



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Pharmacologie*

Présentée et soutenue par *Marie MAUMUS*
Le *30 octobre 2009*

Caractérisation des cellules souches/ progénitrices CD34⁺ / CD31⁻ du tissu adipeux humain et influence du microenvironnement sur leur prolifération, migration et différenciation.

JURY

Professeur Isabelle Castan-Laurell - Président
Docteur Laure Coulombel – Rapporteur
Docteur Christian Dani - Rapporteur
Docteur Fawzia Louache – Examineur
Docteur Coralie Sengenès – Examineur
Docteur Anne Boulomié – Directeur de thèse

Ecole doctorale Biologie Santé Biotechnologies Toulouse
Unité de recherche : INSERM U858 Equipe 1
Directeur(s) de Thèse : Dr Anne Boulomié et Dr Coralie Sengenès

Je profite des premières pages de ce manuscrit de thèse pour exprimer tous mes sincères remerciements à tous ceux qui m'ont soutenue tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier chaleureusement les Docteurs Laure Coulombel et Christian Dani d'avoir spontanément accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs et d'avoir apporté toutes leurs compétences dans les domaines des cellules souches et du tissu adipeux. Je tiens également à remercier le Docteur Fawzia Louache pour l'analyse de ce travail de thèse en tant qu'examinateur.

J'exprime aussi toute ma gratitude au Professeur Isabelle Castan-Laurell qui m'a fait l'honneur et la gentillesse de présider ce jury de thèse et je suis d'autant plus touchée que c'était sa première fois.

Les recherches qui ont fait l'objet de cette thèse ont été effectuées dans l'Equipe 1 de l'unité INSERM U858. Je tiens tout d'abord à remercier Anne Bouloumié de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer cette thèse en me proposant un financement et en m'accueillant au sein de son équipe. Un grand merci à toute l'équipe : Jean, Alec, Pauline, David, Auré et Carine, pour leur aide technique et pour leur soutien.

Je remercie Max pour ses sages conseils et son œil critique. Travailler à votre contact a vraiment été très enrichissant, tant professionnellement que personnellement.

Un merci tout particulier à Virginie qui m'a donné ma chance quand j'étais petite puisque c'est elle qui m'a mis pour la première fois une pipette dans les mains. Merci Virg d'avoir cru en moi toutes ces années, de m'avoir soutenue, d'avoir toujours su trouver les mots justes pour me reconforter et enfin d'avoir tout simplement été là dans les mauvais mais surtout dans les bons moments...j'espère qu'il y en aura beaucoup d'autres (des bons et pas des mauvais moments) !!!

Je tiens à remercier tout spécialement Coralie qui a été présente tout au long de ces années. Je suis un peu handicapée des sentiments et c'est toujours très dur pour moi d'exprimer tout ce que je ressens... mais je sais, enfin j'espère que tu le sais. Un grand MERCI pour TOUT ! Je ne vais pas tout énumérer pour ne pas faire trop catalogue mais ça a été un réel plaisir de travailler avec toi. T'as toujours su comment m'encadrer et ta confiance ainsi que tes conseils m'ont été si précieux pour trouver confiance en moi. C'était vraiment chouette de pouvoir se marrer tout en bossant, on travaille toujours mieux avec le sourire !

Merci à ceux qui ont pris le temps de m'écouter répéter pour être au top le jour J : Didi, GT, Giroussi, Camillou, Céline, Juju, Béné, Audrey et Cédric. Merci pour vos conseils, vos critiques et vos questions, sans vous je n'aurais jamais pris confiance en moi à l'oral et grâce à vous la soutenance s'est passée sans stress... et ce n'était pas gagné !

Je ne saurai clore cette page sans remercier, pour leur contribution à des degrés divers dans la réalisation de cette thèse, ma petite famille d'amis : Coco, Laure, Flo, Pate, Auré, Pep, Antoine, Agathe, Juju, la Singoulet' team et enfin la Super super bom crew family. Merci d'avoir toujours tous été présents (même avec plus de 10 000 kilomètres qui nous séparent pour certains), merci d'avoir cru que les cellules souches du tissu adipeux sont CD34+ et ne vous inquiétez surtout pas, je travaille pour les utiliser en thérapie pour soigner vos futures fistules anales !

Enfin, je tiens à adresser mes sincères remerciements à ma famille. J'adresse un grand merci à mes parents, à mon frère François et à Germaine pour leur soutien toutes ces années.

Le plus fort de mes remerciements est pour Hugo. Merci de m'avoir tenu la main jusqu'aux dernières lignes de ce mémoire. En plus de me supporter dans des conditions «normales», ce qui n'est déjà pas une mince affaire je le conçois, tu as du subir mon humeur de fin de thèse. Tu as fini par découvrir qu'avec « le gras », on faisait de la recherche et non pas du savon comme j'ai essayé de te le faire croire quand on s'est rencontré... Merci d'être là tous les jours et en route pour une nouvelle aventure !

RESUME

De nombreux tissus adultes contiennent des cellules souches et/ou progénitrices qui contribueraient à leur croissance et à leur régénération. Ces cellules souches adultes sont localisées dans un microenvironnement spécialisé, appelé niche, qui régule leur prolifération, leur mobilisation et leur différenciation. Le tissu adipeux (TA) serait un des tissus adultes contenant des cellules souches/progénitrices, potentiellement capables de se différencier *in vitro* en de nombreux types cellulaires. Des travaux précédents menés au sein de l'équipe ont montré que les cellules souches/progénitrices du TA étaient contenues dans la fraction cellulaire CD34⁺/CD31⁻ et qu'elles avaient des capacités adipogéniques et angiogéniques. Alors que de nombreux travaux s'intéressent, pour une utilisation éventuelle en thérapie cellulaire, à ces cellules souches/progénitrices dites de type mésenchymateux en les isolant par leur propriété d'adhérence au plastique, peu de données sont disponibles concernant la caractérisation phénotypique et génotypique de ces cellules à l'état natif ainsi que l'influence de leur microenvironnement et de l'état d'obésité sur leur nombre, leurs capacités de prolifération et de différenciation.

Dans un premier temps, nos travaux ont montré que les cellules souches/progénitrices CD34⁺/CD31⁻ avaient une localisation périvasculaire ainsi que stromale au sein du TA humain et qu'elles étaient hétérogènes en terme de marqueurs de surface ; elles expriment à la fois des marqueurs des cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses et malgré leur localisation périvasculaire, elles n'expriment pas de marqueurs des péricytes. De plus, l'augmentation avec le niveau d'obésité de l'expression génique de marqueurs de l'adipogénèse par les cellules souches/progénitrices suggère leur engagement dans la voie adipocytaire. Dans un second temps, nous avons montré, *in situ*, qu'une fraction de cellules CD34⁺/CD31⁻ était en phase de prolifération et que cette prolifération était augmentée chez les sujets obèses. L'étude des facteurs du microenvironnement pouvant réguler la prolifération a montré que les sécrétions des adipocytes matures et des cellules endothéliales capillaires (CECs) ainsi qu'un environnement hypoxique augmentaient la prolifération des cellules CD34⁺/CD31⁻ alors que des facteurs macrophagiques l'inhibaient. De plus, nous avons montré que les CECs sécrétaient un facteur chimiotactique, le SDF-1 (stromal derived factor-1), qui induit la migration des cellules CD34⁺/CD31⁻ du TA par interaction avec son récepteur, le CXCR-4. Enfin, concernant le contrôle de la différenciation des cellules souches/progénitrices par le microenvironnement tissulaire, nous avons montré, *in vitro* dans nos conditions de culture, que les sécrétions des adipocytes, des macrophages et des CECs avaient des effets pro-angiogéniques et anti-adipogéniques.

L'ensemble de ce travail a ainsi permis de caractériser l'influence de la « niche adipeuse » sur le contrôle de l'activité de prolifération, de migration et de différenciation des cellules souches/progénitrices natives du TA.

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS.....	11
INTRODUCTION.....	14
I. Les cellules souches et leur niche	15
I.1. Qu'est ce qu'une cellule souche ?.....	15
I.2. Les différents types de cellules souches	17
I.2.1. Les cellules souches embryonnaires	18
I.2.2. Les cellules souches amniotiques	21
I.2.3. Les cellules souches pluripotentes induites ou IPs	22
I.2.4. Les cellules souches adultes.....	22
I.3. La niche des cellules souches	39
I.3.1. Qu'est-ce qu'une niche ?	39
I.3.2. Fonctions de la niche:	42
II. Utilisation des cellules souches en thérapie cellulaire.....	56
III. Le tissu adipeux : origine et développement – implication des cellules souches	59
III.1. L'obésité.....	59
III.1.1. Définition	59
III.1.2. Prévalence	60
III.2. Fonctions des tissus adipeux	61
III.2.1. Fonctions du tissu adipeux brun.....	61
III.2.2. Fonctions du tissu adipeux blanc	63
III.3. Origine, développement et composition.....	71
III.3.1. Origine et développement	71
III.3.2. Composition cellulaire du tissu adipeux blanc.....	73
III.4. Rôle potentiel des cellules souches dans le développement du tissu adipeux	81
III.4.1. Rôle potentiel dans la différenciation adipocytaire ou adipogenèse	81
III.4.2. Rôle potentiel dans l'angio/vasculogenèse	88
OBJECTIFS.....	92

RESULTATS	95
I. Caractérisation immunophénotypique et génétique des cellules souches/progénitrices du TA et localisation dans la niche adipeuse	96
I.1. Caractérisation des cellules souches/progénitrices du TA chez l’homme.	96
I.2. Caractérisation des cellules souches/progénitrices chez la souris.	98
II. Effet du microenvironnement sur la prolifération des cellules souches/progénitrices CD34 ⁺ /CD31 ⁻ du TA humain.	103
III. Effet du microenvironnement sur les potentialités de différenciation des cellules souches/progénitrices.	108
III.1. Engagement dans la voie adipogénique.	108
III.2. Engagement dans la voie angiogénique.	109
IV. Effet du microenvironnement sur la migration des cellules souches/progénitrices.	114
IV.1. Etudes <i>in vitro</i>	114
IV.2. Etudes <i>in vivo</i>	115
IV.2.1. Effets de l’AMD3100 sur le poids corporel.	117
IV.2.2. Effets de l’AMD3100 sur la composition cellulaire du sang et de la moelle osseuse.	118
IV.2.3. Effets de l’AMD3100 sur la composition cellulaire du TA.	120
CONCLUSION – PERSPECTIVES	125
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	132
ANNEXES	156

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1: Caractéristiques d'une cellule souche.....	17
Figure 2 : Le blastocyste.	18
Figure 3 : Pluripotence des cellules souches embryonnaires in vivo.	20
Figure 4 : L'hématopoïèse.	25
Figure 5 : Les cellules souches hématopoïétiques (CSH).	26
Figure 6 : Les cellules souches/stromales mésenchymateuses.....	30
Figure 7 : Effets immunomodulateurs des cellules souches mésenchymateuses.....	31
Figure 8 : Les cellules souches de l'intestin.....	34
Figure 9 : Les cellules souches du follicule pileux.	36
Figure 10 : Les cellules satellites du muscle squelettique.....	39
Figure 11 : La niche des cellules souches: composition et fonctions.....	42
Figure 12 : Le cycle cellulaire.....	43
Figure 13 : La division cellulaire asymétrique des cellules souches.....	45
Figure 14 : Rôle potentiel de la niche dans l'orientation et la définition de la nature de la division cellulaire de la cellule souche.....	46
Figure 15 : La mobilisation et la domiciliation des cellules souches.....	49
Figure 16 : Contrôle de la migration des CSH par le système nerveux	51
Figure 17 : Les voies de signalisation Wnt et Notch.....	53
Figure 18 : Localisation des TA.....	63
Figure 19 : Captage des acides gras circulants.....	65
Figure 20 : Lipogenèse/synthèse des triglycérides dans l'adipocyte.	66
Figure 21 : Contrôle de la lipolyse dans l'adipocyte humain.....	69
Figure 22 : Les sécrétions du tissu adipeux.....	71
Figure 23 : Composition cellulaire du TA.	74
Figure 24 : Isolement des différents types cellulaires du tissu adipeux humain.	78
Figure 25 : Les étapes de la différenciation adipocytaire.....	83
Figure 26 : Progression des facteurs de transcription au cours de l'adipogénèse dans les préadipocytes de la lignée 3T3-L1.	85
Figure 27 : Angiogenèse par bourgeonnement.	89
Figure 28 : Angiogenèse par intussusception.....	90

Figure 29 : Caractérisation des populations cellulaires composants la FSV du TA de souris et identification des cellules progénitrices.	99
Figure 30 : Localisation des cellules progénitrices du TA de souris.	101
Figure 31 : Effet du glucose et de l'insuline sur la prolifération des cellules progénitrices CD34 ⁺ /CD31 ⁻	105
Figure 32 : Effet des milieux conditionnés (MC) des adipocytes et des CECs du TA sur l'adipogenèse et l'angiogenèse des progénitrices CD34 ⁺ /CD31 ⁻	110
Figure 33 : Profil sécrétoire des adipocytes et des CECs.	111
Figure 34 : Protocole de l'effet chronique de l'AMD3100 sur le poids des souris et la composition cellulaire du TA.	117
Figure 35 : Effets de l'AMD3100 sur le poids et la composition corporelle des souris.	118
Figure 36 : Effets de l'AMD3100 sur la composition cellulaire sanguine.	119
Figure 37 : Effets de l'AMD3100 sur la composition cellulaire de la moelle osseuse.	120
Figure 38 : Effets de l'AMD3100 sur la composition cellulaire du TA sous-cutané (SC) et viscéral (Vis).	122
Figure 39 : Rôle de la niche "adipeuse" sur la prolifération, différenciation et migration des cellules souches/progénitrices CD34 ⁺ /CD31 ⁻ du TA.	131

TABLEAUX

Tableau 1 : Marqueurs membranaires des CSM humaines.	28
Tableau 2 : Classification internationale du sous poids, surpoids et de l'obésité selon l'IMC.	60
Tableau 3 : Immunophénotype des ASCs humaines.	80
Tableau 4 : Facteurs extracellulaires et molécules de signalisation régulant la différenciation adipocytaire.	87

PUBLICATIONS

Publication 1 : Human native adipose stem/progenitor cells are positive for the CD34 antigen and are scattered in the stroma of subcutaneous adipose tissue.....	96
Publication 2 : Evidence of in situ proliferation of adult adipose tissue-derived progenitor cells: influence of fat mass microenvironment and growth.	103
Publication 3 : Chemotaxis and differentiation of human adipose tissue CD34+/CD31-progenitor cells: role of stromal derived factor-1 released by adipose tissue capillary endothelial cells.....	114
Publication 4 : Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages.	157
Publication 5 : Interplay Between Human Adipocytes and T Lymphocytes in Obesity. CCL20 as an Adipochemokine and T Lymphocytes as Lipogenic Modulators.	158

LISTE DES ABREVIATIONS

-A-

ABC transporteur : ATP-binding cassette transporter
ACC : Acetyl Coenzyme A carboxylase
Acyl-CoA : Acyl-Coenzyme A
AG : Acide gras
AGL : Acide gras libre
AGPAT : acylglycerol-3-phosphate acyltransferase
ALCAM : Activated leukocyte cell adhesion molecule
ANP : Atrial natriuretic peptide
AQP7 : Aquaporine 7
ASC : Adipose stem/stromal/progenitor cells
ATGL : Adipose triglyceride lipase
ATP : Adenosine triphosphate

-B-

BMI : Body Mass Index
BMP : Bone morphogenic protein
BNP : B-type Natriuretic peptide
BrdU : 5-bromo-2-deoxyuridine
BSA : Bovine serum albumin

-C-

CDK : Cyclin dependant kinase
C/EBP : CCAAT/Enhancer Binding Proteins
CECs : cellules endothéliales capillaires
CEP : cellules endothéliales progénitrices
CFU-F : Colony forming units-fibroblastic
CSH : Cellule souche hématopoïétique
CSM : Cellule souche/stromale mésenchymateuse

-D-

DAG : Diacylglycérol

DGAT : diacylglycérol acyltransférase

DNMT3B : DNA methyltransferase 3B

-E-

ECBM : Endothelial cell basal medium

ECGM : Endothelial cell growth medium

EGF : Epithelial growth factor

ES : Embryonic stem cells

-F-

FABP4 : Fatty acid binding protein 4

FAT : Fatty Acid Transporter

FATP : Fatty acid transport protein

FAS : Fatty Acid Synthase

¹⁸F-FDG : ¹⁸F-fluorodeoxyglucose

FGF : Fibroblast growth factor

FSV : Fraction stroma vasculaire

-G-

GABRB3 : Gamma-aminobutyric acid receptor beta-3

G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor

GDF3 : Growth differentiation Factor-3

GFP : Green fluorescent protein

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

GPAT : glycerol-3-phosphate acyltransférase

GPDH : Glycerol 3-phosphate dehydrogenase

-H-

HGF : Hepatocyte growth factor

hMADS : human multipotent adipose-derived stem cells

-I-

ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule-1

IDO : Indoleamine-2,3-dioxygenase

IGF-1 : Insuline Growth Factor-1

IL : Interleukine

IMC : Indice de masse corporelle

IPS : Induced pluripotent cells

-L-

LIF : Leukemia inhibitory factor

LHS : Lipase hormono sensible

LPL : Lipoprotéine lipase

LRC : Label retaining cells

LT-HSC : Long term-hematopoietic stem cell

-M-

MAG : Monoacylglycérol

MCP-1 ou -3 : Monocyte chemotactic protein-1 ou -3

MEC : Matrice extracellulaire

MGL : Monoacylglycerol lipase

MMP : Metalloproteinase matricielle

MPP : Multipotent progenitor

-N-

N-CAM : Neural cell adhesion molecule

NFATc1 : Nuclear factor of activated T cells c1

NK : Natural killer

-O-

OMS : Organisation mondiale de la santé

-P-

PGE2 : Prostaglandine E2

PPAR γ : Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma

-R-

RT-PCR : Real Time Poly Chain Reaction

-S-

SCF : Stem Cell Factor

SDF-1 : Stromal derived factor-1

Slamf1 : Signaling lymphocyte activation molecule family member 1

α SMA : alpha Smooth Muscle Actin

SP : Side population

SSEA : Stage-specific embryonic antigen

ST-HSC : Short term-hematopoietic stem cell

SVF : Sérum de veau fœtal

-T-

T3 : Triiodothyronine

TA : Tissu adipeux

TAG : Triacylglycérol

TDGF1 : Teratocarcinoma-derived growth factor1

TG : Triglycéride

TGF β : Transforming growth factor β

TIMP : Tissue Inhibitor of Metalloproteinases

TNF α : tumor necrosis factor α

TSH : thyroid stimulating hormone

-U-

UCP-1 : Uncoupling Protein-1

-V-

VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule-1

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VLDL : Very low density lipoprotein

AVANT-PROPOS

Le surpoids touche, aujourd'hui, environ 1,6 milliard d'adultes dans le monde et au moins 400 millions d'adultes sont obèses. L'obésité est à l'origine du développement de nombreuses maladies telles que des maladies cardio-vasculaires, le diabète de type 2, des dyslipidémies et des cancers. Les causes de l'obésité sont multiples et dépendent autant de facteurs génétiques que de facteurs environnementaux. L'obésité est la conséquence d'une croissance excessive du tissu adipeux (TA). En effet, le TA est un tissu extrêmement plastique qui peut se développer chez l'adulte de manière importante et qui contient des cellules souches et/ou progénitrices de phénotypes semblables aux cellules mésenchymateux.

De nombreux tissus adultes tels que la moelle osseuse, l'intestin, la peau ou encore les muscles contiennent des cellules souches et/ou progénitrices qui contribueraient à leur croissance et/ou régénération tout au long de la vie. Ces cellules souches/progénitrices adultes sont localisées dans un microenvironnement spécialisé, appelé niche, qui régule leur prolifération, leur mobilisation et leur différenciation. Elles sont largement étudiées afin de comprendre les processus physiologiques dans lesquels elles sont impliquées mais sont aussi de plus en plus étudiées comme outil thérapeutique dans le but de réparer un organe endommagé ou pour traiter des maladies dégénératives telles que les maladies de Parkinson et d'Alzheimer. Le TA pourrait être un de ces organes renfermant des cellules souches et/ou progénitrices facilement isolables et utilisables pour la thérapie cellulaire.

Une meilleure connaissance des cellules souches/progénitrices du TA et plus particulièrement du contrôle de leur prolifération, de leur différenciation et de leur migration est nécessaire, d'une part, à la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement du TA qui a lieu lors de la mise en place de l'obésité mais aussi d'autre part pour une utilisation potentielle de ces cellules comme outil thérapeutique.

Dans l'introduction de ce manuscrit nous allons décrire dans une première partie les différents grands types de cellules souches ainsi que leur microenvironnement et le contrôle qu'il exerce sur leur biologie, puis nous aborderons l'utilisation des cellules souches en thérapie cellulaire. Enfin dans une troisième partie nous nous intéresserons au TA, à ses fonctions et à sa composition cellulaire et notamment aux cellules souches/progénitrices qu'il contient.

Ensuite, nous aborderons les travaux de recherche qui constituent notre travail de thèse. Seront ainsi abordés la caractérisation phénotypique des cellules souches/progénitrices du TA

et leur localisation au sein du TA ainsi que le contrôle exercé par le microenvironnement sur leur activité de prolifération, différenciation et migration.

INTRODUCTION

I. Les cellules souches et leur niche

I.1. Qu'est ce qu'une cellule souche ?

