN5 P1 J14 Adipo C°2 ND	40	25,38643837	25,465	6,955	0,008	11,011
	40	25,5428009				

	Echantillons	CT	Moyenne	Delta CT	2exp(-delta CT)	Norm
CN5 P1 J14 Adipo C°2 diff	41	27,70304489	27,622	9,726	0,001	1,613
	41	27,54061127				
CN5 P1 J14 Adipo C°3 ND	42	31,59332657	31,514	12,814	0,000	0,190
	42	31,43517685				
CN5 P1 J14 Adipo C°3 diff	43	28,91250801	28,849	10,285	0,001	1,095
	43	28,78552818				
CN6 J0 adipo	68	31,82819557	31,361	13,156	0,000	1,000
	68	30,89361191				
CN6 C°2 ND adipo	69	26,76351929	26,754	7,853	0,004	39,491
	69	26,74356461				
CN6 C°2 Diff adipo	70	31,02929497	31,659	12,556	0,000	1,516
	70	32,28952026				
CN6 C°3 ND adipo	71	30,34354973	30,105	10,242	0,001	7,539
	71	29,86649132				
CN6 C°3 Diff adipo	72	32,63510513	33,030	13,713	0,000	0,680
	72	33,42402649				
CN7 vi J0 adipo	73	30,36147499	30,191	11,779	0,000	1,000
	73	30,02117729				
CN7 vi C°2 ND adipo	74	27,75104904	27,864	8,685	0,002	8,537
	74	27,97622871				
CN7 vi C°2 Diff adipo	75	29,5479126	29,648	10,407	0,001	2,587
	75	29,74769402				
CN7 vi C°3 ND adipo	76	30,93900299	30,942	11,304	0,000	1,390
	76	30,94469261				
CN7 vi C°3 Diff adipo	77	31,90111732	32,299	12,891	0,000	0,462
	77	32,69692612				
CN7 sc J0 adipo	78	30,0220871	30,127	11,994	0,000	1,000
	78	30,23145676				
CN7 sc C°2 ND adipo	79	26,33000374	26,467	7,527	0,005	22,120
	79	26,60430527				
CN7 sc C°2 Diff adipo	80	32,11535263	32,010	12,231	0,000	0,849
	80	31,90515518				
CN7 sc C°3 ND adipo	81	28,48681641	28,372	8,274	0,003	13,176
	81	28,25810051				
CN7 sc C°3 Diff adipo	82	32,48431015	32,199	12,463	0,000	0,722
	82	31,9137249				

- **GADPH**

	Echantillons	CT	Moyenne
CN3 P2 J0 adipo	1	17,5143108	17,516
	1	17,5176678	
CN3 P2 J14 adipo C°1 ND	4	17,7194862	17,732
	4	17,7441158	
CN3 P2 J14 adipo C°1 diff	3	16,5946312	16,607
	3	16,6192169	
CN3 P2 J14 adipo C°2 ND	5	18,1093197	18,160
	5	18,2115765	
CN3 P2 J14 adipo C°2 diff	6	17,3493195	17,411
	6	17,4736252	
CN3 P2 J14 adipo C°3 ND	7	19,0227852	19,282
	7	19,5406647	
CN3 P2 J14 adipo C°3 diff	8	19,0009327	18,844
	8	18,6875191	
CN4 P1 J0 adipo	30	18,0610676	18,089
	30	18,1163654	
CN4 P1 J14 adipo C°1 ND	31	18,5960407	18,638
	31	18,6796036	
CN4 P1 J14 adipo C°1 diff	32	18,6552753	18,658
	32	18,6610031	
CN4 P1 J14 adipo C°2 ND	33	17,8591747	18,366
	33	18,8735733	
CN4 P1 J14 adipo C°2 diff	34	18,0711689	18,406
	34	18,7411041	
CN4 P1 J14 adipo C°3 ND	35	19,5252876	20,040
	35	20,5550423	
CN4 P1 J14 adipo C°3 diff	36	19,657156	19,712
	36	19,7675896	
CN5 P1 J0 Adipo	37	17,9425106	17,990
	37	18,0370998	
CN5 P1 J14 Adipo C°1 ND	38	18,7172985	18,712
	38	18,7065811	
CN5 P1 J14 Adipo C°1 diff	39	17,9452896	18,142
	39	18,3395863	
CN5 P1 J14 Adipo C°2 ND	40	18,3042583	18,510
	40	18,7152462	
CN5 P1 J14 Adipo C°2 diff	41	17,9164333	17,896
	41	17,8750057	
CN5 P1 J14 Adipo C°3 ND	42	18,6581631	18,700
	42	18,7426949	
CN5 P1 J14 Adipo C°3 diff	43	18,5924835	18,564
	43	18,5349255	
CN6 J0 adipo	68	18,2700615	18,205
	68	18,1391449	
CN6 C°2 ND adipo	69	18,869421	18,901
	69	18,931963	
CN6 C°2 Diff adipo	70	19,1022224	19,104
	70	19,1050892	

	Echantillons	CT	Moyenne
CN6 C°3 ND adipo	71	19,8347206	19,863
	71	19,8915367	
CN6 C°3 Diff adipo	72	19,3149509	19,316
	72	19,3179951	
CN7 vi J0 adipo	73	18,5000801	18,413
	73	18,3254185	
CN7 vi C°2 ND adipo	74	19,1667519	19,179
	74	19,1907291	
CN7 vi C°2 Diff adipo	75	19,2179871	19,241
	75	19,2631912	
CN7 vi C°3 ND adipo	76	19,609066	19,638
	76	19,667429	
CN7 vi C°3 Diff adipo	77	19,331646	19,408
	77	19,4834766	
CN7 sc J0 adipo	78	18,1177082	18,133
	78	18,1481438	
CN7 sc C°2 ND adipo	79	18,9356213	18,941
	79	18,9455032	
CN7 sc C°2 Diff adipo	80	19,830658	19,780
	80	19,7285156	
CN7 sc C°3 ND adipo	81	20,095232	20,098
	81	20,1016865	
CN7 sc C°3 Diff adipo	82	19,7479649	19,736
	82	19,723196	

## b) Ostéoblastique

- Osterix

	Echantillons	CT	Moyenne	Delta CT	2exp(-delta CT)	Norm
CN3 P2 J0 ostéo	13	27,84433365	27,759	10,195	0,001	1,000
	13	27,67435074				
CN3 P2 J21 ostéo C°4 ND	14	30,15649796	30,023	12,991	0,000	0,144
	14	29,8890419				
CN3 P2 J21 ostéo C°4 diff	13bis	29,56489563	29,461	12,538	0,000	0,197
	13bis	29,35687447				
CN3 P2 J21 C°3 ND	15	29,80809402	29,741	12,173	0,000	0,254
	15	29,67292404				
CN3 P2 J21 ostéo C°3 diff -BMP7	16	30,81962776	30,801	11,588	0,000	0,381
	16	30,78244019				
CN P2 J21 ostéo C°3 diff +BMP7	17	29,49263573	29,461	11,590	0,000	0,380
	17	29,42982101				
CN4 P1 J0 ostéo	18	28,86681175	28,652	11,587	0,000	1,000
	18	28,4379425				
CN4 P1 J21 ostéo C°1 ND	21	31,87952423	31,949	12,883	0,000	0,407
	21	32,01780319				
CN4 P1 J21 ostéo C°1 diff	22	35,0389595				
	22	33,68602371				
CN5 P1 J0 ostéo	29	28,21334267	28,151	9,705	0,001	1,000
	29	28,08887291				
CN5 P1 J21 ostéo C°1 ND	24	31,85389709	31,782	12,975	0,000	0,104
	24	31,71030426				
CN5 P1 J21 ostéo C°1 diff	25	29,17724609	29,309	10,833	0,001	0,458
	25	29,43989754				
CN6 J0 os	44	28,90712929	29,026	10,580	0,001	1,000
	44	29,14462852				
CN6 C°3 ND os	45	32,84939575	32,993	13,657	0,000	0,118
	45	33,13644028				
CN6 C°3 Diff -BMP7 os	46	33,51290131	33,510	14,220	0,000	0,080
	46	33,5079155				
CN6 C°3 Diff +BMP7 os	47	31,68203926	31,850	12,806	0,000	0,214
	47	32,01760864				
CN6 C°4 ND os	48	32,78659821	33,254	14,243	0,000	0,079
	48	33,72196198				
CN6 C°4 Diff -BMP7 os	49	32,70050049	32,712	13,696	0,000	0,115
	49	32,7226944				

