



Traduction de l'article du professeur Gorio sur la graisse activée

## **Activation du tissu adipeux et des cellules souches mésenchymateuses : promotion des propriétés anti-inflammatoires, par le biais du facteur de transcription SOX2 et de modulation de la protéine de liaison ARN HuR.**

La médecine régénérative est un domaine émergent qui combine les connaissances de plusieurs disciplines dans le but de guérir une fonction altérée dans le corps. Généralement, elle est décrite comme la création de tissus qui peuvent réparer, remplacer ou restaurer les structures biologiques et/ou les fonctions qui pourraient manquer à cause de malformations congénitales, du vieillissement, de maladie ou destruction (Haseltine, 2003 ; Gutmann et coll. 2005, Greenwood et al., 2006).

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules multipotentes, auto-renouvelables, ayant la capacité de se différencier, *in vitro*, en cellules d'origine mésenchymateuse, y compris ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes et pouvant engendrer os, graisse, cartilage et tissus musculaires *in vivo* (Pittenger et coll., 1999). Des études récentes ont montré que la potentialité de la régénération tissulaire peut être améliorée à l'aide de cellules souches humaines dérivées du tissu adipeux (hADSCs) (voir Gimble et al., 2011)

La fréquence des cellules souches semble être significativement plus élevée dans le tissu adipeux que dans d'autres tissus tels que la moelle osseuse (Bieback et al., 2004). En effet, la greffe autologue du tissu adipeux est une procédure thérapeutique établie, utilisée pour la réparation d'une variété de lésions tissulaires. Afin de minimiser les divergences et inconsistances et permettre une comparaison des données produites dans des laboratoires différents, la société internationale de thérapie cellulaire (ISCT) a fourni des lignes directrices pour la définition des CSM basées sur (a) leurs propriétés d'adhérence au plastique, (b) l'immunophénotype et (c) le potentiel de différenciation multipotent (Bourin et coll., 2013 ; Dominici et al., 2006).

En outre, plusieurs rapports publiés récemment affirment que les cellules souches humaines dérivées du tissu adipeux (hADSCs) sont capables, sous stimulation appropriée, de se différencier en d'autres types de cellules, telles que des neurones, des cardiomyocytes, des hépatocytes et des cellules pancréatiques (Schäffler et coll., 2007 ; Strem et coll., 2005) et possèdent un potentiel clinique de vasculogénèse (Madonna et al., 2009), d'ostéogénèse (Shenaq et al., 2010) et de modèles de réparation neuronale (Wakabayashi et al., 2010).

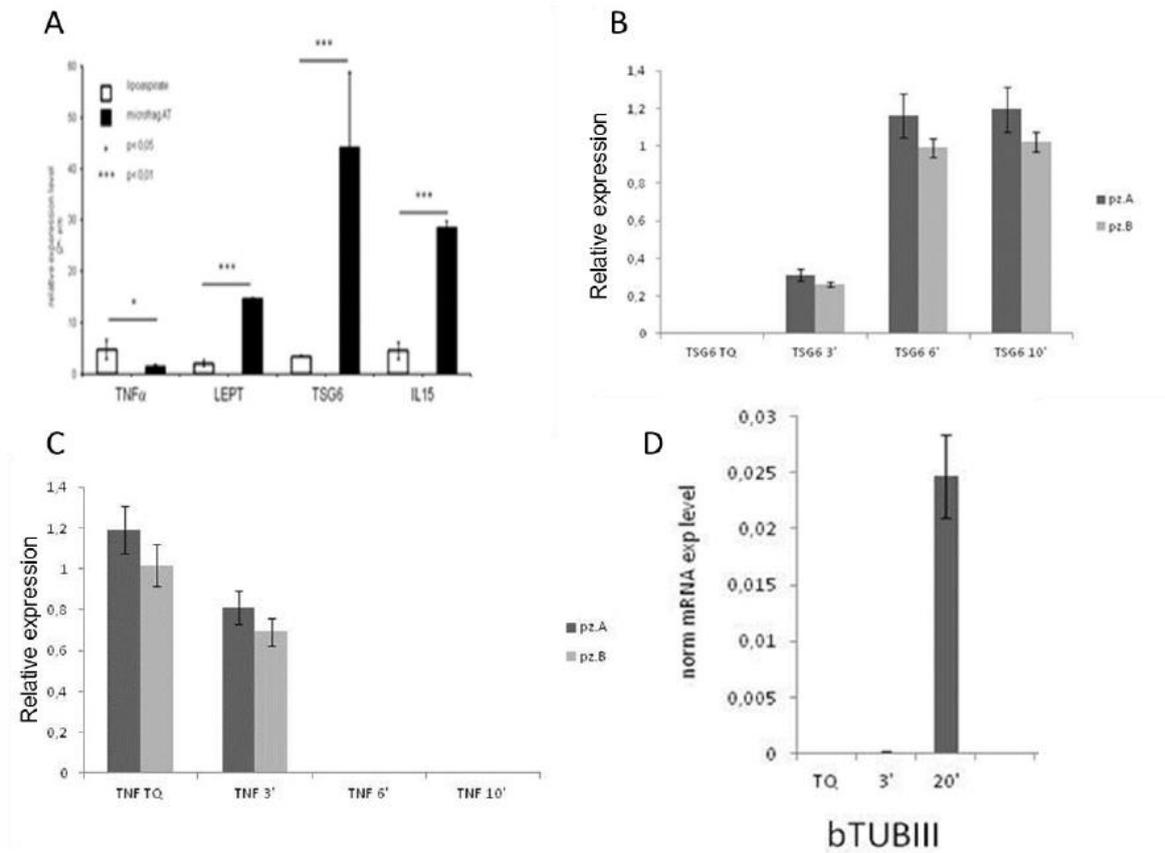
Nous avons récemment rapporté que la manipulation mécanique du tissu adipeux humain, sans modification de la composition du tissu, de sa structure et de son histologie, gardant une consistance comparable à la source d'origine (voir procédure expérimentale pour plus de détails), augmentait considérablement le nombre de cellules stromales portant l'expression de beta-tubuline II.

Nous avons soupçonné que des forces mécaniques pourraient être d'une importance clé dans l'embryogenèse, le remodelage tissulaire et le comportement mitotique et motile des cellules (Vogel et coll., 2006). Les cellules détectent et répondent à la force appliquée en externe par les forces exercées par la matrice cellulaire et les contacts des autres cellules. Les canaux ioniques activés par étirement, les facteurs de croissance, les filaments du cytosquelette, les matrices extracellulaires, les adhérences focales et les tyrosines kinases semblent impliqués dans la transformation des forces mécaniques en signaux biochimiques au sein des cellules (mécanotransduction), conduisant à des événements en aval porteurs de messages clés au noyau (El Haj et al., 1999, Na et al., 2008 ; Walker et al., 2000, Venkatesan Iyer et al., 2012, 2013 de Chen et al. Al 2013). D'autres auteurs ont également postulé la capacité des forces mécaniques à améliorer les applications d'ingénierie tissulaire et les stratégies de médecine régénératrice (Wang et al, 2009 ; El Haj et coll., 1999). Nos découvertes rapportées ici indiquent une méthode d'activation tissulaire claire qui stimule les propriétés anti-inflammatoires dans la graisse humaine récupérée par liposuction, accompagnée d'une réduction dans la production de cytokines inflammatoires connues tels que le TNF-alfa. L'accumulation du tissu adipeux est en fait considérée comme un processus inflammatoire. Ces propriétés anti-inflammatoires induites peuvent être activées en fonction de la force et du temps, en appliquant un mouvement spécifique avec un appareil qui est maintenant techniquement au point et protégé par un brevet.