Une cellule souche est une **cellule indifférenciée** ayant un potentiel de différenciation en au moins un type cellulaire. D'un point de vue cytologique, une cellule souche a un rapport nucléo/cytoplasmique élevé, c'est-à-dire peu de cytoplasme, peu d'organelles et un noyau sphérique proéminent. Elle se caractérise par :

- son **auto-renouvellement** qui est la capacité pour une cellule de proliférer indéfiniment tout en maintenant un état indifférencié et donc toutes les potentialités des cellules souches. Les cellules souches peuvent se multiplier par **division symétrique** ou **asymétrique**. On distingue la **division symétrique homoplastique** qui correspond à la division cellulaire qui génère deux cellules filles identiques à la cellule mère et qui seront destinées à acquérir le même devenir (Figure 1 A). En général, ce type de division cellulaire est utilisé par les cellules souches embryonnaires mais aussi en cas de lésion pour régénérer le stock de cellules. Les cellules souches peuvent aussi effectuer une **division symétrique hétéroplastique** : les deux cellules filles produites seront identiques mais plus différenciées que la cellule mère. Les cellules souches ont aussi une caractéristique essentielle qui est leur capacité à générer simultanément des copies identiques d'elle-même et des cellules filles différenciées par **division asymétrique** (Figure 1 A) (abordé plus tard dans le paragraphe I.3.2.a)).

- ses **potentialités de différenciation** qui sont les capacités pour une cellule de se différencier en un ou plusieurs types de cellules matures. Selon leurs capacités de différenciation, on distingue plusieurs types de cellules souches ¹ (Figure 1 B):

- o **Les cellules souches totipotentes** : cellules issues de l'ovocyte fertilisé ou zygote et des descendants des deux premières divisions. Ces cellules peuvent donner tous les types cellulaires embryonnaires et extra-embryonnaires.

- o **Les cellules souches pluripotentes** : cellules descendant des cellules souches totipotentes qui ont formé la masse interne cellulaire du blastocyste à partir de laquelle l'embryon se développe. Elles ont le potentiel de donner, *in vitro* et *in vivo*, les trois feuilletts embryonnaires qui vont constituer tout l'organisme sauf les tissus extra-embryonnaires à l'origine du placenta.

- **Les cellules souches multipotentes** : cellules pouvant se différencier en un nombre limité de types cellulaires qui généralement constituent un tissu entier.
- **Les cellules souches unipotentes** : cellules capables de s'auto-renouveler et de se différencier en un seul type cellulaire spécialisé.
- **Les cellules progénitrices** : cellules qui présentent une capacité limitée d'auto-renouvellement et qui se différencie en un type cellulaire défini.

En plus de leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation, les cellules souches se caractérisent par leur capacité de maintenir un état de **quiescence** particulier (cf. paragraphe I.3.2.a)). La quiescence est la phase G_0 du cycle cellulaire dans laquelle rentrent les cellules en absence de facteurs mitotiques. C'est une phase de dormance pendant laquelle les cellules ont comme caractéristiques une faible taille cellulaire ainsi qu'une faible activité métabolique. Cet état de quiescence protège les cellules souches de possibles « agressions » qui les endommageraient et leur permet de remplir leurs fonctions tout au long de la vie.

Toutefois, aucune de ces propriétés ne suffit à garantir le caractère « souche » d'une cellule. En effet, celle-ci se doit d'avoir le potentiel de reconstituer à long terme la fonction d'un tissu de manière efficace, ce qui implique d'être capable d'un nombre important de divisions cellulaires et de différenciation *in vivo*. Cette dernière propriété distingue la cellule souche de sa descendance, les cellules progénitrices qui présentent des capacités plus limitées.

Ces caractéristiques jouent un rôle essentiel dans l'organogenèse lors du développement embryonnaire mais aussi dans la régénération des tissus adultes.

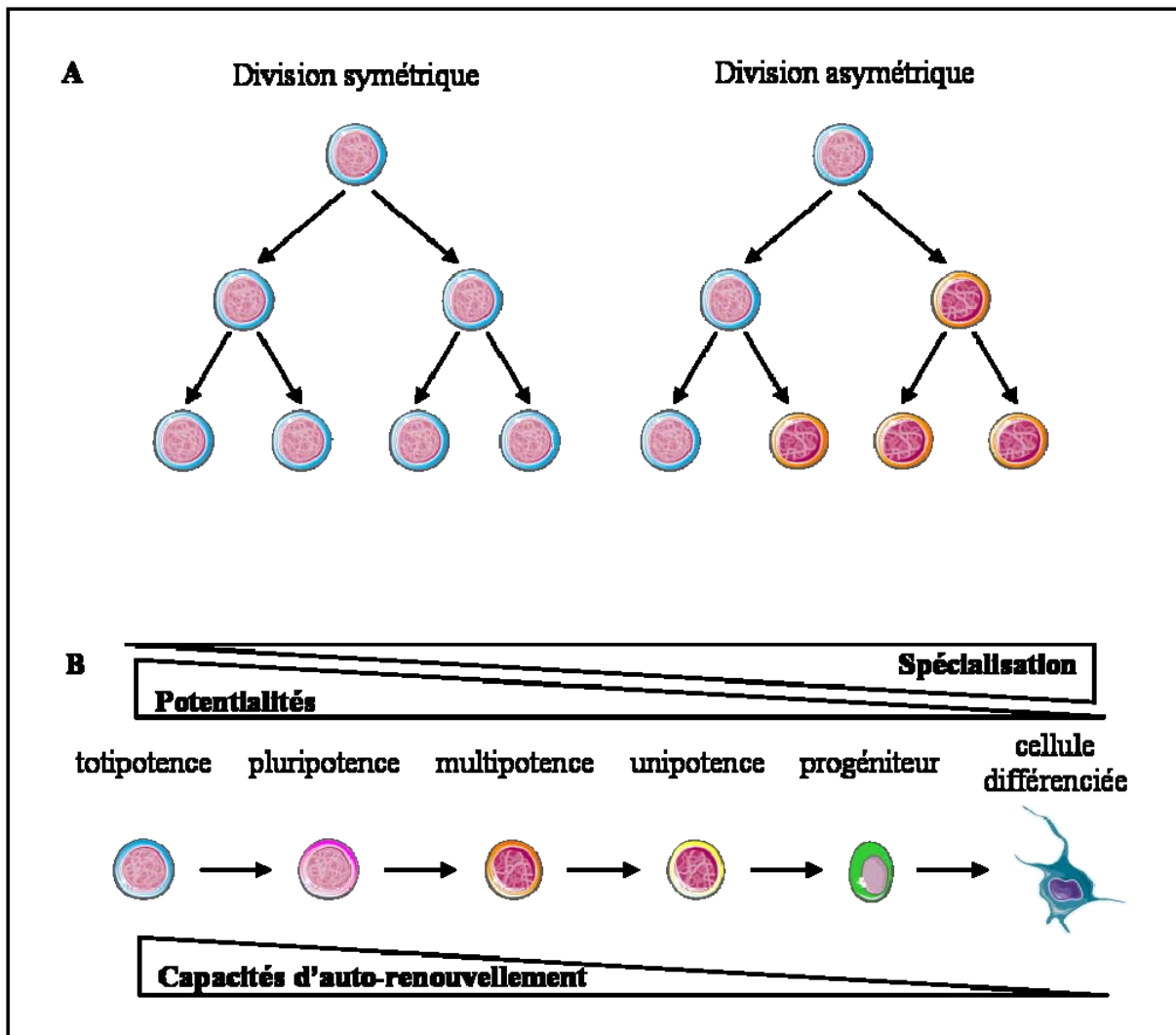


Figure 1: Caractéristiques d'une cellule souche.

(A) Les cellules souches (bleue) peuvent s'auto-renouveler soit par division symétrique en générant 2 cellules identiques à la cellule mère, soit par division asymétrique en donnant une cellule identique à la cellule mère et une cellule destinée à se différencier (orange). (B) Les cellules souches se distinguent par leur capacité de différenciation.

I.2. Les différents types de cellules souches

Les deux grands types de cellules souches chez les mammifères sont : les **cellules souches embryonnaires** qui sont isolées à partir de la masse interne du blastocyste et les **cellules souches adultes** qui sont retrouvées dans la majorité des tissus adultes.

I.2.1. Les cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires (ou cellules ES pour « embryonic stem cells ») sont l'unique population cellulaire qui a la capacité de s'auto-renouveler tout en maintenant une pluripotentiaité et qui peuvent ainsi se différencier en tous les types cellulaires d'un organisme. Les cellules ES dérivent de la masse cellulaire interne du blastocyste (5^{ème} jour préimplantatoire), à l'origine de l'épiblaste qui donne ensuite les trois feuilletts embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme), eux-mêmes qui précèdent la formation de tous les tissus du fœtus en développement (Figure 2).

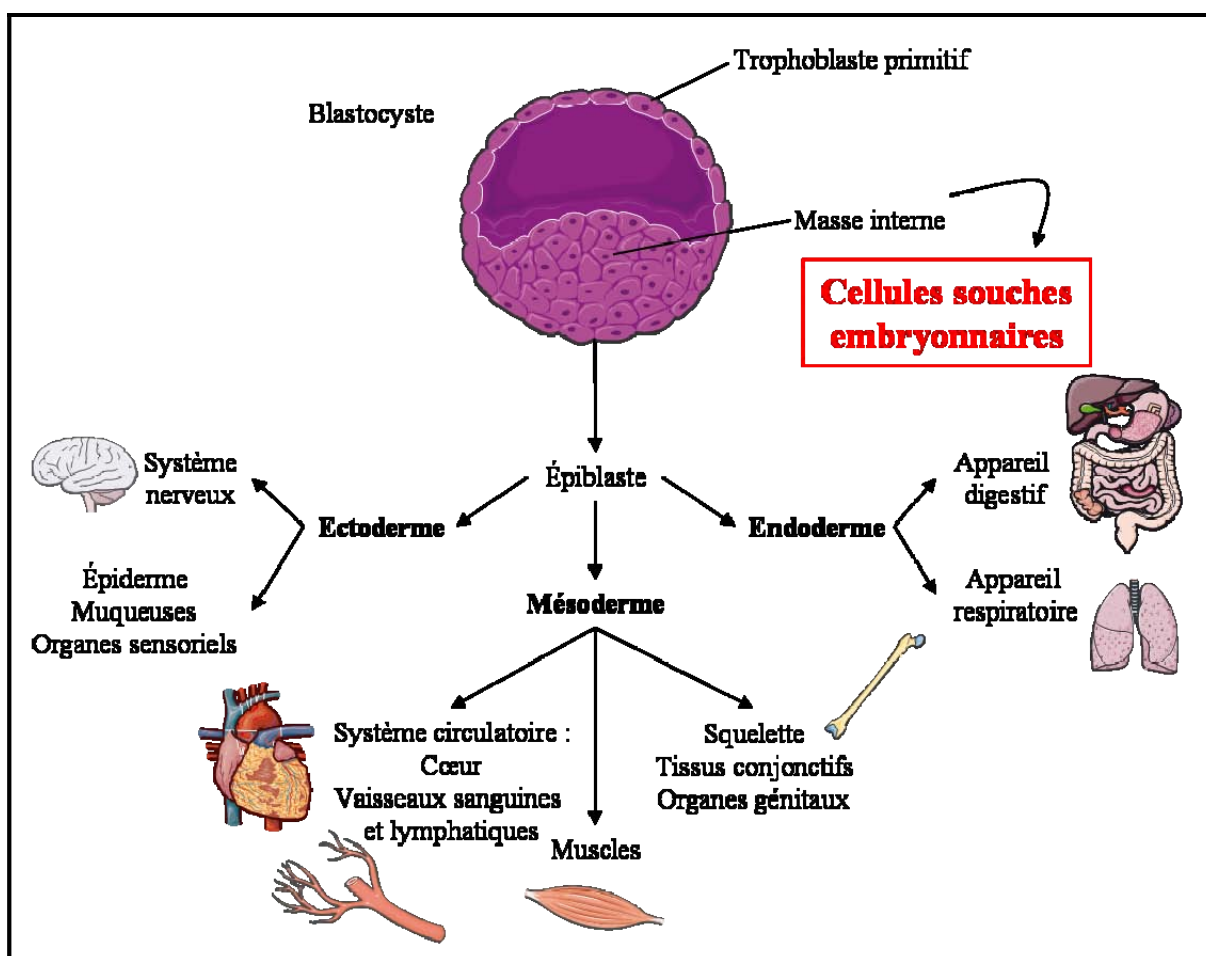


Figure 2 : Le blastocyste.

Les premières cellules ES isolées chez les mammifères l'ont été en 1981 par deux équipes indépendantes, celle de Evans et Kaufman² et celle de Martin³, à partir d'embryons de souris. Ces cellules montrent une intense activité de prolifération *in vitro* tout en gardant un état

indifférencié quand elles sont cultivées sur des cellules nourricières, des fibroblastes embryonnaires de souris, qui produisent la cytokine LIF (leukemia inhibitory factor) connue pour inhiber la différenciation des cellules ES en activant le facteur de transcription Stat3 mais aussi les voies de signalisation extracellular-signal-related kinase (ERK) et phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3K) qui contrôlent leur différenciation et leur prolifération, respectivement ⁴. Les cellules ES murines croissent en colonies de forme ronde et doivent être repiquées tous les 2-3 jours afin de préserver leur statut « souche ». L'injection de cellules ES dans des blastocystes ensuite réimplantés à des souris pseudogestantes, a permis de démontrer, grâce au chimérisme de la descendance, la capacité pluripotente de ces cellules puisqu'elles contribuent à la formation de tous les lignages cellulaires c'est-à-dire de tous les tissus de l'organisme (Figure 3). Depuis ces travaux précurseurs, les cellules ES murines sont devenues un outil central dans le développement de la technologie de transgénèse ⁵ et ont été utilisées et étudiées pour servir de vecteur à l'introduction de gènes dans des embryons.

Enfin, très récemment, des cellules souches murines ont été isolées à partir de l'épiblaste d'embryon post-implantatoire murin : **les EpiStem cells (EpiSC)** ^{6, 7}. Les EpiSC sont plus proches des cellules ES humaines que murines. *In vitro*, elles forment des colonies plates, caractéristique des cellules ES humaines, elles expriment les marqueurs de pluripotence Oct-4, Sox-2 et Nanog. Alors que les cellules ES murines requièrent les facteurs LIF et Bone Morphogenic Factor-4 (BMP-4) pour maintenir leur état indifférencié *in vitro*, les facteurs qui supportent l'auto-renouvellement des EpiSC, comme pour les cellules ES humaines, sont une combinaison de Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) et d'activine A. Les EpiSC sont multipotentes *in vitro* et leur greffe à des souris adultes conduit à la formation de tératomes. Cependant, contrairement aux cellules ES murines, elles sont incapables de s'incorporer à un blastocyste lors d'expérience de chimérisme.

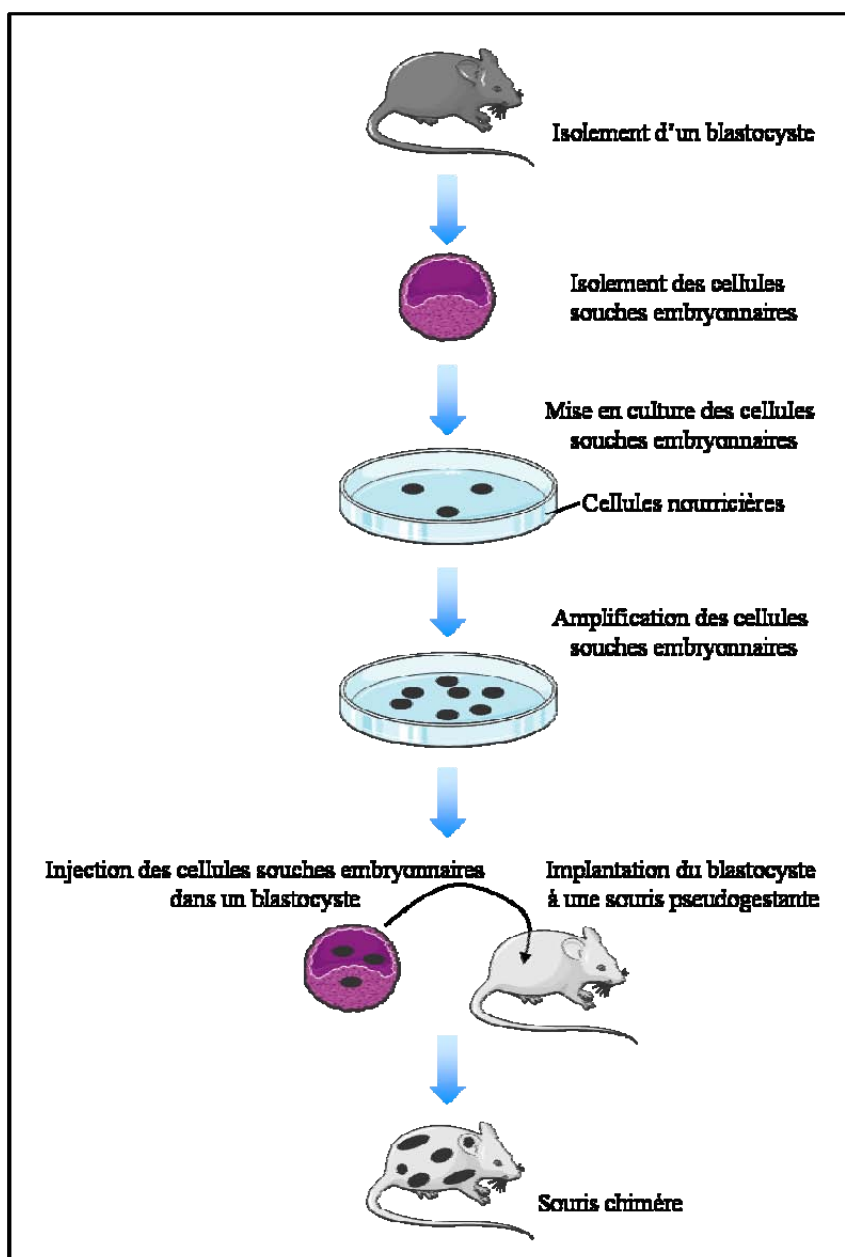


Figure 3 : Pluripotence des cellules souches embryonnaires in vivo.

Depuis 1998, où la première lignée humaine de cellules ES a été établie par Thomson et al. ⁸, pléthore de lignées, génétiquement différentes, ont été isolées à partir de blastocystes humains. Les techniques d'isolement et de culture des cellules ES humaines étant différentes selon le laboratoire ⁹ en terme de cellules nourricières utilisées mais aussi de densité d'ensemencement, de milieu de culture, des facteurs de croissance, de la méthode et du nombre de repiquages, il est évident qu'il existe des différences entre les lignées. Un besoin de standardisation s'est vite avéré nécessaire. Ainsi, un consortium de chercheurs travaillant sur les cellules ES humaines à travers le monde s'est créé, « The International Stem Cell

Initiative », afin de « standardiser » la caractérisation des lignées des cellules ES humaines ¹⁰. Par des approches de cytométrie de flux pour la caractérisation des antigènes de surface et par des approches de RT-PCR ou de « microarrays » pour l'étude des profils d'expression génique, sur 59 lignées de cellules ES provenant de 17 laboratoires à travers le monde ¹¹, un profil des différentes cellules ES humaines a pu être dégagé avec la reconnaissance de marqueurs communs :

- des facteurs de transcription : Nanog, Oct-4 (aussi connu sous le nom de POU5F1) cruciaux pour le maintien de l'état indifférencié et de l'auto-renouvellement ¹² mais aussi les gènes TDGF1 (Teratocarcinoma-derived growth factor1), DNMT3B (DNA methyltransferase 3B), GABRB3 (Gamma-aminobutyric acid receptor beta-3) et GDF3 (Growth differentiation factor 3),
- des antigènes glycolipidiques : SSEA-3 et SSEA-4 (stage-specific embryonic antigen-3 et 4), exprimés sur toutes les cellules ES humaines mais pas essentiels pour le maintien de leur pluripotence ¹³,
- les antigènes à keratane sulfate TRA-1-60, TRA-1-81, GCTM2 et GCT343,
- les protéines CD9, CD90 (Thy-1), l'alkaline phosphatase tissu-non spécifique et l'HLA de classe I.

Il est cependant important de noter que les cellules ES pourraient être un artefact de culture ¹⁴. En effet, *in situ*, pendant le développement embryonnaire, la masse cellulaire interne du blastocyste se différencie rapidement pour donner l'épiblaste et les trois feuilletts embryonnaires. Ceci suggère que les cellules ne sont plus pluripotentes mais multipotentes et ne peuvent donner que les types cellulaires dérivant d'un seul feuillet embryonnaire.

I.2.2. Les cellules souches amniotiques

Le liquide amniotique contient différents types cellulaires provenant du fœtus en cours de développement ^{15, 16}. Ces cellules peuvent être isolées lors d'une amniocentèse, suivie d'une centrifugation et d'une mise en culture du culot cellulaire. Les cellules ainsi obtenues par adhérence sur plastique sont une population hétérogène qui exprime à la fois des marqueurs de cellules souches embryonnaires (TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-4, Nanog et Oct-4) ¹⁷⁻¹⁹ et des marqueurs de cellules souches mésenchymateuses (CD29 (intégrine β 1), CD44, CD73, CD90 et CD105 (endogline)) ^{18, 20}, ce qui suggère qu'elles représentent un état intermédiaire entre des cellules souches embryonnaires et des cellules souches adultes. Elles possèdent une grande capacité de prolifération *in vitro* tout en gardant leur état indifférencié, sans être

tumorigène¹⁸. Ces cellules amniotiques sont considérées comme des cellules souches multipotentes ; elles ont des capacités de différenciation semblables à celles des cellules souches mésenchymateuses (cf. paragraphe I.2.4.b)). Elles peuvent exprimer *in vitro* des marqueurs adipocytaires, ostéoblastiques, chondroblastiques, neuronaux et hépatocytaires ainsi que des marqueurs de cellules musculaires et endothéliales. Elles montrent aussi des activités neurogéniques et ostéogéniques *in vivo*¹⁸. Enfin, il a récemment été montré qu'une population de cellules isolées à partir de liquide amniotique humain ou murin possédaient de réels potentiels hématopoïétiques tant *in vitro* et *in vivo*²¹.