	Echantillons	CT	Moyenne	Delta CT	2exp(-delta CT)	Norm
CN6 C°4 Diff +BMP7 os	50	32,6772995	32,628	14,035	0,000	0,091
	50	32,57869339				
CN7 vi J0 os	51	29,14083862	29,115	10,674	0,001	1,000
	51	29,08889389				
CN7 vi C°3 ND os	52	30,31399918	30,254	11,197	0,000	0,696
	52	30,19453049				
CN7 vi C°3 Diff -BMP7 os	53	29,77061844	29,746	10,434	0,001	1,181
	53	29,72070122				
CN7 vi C°3 Diff +BMP7 os	54	29,61269951	29,604	10,414	0,001	1,198
	54	29,5947094				
CN7 vi C°4 ND os	55	30,54214096	30,624	12,929	0,000	0,210
	55	30,70648193				
CN7 vi C°4 Diff -BMP7 os	56	30,30984306	30,367	11,304	0,000	0,646
	56	30,42389679				
CN7 vi C°4 Diff +BMP7 os	57	30,2244606	30,317	11,304	0,000	0,646
	57	30,40917587				
CN7 sc J0 os	58	29,04872704	29,061	10,942	0,001	1,000
	58	29,0738163				
CN7 sc C°4 ND os	59	32,90818405	32,989	14,207	0,000	0,104
	59	33,07007599				
CN7 sc C°4 Diff -BMP7 os	60	33,62719727	33,535	14,523	0,000	0,084
	60	33,44248581				
CN7 sc C°4 Diff +BMP7 os	61	34,82328033	34,781	16,082	0,000	0,028
	61	34,73826599				

- BSP

	Echantil- lons	CT	Moyen- ne	Delta CT	2exp(-delta CT)	Norm
CN3 P2 J0 ostéo	13	33,1259346	33,126	15,561	0,000	1,000
	13	Undetermined				
CN3 P2 J21 ostéo C°4 ND	14	38,70634079	38,706	21,675	0,000	0,014
	14	Undetermined				
CN3 P2 J21 ostéo C°4 diff	13bis	Undetermined	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0! !
	13bis	Undetermined				
CN3 P2 J21 C°3 ND	15	38,28863144	38,289	20,721	0,000	0,028
	15	Undetermined				
CN3 P2 J21 ostéo C°3 diff -BMP7	16	Undetermined	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0! !
	16	Undetermined				
CN3P2 J21 ostéo C°3 diff +BMP7	17	34,12989426	35,409	17,538	0,000	0,254
	17	36,68869781				
CN4 P1 J0 ostéo	18	36,86315918	38,349	21,284	0,000	1,000
	18	39,83509064				
CN4 P1 J21 ostéo C°1 ND	21	35,15483093	35,155	16,089	0,000	
	21	Undetermined				
CN4 P1 J21 ostéo C°1 diff	22	37,21917725	35,671	35,671	0,000	
	22	34,12315369				
CN5 P1 J0 ostéo	29	34,68667984	34,687	16,241	0,000	1,000
	29	Undetermined				
CN5 P1 J21 ostéo C°1 ND	24	Undetermined	34,601	15,795	0,000	1,362
	24	34,60146713				
CN5 P1 J21 ostéo C°1 diff	25	34,2723732	35,080	16,604	0,000	0,777
	25	35,88710022				
CN6 J0 os	44	33,84852219	33,838	15,392	0,000	1,000
	44	33,82846069				
CN6 C°3 ND os	45	Undetermined	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0! !
	45	Undetermined				
CN6 C°3 Diff -BMP7 os	46	Undetermined	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0! !
	46	Undetermined				
CN6 C°3 Diff +BMP7 os	47	Undetermined	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0! !
	47	Undetermined				
CN6 C°4 ND os	48	Undetermined	35,995	16,984	0,000	0,332
	48	35,9953804				
CN6 C°4 Diff -BMP7 os	49	37,48252869	38,383	19,367	0,000	0,064
	49	39,28274536				
CN6 C°4 Diff +BMP7 os	50	Undetermined	36,636	18,043	0,000	0,159
	50	36,63616562				

	Echantil- lons	CT	Moyen- ne	Delta CT	2exp(-delta CT)	Norm
CN7 vi J0 os	51	34,46126175	34,461	16,021	0,000	1,000
	51	Undetermined				
CN7 vi C°3 ND os	52	37,29990768	37,300	18,243	0,000	0,214
	52	Undetermined				
CN7 vi C°3 Diff -BMP7 os	53	Undetermined	34,864	15,552	0,000	1,383
	53	34,8637886				
CN7 vi C°3 Diff +BMP7 os	54	Undetermined	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0! !
	54	Undetermined				
CN7 vi C°4 ND os	55	Undetermined	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0! !
	55	Undetermined				
CN7 vi C°4 Diff -BMP7 os	56	37,05794144	37,058	17,995	0,000	0,254
	56	Undetermined				
CN7 vi C°4 Diff +BMP7 os	57	35,33760071	35,338	16,325	0,000	0,810
	57	Undetermined				
CN7 sc J0 os	58	34,59989548	34,707	16,588	0,000	1,000
	58	34,81504822				
CN7 sc C°4 ND os	59	35,53971863	35,727	16,945	0,000	0,781
	59	35,91503143				
CN7 sc C°4 Diff -BMP7 os	60	Undetermined	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0! !
	60	Undetermined				
CN7 sc C°4 Diff +BMP7 os	61	Undetermined	39,223	20,524	0,000	0,065
	61	39,22327042				

- GADPH

	Echantillons	CT	Moyenne
CN3 P2 J0 ostéo	13	17,3280544	17,565
	13	17,8013859	
CN3 P2 J21 ostéo C°4 ND	14	16,9973545	17,032
	14	17,0662842	
CN3 P2 J21 ostéo C°4 diff	13bis	16,6548977	16,923
	13bis	17,1915035	
CN3 P2 J21 C°3 ND	15	17,8197594	17,568
	15	17,3158875	
CN3 P2 J21 ostéo C°3 diff -BMP7	16	18,7879372	19,213
	16	19,6378841	
CN3 P2 J21 ostéo C°3 diff +BMP7	17	18,0895977	17,871
	17	17,6533985	
CN4 P1 J0 ostéo	18	16,4365425	17,065
	18	17,6937008	
CN4 P1 J21 ostéo C°1 ND	21	18,5729618	19,066
	21	19,5583382	
CN4 P1 J21 ostéo C°1 diff	22	34,2251396	
	22	34,0962219	
CN5 P1 J0 ostéo	29	18,7382374	18,446
	29	18,1536121	
CN5 P1 J21 ostéo C°1 ND	24	18,0062923	18,807
	24	19,6073418	
CN5 P1 J21 ostéo C°1 diff	25	17,8753891	18,476
	25	19,0760822	
CN6 J0 os	44	18,6177845	18,446
	44	18,2745266	
CN6 C°3 ND os	45	19,3071766	19,336
	45	19,3650742	
CN6 C°3 Diff -BMP7 os	46	19,3357124	19,291
	46	19,2459259	
CN6 C°3 Diff +BMP7 os	47	19,0326614	19,043
	47	19,0539989	
CN6 C°4 ND os	48	19,0272636	19,012
	48	18,9959774	
CN6 C°4 Diff -BMP7 os	49	19,051075	19,015
	49	18,9796677	
CN6 C°4 Diff +BMP7 os	50	18,6270218	18,593
	50	18,5596046	
CN7 vi J0 os	51	18,4440098	18,441
	51	18,437252	
CN7 vi C°3 ND os	52	19,0361614	19,057
	52	19,0785427	
CN7 vi C°3 Diff -BMP7 os	53	19,2788792	19,311
	53	19,3439445	
CN7 vi C°3 Diff +BMP7 os	54	19,1497784	19,190
	54	19,2304211	
CN7 vi C°4 ND os	55	17,6391201	17,695
	55	17,7512379	