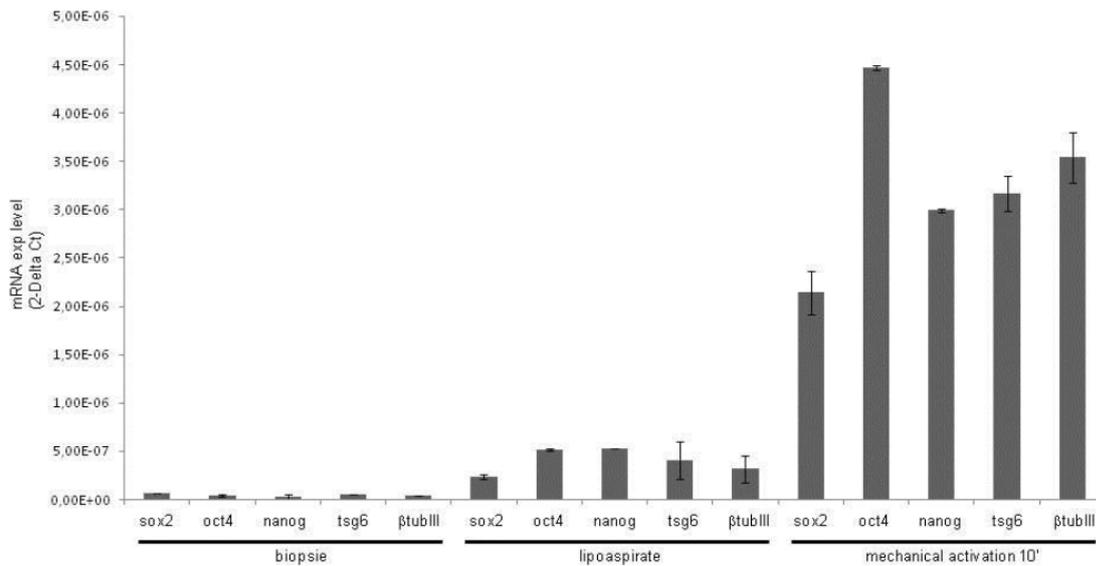
Les facteurs pro - et anti-inflammatoires ont été évalués dans le tissu lipoaspiré obtenu à partir du même groupe de patients et soumis à cette force mécanique spécifique pendant un nombre de minutes variable. La graisse lipoaspirée non traitée a servi de contrôle. Les résultats montrent que l'application d'une force 97 x g élimine l'expression typique du tissu adipeux des cytokines inflammatoires telle que le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF-alpha). Différemment, cette manipulation augmente considérablement son inhibiteur naturel TSG6 et l'interleukine 15, qui sont présents dans la graisse à un niveau marginal (Figure 1).

Une telle modification de l'état inflammatoire du tissu adipeux, induite mécaniquement, pourrait avoir des implications bien plus larges comme l'indique l'amélioration considérable de l'expression de la leptine (Figure 1), l'hormone de satiété produite par la graisse, suggérant une application supplémentaire in vivo d'une telle force directement sur des parties grasses du corps où une telle hormone joue un rôle crucial.

Les données sur la figure 1 b montrent que l'expression maximale de TSG6 a été obtenue dans un délai 6 à 10 minutes d'activation mécanique de 97 x g (Figure 1 b) et la production de TNF alpha est inhibée en 6 minutes dans les mêmes conditions (Figure 1C). Les résultats rapportés dans le panneau 1D montrent que l'expression maximale de la beta-tubuline III peut être atteinte en 20 minutes d'activation mécanique 97 x g (Figure 1D). Les forces inférieures sont marginalement efficaces et l'effet peut varier en fonction des différents sujets.



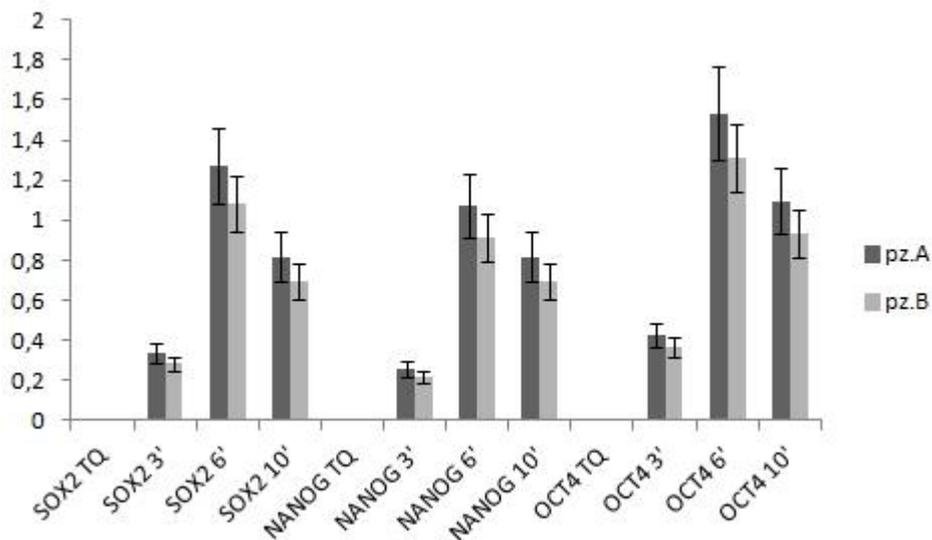
**FIGURE 1.** L'expression différentielle de cytokine dans le tissu adipeux lipoaspiré après activation mécanique. La Beta tubuline IIII exige une stimulation de 10-20 minutes, alors que le TSG6 est déjà observable à 3' de stimulation et est au maximum dans les 6-10 minutes, de même que l'IL15. Le TNF alfa est supprimé en 6 minutes.



**FIGURE 2.** Certains rapports suggèrent que la graisse humaine lipoaspirée (technique de Coleman) a également des effets positifs lorsqu'elle est utilisée pour une variété de conditions réparatrices qui peuvent nécessiter une action anti-inflammatoire. Ici, nous avons étudié quelques gènes de pluripotence (Nanog OCT4, SOX2), la beta-tubuline III et la TSG6 ARNm par RT-PCR, en temps réel, par biopsie, lipoaspiré et lipoaspiré activé mécaniquement (en 10 minutes) à partir de tissu adipeux humain. On voit que tous les gènes étudiés sont à peine actifs dans le tissu ordinaire de biopsie et sont légèrement activés par le procédé de Coleman après liposuction (lipoaspiré). Cependant après notre activation spécifique de 10 minutes, la régulation positive est incomparablement supérieure (Figure 2).

Les gènes régulateurs de pluripotence SOX2, NANOG et OCT4 sont pleinement activés dans les 6 minutes suivant l'activation mécanique 97 x g. Ainsi en plus des propriétés anti-inflammatoires, les paramètres définissant le maintien des cellules présentes dans les tissus sont également augmentés par l'activation mécanique appliquée en fonction de la force et du temps (Figure 3). 5

## ACTIVATION MOLÉCULAIRE DANS LE TISSU ADIPEUX INTACTE PAR LE BIAIS DE MANIPULATION MÉCANIQUE



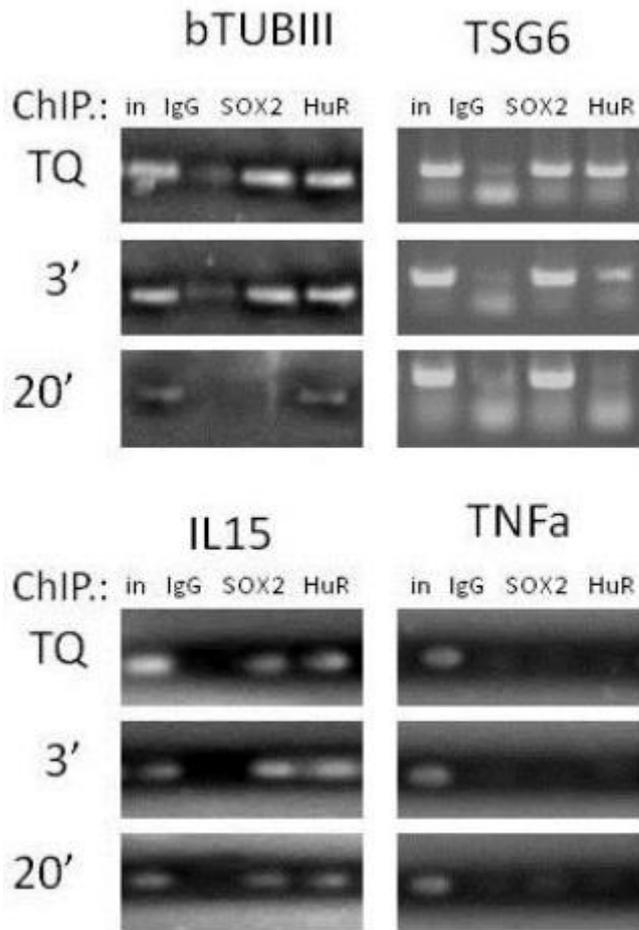
**Figure 3. PCR quantitative, en temps réel, mesurant les niveaux d'expression des gènes de pluripotence ARNm.**