I.2.3. Les cellules souches pluripotentes induites ou IPs

Takahashi et Yamanaka, par d'innovants travaux en 2006, ont montré pour la première fois que l'expression ectopique de 4 facteurs de transcriptions nécessaires au maintien de la pluripotence des cellules ES, Oct3/4, Sox2, c-Myc et Klf4, dans des conditions de culture de cellules souches embryonnaires, pouvait reprogrammer des cellules somatiques murines en cellules souches pluripotentes aussi nommées « iPS cells »^{22, 23}. Étonnamment l'introduction du facteur de transcription Nanog n'était pas nécessaire. Ces travaux d'abord conduits chez la souris ont par la suite été réalisés dans des fibroblastes d'épiderme humain²⁴⁻²⁶. Les iPS sont semblables aux cellules ES en terme de morphologie, de prolifération, d'antigènes de surface, d'expression génique, de statut épigénétique des gènes spécifiques de la pluripotence. De plus, ces cellules peuvent se différencier dans tous les types cellulaires issus des trois feuilletts embryonnaires *in vitro* et *in vivo* dans des tératomes. Au cours des trois dernières années, des progrès ont été faits pour générer ces cellules souches reprogrammées sans utiliser de vecteurs viraux intégratifs mais des adenovirus ou plasmides non-intégratifs^{27, 28} ou des protéines reprogrammées recombinantes²⁹ ou en réduisant le nombre de gènes introduits en utilisant des cellules qui expriment naturellement un gène de pluripotence^{30, 31} mais aussi en jouant seulement sur les conditions de culture³².

I.2.4. Les cellules souches adultes

Avec le développement de l'embryon, les cellules souches embryonnaires pluripotentes laissent place à des cellules aux capacités de plus en plus restreintes qui donneront naissance aux différents tissus et organes. Une fois les cellules des différents tissus différenciées et spécialisées, les organes doivent avoir recours à un mécanisme pouvant maintenir leur homéostasie en remplaçant les cellules perdues par apoptose ou par lésions et ainsi participer

à la régénération tissulaire. On estime qu'un individu perd plus de 20 milliards de cellules par jour, ce qui nécessite un processus de reconstitution permanent³³. Certains organes tels que le cerveau, le cœur³⁴ ou les reins, se renouvellent peu. Par contre, d'autres tissus, comme la moelle osseuse, la peau ou l'intestin, sont en constante régénération. Pour soutenir cette fonction de renouvellement, les organes possèdent un réservoir de cellules, les cellules souches adultes, qui peuvent servir tout au long de la vie, leur stock peut être maintenu grâce à une balance entre auto-renouvellement et différenciation. Même si la capacité de différenciation en la plupart, voire tous les types cellulaires de l'organisme, semble être réservée aux cellules souches embryonnaires, les cellules souches adultes résidant dans un organe ou un tissu semblent cependant capables de donner au moins un (unipotente) ou plusieurs (multipotente) lignages et de s'auto-renouveler. Etant spécifiques des organes dans lesquels elles résident, leur éventail d'options de différenciation est généralement limité aux cellules qui composent le tissu. Elles sont cependant appelées cellules souches multipotentes. Les cellules souches adultes sont aussi connues sous le terme de cellules souches somatiques en référence à toutes les cellules du corps à l'exception des cellules germinales (spermatozoïde et ovule).

Les cellules souches adultes sont rares et n'expriment en général aucun marqueur de surface spécifique mais partagent plutôt une combinaison de certains antigènes qui ne leur sont pas spécifiques. C'est cette combinaison qui permet tout de même de les distinguer des autres types cellulaires.

Dans cette introduction de thèse, nous nous sommes intéressés aux cellules souches adultes des organes qui nécessitent un fort pouvoir d'auto-renouvellement et dont leurs microenvironnements sont les plus étudiés.

a) Les cellules souches hématopoïétiques

Parmi toutes les cellules souches adultes, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont les mieux caractérisées. Leur existence dans la moelle osseuse a été démontrée il y a environ 50 ans par la reconstitution d'une hématopoïèse à long terme dans un modèle de souris létalement irradiées³⁵. Elles sont **multipotentes**, capables de **s'auto-renouveler** et peuvent donner n'importe quel type cellulaire du sang provenant du **lignage myéloïde** (donnant les érythrocytes, les monocytes/macrophages, les granulocytes (éosinophiles, basophiles et neutrophiles) et les plaquettes) et du **lignage lymphoïde** (donnant les cellules NK (pour Natural Killer) et lymphocytes B et T) et ceci tout au long de la vie d'un individu. Les CSH

sont **rares** (fréquence < 1 % des cellules de la moelle osseuse ³⁶) et leur fréquence diminue avec l'âge. Elles donnent des progéniteurs qui perdent progressivement leur capacité d'auto-renouvellement au fur et à mesure que leurs potentiels de différenciation se réduisent pour donner des cellules matures fonctionnelles. Historiquement, c'est par l'utilisation d'anticorps dirigés contre les marqueurs spécifiques des différentes cellules matures (lymphocytes B et T, érythrocytes...) que des cellules négatives pour les marqueurs de ces cellules différenciées ont été isolées. Leurs potentiels ont été testés à la fois *in vitro* par analyse clonale et *in vivo* par des expériences de reconstitution de l'hématopoïèse chez des souris irradiées ³⁷. Ainsi, une cellule n'exprimant pas les marqueurs des lymphocytes B mais pouvant donner des lymphocytes B, T ou NK, a pu être définie comme un progéniteur du lignage lymphoïde. Ces résultats sont à l'origine de l'utilisation de 7-10 anticorps spécifiques pour la sélection négative des cellules de la moelle. Toutes les CSH fonctionnelles sont donc négatives pour des marqueurs de surface qui apparaissent avec l'engagement des cellules dans les différents lignages et donc normalement exprimés sur les cellules différenciées ou matures ; elles sont ainsi nommées Lin⁻ (pour lineage négatif). Par la suite, d'autres marqueurs de surface spécifiques (comme CD90, Sca1 chez la souris ou CD34 chez l'homme et c-kit/CD117) ont été décrits pour être exprimés sur les cellules lin⁻ qui participent à la reconstitution de l'hématopoïèse de souris irradiées. Parmi ces cellules Lin⁻/Sca1⁺/CD90^{+/-}/c-kit⁺ qui restent une population hétérogène, des cellules avec des capacités de repopulation à long terme (LT-HSC : ces cellules souches et leur descendance ont besoin de plus de 15 divisions cellulaires et plus de 5 semaines pour produire des cellules différenciées) et à plus court terme (ST-HSC : ces cellules souches et leur descendance ont besoin de 5 à 10 divisions cellulaires et moins de 3 semaines pour produire des cellules différenciées) mais aussi des progéniteurs multipotents (MPP : qui ont peu ou pas de capacités d'auto-renouvellement) peuvent être distingués ³⁸. Moins de 1% des cellules de la moelle osseuse possèdent cette propriété de repopulation à long terme. Enfin, c'est par l'expression différentielle du marqueur CD150 ou SLAMf1 (Signaling lymphocyte activation molecule family member 1) que les LT-HSC et ST-HSC peuvent être séparées des MPP ³⁹. C'est ainsi, par la mise en évidence de plusieurs marqueurs de surface spécifiques et par la capacité de repopulation *in vivo*, que la hiérarchie de la différenciation hématopoïétique a pu être caractérisée en allant de la cellule souche hématopoïétique la plus immature (LT-HSC) aux cellules différenciées fonctionnelles ³⁷ (Figure 4).

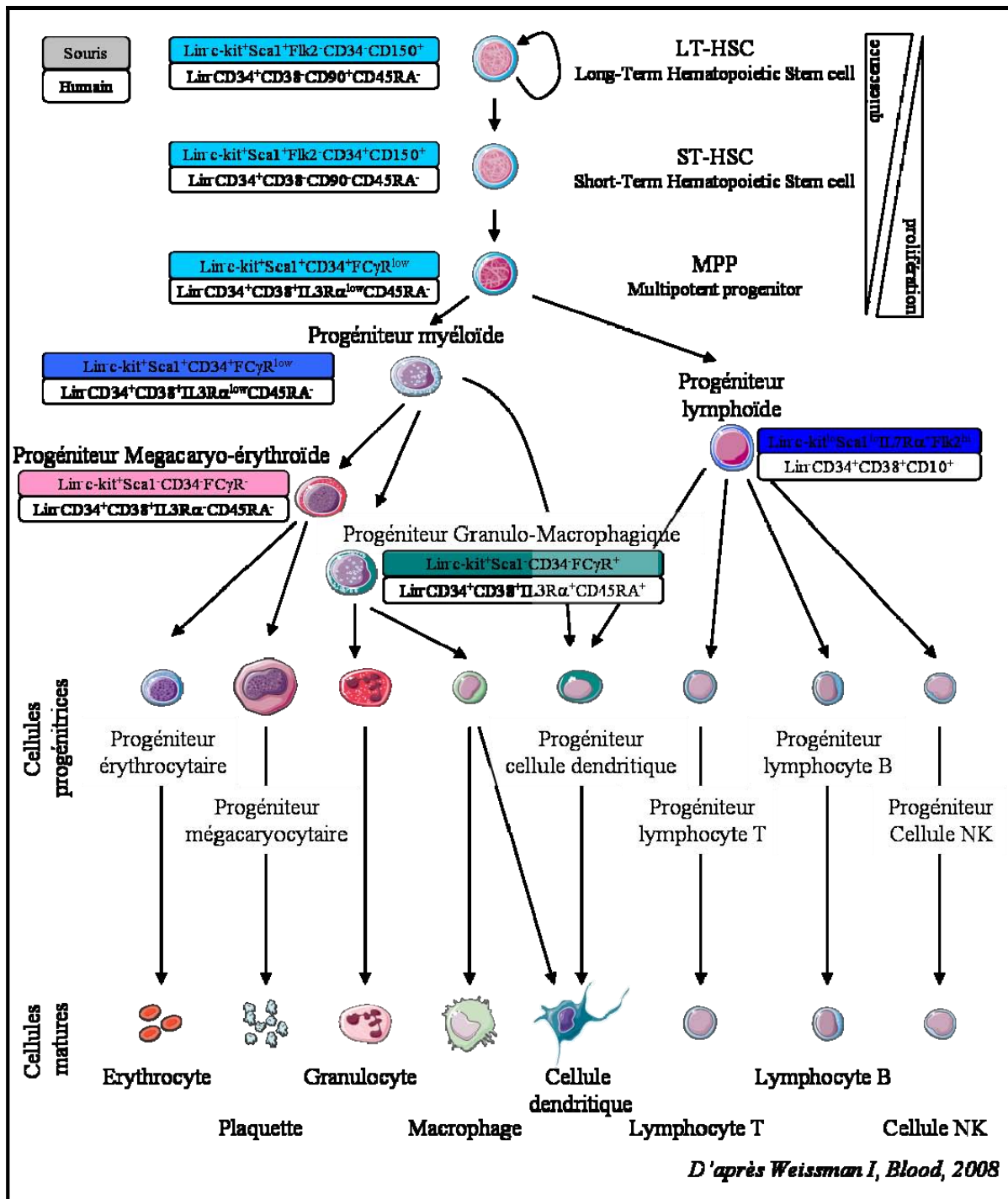


Figure 4 : L'hématopoïèse.

Dans la moelle osseuse, les CSH quiescentes sont localisées à proximité des ostéoblastes qui leur fournissent une partie des facteurs nécessaires à leur maintien dans cet état, alors que les CSH en prolifération et en différenciation sont, elles, localisées près des capillaires sanguins (Figure 5).

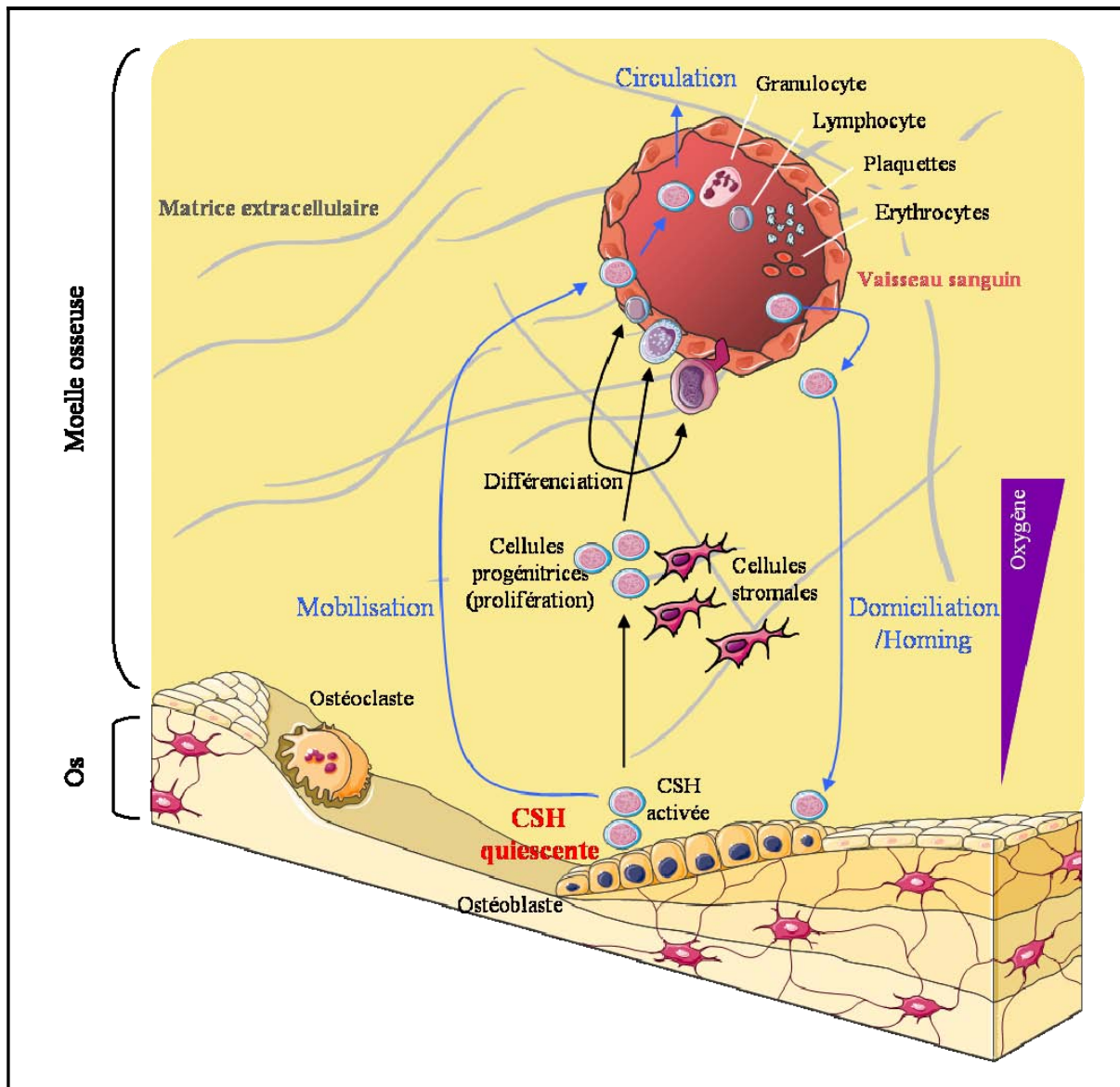


Figure 5 : Les cellules souches hématopoïétiques (CSH).

Outre l'utilisation des marqueurs de surfaces spécifiques pour l'isolement des CSH, d'autres méthodes de séparation sont utilisées. Les LT-HSC sont enrichies dans la population qui possède la capacité à exclure la Rhodamine 123⁴⁰, marqueur de l'activité mitochondriale, grâce à la P-glycoprotéine codée par le gène MDR1 (multidrug resistance 1)⁴¹. Les LT-HSC peuvent aussi se distinguer de leur descendance par leur aptitude à exclure le colorant vital Hoechst 33342⁴² grâce au transporteur ABCG2 de la famille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette transporter)⁴³. Ces cellules qui excluent ce colorant vital sont connues sous le nom de « side population » (SP) du fait de leur position près de l'axe des ordonnées sur un graphique de cytométrie en flux. Notons que les cellules souches hématopoïétiques ne sont

pas le seul type cellulaire à exprimer le transporteur ABCG2 qui confère cette caractéristique d'exclusion du Hoechst. Dans le but de protéger le corps des xénobiotiques, il est exprimé physiologiquement dans le foie, l'épithélium intestinal, le colon, les poumons, les reins, le placenta, la barrière hémato-encéphalique, de nombreuses tumeurs⁴⁴ mais aussi dans d'autres cellules souches telles que des cellules souches neurales⁴⁵ ou des cellules souches musculaires⁴⁶.

Dans le but de maintenir une hématopoïèse tout au long de la vie sans épuiser toutes les CSH, la plupart d'entre elles reste quiescente et un nombre limité d'entre elles entre dans le cycle cellulaire pour finir par se différencier. C'est par leur état de **quiescence** identifiable par leur capacité de rétention d'un intercalant de l'ADN comme la 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) que les LT-HSC peuvent être distinguées de leur descendance, les ST-HSC et les MPP⁴⁷. Approximativement, 75% des LT-HSC sont en phase G₀ et se divisent tous les 57 jours⁴⁸. En effet, après injection de BrdU à des souris, les cellules en prolifération incorporent l'analogue de la thymidine à leur ADN. Les cellules à forte activité mitotique vont perdre le BrdU au fur et à mesure de leur division cellulaire alors que les cellules quiescentes ou avec une prolifération cellulaire lente vont retenir le BrdU plus longtemps. C'est ainsi que les cellules souches quiescentes ou « label retaining cells » (LRC) peuvent être discriminées des cellules progénitrices en phase proliférative « transit-amplifying cells »⁴⁹. Par cette technique, une équipe a récemment identifié, dans la population $lin^-/Sca1^+/cKit^+/CD150^+/CD48^-/CD34^-$, des CSH dormantes qui ne se renouvellent que tous les 145 jours pour préserver leur activité⁵⁰. La balance entre quiescence, auto-renouvellement et engagement dans les différents lignages est finement contrôlée par une combinaison de signaux régis par le microenvironnement dans lequel résident les cellules souches et que nous aborderons plus loin.

b) Les cellules stromales mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses ont d'abord été décrites à partir de la moelle osseuse pour être des cellules non-hématopoïétiques, adhérentes, ressemblant à des fibroblastes, formant des CFU-F (colony forming units-fibroblastic) et capables de se différencier en os⁵¹. Par la suite, ces cellules ont montré des capacités de différenciation en différents types cellulaires dérivant du feuillet embryonnaire mésodermique⁵². Elles sont isolées grâce à leur **propriété d'adhérence au plastique**. Elles ont un grand potentiel d'amplification en culture et après plusieurs « passages », elles sont morphologiquement homogènes et ont un aspect fibroblastique. Leur caractère « souche » (auto-renouvellement et multipotentialité) n'étant

montré qu'*in vitro* après une étape d'expansion cellulaire et non pas au niveau d'une seule cellule et *in vivo* et du fait de leur potentielle localisation stromale dans le tissu ainsi que de leur rôle comme cellules de soutien ; elles sont appelées plus couramment **cellules stromales mésenchymateuses (CSM)**.

Les CSM sont rares dans la moelle osseuse, elles représentent environ une cellule sur 10000⁵³ et leur fréquence diminue avec l'âge⁵⁴. Chez l'homme, les CSM n'expriment pas de marqueur spécifique qui pourrait les définir spécifiquement mais une combinaison de marqueurs (Tableau 1). **Elles sont positives pour les marqueurs CD105, CD73, CD44, CD90, CD71 (récepteur de la transferrine) et Stro-1 aussi bien que les molécules d'adhésion CD106, CD166 (Activated leucocyte cell adhesion molecule=ALCAM), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) et CD29^{55,56}**. Par contre, elles n'expriment ni les marqueurs hématopoïétiques CD45, CD34, CD14 ou CD11, ni les molécules co-stimulantes CD80, CD86 ou CD40, ni les molécules d'adhésion CD31, CD18 ou CD56.

Tableau 1 : Marqueurs membranaires des CSM humaines.

	Positives	Négatives
Molécules d'adhésion	CD106, CD166, ICAM-1, CD29	CD31, CD18, CD56
Molécules co-stimulantes		CD80, CD86, CD40
Marqueurs hématopoïétiques		CD45, CD34, CD14, CD11
Récepteurs	CD44, CD71	
Autres	CD105, CD73, CD90, Stro-1	

Les CSM n'expriment pas toujours les mêmes marqueurs en fonction des espèces. Alors que l'absence d'expression du marqueur CD34 par les CSM est clairement admise chez l'homme, les CSM murines, positives pour les marqueurs Sca-1 et CD44 et négatives pour CD45 ou CD11b, sont enrichies lorsqu'une sélection positive des cellules CD34 est effectuée avant l'adhérence au plastique⁵⁷. Cette observation laisse penser que les CSM natives et non cultivées pourraient exprimer le marqueur CD34. Cependant, du fait de la technique d'isolement par adhérence au plastique et de leur faible nombre dans la moelle osseuse, l'étude des CSM nécessite une étape de prolifération *in vitro* qui pourrait modifier l'expression du CD34. En effet, il a déjà été montré que les cellules endothéliales CD34⁺

perdent l'expression du CD34 en culture et que cette perte est fonction de leur prolifération et de leur adhérence *in vitro*⁵⁸. De plus, alors que l'expression du marqueur CD34 a longtemps été restreinte aux CSH et aux cellules endothéliales, on sait maintenant que d'autres cellules souches adultes telles que les cellules satellites du muscle⁵⁹ ou les cellules souches du follicule pileux⁶⁰ expriment le marqueur CD34 *in vivo*. Pour cette raison, nous nous sommes intéressés à ces deux types de cellules souches dans cette introduction de thèse (cf. paragraphe I.2.4.e) et I.2.4.c)).