	Echantillons	CT	Moyenne
CN7 vi C°4 Diff -BMP7 os	56	19,1917725	19,062
	56	18,9331951	
CN7 vi C°4 Diff +BMP7 os	57	18,9952946	19,013
	57	19,0300331	
CN7 sc J0 os	58	18,1035442	18,119
	58	18,1345005	
CN7 sc C°4 ND os	59	18,7764225	18,782
	59	18,7882977	
CN7 sc C°4 Diff -BMP7 os	60	18,9874496	19,012
	60	19,0371437	
CN7 sc C°4 Diff +BMP7 os	61	18,7096272	18,699
	61	18,6884441	

c) Chondrocytaire

- Aggrecan

	Echantillons	CT	Moyenne	Delta CT	2exp(-delta CT)	Norm
CN3 P2 J0 chondro	2	30,61547852	30,438	13,265	0,00010	1,000
	2	30,26116562				
CN2 P2 J14 chondro ND	9	31,59464073	31,512	13,361	0,00010	0,936
	9	31,42927742				
CN2 P2 J14 chondro diff	12	32,36222458	32,269	15,714	0,00002	0,183
	12	32,17544556				
CN3 P2 J14 chondro ND	11	31,65685844	31,638	14,633	0,00004	0,388
	11	31,6185379				
CN3 P2 J14 chondro diff	10	33,56870651	33,132	15,876	0,00002	0,164
	10	32,6943779				
CN6 ND chondro	62	36,11678696	35,967	17,539	0,00001	0,052
	62	35,81771851				
CN6 diff chondro	63	34,34915161	34,551	17,190	0,00001	0,066
	63	34,75340652				
CN7 vi ND chondro	64	33,84885788	34,368	16,046	0,00001	0,145
	64	34,88669205				
CN7 vi diff chondro	65	33,05887985	33,475	16,041	0,00001	0,146
	65	33,89144135				
CN7 sc ND chondro	66	36,07144165	35,344	17,675	0,00000	0,047
	66	34,61621475				
CN7 sc diff chondro	67	32,94234848	32,605	14,390	0,00005	0,459
	67	32,26759338				

- COL10A1

	Echantillons	CT	Moyenne	Delta CT	2exp(-delta CT)	Norm
CN3 P2 J0 chondro	2	29,37411499	29,348	12,175	0,000	1,000
	2	29,32122612				
CN2 P2 J14 chondro ND	9	31,97974968	31,933	13,782	0,000	0,328
	9	31,88667297				
CN2 P2 J14 chondro diff	12	30,5655899	30,217	13,662	0,000	0,357
	12	29,86812973				
CN3 P2 J14 chondro ND	11	29,89165115	29,946	12,941	0,000	0,588
	11	30,00046539				
CN3 P2 J14 chondro diff	10	30,05394173	30,298	13,043	0,000	0,548
	10	30,54291344				
CN6 ND chondro	62	31,12869072	31,181	12,753	0,000	0,670
	62	31,23339653				
CN6 diff chondro	63	31,11661911	31,022	13,660	0,000	0,357
	63	30,92716217				
CN7 vi ND chondro	64	30,99062347	31,471	13,150	0,000	0,509
	64	31,95155144				
CN7 vi diff chondro	65	31,10808372	31,097	13,662	0,000	0,357
	65	31,08521461				
CN7 sc ND chondro	66	31,9454174	31,879	14,210	0,000	0,244
	66	31,81282616				
CN7 sc diff chondro	67	31,90110397	31,517	13,302	0,000	0,458
	67	31,13233757				

- Sox 9

	Echantillons	CT	Moyenne	Delta CT	2exp(-delta CT)	Norm
CN3 P2 J0 chondro	2	26,54984283	26,528	9,355	0,002	1,000
	2	26,50710678				
CN2 P2 J14 chondro ND	9	26,68485641	26,614	8,463	0,003	1,856
	9	26,54269791				
CN2 P2 J14 chondro diff	12	28,70427132	28,624	12,069	0,000	0,152
	12	28,54297829				
CN3 P2 J14 chondro ND	11	28,42539787	28,488	11,483	0,000	0,229
	11	28,55098152				
CN3 P2 J14 chondro diff	10	31,9178772	32,373	15,118	0,000	0,018
	10	32,8284874				
CN6 ND chondro	62	27,85643005	27,874	9,445	0,001	0,939
	62	27,8908844				
CN6 diff chondro	63	29,18956184	29,196	11,834	0,000	0,179
	63	29,20211792				
CN7 vi ND chondro	64	26,92002296	26,905	8,584	0,003	1,707
	64	26,89025307				
CN7 vi diff chondro	65	29,70270729	29,752	12,318	0,000	0,128
	65	29,8012619				
CN7 sc ND chondro	66	28,99860573	29,170	11,501	0,000	0,226
	66	29,34048462				
CN7 sc diff chondro	67	27,55464172	27,646	9,431	0,001	0,949
	67	27,73707962				

- PPAR $\gamma$

	Echantillons	CT	Moyenne	Delta CT	2exp(-delta CT)	Norm
CN3 P2 J0 chondro	2	33,21959305	33,299	16,125	0,000	1,000
	2	33,37762451				
CN2 P2 J14 chondro ND	9	31,57367134	31,218	13,067	0,000	8,331
	9	30,86202049				
CN2 P2 J14 chondro diff	12	31,19074821	31,124	14,570	0,000	2,940
	12	31,05821609				
CN3 P2 J14 chondro ND	11	30,24290085	29,974	12,969	0,000	8,915
	11	29,70556259				
CN3 P2 J14 chondro diff	10	33,8860054	33,677	16,422	0,000	0,814
	10	33,46848679				
CN6 ND chondro	62	29,5708847	29,417	10,989	0,000	35,177
	62	29,26342392				
CN6 diff chondro	63	33,13119507	33,460	16,099	0,000	1,019
	63	33,78961945				
CN7 vi ND chondro	64	30,94952965	31,006	12,685	0,000	10,858
	64	31,06306267				
CN7 vi diff chondro	65	32,56759644	33,187	15,753	0,000	1,295
	65	33,80604935				
CN7 sc ND chondro	66	32,86226273	32,952	15,283	0,000	1,793
	66	33,04188538				
CN7 sc diff chondro	67	27,84728622	27,948	9,733	0,001	84,003
	67	28,04863167				