Le Sox2 a un rôle essentiel dans le maintien des cellules souches embryonnaires (ES) et neurales et est très prometteur dans la recherche impliquant la pluripotence induite (Nichols et coll., 1998 ; Avilion et coll., 2003) En outre, Go et al. ont observé que le Sox2 est non seulement essentiel pour la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires, mais il est aussi exprimé dans les cellules souches somatiques avec une expansion supérieure et un potentiel de différenciation (Go et al., 2008)

Le SOX2 est un facteur de transcription (34Kda) qui contient une zone HMG pour la fixation de l'ADN et qui forme des complexes trimères avec l'Oct4 pour contrôler l'expression de plusieurs gènes. Nous avons testé une régulation directe de l'expression génétique à l'aide du facteur principal de transcription SOX2 sur la région promotrice des gènes codant pour les cytokines décrites ci-dessus.

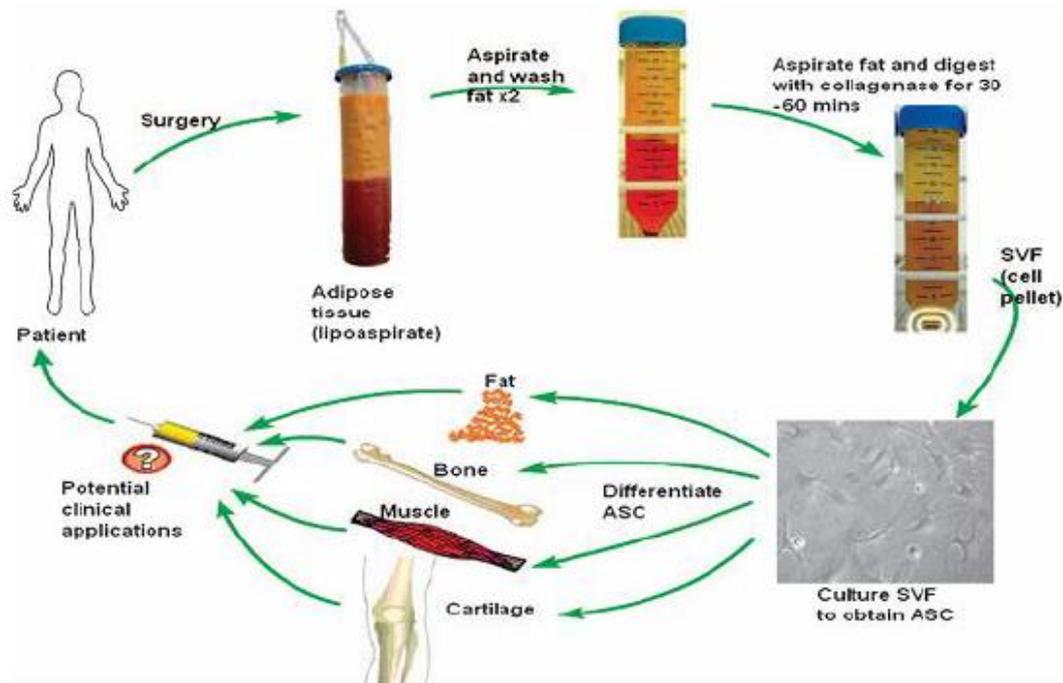
En outre, il a également été noté que le séquençage ChIP-Seq sur le gène SOX2 immunoprécipité montrait une liaison efficace élevée du gène SOX2 sur le promoteur IL6 (interleukine 6) dans le glioblastome ou dans les cellules ES (Fang et al., 2011).

Nous avons analysé in silico la région promotrice de 3000bp (paires de bases) de beta tubuline III, TSG6, TNFalpha, IL1b, IL10, IL15 et leptine, recherchant la présence de la séquence consensus du SOX2 et nous avons conçu des épreuves de CHIP (immunoprécipitation de chromatine) pour détecter la liaison du facteur de transcription en laboratoire humide. L'analyse de CHIP montre que le SOX2 et l'antigène humain R (HuR) se lient à la région promotrice de beta-tubuline III, IL15 et TSG6 et que l'application mécanique de 97 x g réglemente de manière différentielle une telle interaction (Figure 4). Après 20 min d'application de force, le SOX2 ne lie plus le promoteur beta tubuline et la transcription est alors renforcée; la transcription de TSG6 accrue semble être réglementée par la perte de liaison HuR. L'IL15 est probablement régulée par d'autres facteurs, qui viennent s'ajouter au Sox 2 et à l'HuR.



**Figure 4.** L'application de la force mécanique au tissu adipeux modifie l'interaction du SOX2 avec le promoteur des gènes spécifiques (bêta-tub III, TSG6, IL15 et TNF alpha).

2. Manipulation minimale de cellules souches mésenchymateuses provenant du tissu adipeux activé avec application en médecine régénérative. Les cellules souches adipeuses ont été purifiées à partir de graisse humaine provenant de la microliposuction sous anesthésie locale tumescente, à l'aide de microcannules de Coleman.



**Figure 5.** Traitement des cellules lipoaspirées pour obtenir des hADSCs (modifiées de Zuk et al., 2002). Suivant ce procédé, la graisse lipoaspirée a été centrifugée dans un système stérile fermé à 2000 rpm/mn pendant 10 minutes et le culot a été digéré avec la collagénase pendant une demi-heure à 37° C (Figure 5). La digestion est centrifugée pour séparer la population flottante d'adipocytes matures de la fraction stroma-vasculaire granulée (SVF)<sup>7</sup>

Après 24 heures de placage en milieu standard (milieu de Dulbecco « Modified Eagle » additionné de 10 % de bovin fœtal), les cellules non adhérentes sont supprimées. La population de cellules adhérentes au plastique identifie les cellules stromales – dérivées du tissu adipeux (ADSCs). Un défi majeur en médecine régénérative est la manipulation des cellules souches, afin de traduire/convertir facilement une lignée de cellules spécifiques en thérapie cellulaire. Le terme « manipulation minimale » signifie que le produit de traitement ne modifie pas les caractéristiques originales et pertinentes du tissu, ayant trait à la reconstruction de ce tissu, à sa réparation ou à son remplacement ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu); [www.fda.gov](http://www.fda.gov)).