Mise à part leur identification basée sur leurs caractéristiques morphologiques et phénotypiques, les CSM peuvent être identifiées par leurs **potentiels de différenciation *in vitro*** en trois principaux types cellulaires : les ostéoblastes, les chondroblastes ou les adipocytes⁵². Néanmoins, elles ont aussi montré des capacités de différenciation *in vitro* en myocytes⁶¹, ténocytes⁶², neurones⁶³, hépatocytes⁶⁴, cellules endothéliales⁶⁵, cardiomyocytes⁶⁶ et cellules produisant de l'insuline⁶⁷ (Figure 6).

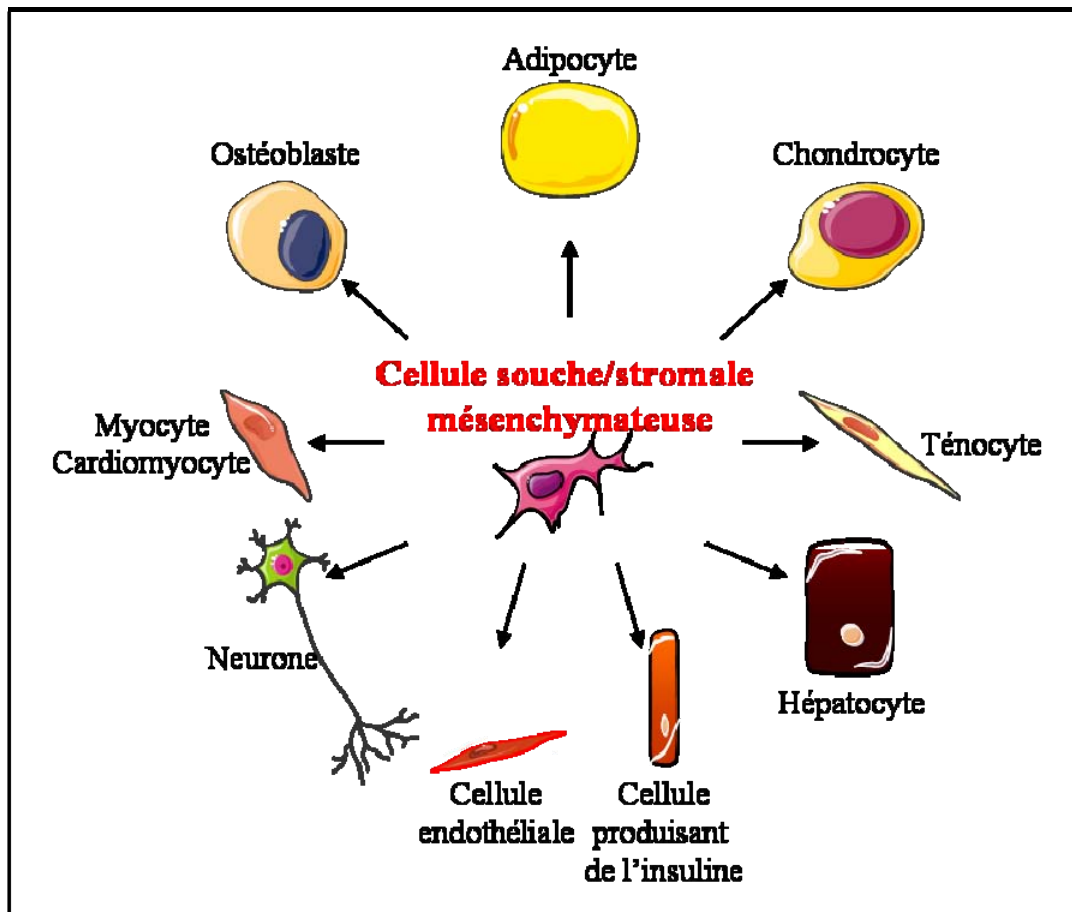


Figure 6 : Les cellules souches/stromales mésenchymateuses.

Au sein de la moelle osseuse, les CSM participeraient à l'homéostasie du squelette en se différenciant en ostéoblastes et en adipocytes, cellules de soutien de la moelle. Elles fournissent aussi une structure physique aux CSH par la sécrétion de molécules matricielles telles que la fibronectine, la laminine, du collagène et des protéoglycans. Elles peuvent réguler leur prolifération et leur différenciation par la production de cytokines et de facteurs de croissance^{56, 68, 69} mais aussi par des contacts cellules-cellules puisqu'elles expriment un grand nombre d'intégrines et d'autres molécules d'adhésion. Les CSM possèdent de nombreux **effets immunomodulateurs** (Figure 7). Elles ont montré des capacités à échapper à la reconnaissance immunitaire et à inhiber les réponses immunes^{70, 71}. Elles limitent *in vitro* l'activation et la prolifération des lymphocytes T surtout par des interactions via des contacts cellules-cellules mais aussi par les facteurs qu'elles sécrètent comme l'HGF (Hepatocyte Growth Factor), le TGF β ⁷² ou la prostaglandine E2⁷³. Mais cet effet immunosuppresseur est aussi mis en jeu grâce à une enzyme exprimée par les CSM, l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), qui dégrade le tryptophane et dont les produits de dégradation suppriment la

prolifération des lymphocytes T ⁷⁴. Parallèlement, les CSM augmentent la proportion de lymphocytes T régulateurs CD4⁺/CD25⁺ ⁷⁵. Les CSM interfèrent aussi avec la différenciation, la maturation et la fonction des cellules dendritiques ⁷⁶, la prolifération des lymphocytes B ⁷⁷ et des cellules NK ⁷⁸. Les CSM ont aussi d'importants effets immunomodulateurs *in vivo*.

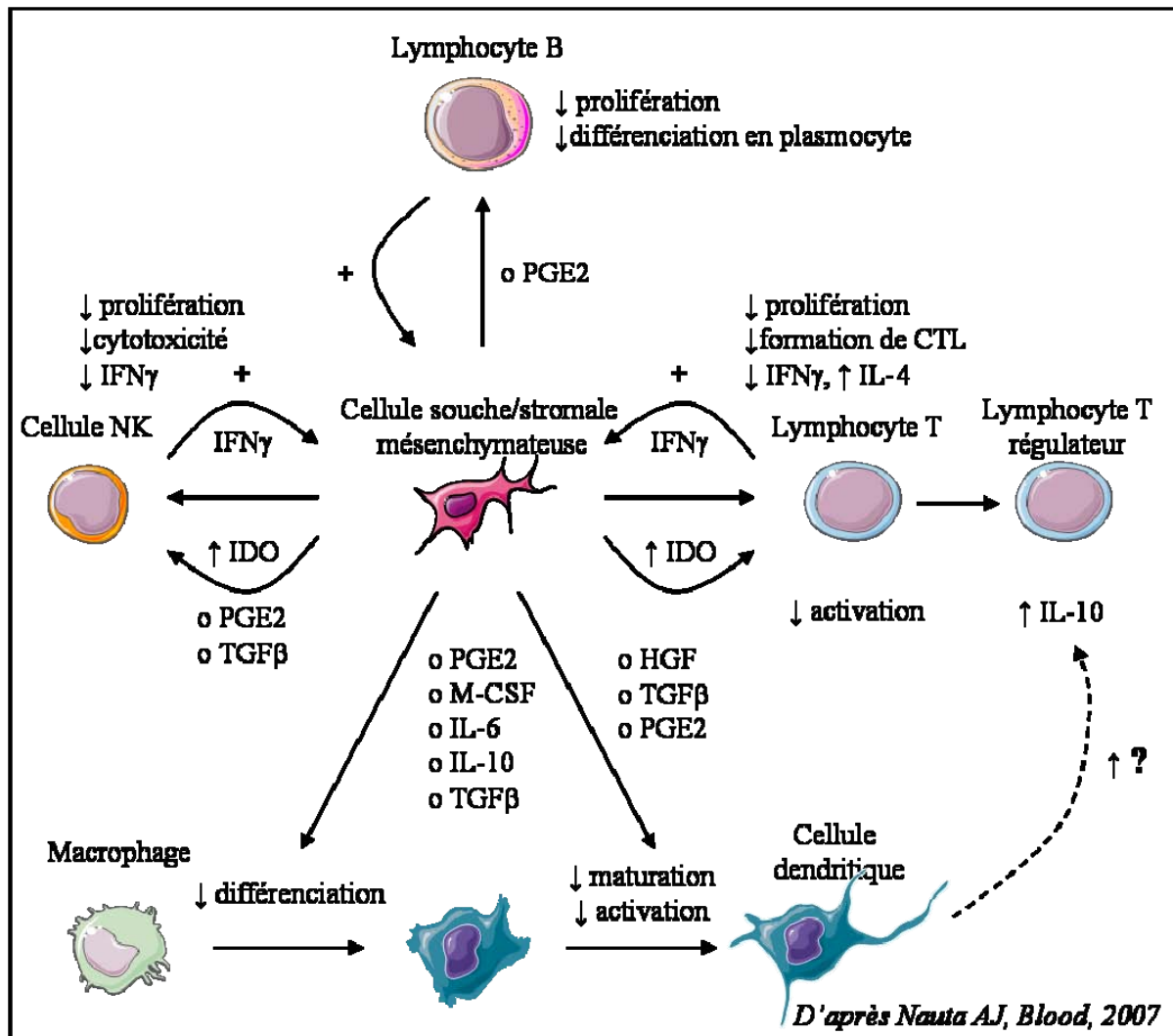


Figure 7 : Effets immunomodulateurs des cellules souches mésenchymateuses.

IDO: l'indoleamine 2,3-dioxygénase; PGE2: Prostaglandine E2; IFN γ : Interféron γ ; IL-4 ou -10: Interleukine -4 ou -10; TGF β : Transforming Growth Factor β ; M-CSF: macrophage colony stimulating factor.

Les CSM ont la capacité de migrer depuis la circulation vers les tissus dans des conditions de lésions durant lesquelles certains signaux chémoattractants peuvent être augmentés ⁷⁹.

Des cellules de type mésenchymateux sont maintenant isolées à partir de tissus autres que la moelle osseuse comme le tissu adipeux ⁸⁰ (cf. paragraphe III.3.2), le liquide amniotique (cf.

paragraphe I.2.2) ou le liquide synovial ⁸¹. Il est même suggéré qu'elles pourraient résider dans tous les tissus ou organes du corps humain ⁸².

L'intérêt grandissant pour les CSM a conduit de nombreux laboratoires à les étudier en utilisant des approches d'isolement et d'expansion différentes ainsi que diverses méthodes de caractérisation mais aussi une dénomination différente comme cellules souches mésenchymateuses, cellules stromales mésenchymateuses ou cellules progénitrices mésenchymateuses. Un comité, « The International Society for Cellular Therapy position statement », a essayé de résoudre la confusion qui existe en suggérant le nom de cellules stromales mésenchymateuses multipotentes et en proposant trois critères d'identification des CSM humaines ⁸³. Premièrement, les CSM doivent être des cellules adhérentes au plastique lorsqu'elles sont cultivées en conditions normales. Deuxièmement, les CSM doivent exprimer les marqueurs CD105, CD73 et CD90 et être négatives pour les marqueurs CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 et pour l'HLA-DR. Troisièmement, les CSM doivent se différencier en ostéoblastes, chondroblastes et en adipocytes *in vitro*.

Cependant leur identité ainsi que leur localisation restent controversées. Au niveau morphologique avec sa forme étoilée et du fait de sa localisation stromale dans la moelle osseuse, la CSM est souvent confondue avec un fibroblaste. La CSM serait-elle le nouveau terme pour désigner un fibroblaste ⁸⁴? D'un point de vue histo-anatomique, un fibroblaste est une cellule de forme étoilée, indifférenciée, adhérente, n'exprimant pas de marqueur spécifique, entourée du collagène qu'elle sécrète et se localisant dans le stroma de tous les tissus du corps humains. Les fibroblastes partagent avec les CSM un certain nombre de propriétés. Comme les CSM, ils ont notamment la capacité de différenciation en adipocytes, ostéocytes, chondrocytes ou en cellules musculaires lisses ⁸⁵ et possèdent aussi des effets immunomodulateurs ⁸⁶. Bien qu'il soit très difficile de localiser les CSM *in vivo* à cause du manque de marqueur spécifique et de leur faible nombre, il a été suggéré que les CSM pourraient avoir une localisation périvasculaire *in vivo*. Cette localisation associée à l'expression de marqueurs des péricytes laisse même spéculer que les CSM seraient des péricytes ^{56, 87}. En effet, un péricyte est défini morphologiquement par sa localisation le long des microvaisseaux (artérioles, capillaires et veinules) qu'il stabilise grâce aux contacts étroits qu'il établit avec les cellules endothéliales ⁸⁸. Ils expriment de nombreux marqueurs communs avec les CSM tels que CD105 ⁸⁹, CD73 et CD90 ⁹⁰, Stro-1 mais sont aussi positifs pour les marqueurs α SMA (α Smooth Muscle Actin), NG2, CD140b ⁸⁹ et CD146 ⁹¹ et négatif pour CD45. Ils possèdent des capacités de différenciation chondrocytaire ⁹², ostéocytaire ⁹³, myocytaire, adipocytaire ⁹⁴ et montrent des capacités de phagocytose ⁹⁵. Des questions restent

ouvertes. **Les CSM, les fibroblastes et les péricytes sont-elles la même cellule ou sont-elles des cellules spécialisées différentes ?** Il est certain que des investigations sont encore nécessaires afin de répondre à cette question mais aussi pour trouver des marqueurs spécifiques afin de définir la localisation et le rôle des CSM *in vivo*. En effet, les CSM sont très bien décrites *in vitro* mais il n'existe à ce jour aucune preuve qu'elles soient fonctionnelles *in vivo*, il se pourrait qu'elles acquièrent leur multipotence en culture grâce aux facteurs de croissance apportés par l'expérimentateur ou produits par les conditions de culture.

c) Les cellules souches intestinales

L'intestin est composé de 3 couches tissulaires : la couche externe qui est une couche de muscles lisses ; la couche intermédiaire qui est une couche de tissu connectif contenant les vaisseaux sanguins et lymphatiques, les fibres nerveuses et de nombreuses cellules immunitaires et la couche interne qui est un épithélium monostratifié ou muqueuse intestinale. Chez les mammifères, l'épithélium intestinal est replié en des millions d'invaginations qui comprennent une crypte à la base et une villosité composée de cellules différenciées. L'épithélium intestinal subit un constant renouvellement. Seulement 3 à 5 jours sont nécessaires à des cellules indifférenciées ou cellules souches intestinales pour proliférer et différencier en tous les types cellulaires constituant l'épithélium⁹⁶. C'est en 1974 que Cheng et Leblond ont décrit pour la première fois des cellules souches intestinales multipotentes capables de donner tous les types cellulaires matures de l'épithélium intestinal tout en s'auto-renouvelant⁹⁷⁻⁹⁹. Ces cellules peuvent donner les 4 types cellulaires qui composent l'épithélium intestinal ; les entérocytes (qui absorbent les nutriments), les cellules entéroendocrines (qui sécrètent les hormones peptidiques), les cellules de Gobelet (qui produisent le mucus intestinal) sont les types cellulaires qui forment la villosité et les cellules de Paneth (qui sécrètent des peptides antibactériens) sont situées au fond des cryptes. Les cellules souches se divisent, leurs cellules filles « transit-amplifying cells » migrent le long de l'axe de la crypte et prolifèrent activement (Figure 8).

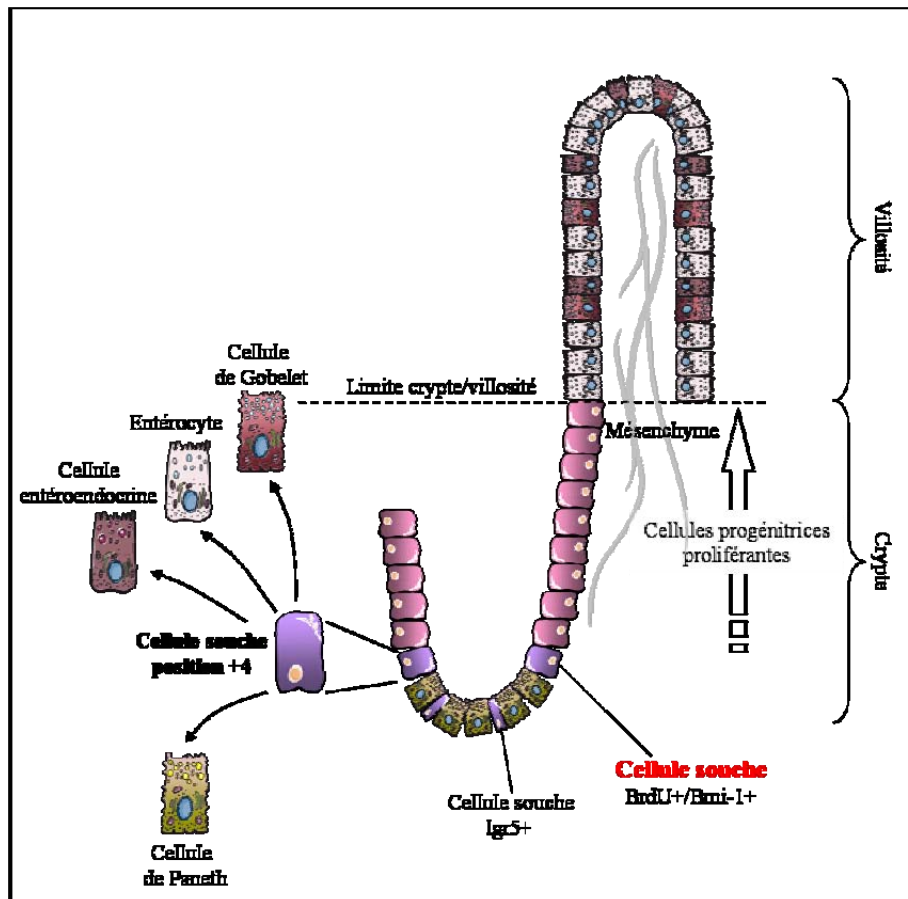


Figure 8 : Les cellules souches de l'intestin.

Ces dernières se divisent toutes les 12 à 16 heures générant environ 300 cellules par crypte chaque jour. Lorsqu'elles ont atteint la jonction crypte-villosité, elles différencient en un des 3 types cellulaires constitutifs de la villosité et continuent leur migration jusqu'à leur position définitive. Du fait du manque de marqueur spécifique et d'expérience pour étudier leurs propriétés, leur localisation ainsi que leur identification précise a été très difficile. Il a longtemps été admis par histologie que les cellules souches intestinales étaient localisées au fond des cryptes parmi des cellules de Paneth. Des expériences de rétention de BrdU ont permis de définir leur position précise au sein de la crypte grâce à une des caractéristiques des cellules souches qui est leur état de quiescence. Il a pu être démontré que les cellules souches intestinales au nombre de 4 à 6 par crypte¹⁰⁰ se situent au fond des cryptes en « position + 4 » c'est-à-dire que les cellules sont positionnées en anneau à 4 cellules de Paneth du fond¹⁰¹. Un marqueur spécifique des cellules souches intestinales a récemment été découvert. En effet, ces cellules expriment *lgr5*, gène cible de Wnt qui code pour un récepteur couplé à une protéine G dont la fonction encore inconnue. Les cellules *lgr5*⁺ sont multipotentes, se divisent

approximativement tous les jours et sont capables de régénérer un épithélium intestinal pour de longues périodes (> à 12 mois). Cependant les cellules $Igr5^+$ se distribuent entre les cellules de Paneth et dont différentes des cellules en position + 4 depuis la base de la crypte¹⁰². Plus récemment, *Bmi-1*, un gène de la famille polycomb essentiel dans l'auto-renouvellement des CSH, a été proposé pour être un autre marqueur des cellules souches intestinales. Les cellules $Bmi-1^+$ ont elles aussi un potentiel de régénération à long terme mais sont localisées juste au dessus des cellules de Paneth, en position + 4¹⁰³. Ces différences de localisation laissent penser que *Igr5* et *Bmi-1* permettent d'identifier des populations de cellules souches intestinales distinctes et une comparaison des fonctions des 2 populations reste encore à faire.

d) Les cellules souches du follicule pileux

L'épiderme de la peau et ses structures associées subissent un renouvellement incessant et pour cela, utilisent deux populations de cellules souches. La première se situe dans la couche basale de la peau et va normalement donner toutes les couches stratifiées de l'épithélium interfolliculaire. La seconde, aussi nommée cellule souche du follicule pileux, participe à la régénération des poils et des glandes sébacées (Figure 9).