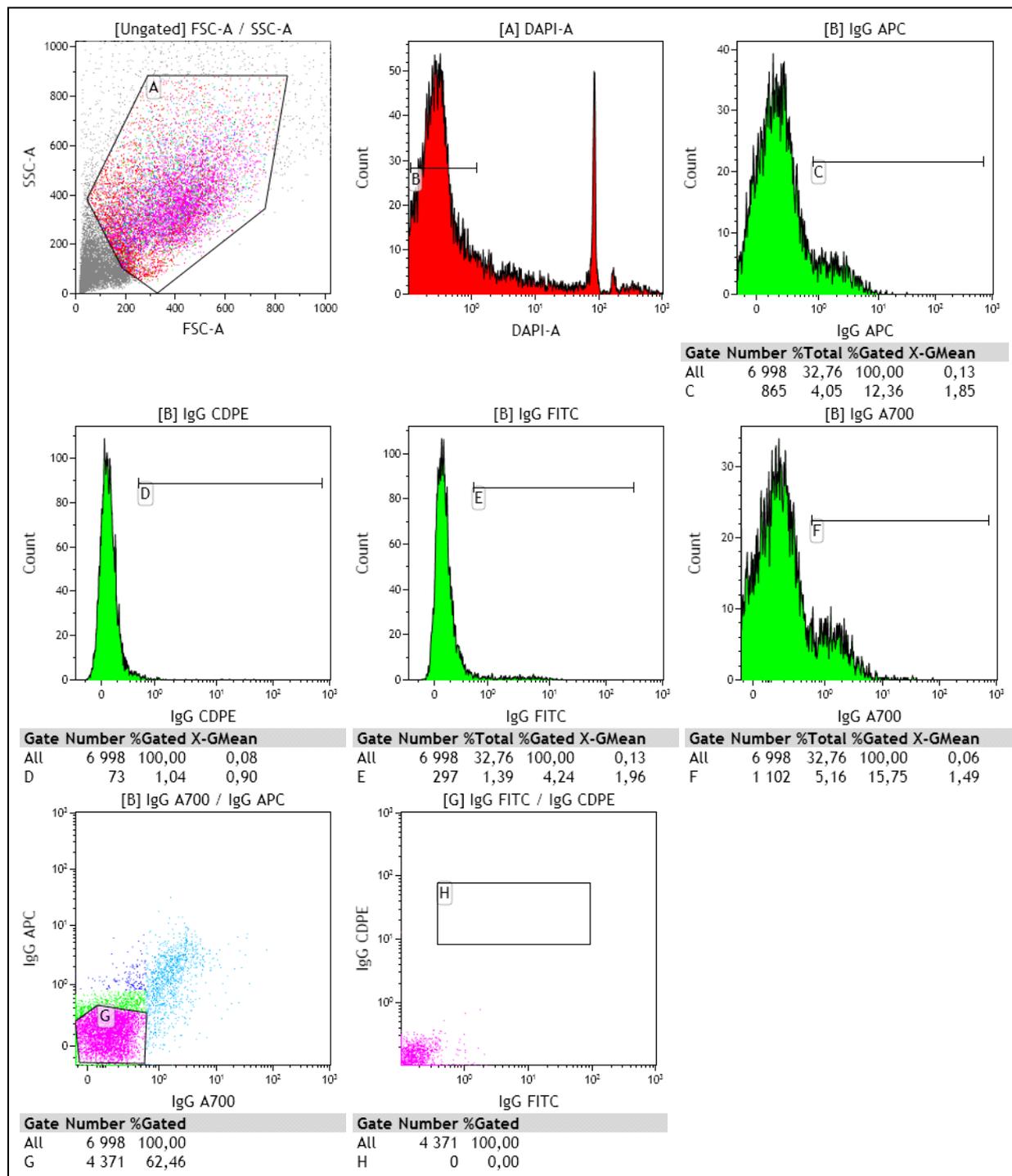
- GADPH

	Echantillons	CT	Moyenne
CN3 P2 J0 chondro	2	17,1239948	17,173
	2	17,2222843	
CN2 P2 J14 chondro ND	9	17,8473816	18,151
	9	18,4543915	
CN2 P2 J14 chondro diff	12	16,4295464	16,555
	12	16,6803513	
CN3 P2 J14 chondro ND	11	16,8929176	17,005
	11	17,1171513	
CN3 P2 J14 chondro diff	10	17,299757	17,255
	10	17,2106724	
CN6 ND chondro	62	18,4426174	18,428
	62	18,4138947	
CN6 diff chondro	63	17,3315258	17,362
	63	17,391716	
CN7 vi ND chondro	64	18,2953129	18,322
	64	18,347765	
CN7 vi diff chondro	65	17,3419914	17,434
	65	17,52631	
CN7 sc ND chondro	66	17,6052265	17,669
	66	17,7325211	
CN7 sc diff chondro	67	18,2011948	18,215
	67	18,2285194	

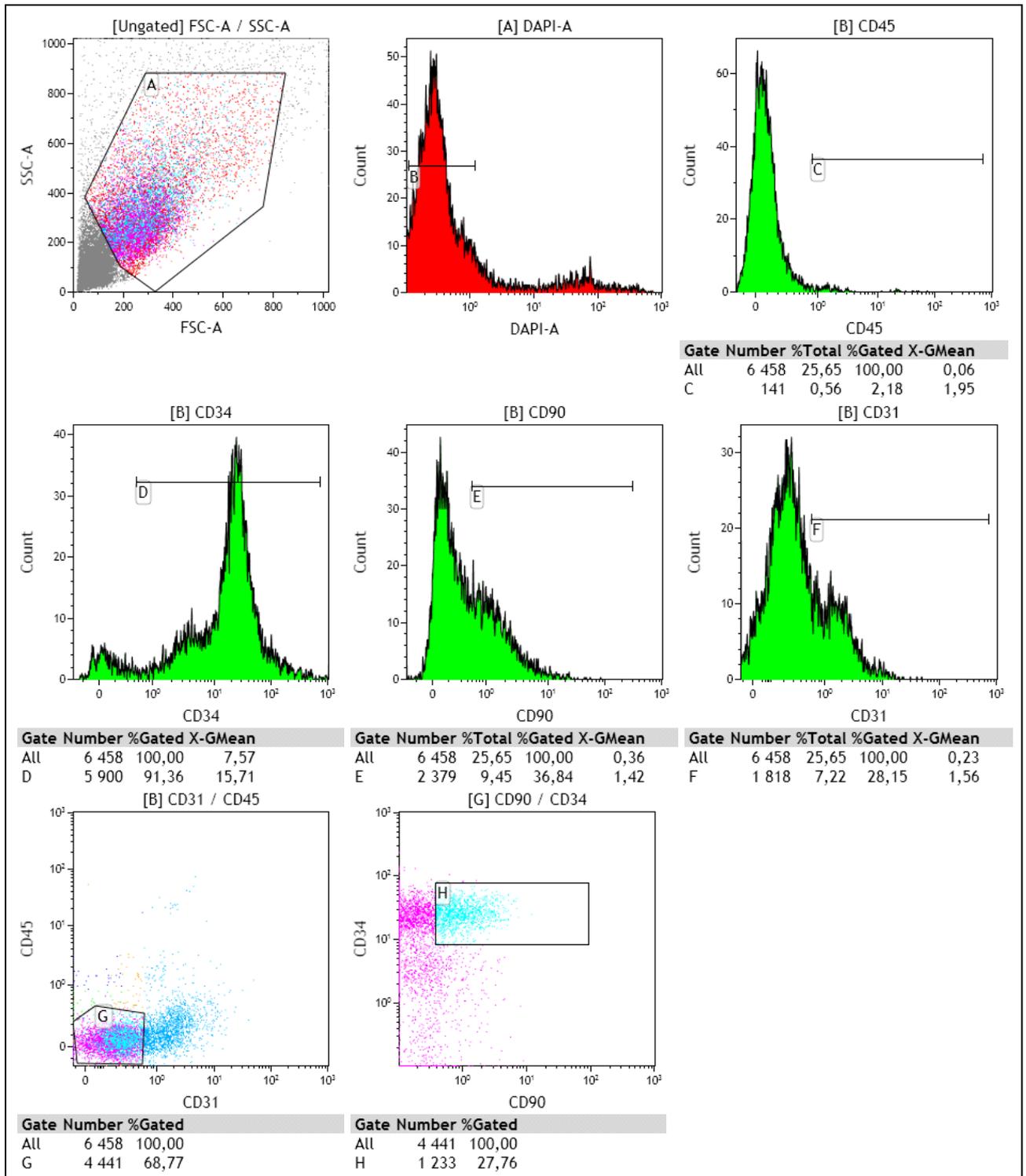
## Annexe 17: résultats des analyses par cytométrie de flux