Les organismes de réglementation (FDA et EMA) et la société de recherche de cellules souches internationale (ISCCR) assurent que la thérapie cellulaire doit être considérée comme un médicament lorsque la manipulation des cellules destinées à des applications cliniques est plus que minimale ou lorsque l'usage prévu est différent de la fonction normale de ces cellules dans le corps ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu); [www.fda.gov](http://www.fda.gov); Hyun et al. 2008)

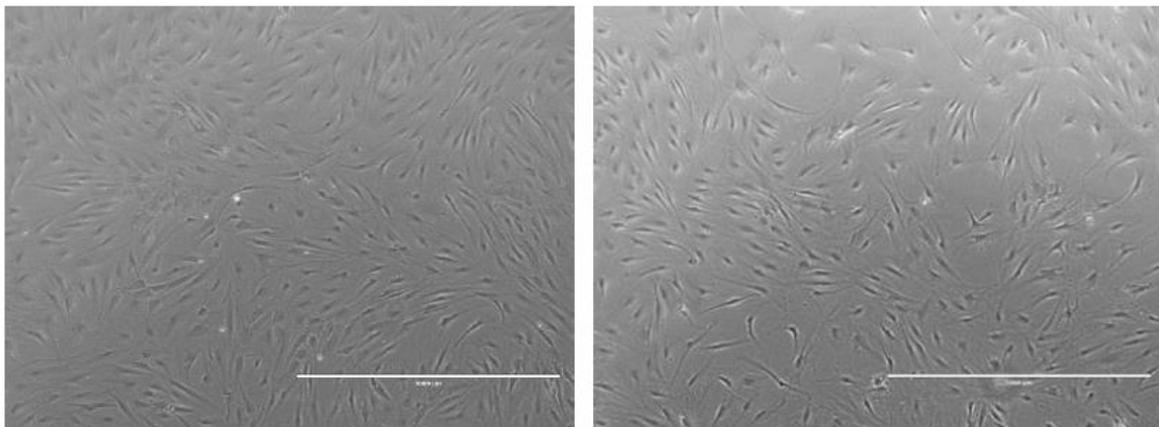
Les organismes de réglementation soulignent que la protection des patients est au cœur de ces règlements. En plus d'appliquer les mêmes normes de sécurité et d'efficacité que pour tous les produits pharmaceutiques, la qualité et la fabrication de produits à base de cellules est conforme aux exigences de bonnes pratiques de fabrication (GMP). Ces normes sont mondialement reconnues pour l'assurance qualité dans la production et le contrôle des médicaments. Toute utilisation de ces

médicaments à base de cellules, est soumise à une autorisation et à des contrôles, y compris le procédé de fabrication. ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu); [www.fda.gov](http://www.fda.gov)).

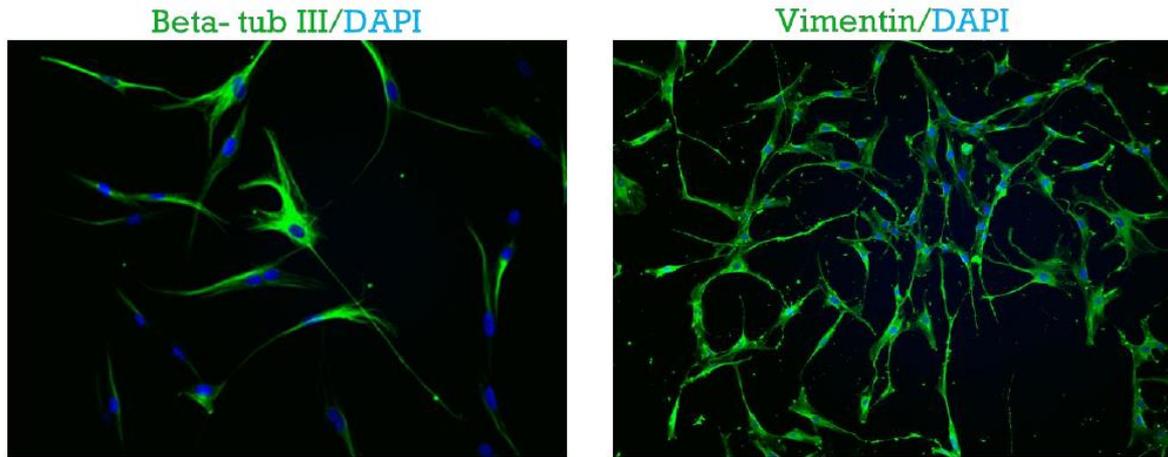
Selon les agences de réglementation, au cours de la culture cellulaire *in vitro*, il faudrait veiller à ce que la croissance et la manipulation des cellules isolées soient acceptables. Les étapes de traitement doivent être correctement conçues pour préserver l'intégrité des cellules et pour contrôler leur fonction. Les modalités de toute manipulation doivent être documentées en détail et étroitement surveillées selon des contrôles de processus spécifiques. La durée de la culture et le nombre maximum de passages cellulaires doivent être clairement précisés et validés. Les caractéristiques génotypiques et phénotypiques des cultures cellulaires primaires, des lignées cellulaires établies et des clones cellulaires dérivés devraient être définis et leur stabilité en ce qui concerne la longévité de culture déterminée. L'uniformité et la répétabilité du processus de culture cellulaire devraient être démontrées, et les conditions de culture, y compris les milieux et la durée doivent être optimisées par rapport à la fonction clinique prévue pour ces cellules. Pour ces raisons, la recherche de cellules souches appliquée à la médecine régénérative a l'obligation d'adhérer à la notion fondamentale de « manipulation minimale ».

À partir du tissu adipeux soumis à la force 97 x g, nous avons pu mettre en place une méthode efficace et reproductible pour l'isolement et l'expansion des hADSCs par le biais de la modification des méthodes décrites par Matsumoto et al., 2007 et Perrini S., et al 2013. Le tissu adipeux lipoaspiré traité à la force 97x g, est placé dans des flacons de culture de 25-cm<sup>2</sup> (NUNC, Roskilde, Danemark) complètement remplis d'un milieu de croissance. Cela permet l'adhérence du tissu au plafond de la plaque. Après 2 semaines de culture, le tissu adipeux est retiré, le ballon est retourné et les cellules sont maintenues en culture. Après 30 jours les cellules atteignent la confluence de 90 %. À partir de chaque plaque contenant 2 ml de tissu adipeux traité mécaniquement, le rendement des cellules est d'environ 5,5-6 x10<sup>5</sup> cellules.

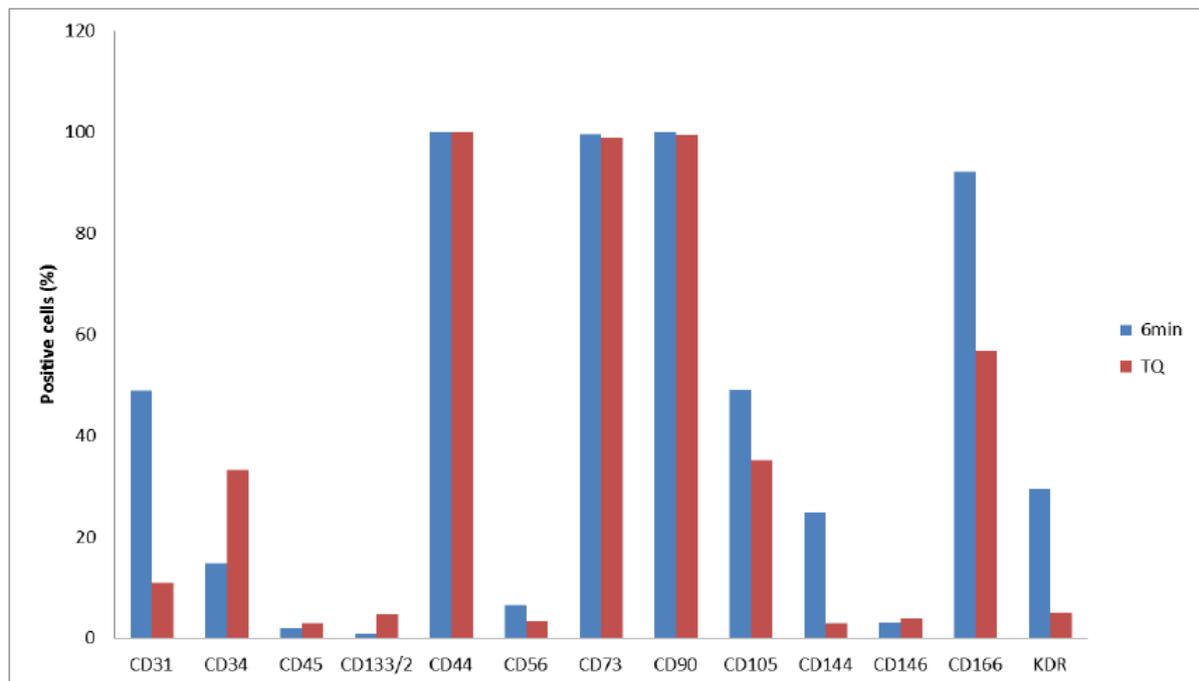
La morphologie en direct (saisie au moyen d'appareils de microscope EVOS<sup>®</sup>, AMG, é.-u.) de ces cellules présente un phénotype de type fibroblaste, comparable à celui des cellules obtenues avec les méthodes classiques (Figure 6)..