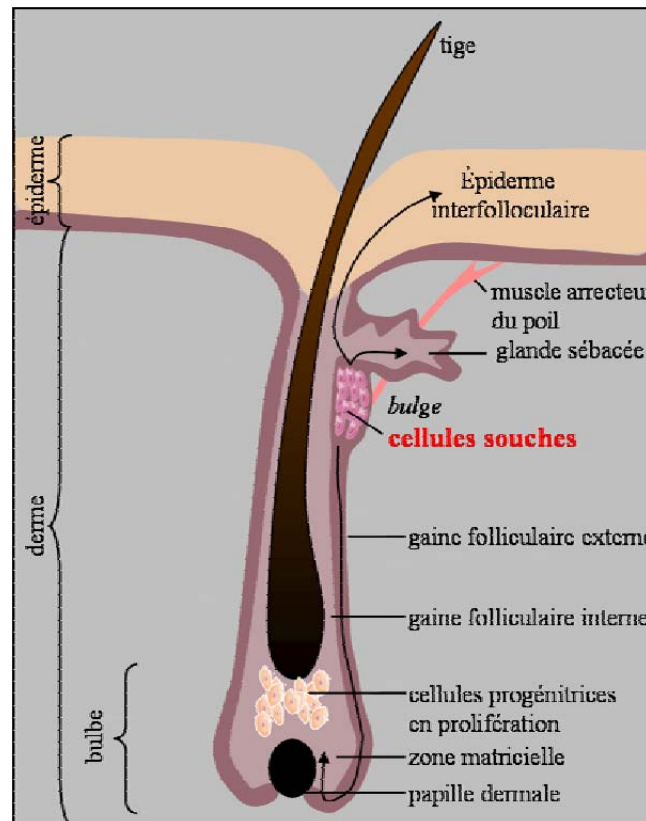


Figure 9 : Les cellules souches du follicule pileux.

Le follicule pileux est composé de différentes couches concentriques comprenant la gaine folliculaire externe attachée à la membrane basale et en continuité avec l'épiderme, un canal ou gaine folliculaire interne et la tige du poil/cheveu. A la base du follicule existe un bulbe qui est une zone matricielle où se trouvent des cellules en prolifération transitoire qui ensuite s'engagent dans un des sept programmes de différenciation terminale qui génèrent la tige ainsi que la gaine folliculaire interne. Les cellules en prolifération dans cette zone matricielle sont stimulées par des cellules mésenchymales spécialisées, appelées la papille dermique. Des études de ces 20 dernières années ont montré que ces cellules souches du follicule pileux résidaient au fond d'un renflement non-proliférant de la gaine folliculaire externe, zone appelée en anglais *bulge*, qui est adjacente à l'insertion du muscle arrecteur du poil et qui se situe au dessous des glandes sébacées qui produisent de l'huile nécessaire à la lubrification du canal du poil et de la peau ¹⁰⁴. Le cycle pileux normal comprend une phase de dégénérescence (aussi connue sous le nom de catagène), une phase de quiescence (télogène) et une phase de croissance (anagène) ¹⁰⁵. Lors de ce cycle, les cellules souches sont périodiquement activées pour former de nouveaux follicules pileux. En situation physiologique, pendant l'anagène, des

cellules souches du bulbe vont migrer via la gaine folliculaire externe vers la matrice où elles proliféreront et différencieront pour former la nouvelle tige. C'est dans des conditions de blessure dans lesquelles l'épithélium interfolliculaire et les glandes sébacées sont endommagés que les cellules souches du *bulge* migrent et se différencient en ces 2 différents lignages. Ces cellules exhibent donc une multipotentialité ¹⁰⁶. Des expériences de marquages nucléotidiques ont permis de montrer que les cellules qui retenaient le marquage à long terme, les cellules quiescentes, se trouvaient dans le *bulge* ¹⁰⁴. Ces mêmes cellules sont positives pour le marqueur CD34 ⁶⁰ et expriment la kératine 15 ^{106, 107}. Les cellules du *bulge* sont aussi marquées par l'expression des facteurs de transcription Sox9, Tcf3, Lhx2 et NFATc1 ¹⁰⁸. De plus, les niveaux de rétention du marquage nucléotidique ainsi que l'expression génique varient pendant le cycle pileux ^{106, 108, 109}, les cellules sont quiescentes et n'expriment pas les marqueurs de prolifération pendant la phase télogène ¹¹⁰. La découverte du marqueur des cellules souches intestinales, *Igr5* ¹⁰², a permis au même laboratoire de montrer que ce marqueur était aussi exprimé dans les cellules souches du follicule pileux. Ces cellules *Igr5*⁺ expriment les caractéristiques des cellules souches, auto-renouvellement et multipotentialité, autant *in vitro* qu'*in vivo*. Cependant elles se distinguent des cellules souches du *bulge* classiquement décrites par le fait qu'elles sont très proliférantes, qu'elles ne retiennent pas le marquage au BrdU, qu'elles sont très peu positives pour le CD34 et la kératine 15 et qu'elles ne sont pas localisées dans le *bulge* ¹⁰⁹. Des expériences complémentaires restent encore à être menées afin de mieux définir cette population de cellules *Igr5*⁺ ¹¹¹.

e) Les cellules satellites du muscle

Le muscle squelettique adulte est un tissu différencié hautement spécialisé constitué de paquets de myofibrilles contractiles, chacune contenant plusieurs centaines de noyaux post-mitotiques. En absence de maladie ou de blessure, le renouvellement cellulaire est très faible (1 à 2 % des myonuclei par semaine) ¹¹². Cependant, dans une période de croissance ou lorsque des lésions surviennent, les muscles montrent une excellente capacité de régénération grâce à une population cellulaire de progéniteurs myogéniques nommés : cellules satellites du muscle. Ces cellules sont ainsi appelées du fait de leur localisation à la périphérie et tout le long des fibres musculaires, sous la lame basale ¹¹³ et à proximité des capillaires ¹¹⁴ (Figure 10 A). Les capacités de différenciation myogénique des cellules satellites ont été montrées, *in vitro* et *in vivo*, pour la première fois dans les années 1975 et confirmées plus récemment.

Les cellules satellites Pax7⁺/CD34⁺/CD45⁻/Sca1⁻/CD31⁻ sont quiescentes, capables de s'auto-renouveler et de se différencier, comme des expériences de greffe d'une seule myofibre (contenant en moyenne ≈ 7 cellules satellites) l'ont montré^{59, 115, 116}. Cependant, les cellules satellites sont une population hétérogène (Figure 10 B) comprenant des cellules souches non engagées exprimant Pax7 mais pas Myf5 ni MyoD et pouvant s'auto-renouveler ainsi que des progéniteurs engagés dans la voie myogénique exprimant Pax7⁺, Myf5⁺ et MyoD^{117, 118}. Les cellules satellites quiescentes sont détectables par d'autres marqueurs de surface comme VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), c-met (récepteur de l'HGF), Foxk1, les syndecans 3 et 4, la caveolin-1¹¹⁹, l'intégrine $\alpha 7$, le récepteur à la calcitonine¹²⁰ et N-CAM (Neural cell adhesion molecule ou CD56)¹²¹ par lequel elles peuvent être triées par billes magnétiques.

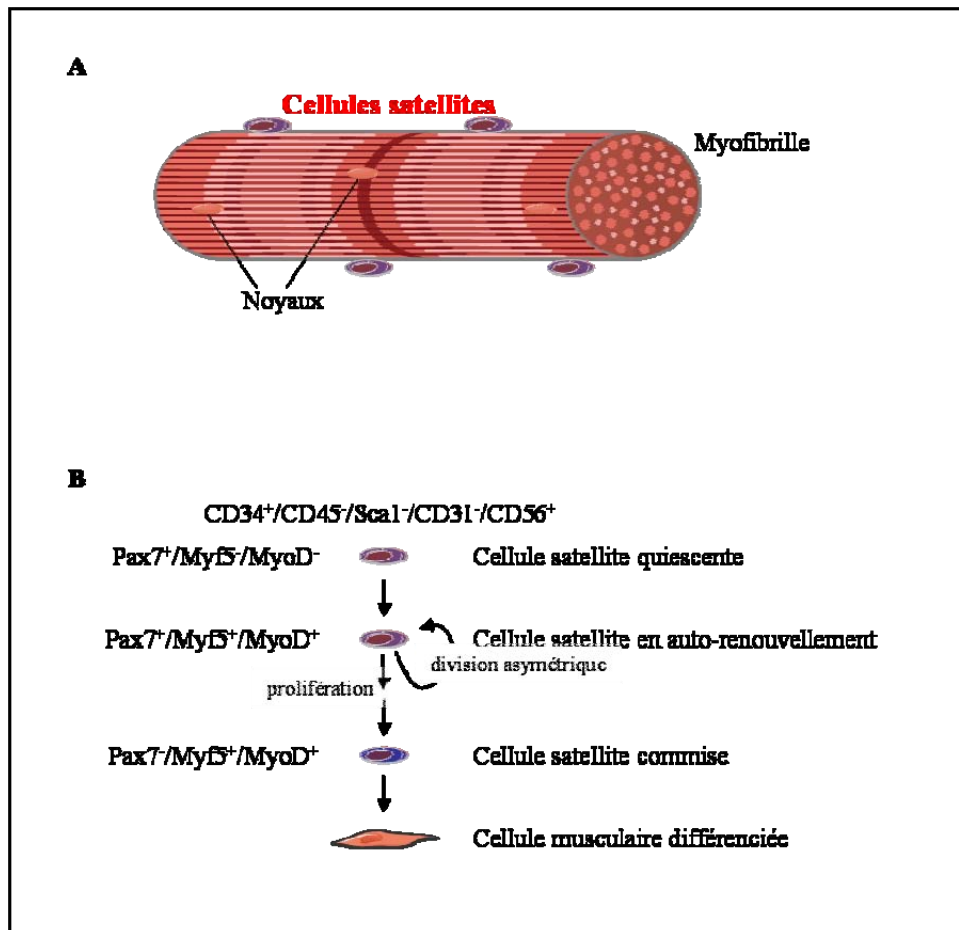


Figure 10 : Les cellules satellites du muscle squelettique.

I.3. La niche des cellules souches

I.3.1. Qu'est-ce qu'une niche ?

Pour survivre, se reproduire et ainsi maintenir leurs populations, toutes les espèces doivent trouver les ressources nécessaires et être en harmonie avec l'environnement dans lequel elles se trouvent. Une combinaison de facteurs environnementaux adéquats est donc essentielle à une espèce pour prospérer dans un environnement physique, obtenir de l'énergie et des nutriments, éviter la prédation et se reproduire pour assurer le maintien de l'espèce et passer en fin de compte le matériel génétique à la descendance. Historiquement, Grinnell a proposé le terme de « niche » pour définir l'environnement et les conditions dans lesquelles vit une espèce ¹²². En 1978, Schofield propose l'hypothèse de la « niche » pour décrire le microenvironnement physiologique qui permet la pérennisation des cellules souches hématopoïétiques ¹²³.

a) Définition - Fonctions

La niche est le microenvironnement qui protège les cellules souches de stimuli de différenciation, d'apoptose ou d'autres stimuli qui mettraient à l'épreuve leur réserve et qui limite aussi leur expansion excessive. C'est une structure anatomique comprenant des composants cellulaires et non cellulaires qui intègrent des facteurs locaux et systémiques contrôlant le « comportement » des cellules souches ¹²⁴:

- les signaux qui émanent de la niche régulent la prolifération, la survie et la différenciation des cellules souches.

- l'adhésion des cellules souches avec les cellules stromales et/ou la matrice extracellulaire ancre les cellules souches dans leur niche à proximité des signaux d'auto-renouvellement.

- l'environnement spécifique mettant en relation les cellules souches avec les cellules de soutien peut polariser les cellules souches dans la niche pour promouvoir la division cellulaire asymétrique.

- les facteurs sécrétés peuvent attirer ou au contraire repousser les cellules souches permettant leur migration.

La niche est donc un **microenvironnement spécifique**, dans lequel se trouvent les cellules souches, qui maintient l'homéostasie tissulaire : régulation de la balance entre **quiescence**, **auto-renouvellement**, **mobilisation** et **différenciation**.

Les niches les plus connues et étudiées sont les niches des cellules souches germinales de la drosophile, la niche des CSH, des cellules souches intestinales et celle du follicule pileux.

b) Les composants de la niche

L'étude des différentes niches a révélé plusieurs caractéristiques physiques et fonctionnelles qui apparaissent être la « marque » de la niche des cellules souches. En rassemblant les caractéristiques de ces niches, une liste des particularités définissant la niche des cellules souche peut être constituée ¹²⁴. Une niche se compose :

- des cellules souches elles-mêmes,
- de cellules stromales de support qui interagissent directement avec les cellules souches et entre elles par l'intermédiaire de récepteurs membranaires, de gap junctions ou de facteurs solubles,

- d'une matrice extracellulaire qui procure une structure, une organisation et des signaux mécaniques,
- de vaisseaux sanguins qui amènent des signaux systémiques et qui permettent le recrutement de cellules inflammatoires ou d'autres cellules circulantes dans la niche mais aussi l'entrée et la sortie des cellules souches (nichage et mobilisation),
- de fibres nerveuses qui permettent de communiquer de lointains messages physiologiques aux cellules souches dans leur microenvironnement.

La niche représente une entité complexe et dynamique dans laquelle l'intégration de multiples signaux permet un contrôle précis du nombre et de la fonction des cellules souches (Figure 11).

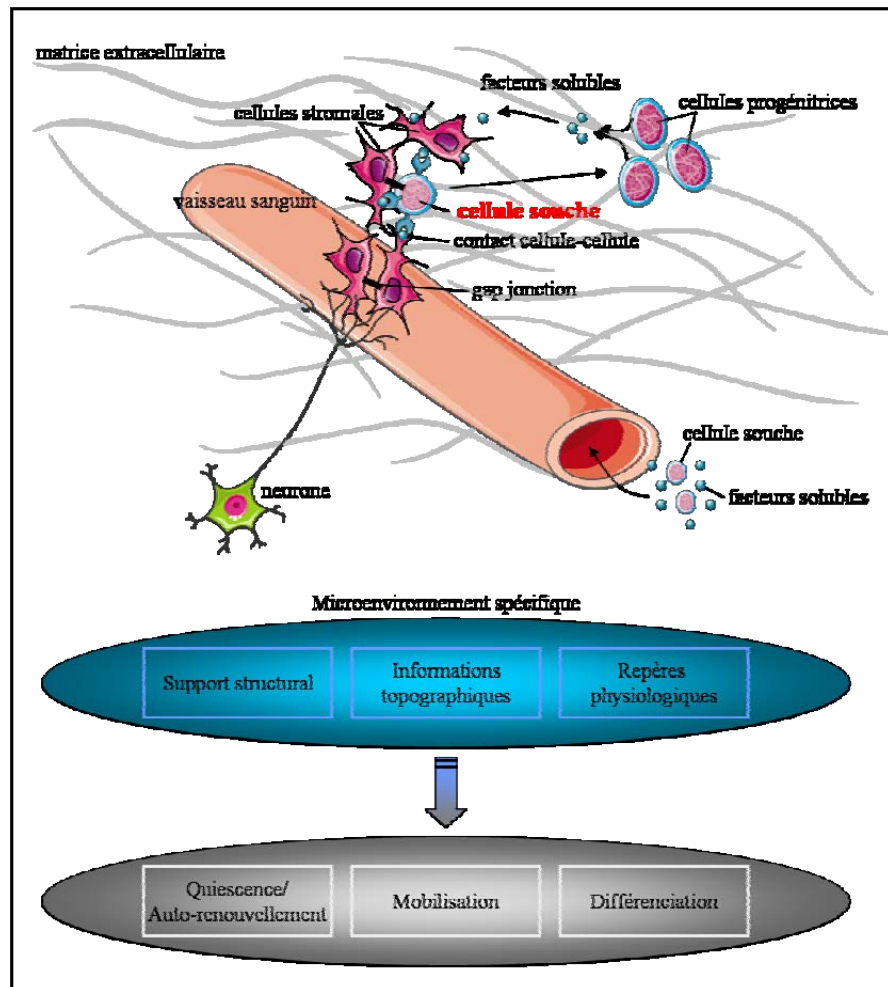


Figure 11 : La niche des cellules souches: composition et fonctions.

I.3.2. Fonctions de la niche:

a) L'auto-renouvellement : balance entre quiescence et prolifération ; la division asymétrique et symétrique

La quiescence. Pour maintenir un stock constant pouvant approvisionner l'organisme en cellules différenciées tout au long de la vie et pour se protéger des radiations, de produits toxiques ou d'un stress oxydatif, les cellules souches doivent limiter leur division cellulaire et demeurent en phase G_0 du cycle cellulaire ou phase de quiescence. A tout moment, seulement une faible partie des cellules souches sont en cycle et la régulation de cette capacité à entrer en prolifération ou à rester en quiescence est grandement contrôlée par la niche. Les cellules entrant en phase G_0 augmentent leur quantité intracellulaire de protéines inhibitrices du cycle

cellulaire tels que les inhibiteurs des CDK (cyclin-dépendant kinase) (p16, p21, p53) (Figure 12) et possèdent peu de facteurs stimulant la mitose.

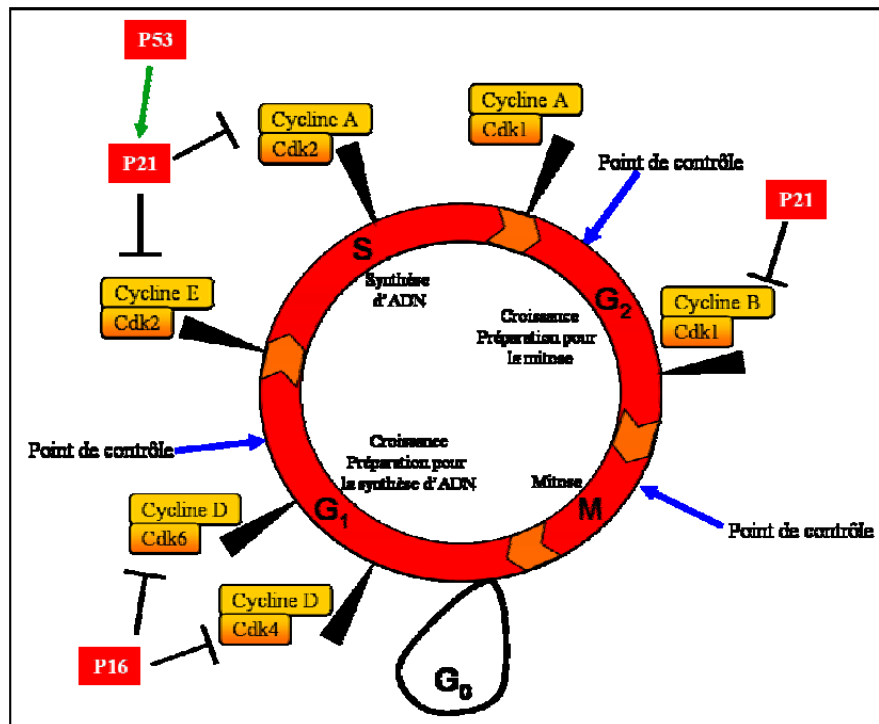


Figure 12 : Le cycle cellulaire.

Les cellules souches quiescentes sont détectables dans la niche hématopoïétique¹²⁵, intestinale et du follicule pileux grâce à des expériences d'injection d'un analogue de la thymidine, le BrdU, suivi d'une longue période d'attente, comme évoqué plus tôt dans le manuscrit. Les cellules en phase S du cycle cellulaire au moment de l'injection incorporent le BrdU à leur ADN. Les cellules avec une forte activité proliférative ont un marquage dilué par les divisions cellulaires alors que les cellules qui prolifèrent peu ou pas, les cellules quiescentes, retiennent le marquage longtemps et peuvent être ainsi repérées. Par conséquent, les cellules souches quiescentes de la niche intestinale ont pu être détectées en position +4 dans la crypte, celles de la niche du follicule pileux dans le « bulge » et les CSH au contact des ostéoblastes. C'est dans la moelle osseuse que des mécanismes intrinsèques mais aussi des facteurs environnementaux contrôlant la quiescence ont été les mieux détaillés. De nombreuses cytokines sécrétées par les ostéoblastes comme l'angiopoïétine 1 se lient à son récepteur Tie2 exprimé sur les CSH, le TGFβ, l'ostéopontine, le SDF-1 ou la thrombopoïétine mais aussi certains facteurs de transcription comme Pbx1 promeuvent la quiescence des CSH

¹²⁶⁻¹³¹. Enfin, il a récemment été montré que la protéine p53 impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire induisait la quiescence des CSH en ayant pour cible les gènes *Gfi-1* et *Nectin*, indépendamment de p21, lui aussi augmentant la quiescence ¹³². Dans la niche du follicule pileux, c'est le facteur de transcription NFATc1 (Nuclear factor of activated T cells c1) activé par BMP-6 sécrété par la papille dermique qui augmente la quiescence des cellules souches du *bulge* ^{106, 133}.

La division symétrique et asymétrique. Lorsque les cellules souches sortent de leur état de quiescence, c'est dans le but de s'auto-renouveler pour ensuite se différencier. Une fine régulation de l'auto-renouvellement est une fonction essentielle de la niche pour la génération de nouvelles cellules qui ré-entreront en phase G₀ ou qui se différencieront pour remplacer les cellules endommagées ou sénescents. Lorsque les cellules souches prolifèrent, elles subissent soit une division symétrique qui génère deux cellules filles identiques, soit une division asymétrique résultant en une cellule fille qui restera dans la niche et qui gardera son statut « souche » et en une cellule fille qui sortira de la niche et qui sera engagée dans une voie de différenciation spécifique. Il existe deux mécanismes par lesquels l'asymétrie peut être acquise (Figure 13). On distingue la division asymétrique intrinsèque ou déterministe et la division asymétrique extrinsèque ou stochastique. Lors de la **division intrinsèque** (Figure 13 A) des facteurs déterminant le devenir cellulaire (ARNm ou protéines) vont être répartis inégalement dans le cytoplasme avant la division cellulaire.