### a) Résultats sur la SVF de la chienne 8

- Analyse isotypique

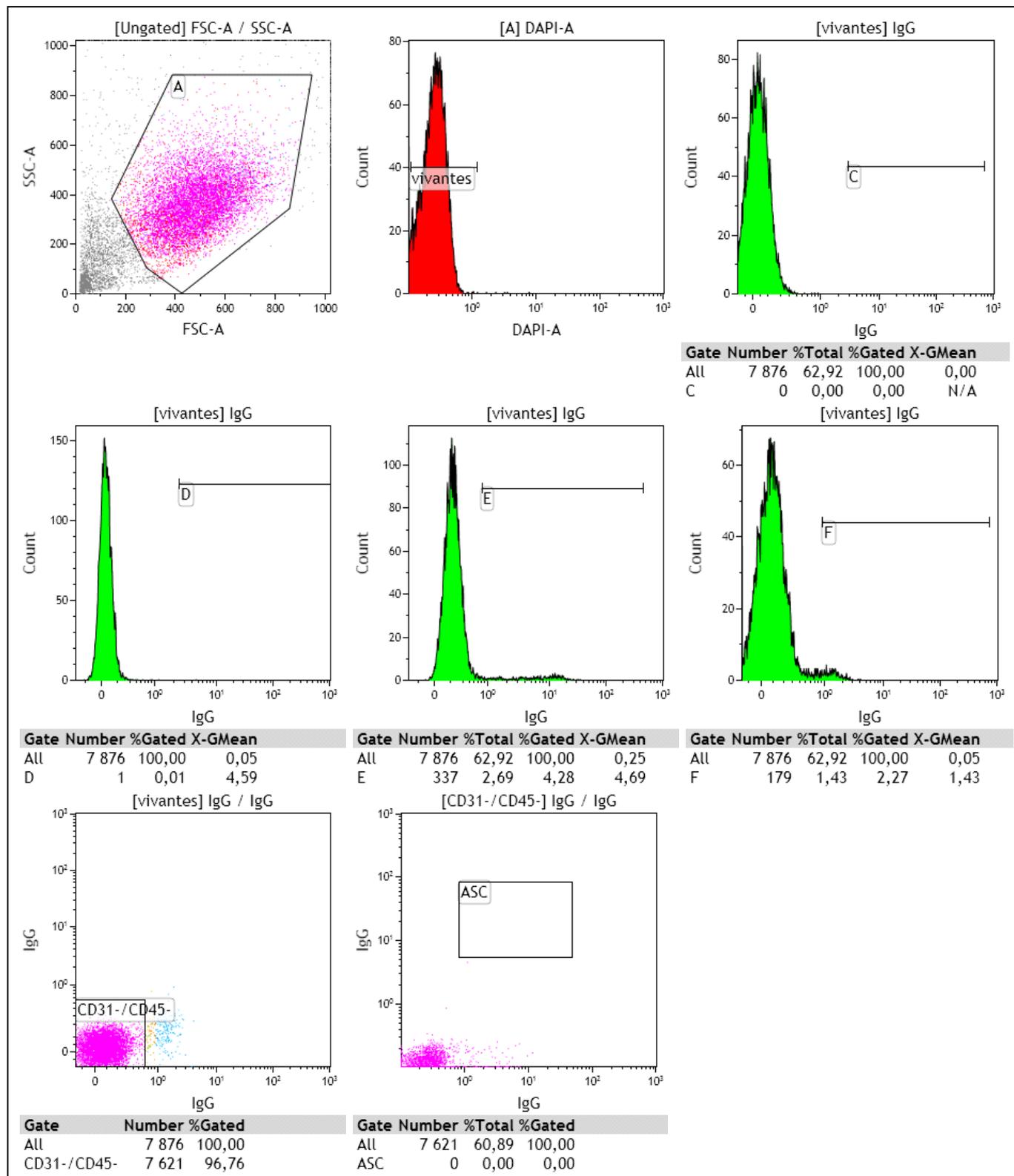


• Marquage

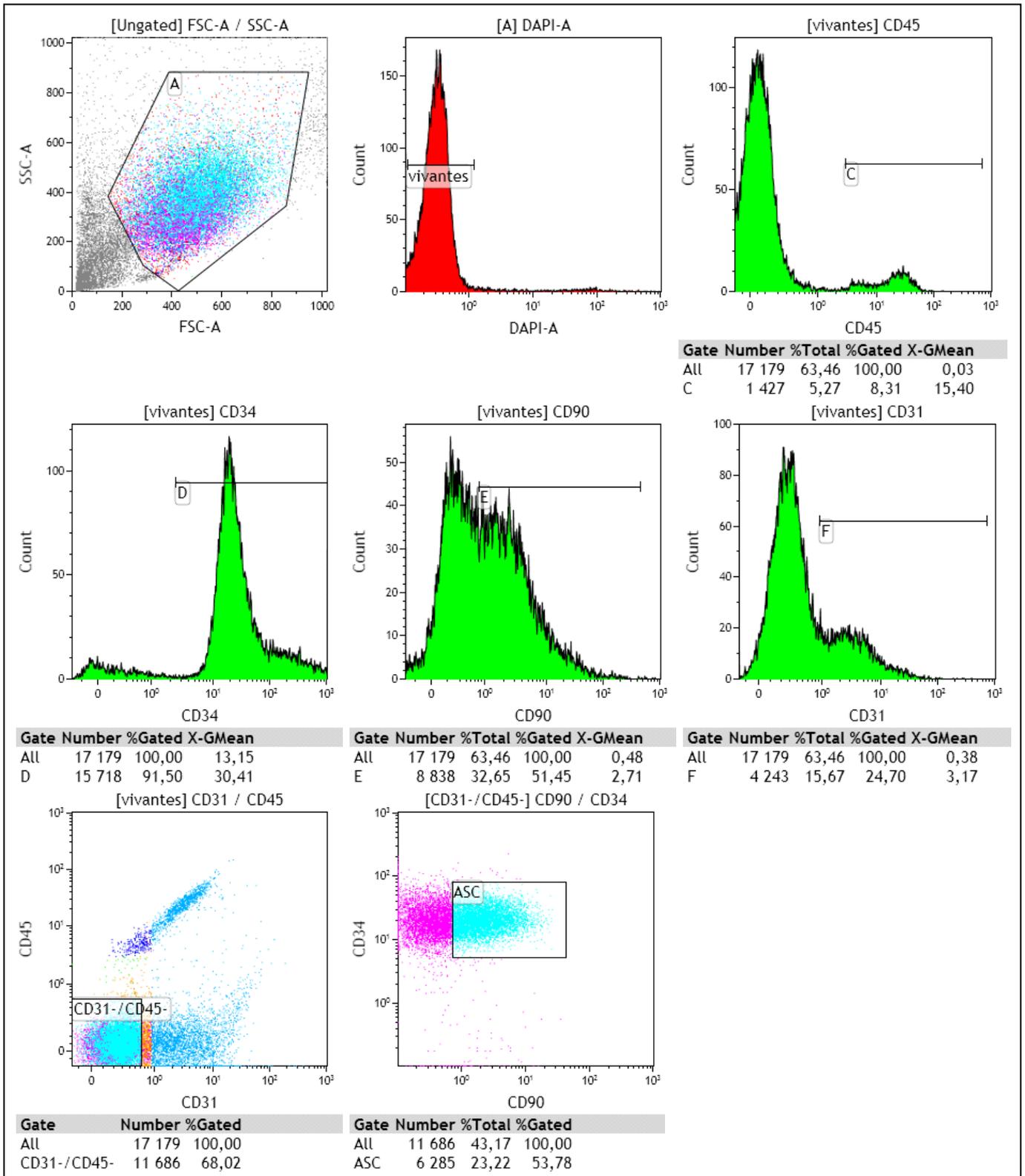