**Figure 6.** La morphologie en direct des hADSCs provenant du tissu adipeux traité par agitation orbitale (de 6 et 10 minutes, respectivement). Les caractéristiques immunohisto-chimiques montrent une expression classique de beta-tubuline III (TUJ1) et de vimentine (Figure 7).

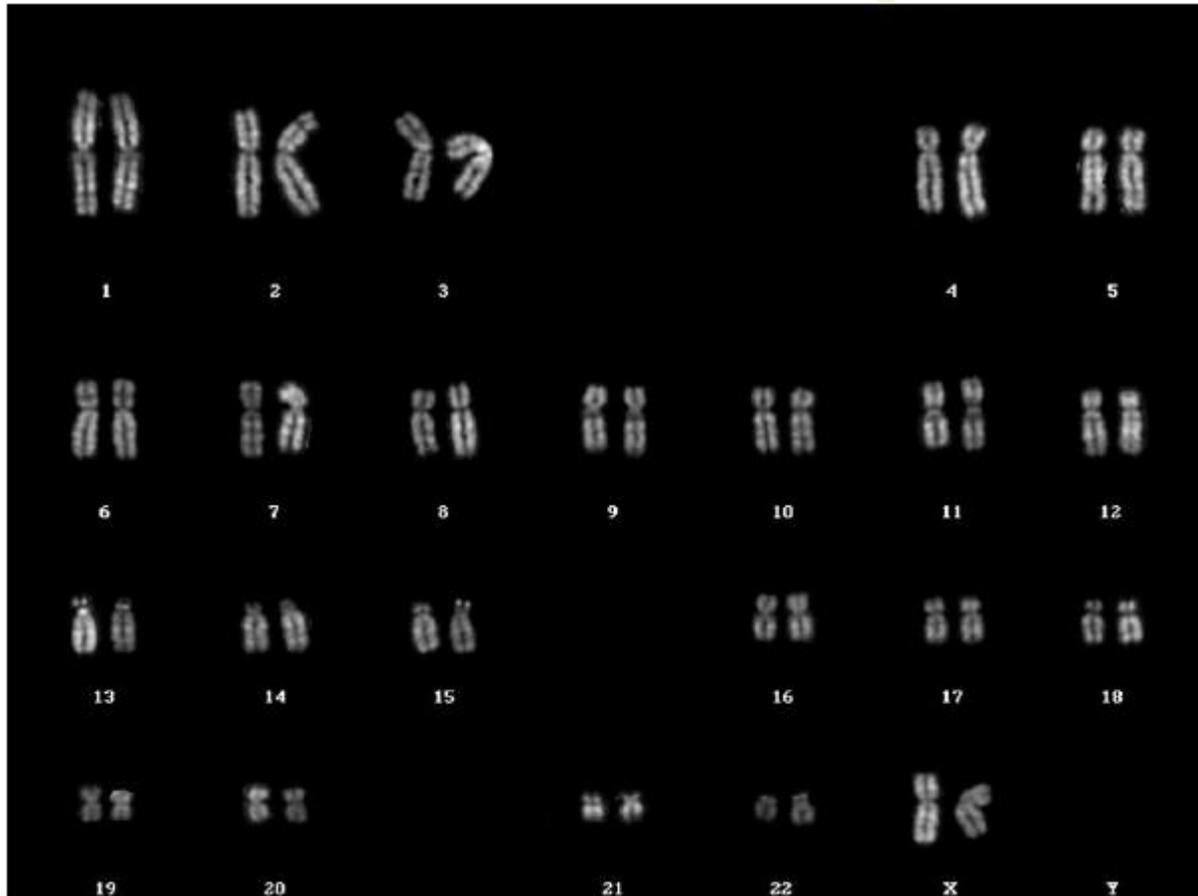


**Figure 7.** Expression de Beta-tubuline III (TUJ 1) et de vimentine dans les hADSCs provenant du tissu adipeux traité par agitation orbitale. Les hADSCs isolées avec le protocole décrit ci-dessus ont été caractérisées par l'expression de marqueurs mésenchymateux au moyen de l'analyse FACS (Figure 7). Ces hADSCs expriment des valeurs élevées (environ 90-100 %) de marqueurs mésenchymateux connus (tels que le CD44, CD73, CD90 et CD166) (Figure 7). Les marqueurs hématopoïétiques (CD45, CD133, CD56) sont très peu présents (Figure 7), tandis que les marqueurs endothéliales (CD31, CD34, CD144, CD146, KRR) ne sont plus présents dans les cellules 9 obtenues à partir de tissu adipeux traité en 97 x g (Figure 8). Ceci pourrait suggérer que ces cellules peuvent également être sujettes à un destin endothélial.



**Figure 8.** L'analyse par le système FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) de l'expression de marqueurs mésenchymateux dans les MSCs provenant du tissu adipeux traité ou non à la force 97 x g. Pour étudier la stabilité chromosomique des hADSCs obtenues à partir de tissu adipeux activé

mécaniquement, nous avons effectué une analyse des bandes QFQ. Les cellules n'ont pas présenté de réarrangements chromosomiques et le nombre de chromosomes était normal (Figure 9).



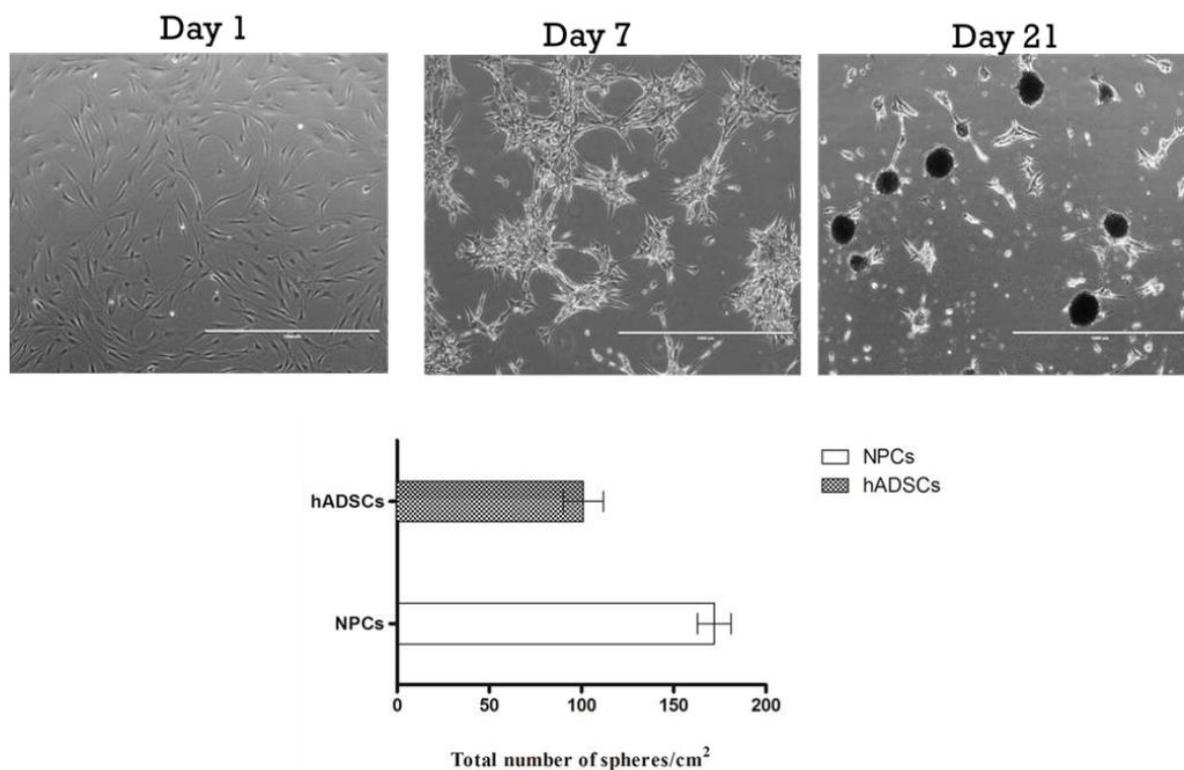
**Figure 9.** Analyse du caryotype dans les hADSCs (passage 2) provenant du tissu adipeux traité par la force mécanique. La micrographie se réfère aux hADSCs d'un cas et est représentative de la même analyse effectuée dans les trois autres cas. 10