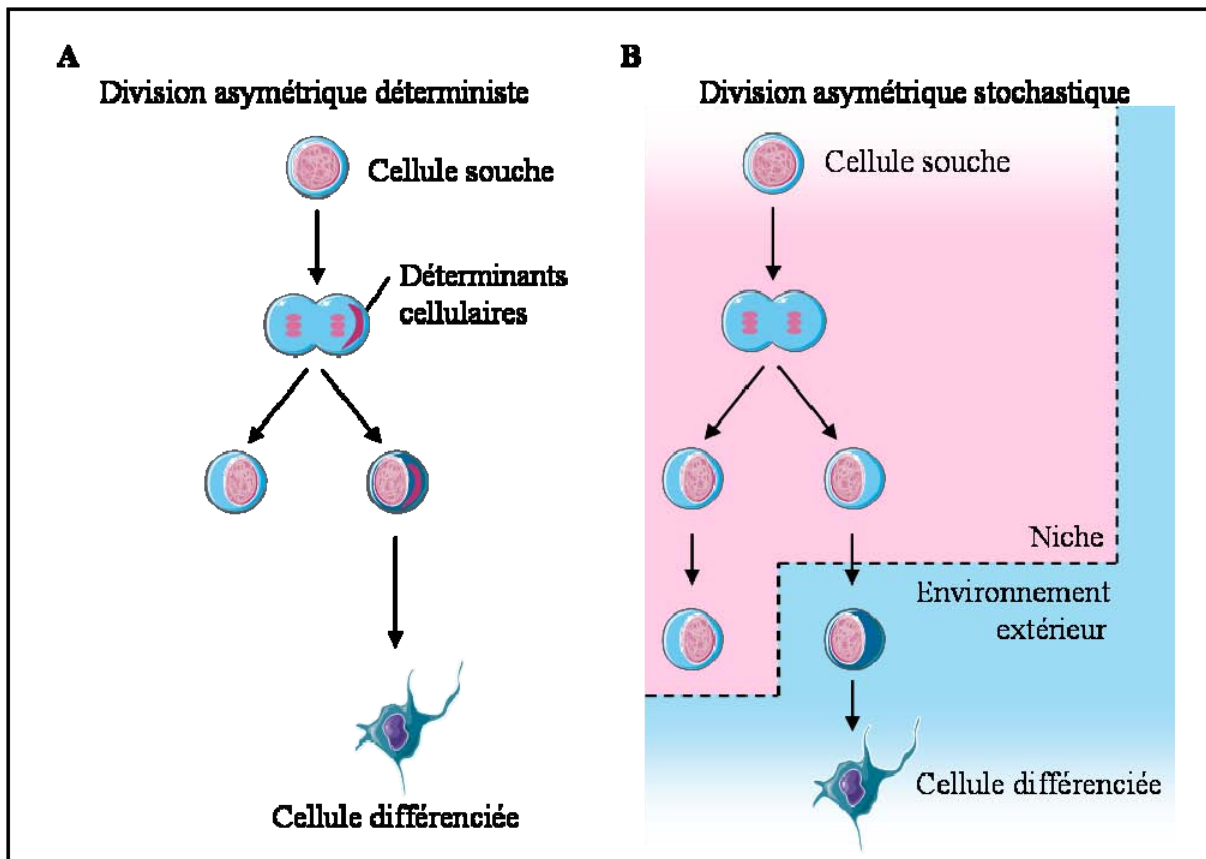


Figure 13 : La division cellulaire asymétrique des cellules souches.

Pendant la mitose, le plan de clivage est orienté de telle façon qu'une seule des deux cellules recevra les déterminants cellulaires. Ainsi, deux cellules filles différentes sont produites, une gardant le statut « souche » et l'autre pouvant initier sa différenciation. Une cellule fille destinée à rester une cellule souche gardera les facteurs nécessaires à son auto-renouvellement et les facteurs anti-différenciants alors qu'une cellule fille destinée à proliférer et à différencier dans un lignage particulier recevra moins de facteurs « souche » et plus de facteurs proliférants et différenciants. L'ancrage des cellules souches à leur niche via les cellules de soutien en établissant des contacts cellule-cellule ou via la matrice extracellulaire mais aussi la localisation de facteurs dans la niche permettent leur polarisation et l'orientation de leur fuseau mitotique, partageant ainsi les déterminants du devenir cellulaire (Figure 14). Cette polarisation est initiée par des stimuli rapides qui réorganisent le cytosquelette d'actine faisant des intégrines et des cadhérines des molécules centrales du processus.

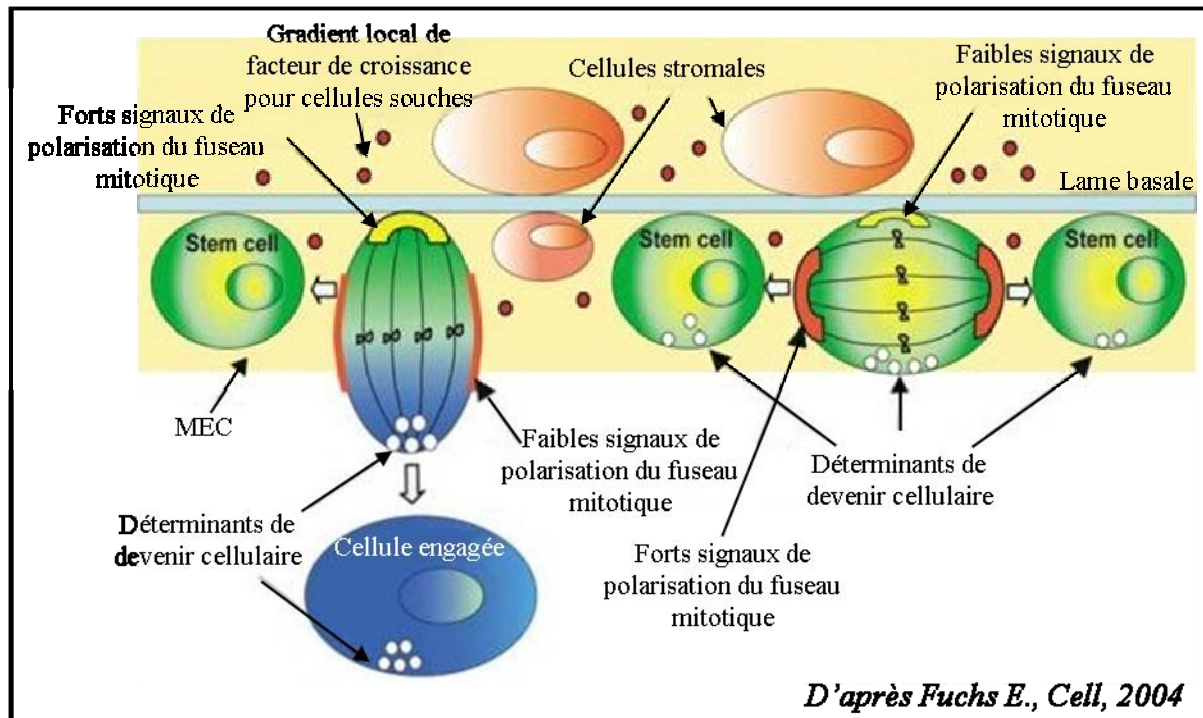


Figure 14 : Rôle potentiel de la niche dans l'orientation et la définition de la nature de la division cellulaire de la cellule souche.

Les interactions entre la lame basale et les cellules souches avoisinantes, par les jonctions adhérentes (en jaune) et par les complexes PAR (en rouge), établissent la polarité de la cellule souche qui mène à la concentration des facteurs de détermination cellulaire d'un côté de la cellule et à l'orientation du fuseau mitotique. Si les forts signaux de polarisation du fuseau mitotique émanent de la lame basale, le partitionnement des déterminants cellulaires se fera de façon asymétrique (exemple gauche). Au contraire, les forts signaux se font au contact des cellules, les déterminants seront partagés de façon équitable menant à 2 cellules filles identiques (exemple droit).

Ce sont des travaux chez la drosophile qui ont permis d'élucider les voies entrant en jeu dans ces mécanismes¹³⁴. Les mécanismes sous-jacents à l'établissement de la polarité cellulaire et à l'orientation du fuseau mitotique sont complexes et dans certains cas des facteurs tels que APC (adenomatous polyposis coli), dynéine-dynactine, le complexe de protéines PAR, la protéine kinase atypique C (PKC ξ), les filaments d'actine et de myosine sont impliqués. Si le fuseau mitotique est orienté parallèlement à la membrane basale, il y aura une répartition égalitaire des déterminants cellulaires au cours de la mitose et la division sera symétrique (Figure 14 droite). Si le fuseau mitotique est orienté perpendiculairement à la lame basale, les facteurs qui déterminent le devenir des cellules seront inégalement répartis et la division sera asymétrique (Figure 14 gauche). La cellule ancrée à la membrane basale restera dans la niche,

gardera son statut de cellule souche et retournera en phase G₀ tandis que l'autre cellule sera destinée à donner des progéniteurs puis des cellules matures qui quitteront la niche.

Une voie alternative pour acquérir l'asymétrie est par exposition des deux cellules filles à différents signaux extrinsèques provenant de l'environnement local, c'est la **division extrinsèque** (Figure 13 B). Une cellule souche subit tout d'abord une division symétrique et produit ainsi deux cellules filles identiques. Alors qu'une cellule fille reste dans la niche en gardant un devenir de cellule souche, l'autre entre au contact d'un environnement différent qui produit des signaux initiant la différenciation. Ainsi, comme pour la division asymétrique intrinsèque, le produit final est deux cellules filles différentes ¹³⁵.

b) L'adhésion et la migration

Les **contacts cellule-cellule** et **cellule-matrice extracellulaire** (MEC) sont connus pour être essentiels au bon fonctionnement des cellules souches dans leur niche. Ces contacts physiques sont important pour **l'ancrage et la rétention** des cellules souches à leur support mais aussi jouent leur rôle dans **la migration** ¹³⁶.

L'ancrage et la rétention. Un attachement physique aux cellules stromales ou à la membrane basale est important pour maintenir les cellules souches dans leur niche à proximité des signaux qui contrôlent leur quiescence/prolifération et différenciation. Les jonctions adhérentes sont les contacts cellule-cellule qui sont formés par des interactions entre des protéines transmembranaires, **les cadhérines**. Une perte de la fonction des cadhérines dans les cellules souches germinales de la drosophile entraîne une diminution des cellules souches ¹³⁷, ¹³⁸. Alors que l'ancrage des CSH aux ostéoblastes a été montrée comme étant en partie médiée par la N-cadhérine, il a récemment été montré que cette cadhérine ne participait pas à leur maintien dans la niche ¹³⁹. Les cadhérines (M-cadhérine) déterminent aussi la position des cellules satellites le long de la fibre musculaire ¹⁴⁰. Un autre moyen pour les cellules souches de rester dans leur niche est leur ancrage à lame basale par l'intermédiaire des **intégrines**. Par exemple l'intégrine β1 semble être une caractéristique des cellules souches de plusieurs tissus comme celles du follicule pileux ¹⁴¹, de la moelle osseuse ¹⁴² ou encore celles des muscles ¹⁴³ mais d'autres différentes intégrines, comme l'intégrine α6 qui est le récepteur de la laminine composant majoritaire de la membrane basale, sont impliquées dans l'adhésion des cellules souches dans leur niche ¹³⁶. Outre les contacts cellule-cellule et cellule-MEC, des facteurs solubles tels que l'angiopoïétine, l'ostéopontine connus pour induire la quiescence

des CSH mais aussi de fortes concentrations locales de calcium semblent localiser les cellules souches à proximité des ostéoblastes ¹⁴⁴. Enfin il a été montré que les CSH sont préférentiellement localisées dans des zones locales d'hypoxie de la moelle osseuse ¹⁴⁵.

La mobilisation et la domiciliation. Alors que la grande majorité des cellules souches est ancrée et retenue dans sa niche, une partie d'entre elles peut être mobilisée. En réponse à des stimuli spécifiques, les cellules souches peuvent sortir ou ré-entrer dans leur niche, processus appelés mobilisation et domiciliation (« homing » en anglais), respectivement. Ces processus biologiques opposés sont contrôlés par des mécanismes moléculaires similaires qui nécessitent une sécrétion de facteurs chémoattractants, une activation/inhibition des molécules d'adhésion pour l'attachement ou la libération des cellules souches, une transmigration à travers la paroi endothéliale et une migration/invasion dans la MEC impliquant sa dégradation grâce à des protéases ¹⁴⁶ (Figure 15).

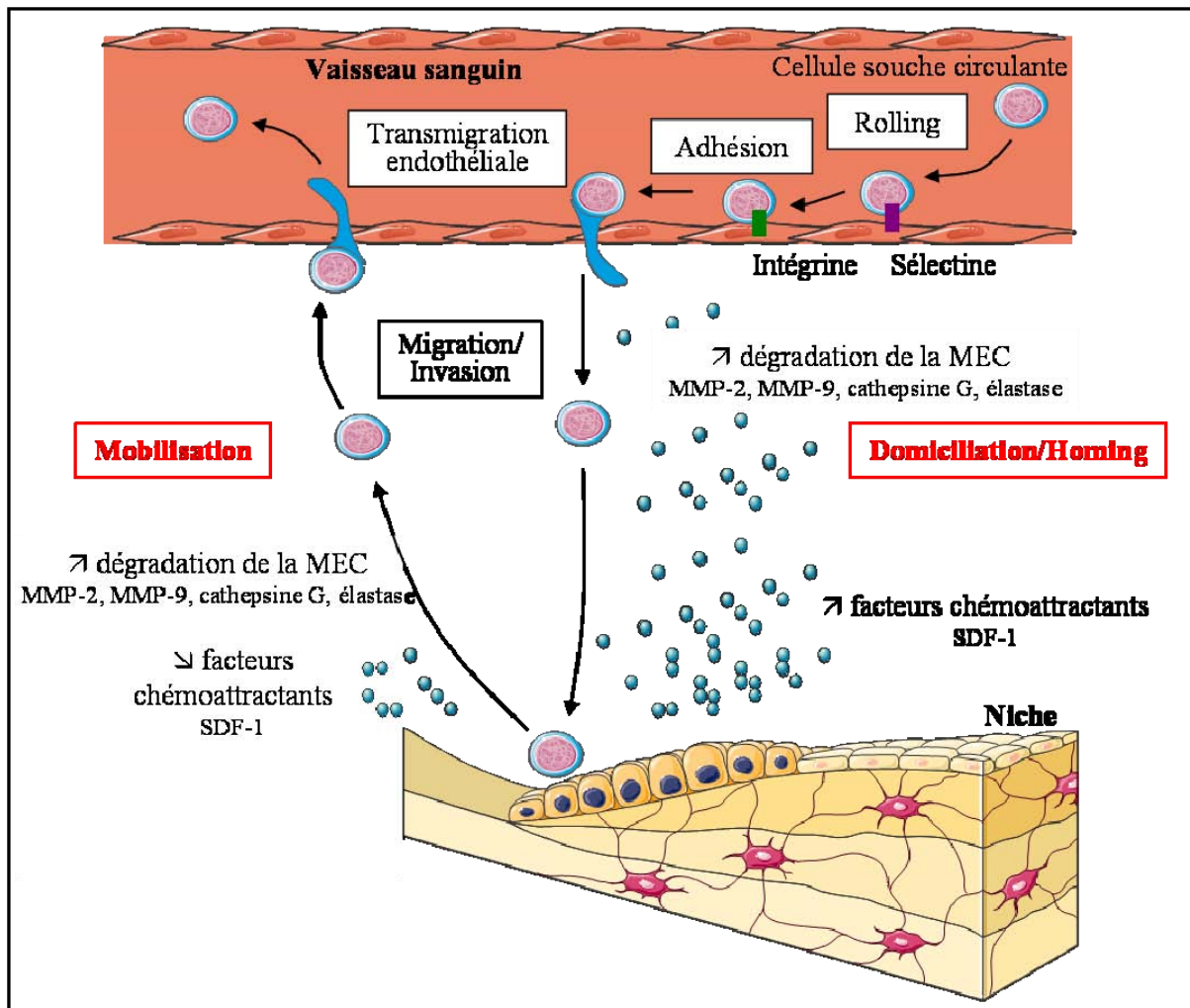


Figure 15 : La mobilisation et la domiciliation des cellules souches.

Lors de la mobilisation induite par de nombreuses molécules, telles que des cytokines (G-CSF, Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Interleukine-7 (IL-7), IL-3, IL-12, Stem Cell Factor (SCF) et flt-3 ligand), des chémokines (IL-8, Mip-1 α , Gro β et SDF-1) ou des catécholamines (dopamine et noradrénaline), les CSH voient l'expression de leurs molécules d'adhésion (l'intégrine VLA-4 et du récepteur à la cytokine c-kit) diminuée. De manière concomitante, il y a une dégradation de la MEC et des connexions cellulaires par l'augmentation de la sécrétion des métalloprotéinases (MMP) 2 et 9 et des protéases neutrophiles (élastase et cathepsine G) ainsi que par l'action des ostéoclastes¹⁴⁷. La migration transendothéliale est la dernière étape pour atteindre la circulation sanguine et rejoindre le site d'accueil. Les mécanismes contrôlant le homing sont assez similaires mais en sens opposé. Un des acteurs essentiels impliqués dans la mobilisation et de la domiciliation des CSH en conditions homéostasiques ou en cas de lésion est la chémokine SDF-1 aussi appelé CXCL12

dont le principal récepteur, le CXCR4, est exprimé sur les CSH. Le SDF-1 est produit par plusieurs types cellulaires dans la moelle osseuse dont les ostéoblastes et les cellules endothéliales¹⁴⁸. Les effets biologiques de SDF-1 sont médiés par sa capacité à induire la mobilité, le chimiotactisme et l'adhésion aussi bien que la sécrétion des MMP et des facteurs angiogéniques. Les concentrations de SDF-1 fluctuent en fonction du rythme circadien et sont régulées par le système nerveux sympathique (Figure 16). Les CSH, les cellules progénitrices hématopoïétiques, les ostéoclastes, les ostéoblastes et les cellules endothéliales expriment des récepteurs aux catécholamines et sont capables de répondre à des signaux neuronaux en conditions homéostatiques. Dans ces conditions (Figure 16 gauche), les CSH et les cellules progénitrices sont attachées aux ostéoblastes et aux cellules endothéliales. Elles quittent, en très faible quantité, la moelle osseuse pour entrer transitoirement dans la circulation. Au cours de la journée, le nombre de CSH dans le sang oscille de façon opposée aux concentrations de SDF-1 dans le microenvironnement de la moelle osseuse très innervée. En situation de stress physiologique ou induit (Figure 16 droite), le système nerveux sympathique est activé et augmente sa sécrétion de catécholamines ce qui induit l'expression des récepteurs α -adrénergiques sur les CSH. L'activité des ostéoclastes augmente provoquant une sécrétion accrue de MMP qui dégrade la MEC et s'accompagne d'une diminution de niveaux de SDF-1 dans la moelle osseuse. Ces mécanismes induisent un détachement des CSH de leur emplacement et une mobilisation dans la circulation sanguine¹⁴⁹.

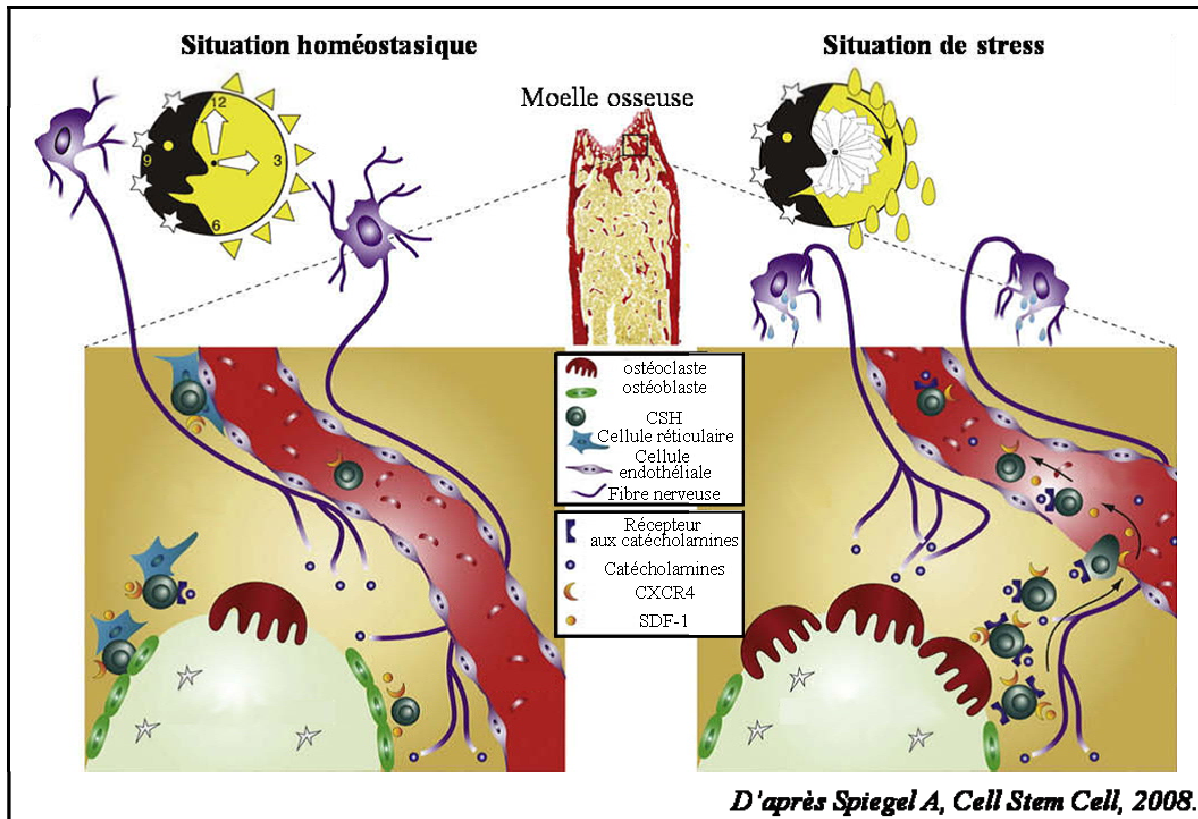


Figure 16 : Contrôle de la migration des CSH par le système nerveux

Outre les CSH, d'autres cellules souches sont capables de migrer, c'est notamment le cas des CSM. Elles peuvent migrer notamment grâce au couple SDF-1 (Stromal Derived Factor-1) /CXCR4¹⁵⁰, en réponse au G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)¹⁵¹, à MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) et MCP-3^{152, 153}, mais aussi en réponse au TGFβ1 (Transforming Growth Factor beta 1) sécrété par les ostéoblastes lors de la résorption osseuse¹⁵⁴. Dans la niche intestinale, la mobilisation des cellules souches est contrôlée par le couple EphrineB2 et son récepteur Eph lorsque les cellules migrent le long de la crypte¹⁵⁵.

c) Balance entre prolifération et différenciation

La communication des cellules souches avec leur niche est essentielle pour le maintien de leurs fonctions et pour la détermination de leur devenir. Parmi les voies de signalisation impliquées dans cette balance entre auto-renouvellement ou différenciation, on peut citer les voies Wnt et Notch comme étant les plus importantes. Les protéines **Wnt** sont une famille de glycoprotéines sécrétées ayant comme principaux récepteurs les protéines « frizzled » et dont le transducteur intracellulaire majeur est la β-caténine (Figure 17 A). Cette voie de

signalisation est impliquée dans de multiples aspects du développement embryonnaire, gouvernent aussi le devenir cellulaire, la polarité et la prolifération ¹⁵⁶. Les protéines **Notch** sont quant à elles des récepteurs transmembranaires dont les principaux ligands sont Jagged (1-2) et Delta (1-3) (Figure 17 B). La voie de signalisation Notch est importante pour la communication cellule-cellule et dans le contrôle du processus de différenciation cellulaire pendant l'embryogenèse et la vie adulte ¹⁵⁷.