## b) Résultats sur la SVF de la chienne 9

- Analyse isotypique

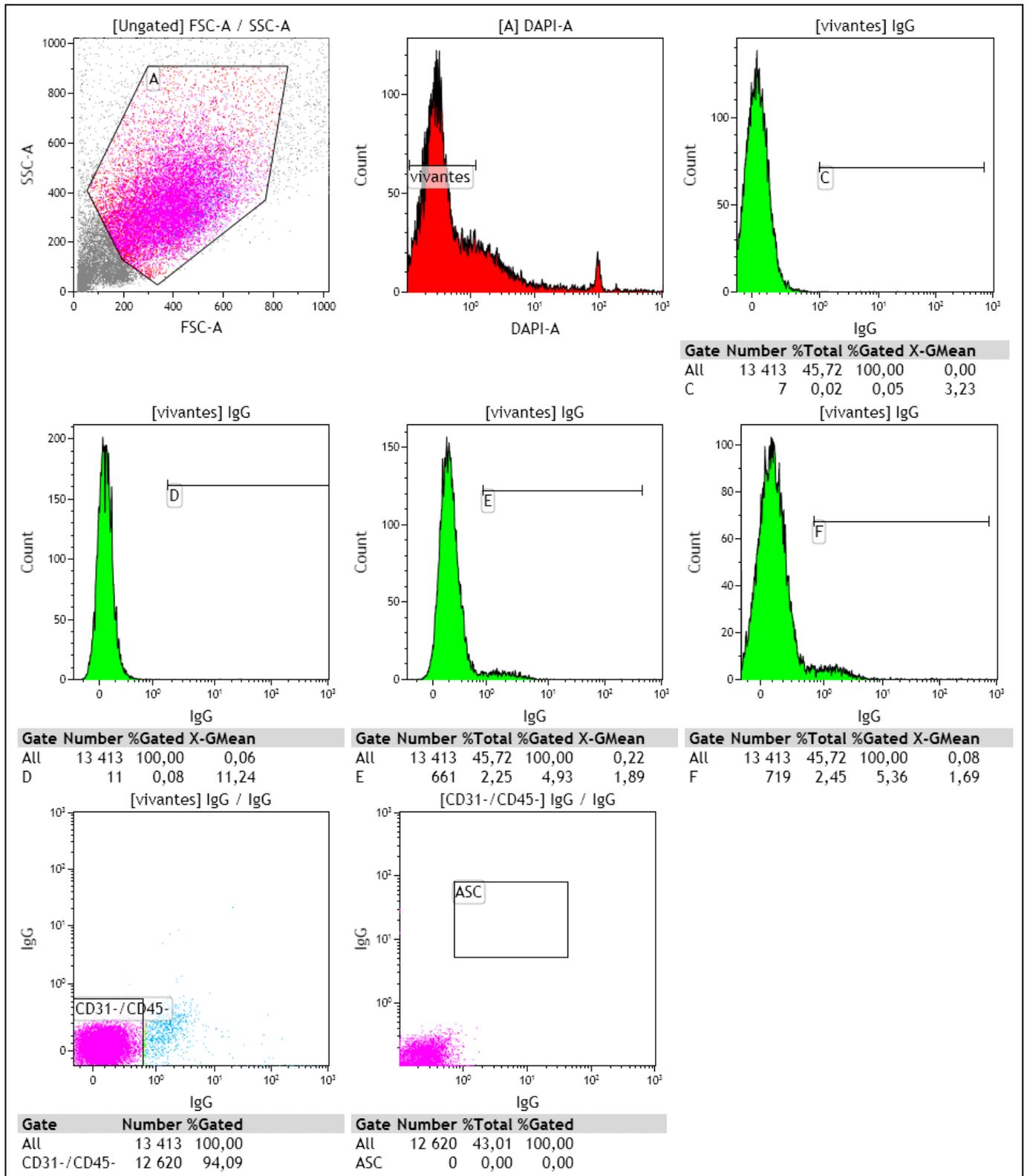


• Marquage

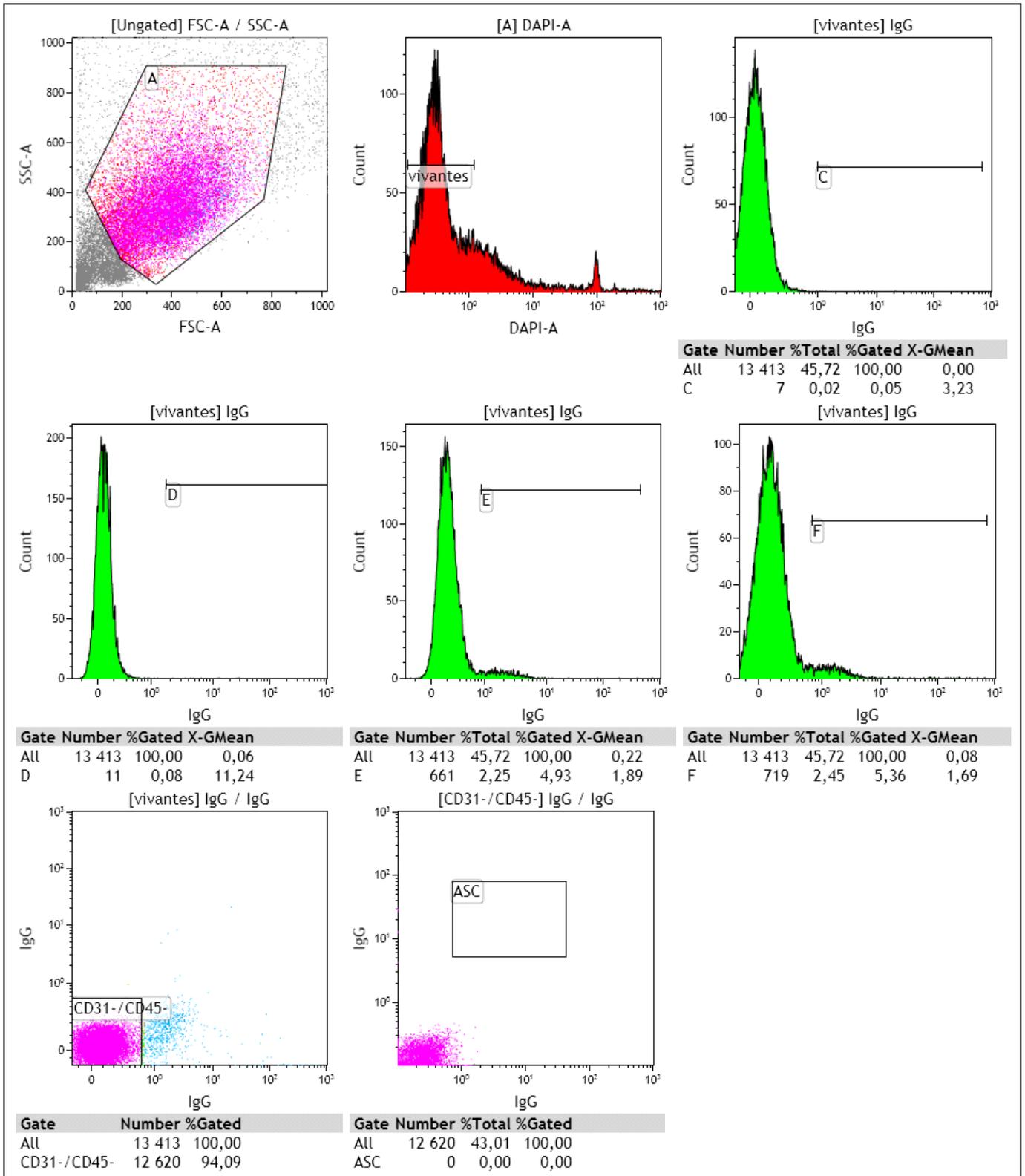


c) Résultats sur la SVF de la chienne 10