La génération de sphéroïdes est normalement limitée aux cellules souches neurales ; ici, nous démontrons que les hADSCs issues de la graisse activée forment également des neurosphères. Des hADSCs ont été incubées avec un milieu sans sérum normalement utilisé pour la formation des neurosphères (Gritti et al., 2002).

Le test de formation de sphères a été réalisé par l'ensemencement de  $5 \times 10^3/cm^2$ . Environ 50 % des hADSCs obtenues à partir du tissu adipeux activé mécaniquement ont constitué de gros sphéroïdes atteignant un diamètre moyen de 100  $\mu m$  en 21 jours de culture (Figure 10).

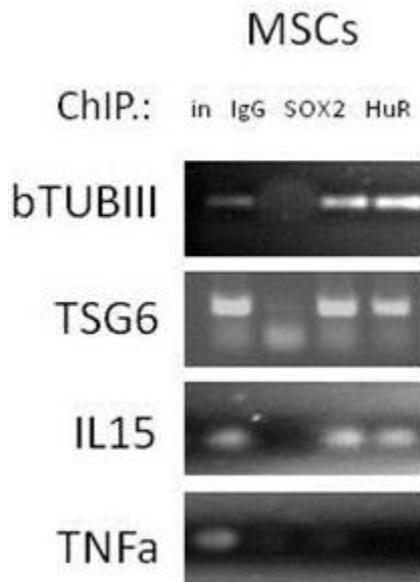
Environ 50 % des hADSCs extraites de tissu adipeux activé mécaniquement ont constitué de larges sphéroïdes atteignant un diamètre moyen de 100  $\mu m$  en 21 jours de culture et une moyenne de  $100,95 \pm 10,89$  sphères/ $cm^2$  en 21 jours (Figure 9).

Les cellules souches neurales de souris adultes obtenues à partir de la zone sub-ventriculaire ont été utilisées comme contrôle positif, et dans le cas présent, la formation de sphères a été évidemment supérieure (Figure 10).



**Figure 10.** Après avoir été cultivées dans un milieu de neurosphères pendant 21 jours, les hADSCs issues du tissu adipeux activé mécaniquement forment des sphéroïdes.

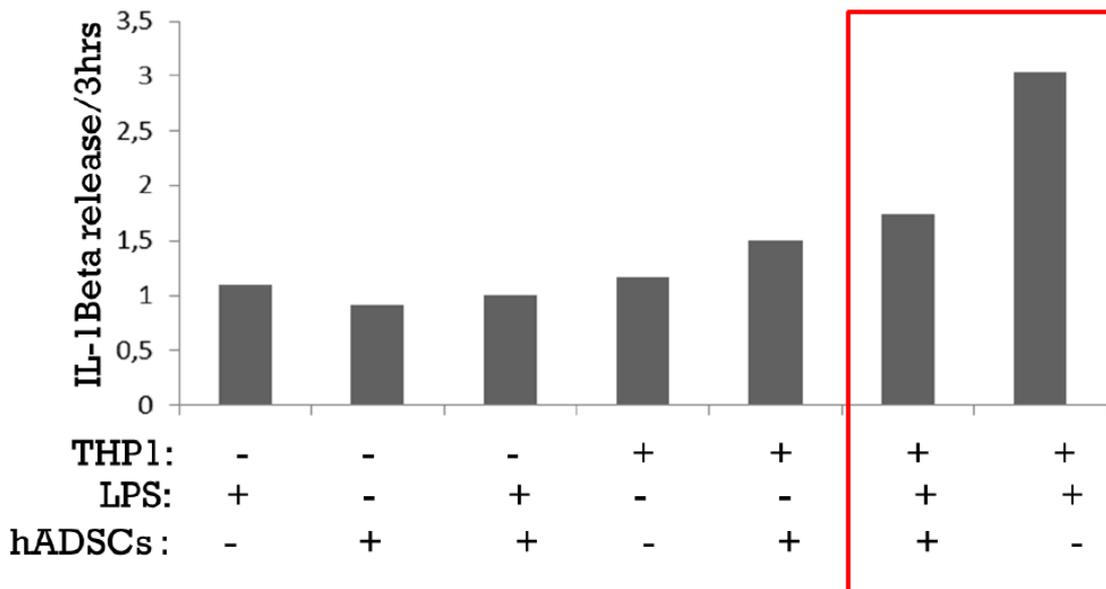
L'implication du SOX2 dans la régulation de l'expression des cytokines citées ci-dessus a aussi été étudiée dans les cellules isolées à partir de tissu adipeux traité à 97 x g. L'analyse de ChIP montre que le SOX2 se lie à la région promotrice de bêta-tubuline III, IL15 et TSG6 (Figure 11).



**Figure 11.** La figure 11. Le SOX2 interagit avec le promoteur de gènes spécifiques (bêta-tub III, TSG6, IL15 et TNF alpha) ainsi que dans les MSCs isolées à partir du tissu adipeux traité à la force 97 x g. Des rapports récents suggèrent que les MSCs sont capables de moduler l'inflammation (Prockop et coll., 2013). Le THP-1 est composé de cellules en suspension individuelles rondes avec des marqueurs monocytaires distincts et ressemblant à des monocytes et macrophages primaires par leur propriété de morphologie et de différenciation (Tsuchiya et al., 1980).

L'interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) est un puissant médiateur de réponses inflammatoire et immunitaire, produites principalement par l'activation des monocytes (Dinarello, 1994). La stimulation des monocytes avec l'endotoxine bactérienne lipopolysaccharide (LPS), induit la production d'IL-1 $\beta$  via l'activation du gène pro-IL-1, l'expression de l'ARNm de pro-IL-1 $\beta$  et la traduction ultérieure du message pro-IL-1 $\beta$ . Le Pro-IL-1 $\beta$  est transformé en IL-1 $\beta$  mature, biologiquement actif par l'enzyme de conversion de cystéine protéase interleukine-1 (Kostura et coll., 1989). Pro-IL-1 $\beta$  is processed to mature, biologically active IL-1 $\beta$  by the cysteine protease interleukin-1 converting enzyme (Kostura et al., 1989).

L'action anti-inflammatoire des hADSCs provenant du tissu adipeux activé mécaniquement a été évaluée dans un essai de co-culture (dispositif Transwell (boîte de co-culture), voir procédure expérimentale) avec des cellules THP1 activées avec LPS (10 microgr/ml ; pendant 3 heures). Comme indiqué dans la figure 12, la libération d'IL-1Beta est maximale 3 heures après stimulation par LPS, et la présence de hADSCs provenant du tissu adipeux activé mécaniquement réduit la sécrétion de la chimiokine étudiée de manière significative (Figure 12).