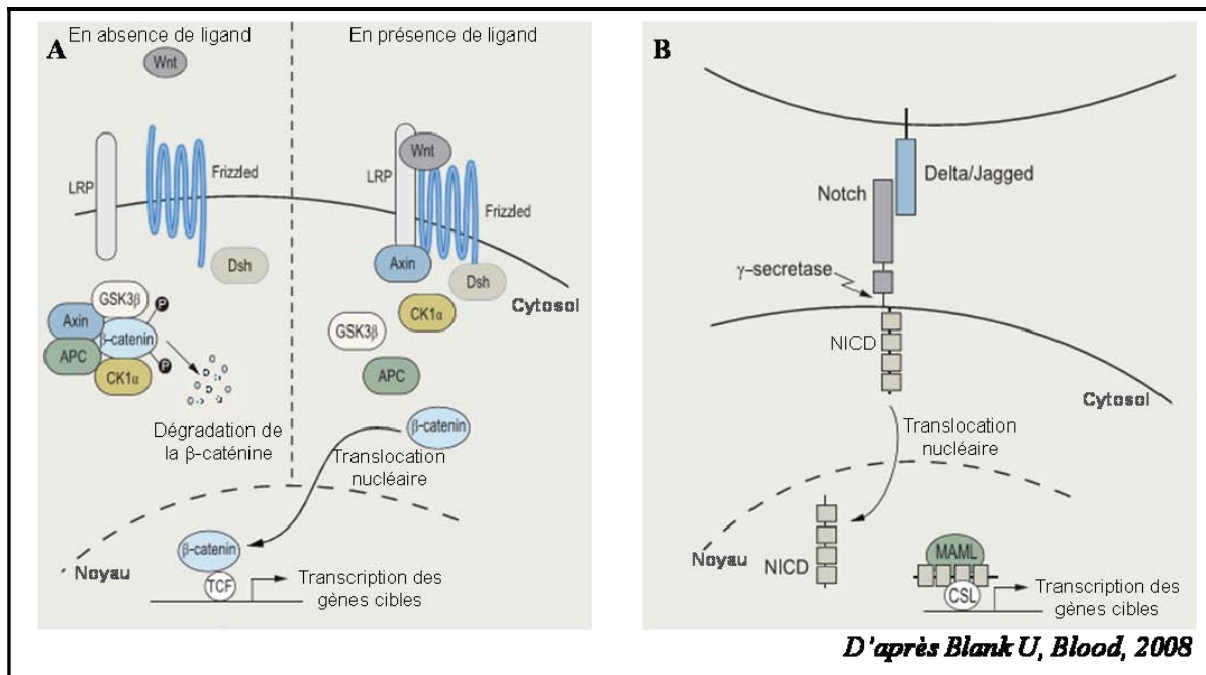


Figure 17 : Les voies de signalisation Wnt et Notch.

(A) Voie Wnt: la voie de signalisation est initiée quand un ligand se lie aux récepteurs Frizzled ou LRP (Lipoprotein receptor-related protein) à la surface cellulaire. En absence de ligand, la β -caténine est piégée dans un complexe (adenomatous polyposis coli (APC) et axine) qui va être phosphorylé par la casein-kinase 1 α (CK1 α) et la glycogène synthase kinase (GSK3 β). La phosphorylation mène à l'ubiquitination et la dégradation de la β -caténine. Quand un ligand se lie au récepteur, Frizzled forme un complexe avec Dishevelled (Dsh) alors que LRP est phosphorylé ce qui provoque une relocalisation de l'axine à la membrane plasmique. La déstructuration du complexe mène à une accumulation de la β -caténine dans le cytosol et à sa translocation dans le noyau qui va interagir avec le facteur de transcription T-cell factor/lymphoid enhancer factor (Tcf) qui régule l'expression de nombreux gènes.

(B) Voie Notch: quand un ligand de la famille Delta (Delta 1-3) ou Jagged (Jagged 1-2) se lie au récepteur Notch, des événements protéolytiques impliquant la γ -sécrétase mènent au relargage et à la translocation du domaine intracellulaire du récepteur (NICD) dans le noyau. Le NICD va former un complexe avec le facteur de transcription CSL et les co-facteurs de la famille Mastermind-like (MAML) pour activer la transcription des gènes cibles.

Dans la moelle osseuse, la voie de signalisation Wnt favorise l'auto-renouvellement des CSH et la prolifération des progéniteurs qui peuvent donner des cellules matures fonctionnelles en peu de temps¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ alors que la voie Notch maintient les CSH dans un état indifférencié¹⁶¹. Ainsi les voies Wnt et Notch agissent en synergie pour maintenir un stock de CSH.

Plusieurs membres de la famille de Wnt sont exprimés dans les cellules épithéliales de la crypte intestinale ce qui suggère qu'ils agissent de manière auto- et paracrine¹⁶². L'abolition de la voie de signalisation Wnt soit par suppression de Tcf4 ou de la β -caténine, soit par

surexpression de l'inhibiteur de Wnt, DKK1, résulte en une perte de la prolifération des cellules souches intestinales faisant de la voie Wnt une voie dominante dans le contrôle de l'activité proliférative des cellules souches des cryptes intestinales¹⁶³⁻¹⁶⁶. De plus, la modulation de la voie de signalisation Notch a aussi de profondes répercussions sur la capacité de prolifération des cellules souches intestinales. Comme souvent dans les systèmes en développement, Notch agit de concert avec Wnt et leur combinaison spécifie le devenir des cellules souches intestinales: des cellules Notch⁻/Wnt⁺ vont différencier en cellules sécrétrices, des cellules Notch⁺/Wnt⁻ vont donner des entérocytes alors que des cellules Notch⁺/Wnt⁺ auront leur phénotype indifférencié maintenu¹⁶².

Alors que la voie de signalisation Wnt est importante dans l'auto-renouvellement des cellules souches de la moelle osseuse et de l'intestin, elle est aussi importante dans le processus de différenciation des cellules souches d'autres tissus. Dans le bulbe du follicule pileux, la voie Wnt a des rôles séquentiels dans la régulation du lignage des cellules souches qui dépend des niveaux de signal. Une activation de la voie entraîne une sortie des cellules souches de leur quiescence, leur activation et prolifération puis différenciation pouvant aller jusqu'à un processus de tumorigénèse si la voie est trop activée¹⁶⁷. Dans le muscle, squelettique, la voie Wnt promeut la différenciation terminale et la fusion des myoblastes en prolifération¹⁶⁸ mais aussi la prolifération des cellules satellites pendant la régénération musculaire qui a lieu après une blessure¹⁶⁹. Quant à la voie Notch, elle maintiendrait la structure folliculaire mais ne participerait pas au choix du devenir cellulaire des cellules souches du follicule pileux¹⁷⁰. En plus de son rôle dans le maintien des cellules différenciées du bulbe, elle serait aussi nécessaire au blocage de la migration des cellules souches du « bulge » en leur différenciation en épiderme interfolliculaire qui a lieu en situation de blessure¹⁷¹. Notch active et fait proliférer les cellules satellites du muscle¹²⁰.

Les CSM de la moelle osseuse expriment de nombreuses protéines de la famille Wnt incluant des ligands, des récepteurs, des co-récepteurs et des antagonistes agissant de manière auto- et paracrine¹⁷². Une faible activation de la voie de signalisation Wnt aurait des effets stimulateurs sur l'auto-renouvellement des CSM alors qu'à forte concentration les ligands Wnt auraient un effet inverse. Que ce soit pour la voie de différenciation ostéoblastique ou chondroblastique, la voie de signalisation Wnt promeut l'engagement des CSM dans les deux voies mais inhibe la différenciation terminale. Enfin la voie Wnt inhibe la différenciation adipocytaire et stimule la différenciation myogénique comme pour les cellules satellites du muscle (pour revue Ling L 2009¹⁷³). Quant à la voie de signalisation Notch, elle maintient un

stock de CSM en inhibant la différenciation ostéoblastique¹⁷⁴ et est nécessaire à l'engagement des CSM dans la voie chondroblastique mais pas pour la différenciation terminale¹⁷⁵.

II. Utilisation des cellules souches en thérapie cellulaire

Les cellules souches sont considérées de plus en plus comme un outil thérapeutique. Les traitements médicaux à partir de ces cellules sont de la thérapie cellulaire qui vise à introduire des nouvelles cellules dans un organe endommagé ou pour traiter une maladie. L'utilisation des cellules souches donne beaucoup d'espoir pour soigner des pathologies telles que des leucémies, des maladies neurodégénératives, le diabète, la cirrhose hépatique, des maladies cardiovasculaires, pour faciliter les greffes ou encore pour faire de l'ingénierie tissulaire dans le processus de régénération d'os et de réparation de cartilage.

Les cellules souches utilisées en thérapie cellulaire peuvent avoir différents modes d'action visant à l'amélioration de la maladie ; d'un part, elles peuvent s'intégrer à l'organe malade ou blessé et se différencier en cellules matures spécialisées et ainsi remplacer les cellules endommagées et d'autre part, elles peuvent aussi servir « d'adjuvant » par des propriétés qui leur sont propres comme la sécrétion de facteurs de croissance ou une immunomodulation.

La greffe des CSH humaines est utilisée depuis environ 50 ans lors des transplantations de moelle pour traiter différentes hémopathies comme par exemple des aplasies médullaires, des leucémies, des myélomes ou encore des lymphomes. Les cellules souches sont isolées soit à partir d'une ponction de moelle, soit dans le sang après avoir induit une mobilisation (cytaphérèse) puis elles sont réinjectées au receveur par voie intraveineuse. Bien qu'utilisées depuis longtemps, des investigations pour l'amélioration des techniques implantatoires sont toujours en cours.

Concernant la thérapie cellulaire visant à améliorer l'état des patients atteints de maladies neurodégénératives, cardiovasculaires ou pour l'ingénierie tissulaire, ce sont les cellules souches embryonnaires et mésenchymateuses de la moelle osseuse qui sont les plus courtisées. Les cellules souches embryonnaires ont pour avantages d'être des cellules normales, pluripotentes et disponibles en quantité mais présentant des risques immunogènes du fait de la situation allogénique, mais aussi des risques tumorigènes. De plus, elles soulèvent un problème éthique important quant à leur obtention. Cependant un premier essai clinique de thérapie cellulaire utilisant des cellules souches embryonnaires différenciées en

oligodendrocytes a été lancé cette année aux Etats-Unis dans le but de réparer des lésions de la moelle épinière ¹⁷⁶.

Les CSM humaines par leurs caractéristiques biologiques sont aussi un grand axe d'étude pour la thérapie cellulaire mais leur utilisation semble un peu controversée ¹⁷⁷. Elles peuvent être isolées à partir de la moelle osseuse et amplifiées *in vitro* en maintenant une stabilité génétique ¹⁷⁸, et être ainsi utilisées de manière autologue. Elles peuvent être employées pour la prévention et le traitement des effets secondaires qui peuvent apparaître lors de greffes de CSH allogéniques ¹⁷⁹. Leur co-injection avec des CSH a montré une meilleure prise de la greffe associée à une récupération complète de l'hématopoïèse, mais aussi une réduction des effets secondaires et notamment des réactions greffe contre hôte que peuvent engendrer les greffes allogéniques ¹⁸⁰⁻¹⁸². Des études précliniques utilisant des modèles animaux de pathologies cardiaques ont montré que l'administration systémique de CSM (ou de cellules satellites) pouvait réparer un myocarde de rongeurs ayant subi un infarctus ^{183, 184}, améliorer les fonctions cardiaques de rongeurs présentant des cardiomyopathies en augmentant l'angiogénèse et la myogénèse, en inhibant la fibrose ¹⁸⁵ et favoriser la sécrétion de protéines anti-inflammatoires ¹⁸⁶. Les essais cliniques chez l'homme sont toutefois moins concluants mais restent encourageant ¹⁸⁷. Des injections de CSM à des modèles animaux présentant des pathologies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, mais aussi pour traiter la cirrhose hépatique et le diabète de type I améliorent les symptômes de ces pathologies grâce à leurs sécrétions et actions immunomodulatrices et non pas par directe différenciation cellulaire ¹⁸⁸⁻¹⁹⁴. Elles diminuent aussi les signes cliniques de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale, préviennent des dommages causés par l'arthrite rhumatoïde et retarderaient l'installation du diabète autoimmun de type I ¹⁹⁴⁻¹⁹⁷. Concernant l'ingénierie tissulaire, la transplantation de CSM autologue en combinaison avec des biomatériaux a conduit à la reconstruction osseuse mandibulaire ¹⁹⁸ mais aussi à réparer un défaut de cartilage articulaire de genou ¹⁹⁹. Toutefois, la définition des conditions optimales de l'utilisation en ingénierie tissulaire des CSM pour la réparation osseuse et cartilagineuse demande encore de nombreuses futures études cliniques.

L'utilisation des CSM de la moelle osseuse en thérapie cellulaire semble prometteuse. Cependant la méthode d'isolement qui consiste en une ponction de la moelle osseuse dans les os du bassin sous anesthésie générale reste invasive et douloureuse. De plus, du fait de leur faible proportion *in situ*, il est nécessaire de les amplifier *in vitro* pour pouvoir en obtenir un nombre suffisant avant de les utiliser. Cette étape d'expansion peut aboutir à des

transformations malignes spontanées pouvant aboutir à une perte des potentiels de différenciation lorsqu'elles sont injectées *in vivo*²⁰⁰ ou générer des tumeurs²⁰¹.

Une source de cellules avec de multiples potentiels de différenciation, pouvant être isolées en grande quantité par une procédure peu invasive, sans étape d'expansion *in vitro* et aussi transplantées de façon sûre et efficace de manière auto- ou allogénique serait « idéale » pour des applications en thérapie cellulaire en substitution des CSM de la moelle osseuse. Cette source « idéale » pourrait être le tissu adipeux (TA) sous-cutané. En effet, le TA a été décrit pour être une source potentielle de cellules souches adultes dites de type mésenchymateux avec de multiples potentiels de différenciation⁸⁰. Plusieurs termes sont utilisés pour nommer ces cellules, tels que « adipose-derived stem cells » ou « adipose-derived stromal cells » reconnues sous l'acronyme ASC ou encore cellules souches/progénitrices du TA. La méthode d'isolement de ces cellules, leurs capacités de différenciation et leurs potentiels immunomodulateurs sont comparables à ceux des CSM de la moelle osseuse²⁰². Avec l'augmentation de l'incidence de l'obésité dans le monde entier, le TA sous-cutané est un tissu abondant et rapidement accessible par simple liposuction et renferme un nombre important de cellules dites « souches » pouvant être utilisées en substitution des CSM de la moelle osseuse et donc comme outils pour la thérapie cellulaire²⁰³.

Au démarrage de ma thèse, alors que de nombreux travaux s'intéressaient à ces cellules souches/progénitrices pour leurs potentiels de différenciation et en vue d'une utilisation éventuelle en thérapie cellulaire, peu de données étaient disponibles concernant la caractérisation phénotypique et génotypique de ces cellules à l'état natif ainsi que l'influence de leur microenvironnement et de l'état d'obésité sur leur nombre, leurs capacités de prolifération et de différenciation. En effet, le TA n'est pas un tissu inerte, il est métaboliquement actif et fortement impliqué dans le métabolisme énergétique et il représente un important organe endocrine (cf. paragraphe III.2.2). De plus, le TA apparaît comme un acteur clé en tant que source et site de l'inflammation qui survient au cours de la mise en place de l'obésité²⁰⁴. C'est un tissu plastique qui peut subir de forts changements (obésité ou lipoatrophie) tout au long de la vie. **Étudier l'influence du microenvironnement dans lequel évoluent les cellules souches/progénitrices et mieux les caractériser semble être indispensable pour une meilleure compréhension de leur biologie dans les étapes précoces du développement de l'obésité mais aussi dans le but d'une utilisation optimisée en thérapie cellulaire.**

III. Le tissu adipeux : origine et développement – implication des cellules souches

III.1. L'obésité

III.1.1. Définition

L'obésité est définie comme un développement excessif de la masse grasse pouvant avoir des effets néfastes sur la santé. Les causes de l'obésité sont multifactorielles. L'obésité comme le surpoids peuvent être expliqués dans la majorité des cas par la combinaison d'un déséquilibre de la balance énergétique, conséquence d'un excès d'apports caloriques ; d'une diminution des dépenses énergétiques due à une réduction de l'activité physique (sédentarisation) ; et d'une susceptibilité génétique.

L'obésité se mesure par l'**indice de masse corporelle** (IMC) ou **body mass index** (BMI) en anglais (Tableau 2). L'IMC est calculé en divisant le poids de la personne par le carré de sa taille (kg/m^2). Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), une personne adulte ayant un IMC compris entre 18,5 et 24,9 est considérée comme ayant un poids normal et entre 25 et 29,9 kg/m^2 comme étant en surpoids ou préobèse. Une personne est obèse lorsque son IMC est supérieur à 30 kg/m^2 et un IMC supérieur à 40 kg/m^2 signe une obésité sévère ou morbide, seuil à partir duquel une morbidité apparaît suite aux complications liées au poids.

Tableau 2 : Classification internationale du sous poids, surpoids et de l'obésité selon l'IMC.

Classification	IMC (kg/m ²)	Risque de morbidité associée
Insuffisance pondérale	< 18,5	Faible
Normo-pondéré	18,5 – 24,9	
Surpoids ou pré-obèse	25 – 29,9	Accru
Obèse	≥ 30	
Obèse classe I	30 – 34,9	Modérée
Obèse classe II	35 – 39,9	Important
Obèse classe III	≥ 40	Très important

D'après la classification mondiale de l'OMS

Cependant, bien que l'IMC corrèle positivement avec la masse grasse, il ne la mesure pas directement et son interprétation a quelques limites. En effet, l'IMC ne prend pas en compte une forte ossature ou musculature et ne donne aucune indication quant à la répartition du TA dans l'organisme dont dépend le risque de maladies associées au développement de la masse grasse. Il est un bon indicateur de l'obésité chez l'adulte mais pas chez l'enfant ou l'adolescent. D'autres techniques existent pour estimer la masse grasse :

- **La mesure des plis cutanés** qui permet d'estimer l'adiposité sous-cutanée.
- **La mesure du tour de taille** (mesure supérieure à 102 cm pour les hommes et à 88 cm chez la femme (en dehors des grossesses)) et **le ratio taille sur hanche** (supérieur à 0.9 chez l'homme et à 0,85 chez la femme) qui permettent d'apprécier l'adiposité abdominale qui est associée à une augmentation du risque de maladies cardio-vasculaires.
- **L'impédancemétrie** qui par le calcul de la résistance des tissus biologiques à un courant sinusoïdal de faible intensité permet d'estimer la quantité de TA, ce dernier n'étant pas conducteur d'électricité.
- Et enfin **l'imagerie par résonance magnétique (IRM)** qui est une méthode plus fine mais coûteuse car elle permet de localiser et de quantifier le TA dans tout l'organisme.

III.1.2. Prévalence

L'obésité est devenue la première maladie non infectieuse de l'histoire mais ne constitue pas une pathologie elle-même. Elle est délétère pour l'organisme car elle est à l'origine du développement d'autres maladies (maladies cardio-vasculaires, diabète de type 2, cancers,

dyslipidémies). L'obésité raccourcit l'espérance de vie et influence de manière négative la qualité de vie. Sur 6 milliards d'individus, 3 milliards sont sous-alimentés et les autres sont en train de devenir obèses. D'après les dernières estimations de l'OMS en 2005, environ 1,6 milliard d'adultes avaient un surpoids et au moins 400 millions d'adultes étaient obèses. Autrefois considérés comme des problèmes propres aux pays à haut revenu, le surpoids et l'obésité augmentent de façon spectaculaire dans les pays à faible ou moyen revenu, surtout en milieu urbain. En Europe, la prévalence de l'obésité a triplé en 20 ans, un adulte sur deux et un enfant sur cinq sont en surcharge pondérale et un tiers d'entre eux sont obèses. Selon la dernière étude Obépi, la prévalence de l'obésité est aujourd'hui en France de 13.1% et reste cependant inférieure à celle des Etats-Unis où un tiers de la population est obèse²⁰⁵.