- Analyse isotypique

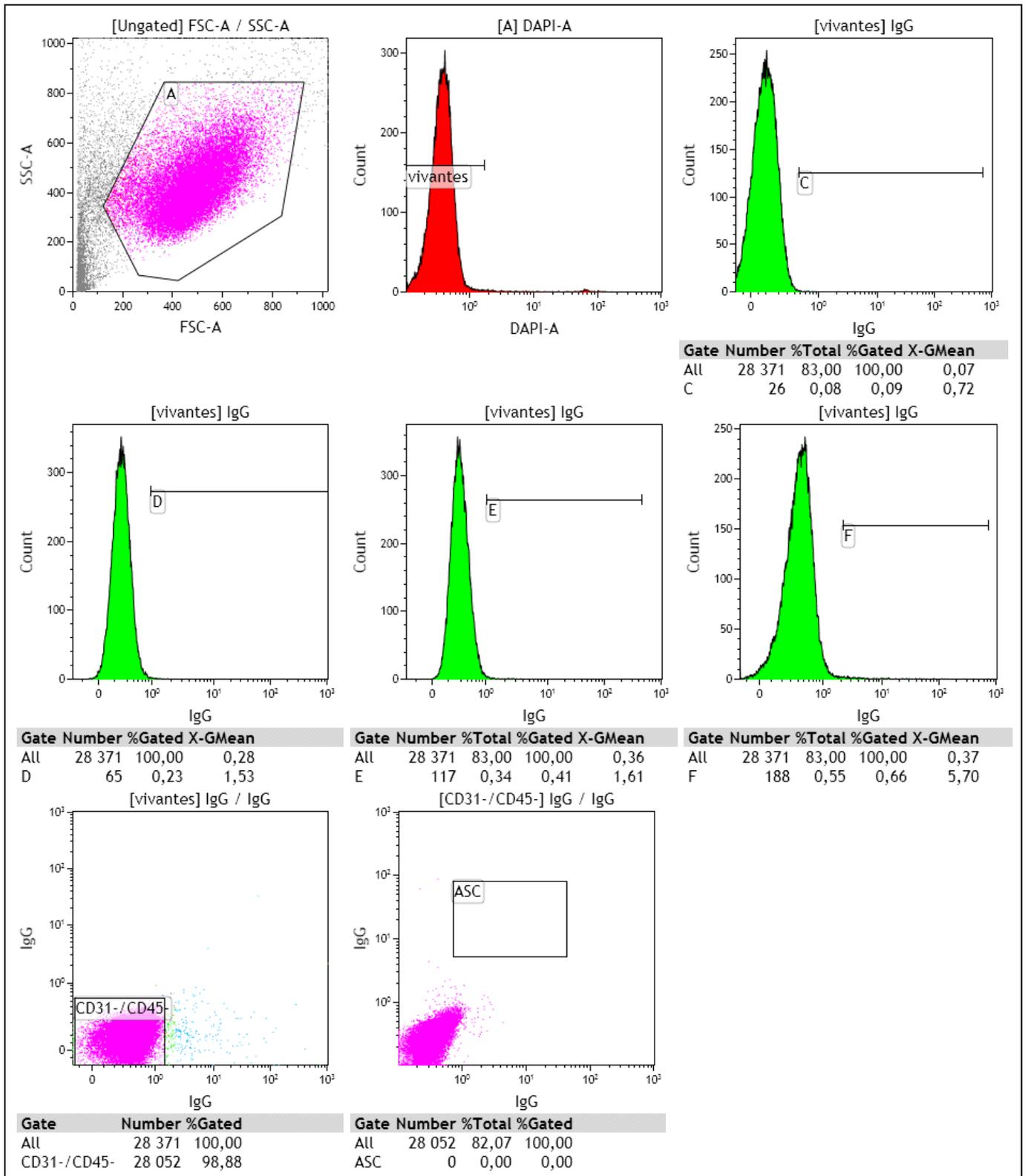


- Marquage

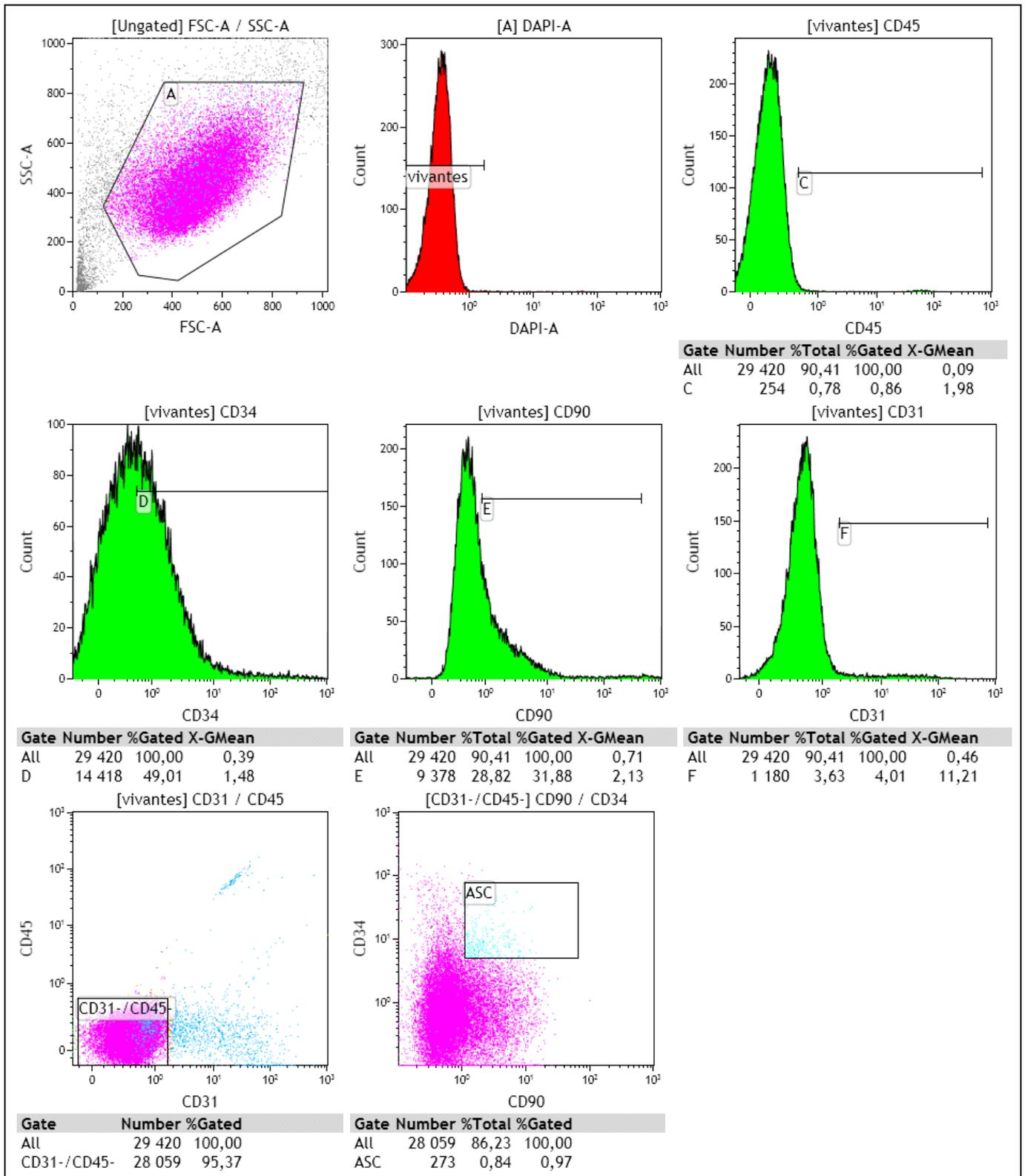


d) Résultats sur les ASCs P0 de la chienne 10 (4<sup>ème</sup> jour)