**Figure 12. 13** Les MSCs isolées à partir du tissu adipeux activé mécaniquement sont capables de réduire la libération de bêta IL-1 des cellules THP1. 13

## PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

### Activation mécanique des tissus et cultures cellulaires.

Des échantillons de tissu adipeux humain provenant de culture cellulaire ont été obtenus à partir d'une procédure de liposuccion élective sous anesthésie locale (lidocaïne, AstraZeneca, London, United Kingdom). Cette procédure comprend une étape d'infiltration, dans laquelle une solution de sérum physiologique et d'épinéphrine vasoconstrictrice (2 µg/ml) (clé client Solutions S.A.S., Basiglio, Milan, Italie) est perfusée dans le compartiment adipeux pour minimiser la perte de sang et la contamination du tissu par les cellules du sang périphériques. Le produit final sera appelé « tissu adipeux lipoaspiré ».

Pour l'activation mécanique, 10 ml de tissu adipeux lavé liposapiré est recueilli dans un tube de 50 ml, puis est activé par agitation orbitale (97 x g) à des durées différentes (3, 6, 10 et 20 minutes) et à température ambiante. Deux ml de tissu adipeux activé mécaniquement sont ensemencés dans des flacons de 25 cm<sup>2</sup> complètement remplis d'un milieu modifié de Dulbecco (DMEM ; Invitrogen, Carlsbad, CA) additionné de 20 % sérum fœtal bovin (SVF ; HJR Bioscience, Lenexa, KS, Lot 6 2146) et incubé à 37 ° C dans 5 % de CO<sub>2</sub>.

Les ballons sont retournés et les cellules remontent alors, venant adhérer à la surface du plafond intérieur supérieur du ballon. Après 15 jours, le milieu et les tissus sont supprimés, et les fioles sont inversées afin que les cellules soient maintenant au fond. Le milieu est changé tous les 4 jours jusqu'à ce que les cellules atteignent la confluence (90-95 % après environ 30 jours).

### **Analyses histologiques de contrôle et de tissu lipoaspiré traité mécaniquement.**

Les analyses histologiques ont été réalisées sur des tissus adipeux frais (avec ou sans traitement mécanique) sur des échantillons provenant du même sujet. En bref, des échantillons de tissu enrobés de paraffine et fixés au formol ont été traités en vue de l'examen histopathologique classique et de l'immunohistochimie. Des sections de tissu épais standard 4 µm colorés à l'hématoxyline et éosine (H & E) ont été examinées au microscope photonique direct à grand champ. Quatre échantillons de paraffine d'immunohistochimie ont été sectionnés (4µm-d'épaisseur), déparaffinés et réhydratés dans le xylène et des concentrations graduées d'éthanol dans de l'eau distillée. Puis ils ont été rincés avec du PBS, traités avec une solution bloquante (PBS + 1 % V/V sérum de veau fœtal pendant 1 h à température ambiante) et incubés avec des anticorps primaires pendant une nuit à 4° C. Après traitement avec des anticorps primaires, les sections ont été lavées avec du PBS et incubées avec les anticorps secondaires appropriés. Loi de peroxydase endogène....

L'activité peroxydasique endogène a été trempée dans une solution de 3 % de peroxyde d'hydrogène dans de l'eau distillée pendant 10 min.

La coloration a été réalisée avec 3,3' de diaminobenzidine (DAB) en tant que chromogène (kit de détection de DAKO EnVision).

Dans les déterminations de contrôle, les anticorps primaires ont été omis et remplacés par des concentrations équivalentes d'IgG non lié, et de la même sous-classe. Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : vimentine (1 : 5000 ; DAKO Cytomatic) ; S100 (1:2000 ; Novocastra) ; B-tubuline III (1:6000 ; Covance) ; Nestin humain (1 : 2000 ; Millipore) ; Nanog (1 : 1000 ; Novus). 14

Pour les études d'immunofluorescence, les cellules ont été rincées avec du PBS, fixées avec du paraformaldéhyde (4 % dans du PBS) traité dans une solution de blocage, et incubées avec l'anticorps primaire anti β-tubuline III (1:6000 ; Covance) pendant une nuit à 4 ° C. Après le traitement avec des anticorps primaires, les sections ont été lavées avec du PBS et incubées avec un anticorps secondaire (Alexa Fluor® 555 chèvre anti-souris 1 : 200 Molecular Probes®, Invitrogen, Life Technologies Italia, Monza, Italie) pendant 2 heures à température ambiante. Les noyaux ont été colorés au DAPI (Hoechst 1/1000), montés à l'aide du réactif FluorSave (Calbiochem, produit chimique Merck, Darmstadt, Allemagne) et analysés par microscopie d'immunofluorescence (Leica 5500).

Comme référence négative, pour l'analyse confocale, nous avons utilisé une section consécutive qui a été souillée par omission de l'anticorps primaire anti β-tubuline III, remplacé par des concentrations équivalentes d'IgG non lié de la même sous-classe.

### **Extraction d'ARN et analyses de qRT-PCR.**

Des ARN cellulaires complets ont été extraits à l'aide du réactif TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, é.-u.) selon les instructions du fabricant. La pureté et la quantité de l'ARN ont été évaluées par Nanodrop (Fisher Scientific) (A260/A280 1,8-2 a été considéré comme approprié pour une analyse plus approfondie). On a éliminé une contamination possible de l'ADN, et établi une ARNc de 1 µg d'ARN à l'aide d'un Kit RNA-à-cDNA (ARN-a-ADNc) de haute capacité (Applied Biosystems, Foster City, CA, EU.).

### **Expression des gènes dans les tissus adipeux.**

Des résultats quantitatifs ont été obtenus lors de tests SYBR-Green (Euroclone s.p.a., Milan, ITALIE) en temps réel sur l'ARN total extrait à l'aide du réactif TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, é.-u.) traité dans une solution exempte de DNase I – RNase (Ambion Inc. Foster City CA, é.-u.) et retrotranscrites à l'aide d'un kit de transcription inverse cDNA de haute capacité (Ambion Inc. Foster City CA, EU) suivant les recommandations du fabricant. On a détecté des gènes exprimés différemment en appliquant un seuil de significativité au test t de variance inégale.

### **ChIP sur le tissu adipeux.**

L'immunoprécipitation de la chromatine a été réalisée sur 1 ml de tissu adipeux lipoaspiré mécaniquement traité ou non ainsi que décrit dans Haim et al 2013.

### **Analyses caryotype en bande G**

Les analyses cytogénétiques ont été réalisées en bande G sur des cultures « in situ » obtenues en inoculant des hADSCs directement sur une lamelle à l'intérieur de boîtes de Pétri contenant 2 ml de milieu ( $\alpha$ MEM).

Les cellules ont été traitées avec de la colcémide (0.02  $\mu$ l/ml) (Life Technologies Carlsbad, Californie, USA) pendant 90 minutes, dans une solution hypotonique (1:1 Na citrate 1 % : NaCl 0,3 %) (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EU) et une solution de fixation de 3:1 méthanol : acide acétique (VWR International Radnor, Pennsylvanie, EU), remplacée deux fois.

Au moins vingt-cinq métaphases de marquage en bandes QFQ ont été observées pour chaque échantillon. L'image a été obtenue à l'aide d'un microscope à fluorescence (BX 60 Olympus) et analysées avec le système Powergene PSI système 15

### **Formation de sphéroïdes**

Les HADSCs provenant du tissu lipoaspiré mécaniquement activé ont été cultivées dans un milieu alpha-MEM avec du sérum de veau fœtal (20 %) pour atteindre 85 % de confluence au passage 1. Le milieu Alpha MEM a été supprimé, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS stérile, puis dans un milieu de neurosphères contenant des/du ? bFGF (20 ng/ml) et en l'absence de sérum, on a ajouté de l'EGF (10 ng/ml) (Gritti et al., 2002).

### **Culture de cellules THP-1 et activation avec LPS**

Des cellules (202-TIB ; CIFA, Rockville, MD) ont été cultivées en suspension en milieu RPMI 1640 additionné de 10 % de sérum de veau foetal (FCS), 50 U/mL de pénicilline et 50  $\mu$ g/mL de streptomycine dans des flacons de culture de tissu de 150-cm<sup>2</sup>.

La culture de cellules et toutes les expériences ont été menées à 37° C, 5 % de CO<sub>2</sub>, 95 % de l'air de la pièce, 95% room air.

Les cellules ont été soumises à des passages tous les 3 jours et utilisées entre 3 et 12 passages.

L'action anti-inflammatoire des hADSCs a été mesurée dans le système de culture trans-puits, réparties dans 6 plaques à cupule. Les hADSCs ont été cultivées dans le puits au-dessous de la densité de 1,5 x 10<sup>4</sup> cellules/puits dans un milieu MEM alpha.

Vingt-quatre heures après adhérence, des cellules THP-1 ont été ajoutées dans la plaque à cupule supérieure, avec une densité de 75 x 10<sup>4</sup> cellules/puits. Pour induire la libération de bêta de IL-1, la lipopolysaccharide (LPS) été administrée avec une concentration finale de 10 microgr/ml. Après trois heures d'incubation, le surnageant a été recueilli dans la glace et surgelé immédiatement. La libération d'IL-1beta a été étudiée par immunobuvardage.

## REFERENCES

- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 2003; 17: 126–140.
- Bourin, P.; Bunnell, B. A.; Casteilla, L.; Dominici, M.; Katz, A. J.; March, K. L.; Redl, H.; Rubin, J. P.; Yoshimura, K.; Gimble J. M. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 15:641-648; 2013.
- Chen et al. Mechanical regulation of epigenetics in vascular biology and pathology. *J of cell Mol Med* 2013. Vol 17, 4, pp 437-448.
- DINARELLO, C. A. (1998), Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-18, and the Interleukin-1 $\beta$  Converting Enzyme. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 856: 1–11.
- Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D. J.; Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-317; 2006.
- El Haj AJ, Walker LM, Preston MR, Publicover SJ. Mechanotransduction pathways in bone: calcium fluxes and the role of voltage-operated calcium channels. *Med Biol Eng Comput* 1999;37:403-9.
- Fang X, Yoon JG, Li L, Yu W, Shao J, Hua D, Zheng S, Hood L, Goodlett DR, Foltz G, Lin B. The SOX2 response program in glioblastoma multiforme: an integrated ChIP-seq, expression microarray, and microRNA analysis. *BMC Genomics*. 2011 Jan 6;12:11. doi: 10.1186/1471-2164-12-11.
- Gimble, J. M.; Bunnell, B. A.; Chiu, E. S.; Guilak, F. Taking stem cells beyond discovery: a milestone in the reporting of regulatory requirements for cell therapy. *Stem Cells Dev*. 20:1295-1296; 2011.
- Go MJ, Takenaka C, Ohgushi H. Forced expression of Sox2 or Nanog in human bone marrow derived mesenchymal stem cells maintains their expansion and differentiation capabilities. *Exp Cell Res* 2008; 314: 1147–1154.

- Greenwood HL, Thorsteinsdottir H, Perry G, Renihan J, Singer PA, et al. (2006) Regenerative medicine: New opportunities for developing countries. *Int J Biotechnol* 8: 60–77.
- Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci*. 22:437-45.
- Gutmann T et al. 2005. Regenerative medicine: A taxonomy for addressing ethical, legal and social issues. Ethical, legal and social issues in organ transplantation. In: Gutmann T, Daar AS, Sells RA, Land W, editors. Munich: PABST Publishers. pp. 368–377.
- Haim Y, Tarnovscki T, Bashari D, Rudich A. A chromatin immunoprecipitation (ChIP) protocol for use in whole human adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013 Nov 1;305(9):E1172-7. 17
- Haseltine WA (2003) Regenerative medicine 2003: An overview. *J Regen Med* 4: 15–18. doi: 10.1089/152489003321222844.
- Hyun I, Lindvall O, Ahrlund-Richter L, Cattaneo E, Cavazzana-Calvo M, Cossu G, De Luca M, Fox IJ, Gerstle C, Goldstein RA, Hermerén G, High KA, Kim HO, Lee HP, Levy-Lahad E, Li L, Lo B, Marshak DR, McNab A, Munsie M, Nakauchi H, Rao M, Rooke HM, Valles CS, Srivastava A, Sugarman J, Taylor PL, Veiga A, Wong AL, Zoloth L, Daley GQ. New ISSCR guidelines underscore major principles for responsible translational stem cell research. *Cell Stem Cell*. 2008 Dec 4;3(6):607-9. doi: 10.1016/j.stem.2008.11.009. Review. PubMed PMID: 19041777.
- K. Venkatesan Iyer, S. Pulford, A. Mogilner, G.V. Shivashankar. Mechanical Activation of Cells Induces Chromatin Remodeling Preceding MKL Nuclear Transport. *Biophys J*. 2012 October 3; 103(7): 1416–1428. doi: 10.1016/j.bpj.2012.08.041
- Kostura MJ, Tocci MJ, Limjuco G, Chin J, Cameron P, Hillman AG, Chartrain NA, Schmidt JA. Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jul;86(14):5227-31.
- Madonna, R.; Geng, Y. J.; De Caterina, R. Adipose tissue-derived stem cells: characterization and potential for cardiovascular repair. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 29:1723-1729; 2009.
- Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, Matsubara Y, Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J, Mugishima H. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential First published: 6 December 2007.
- Na S, Collin O, Chowdhury F, Tay B, Ouyang M, Wang Y, Wang N. Rapid signal transduction in living cells is a unique feature of mechanotransduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:6626-31.
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998; 95: 379–391.
- Perrini S, Ficarella R, Picardi R, Cignarelli A, Barbaro M, Nigro P, Pescechera A, Palumbo O, Carella M, De Fazio M, Natalicchio A, Laviola L, Pesole G, Giorgino F. Differences in Gene Expression and Cytokine Release Profiles Highlight the Heterogeneity of Distinct Subsets of Adipose Tissue-Derived Stem Cells in the Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue in Humans.

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147. doi: 10.1126/science.284.5411.143

Schäffler, A.; Büchler, C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 25:818-827; 2007.

Shenaq, D. S.; Rastegar, F.; Petkovic, D.; Zhang, B. Q.; He, B. C.; Chen, L.; Zuo, G. W.; Luo, Q.; Shi, Q.; Wagner, E. R.; Huang, E.; Gao, Y.; Gao, J. L.; Kim, S. H.; Yang, K.; Bi, Y.; Su, Y.; Zhu, G.; Luo, J.; Luo, X.; Qin, J.; Reid, R. R.; Luu, H. H.; Haydon, R. C.; He, T. C. Mesenchymal Progenitor Cells and Their Orthopedic Applications: Forging a Path towards Clinical Trials. *Stem Cells Int.* 2010:519028; 2010. 18

Strem, B. M.; Zhu, M.; Alfonso, Z.; Daniels, E. J.; Schreiber, R.; Beygui, R.; MacLellan, W. R.; Hedrick, M. H.; Fraser, J. K. Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury. *Cytotherapy* 7:282-291; 2005

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer.* 1980 Aug;26(2):171-6.

Vogel V, Sheetz M. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:265-75.

Wakabayashi, K.; Nagai A.; Sheikh A. M.; Shiota, Y.; Narantuya, D.; Watanabe, T; Masuda, J.; Kobayashi, S.; Kim, S. U.; Yamaguchi, S. Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model. *J. Neurosci. Res.* 88:1017-1025; 2010.

Walker LM, Publicover SJ, Preston MR, Said Ahmed MA, El Haj AJ. Calcium-channel activation and matrix protein upregulation in bone cells in response to mechanical strain. *J Cell Biochem* 2000;79:648-61.

Wang N, Tytell JD, Ingber DE. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:75-82.

Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Benhaim, P., Hedrick, M. H., & Fraser, J. K. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 13, 4279-4295.