- Analyse isotypique

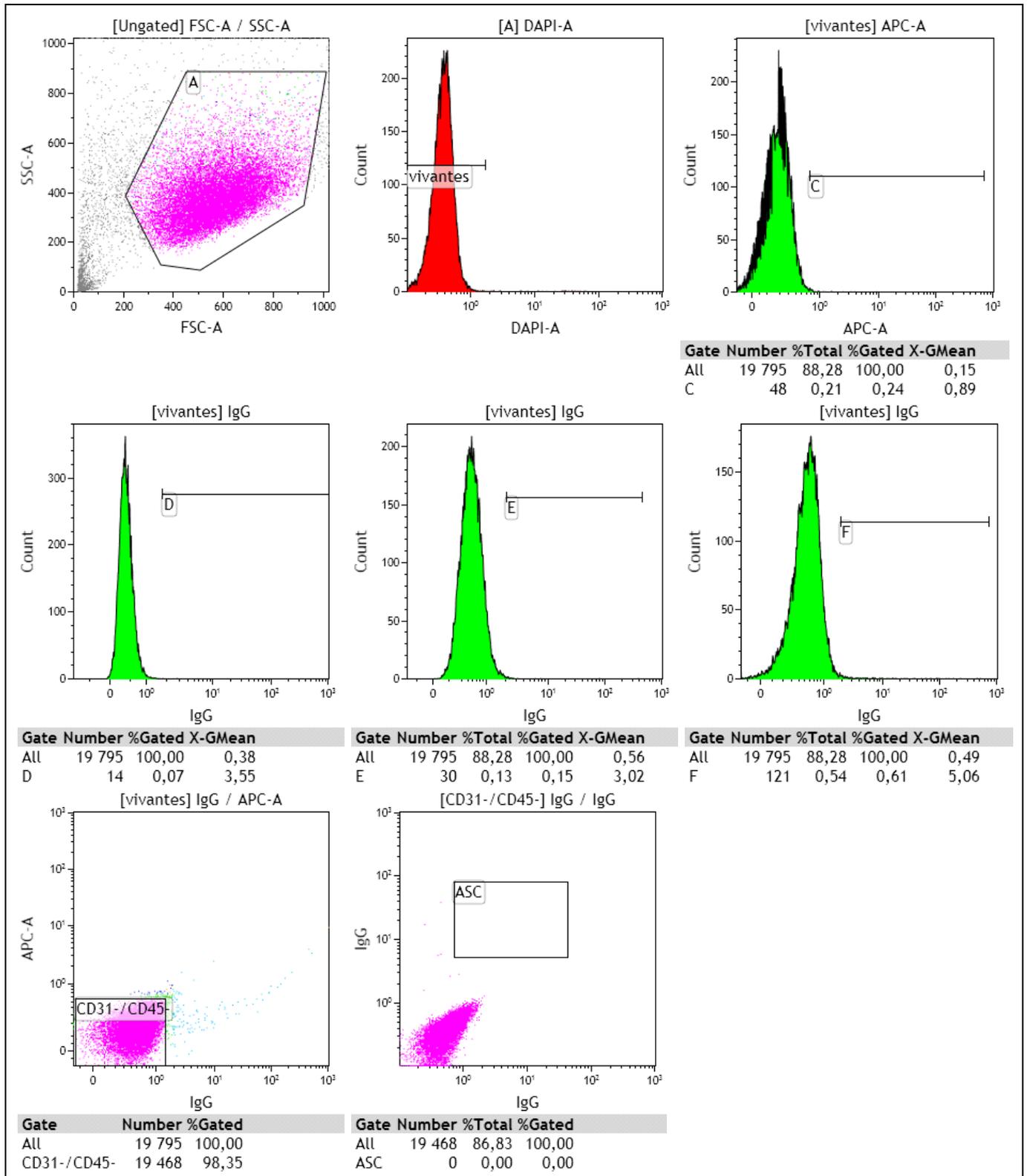


- Marquage

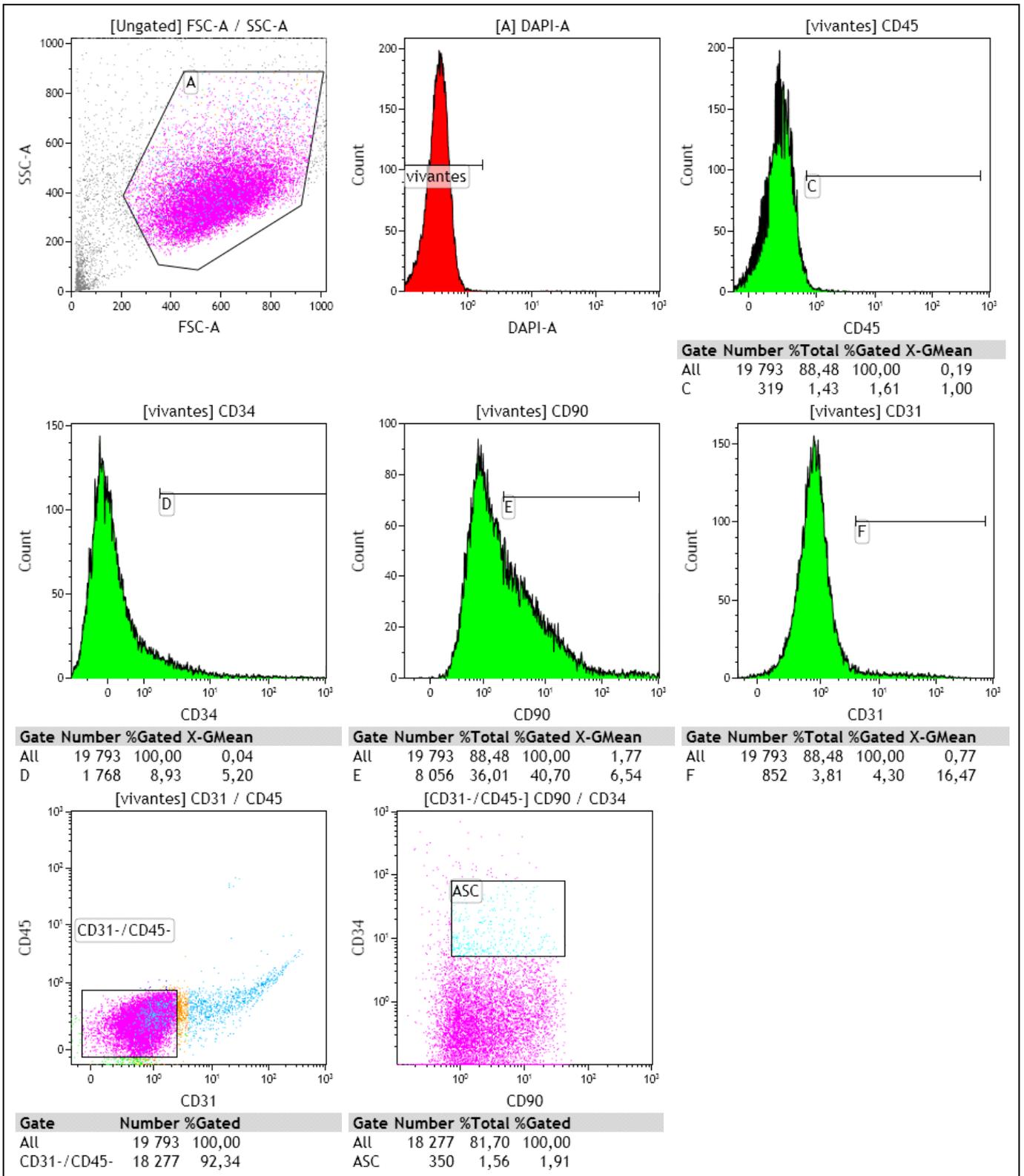


e) Résultats sur les ASCs P1 de la chienne 10 (8<sup>ème</sup> jour)

- Analyse isotypique



- Marquage



**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

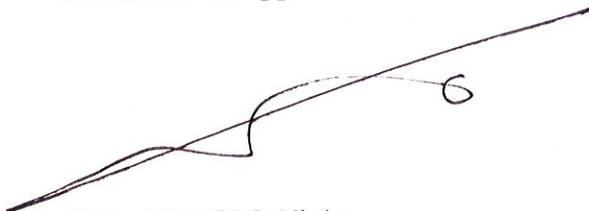
**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussignée, isabelle RAYMOND-LETRON, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **DORDOLO Alizée** intitulée « **Validation de la production et de la caractérisation des cellules souches mésenchymateuse canines dérivées du tissu adipeux (ASC).**» et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 8 novembre 2016  
Docteur Isabelle RAYMOND-LETRON  
*Maître de Conférences*  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Philippe KEMOUN



Melle DORDOLO Alizée  
a été admis(e) sur concours en : 2011  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2015  
a validé son année d'approfondissement le : 03/11/2016  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Vu :  
La Directrice de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Isabelle CHMITELIN



Vu et autorisation de l'impression :  
Président de l'Université  
Paul Sabatier  
Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier  
par délégation,  
La Vice-Présidente de la CFVU

Régine ANDRE-OBRECHT





**NOM** : DORDOLO

**PRENOM** : Alizée

**TITRE** : VALIDATION DE LA PRODUCTION ET DE LA CARACTERISATION DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES CANINES DERIVEES DE TISSU ADIPEUX

**RESUME** : L'accessibilité et la quantité de tissu disponible font du dépôt adipeux une source de cellules souches mésenchymateuses attractive. Les cellules souches dérivées de tissu adipeux (ASCs) canines ont déjà été étudiées dans des essais précliniques comme modèle pour l'espèce humaine ou dans des essais thérapeutiques chez le chien, avec des résultats prometteurs. Elles sont caractérisées par leur capacité d'adhésion au plastique, de prolifération et de différenciation en plusieurs lignages car leur caractérisation immunophénotypique n'est pas encore précise. Nous avons étudié des ASCs canines dérivées de tissu adipeux prélevé lors de chirurgies de stérilisation de chiennes réalisées à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse en nous appuyant sur les protocoles de production des ASCs humaines de l'unité STROMALab. Nous avons cultivé des ASCs canines présentant une morphologie fibroblastique et nous avons étudié leur potentiel de différenciation adipocytaire, ostéoblastique et chondrogénique ainsi que l'immunophénotype CD31-/CDC45-/CD90+/CD34+. Les ASCs canines ont présenté un potentiel de prolifération plus important que les ASCs humaines mais leur caractérisation est à poursuivre en révisant nos protocoles de différenciation et en continuant l'étude de leur immunophénotype.

**MOTS CLES** : cellules souches mésenchymateuses adipeuses (ASC), chien, culture cellulaire, caractérisation, médecine régénérative

---

**TITLE**: VALIDATION OF CANINE MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM ADIPOSE TISSUE PRODUCTION AND CHARACTERISATION

**ABSTRACT**: The availability and the ease of tissue collection of fat depots have made adipose tissue an attractive stem cells source. Canine adipose derived stem cells (ASCs) have been studied in clinical trials for dogs or in experimental trials as human models with promising results. They are characterized by their capacity for plastic adhesion, expansion and at least three-lineage differentiation potential in the absence of uniform immunophenotyping criteria. We studied canine ASCs derived from adipose tissue obtained in sterilisation surgeries performed at the Ecole Nationale Veterinaire de Toulouse and we adapted the protocols used at STROMALab for human ASCs production. In culture, the ASCs we isolated had a fibroblast-like morphology. We studied their differentiation potential for adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineage and the immunophenotype CD31-/CDC45-/CD90+/CD34+. The canines ASCs showed a higher expansion potential than human ASCs but we have to study further their characterisation by improving our protocols for differentiation and their immunophenotype.

**KEY WORDS**: Mesenchymal adipose stem cells (ASC), dog, cellular culture, characterisation, regenerative medicine