III.2. Fonctions des tissus adipeux

Deux types de tissu adipeux (TA) fonctionnellement différents sont classiquement décrits chez les mammifères: **le TA brun** et **le TA blanc** (Figure 18 A et B). Ces deux types de TA sont principalement composés de cellules « stockeuses de lipides », l'adipocyte, et sont impliquées dans la balance énergétique mais présentent une morphologie différente et assument des fonctions bien distinctes.

III.2.1. Fonctions du tissu adipeux brun

Le tissu adipeux brun est impliqué dans la dépense d'énergie en dissipant de la chaleur lors de la thermogenèse adaptative. Cette propriété unique du TA brun est due à une grande capacité oxydative et à la grande densité mitochondriale dans les adipocytes bruns (Figure 18 A). Ces cellules expriment spécifiquement la protéine découplante UCP-1 (uncoupling protein-1) dans la membrane interne des mitochondries qui joue un rôle essentiel dans la thermogenèse adaptative en permettant la dissipation du gradient de protons généré par la respiration sous la forme de chaleur à la place de la production d'ATP. Chez les rongeurs, le TA brun est abondant dans la période néonatale mais est présent pendant toute leur vie et est principalement situé dans la région intra-scapulaire. Chez l'Homme, il est abondant chez le fœtus et les nouveau-nés dans les régions axillaire, cervicale, périrénale et autour des glandes surrénales (Figure 18 C) et jusqu'à récemment il était admis qu'il disparaît rapidement après la naissance et il était considéré comme inexistant et sans pertinence physiologique chez l'adulte²⁰⁶. Cependant, l'utilisation de la tomographie par émission de positrons couplée à de la tomographie assistée par ordinateur (PET-CT) utilisée pour détecter les métastases

tumorales, ont permis de détecter des zones symétriques présentant une grande absorption de ^{18}F -fluorodeoxyglucose (^{18}F -FDG) mais d'une densité différente à celle du muscle. Ces zones ont été décrites pour être du TA brun. Des dépôts se retrouvent dans les régions cervicale, supraclaviculaire et paravertébrale chez des individus sains (Figure 18 C) et non pas entre les omoplates comme chez le rongeur²⁰⁷. Récemment par l'utilisation de la même méthode, deux études ont montré, chez l'homme, que ce TA brun était métaboliquement actif et que son activité était augmentée par le froid. De plus, il est plus fréquent chez la femme que chez l'homme et inversement corrélé à l'IMC, surtout chez les personnes âgées^{208, 209}. Enfin, il vient d'être décrit, chez l'homme, comme subissant les variations saisonnières, il est plus particulièrement modulé par la photopériode que par la température²¹⁰.

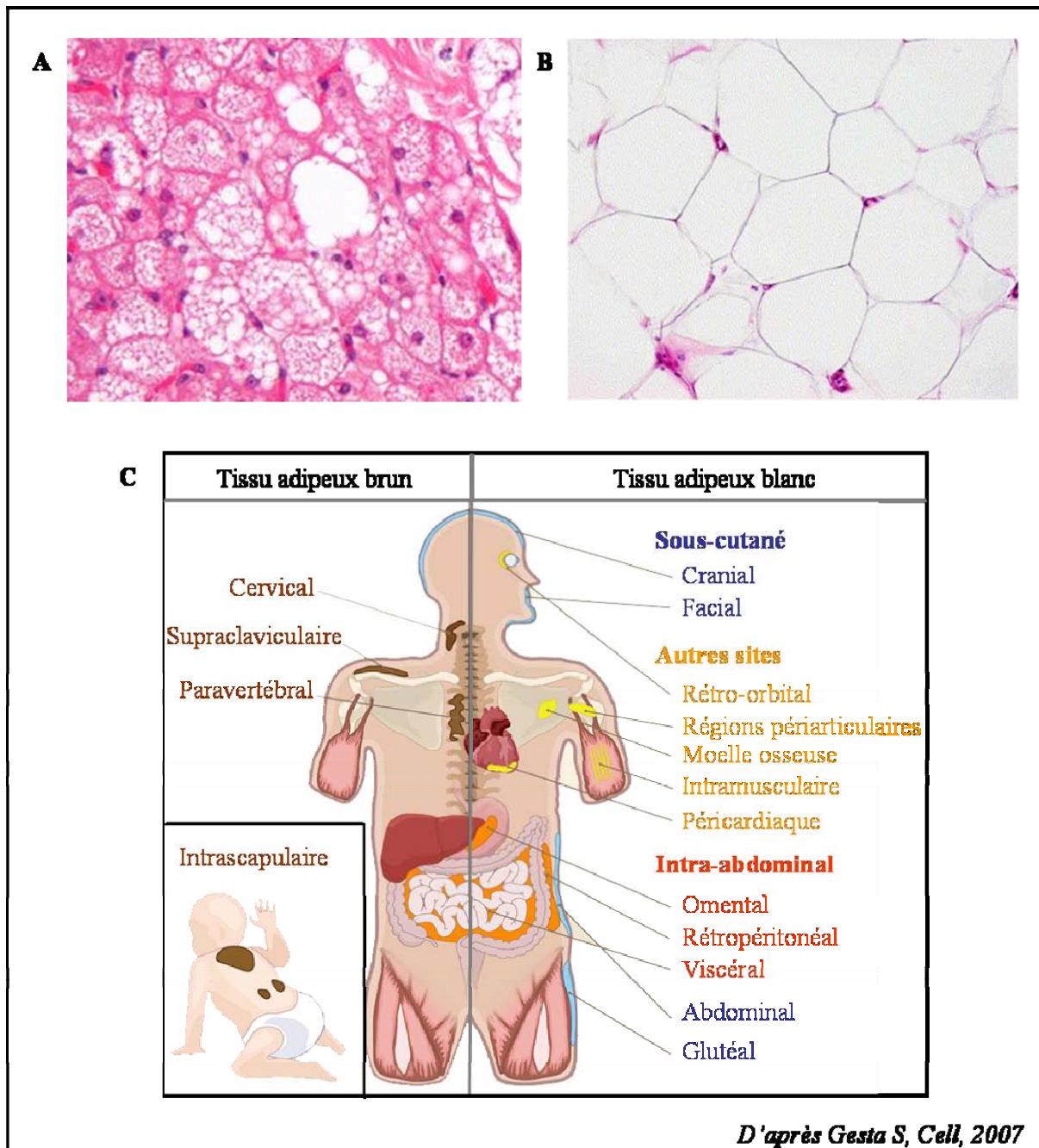


Figure 18 : Localisation des TA.

(A) Coupe histologique de TA brun. (B) Coupe histologique de TA blanc. (C) Distribution du TA brun et blanc à travers le corps.

III.2.2. Fonctions du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est lui impliqué dans le stockage et la mobilisation d'énergie sous forme de triglycérides et est aussi un organe endocrine important pour la modulation du métabolisme. Alors que chez la souris, le TA blanc se développe principalement après la

naissance, chez l'homme, les premiers adipocytes apparaissent au cours du second trimestre de gestation et après la naissance, les dépôts sous-cutanés et viscéraux sont déjà apparents et continuent de se développer²¹¹.

Sa localisation varie selon les espèces. Chez l'Homme, le TA blanc est présent dans plusieurs dépôts qui se distribuent à travers tout le corps (Figure 18 C)²¹². Les localisations principales sont intra-abdominales (autours de l'épiploon, des intestins et dans les zones péri-rénales) mais aussi sous-cutanées (au niveau abdominal, des fesses et des cuisses). Mais le TA blanc peut se trouver ailleurs comme dans les espaces rétro-orbitaux, aux extrémités, sur la face, dans la moelle osseuse mais aussi en intra- et péri-musculaires. Les différents dépôts ne sont pas tous métaboliquement équivalents et ont des profils sécrétoires différents. La répartition de la masse grasse, même chez les individus minces ou de poids constant, change avec l'âge: il y a une diminution du TA sous-cutané en faveur du TA intra-abdominal.

a) Fonctions métaboliques

Le TA n'est plus décrit comme un simple tissu de soutien et de protection, il possède une activité métabolique intense. Il est le lieu de stockage et de mobilisation de l'énergie sous forme de triglycérides (TG) ou triacyglycérols (TAG). On parle de lipogenèse lorsque les apports caloriques sont supérieurs aux dépenses et que le corps a besoin de stocker de l'énergie. Inversement, en situations de jeûne, d'exercice physique, de stress ou d'exposition au froid, le TA peut libérer de l'énergie sous forme d'acides gras libres dans le sang. On parle alors de lipolyse ou lipomobilisation.

– La synthèse des lipides : la lipogenèse

Les plus grandes réserves énergétiques du corps humain sont stockées dans l'adipocyte sous forme de TG. Deux voies permettent la synthèse et le stockage des TG dans l'adipocyte: (I) **le captage d'acides gras (AG) circulants** et (II) **la synthèse d'AG *de novo* ou lipogenèse**.

→ Le captage des AG circulants :

La principale voie de synthèse des TG dans le TA se fait à partir des acides gras, les TG, présents dans les lipoprotéines (chylomicrons et VLDL (Very low density lipoprotein)) de la circulation sanguine en situation post-prandiale. Ces lipoprotéines étant de trop grande taille pour passer la barrière endothéliale, les TG sont hydrolysés par une lipase : la lipoprotéine

lipase ou LPL. La LPL est synthétisée et sécrétée par les adipocytes en situation post-prandiale et transférée à la surface des cellules endothéliales dans la lumière des capillaires où elle est ancrée grâce à des protéoglycans à héparane sulfate²¹³ (Figure 19).

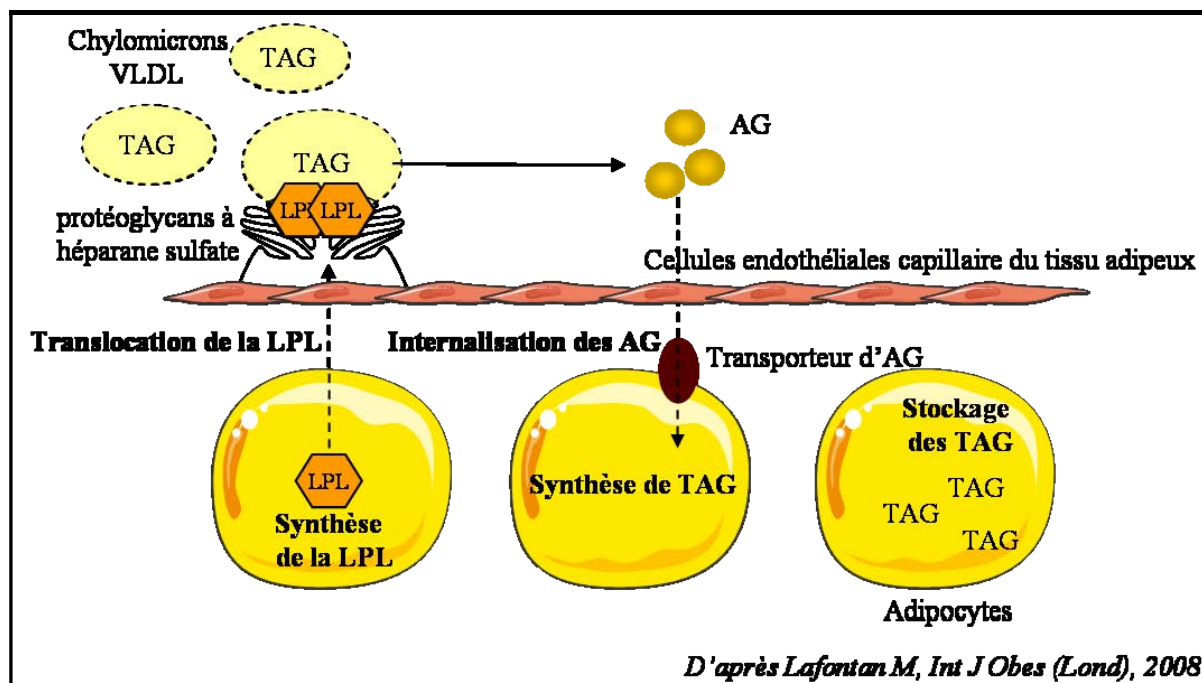


Figure 19 : Captage des acides gras circulants.

LPL: Lipoprotéine lipase; TAG: Triacylglycérol; AG: Acide gras; VLDL: Very low density lipoprotein.

L'hydrolyse des TG par la LPL en coopération avec la GPIHBP1 (glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1) récemment décrite comme potentiel récepteur aux chylomicrons et VLDL, entraîne la libération d'AG^{214, 215}. Les AG libres sont ensuite internalisés dans l'adipocyte par diffusion passive grâce au flip-flop de la membrane pour les AG libres à courtes chaînes^{216, 217} ou pour les AG libres à longues chaînes par transport actif via des protéines de transport de la famille des Fatty acid transport protein (FATP) ou CD36 (ou Fatty Acid translocase (FAT))^{218,219}. Une fois dans le cytosol de l'adipocyte, le transfert des AG est assuré par la protéine de transport aP2/FABP4. Les AG sont transformés par l'enzyme acyl-coenzyme A synthase en Acyl-Coenzyme A (Acyl-CoA) puis sont ré-estérifiés en TG sur les fonctions alcool du glycérol-3-phosphate par l'intermédiaire et l'action successive de trois enzymes : la glycerol-3-phosphate acyltransférase ou GPAT qui greffe le premier AG en position 1 sur le glycérol-3

phosphate ²²⁰, l'acylglycerol-3-phosphate acyltransferase ou AGPAT qui pose le second AG ²²¹ et la diacylglycérol acyltransférase ou DGAT qui fixe le dernier AG ²²².

→ La synthèse d'AG ou lipogénèse *de novo* :

La lipogénèse *de novo* est la synthèse d'AG à partir de précurseurs non lipidiques qui sont principalement les sucres (Figure 20).

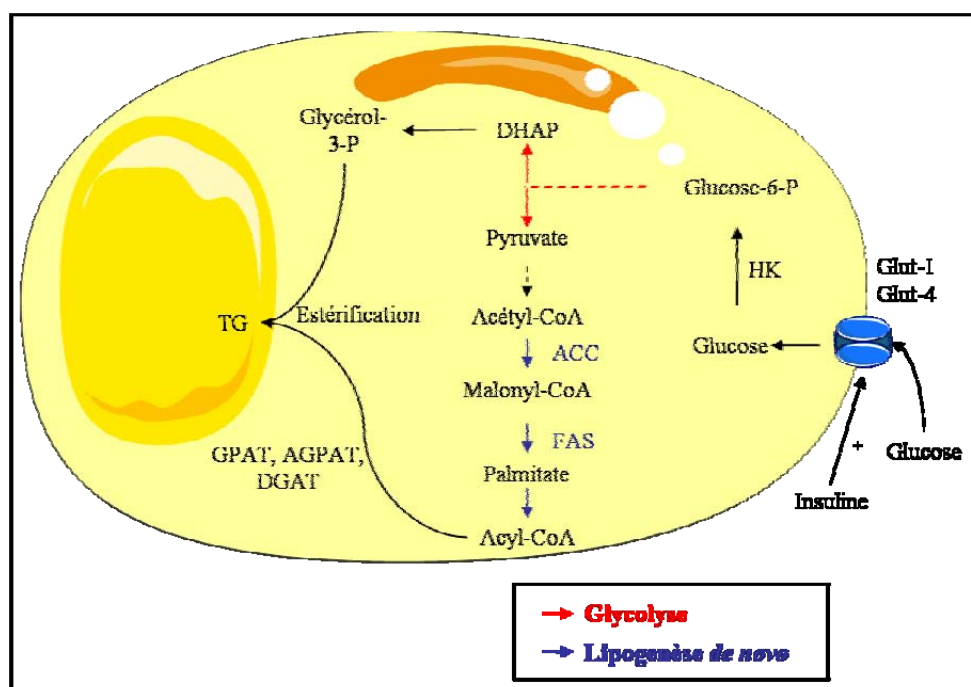


Figure 20 : Lipogénèse/synthèse des triglycérides dans l'adipocyte.

Glut: glucose transporter; HK: hexokinase; DHAP: dihydroxyacétone phosphate; TG: triglycérides; ACC: acétyl Coenzyme A (CoA) carboxylase; FAS: fatty acid synthase; GPAT: glycerol-3-P acyltransferase; AGPAT: acylglycerophosphate acyltransferase; DGAT: diacylglycerol acyltransferase.

Le substrat majeur est le glucose. Chez les mammifères, elle se déroule principalement dans le foie ²²³ mais aussi dans le TA blanc et les glandes mammaires pendant la lactation. Chez l'homme, la capacité lipogénique est essentiellement hépatique, la voie de synthèse des AG à partir du glucose étant faiblement active dans l'adipocyte humain ^{224, 225}. Après son entrée dans l'adipocyte par les transporteurs spécifiques Glut-1 (transport basal) et Glut-4 (transport insulino-dépendant), le glucose est transformé en pyruvate par la voie de la glycolyse. Le pyruvate donne ensuite de l'acétyl CoA puis du malonyl CoA par l'action séquentielle de

l'acetyl coenzyme A carboxylase (ACC) et de la fatty acid synthase (FAS) pour enfin se transformer en acide gras à longue chaîne saturée. L'action des différentes désaturases permet de synthétiser des AG plus ou moins saturés. Alors que la contribution de cette voie dans l'accumulation de TG dans le TA est clairement démontrée chez le rongeur, elle semble beaucoup moins importante chez l'Homme ²²⁴. De nombreux facteurs endocrines et paracrines tels que les catécholamines, l'hormone de croissance et la leptine sont capables de contrôler le stockage des TGs. Le facteur majeur est l'insuline qui stimule cette voie en augmentant le captage du glucose via le recrutement du transporteur Glut-4 à la membrane, et en activant les enzymes glycolytiques et lipogéniques ²²⁶. La dernière étape nécessaire à la synthèse des TG est la ré-estérification des AG néoformés ou captés de la circulation. Cette étape nécessite l'action de 3 enzymes spécifiques qui agissent séquentiellement pour greffer 3 AG sur un squelette de glycérol phosphorylé en position 3 pour donner un TG (cf. paragraphe captage des AG circulants).

– La mobilisation des lipides : la lipolyse

Afin de fournir l'énergie nécessaire aux tissus périphériques comme les muscles et le foie, les réserves d'énergie du TA sont utilisées et ainsi les TAG sont hydrolysés en glycérol et AG non estérifiés qui seront utilisés via la β -oxydation dans les mitochondries des tissus cibles en demande énergétique.

Plusieurs lipases ainsi que des protéines associées aux gouttelettes lipidiques sont nécessaires à l'hydrolyse des TG. La LHS (Lipase Hormono Sensible) permet l'hydrolyse des TAG en DAG (diacylglycerol) et des DAG en MAG (monoacylglycérols) ²²⁷. La LHS est la seule enzyme pouvant être régulée par des facteurs hormonaux (insuline et catécholamines) ce qui en fait une enzyme clé de la lipolyse ²²⁸. En plus de la LHS, une nouvelle enzyme a été identifiée, l'ATGL (Adipose Triglycéride Lipase), qui possède exclusivement une activité triglycéride lipase (hydrolyse de TAG en DAG) ²²⁹⁻²³¹. L'activité de l'ATGL est dépendante de son co-activateur CGI-58/ABHD5 et semble jouer un rôle important dans la lipolyse basale ²³². L'étape finale de la lipolyse génère des AG libres et du glycérol grâce à la monoacylglycérol lipase (MGL) qui n'est pas hormonalement régulée ²³³.

Plusieurs hormones participent à la régulation de la lipolyse en la stimulant ou en l'inhibant (pour revue Lafontan M et Langin D 2009 ²³⁴) (Figure 21). Les catécholamines, telles que l'adrénaline via la circulation et la noradrénaline via l'innervation sympathique, par leurs récepteurs beta-adrénergiques couplés à des protéines Gs présents à la surface des adipocytes,

stimulent la lipolyse²³⁵⁻²³⁷. L'adrénaline par les récepteurs α -adrénergiques couplés aux protéines G_i mais aussi l'insuline ou encore le neuropeptide Y, l'adénosine, les prostaglandines et l'acide nicotinique, ont elles une action inhibitrice sur la lipolyse. Ces hormones contrôlent les concentrations intracellulaires d'AMP cyclique via leurs actions sur l'adenylyl cyclase ou par l'activation de la phosphodiesterase 3B de l'adipocyte par l'insuline. Outre les catécholamines, de nombreuses molécules sont connues pour réguler positivement la lipolyse (la thyroid stimulating hormone (TSH), le glucagon, l'IL-6 ou le TNF- α ²³⁸⁻²⁴⁰) mais de façon plus lente. Une autre voie peut stimuler la lipolyse, c'est la voie des peptides natriurétiques. L'ANP (atrial natriuretic peptide) et le BNP (B-type natriuretic peptide) stimulent l'activité de la guanylyl cyclase couplée au récepteur de l'ANP et ainsi la production de GMP cyclique²⁴¹⁻²⁴³. L'AMPc et le GMPc contribuent à la phosphorylation par la PKA ou la PKG des périlipines et de la LHS. La phosphorylation des périlipines entraîne la libération d'un co-activateur de l'ATGL et une importante altération de la surface des gouttelettes lipidiques qui facilite l'hydrolyse des TAG par la LHS. La phosphorylation de la LHS a pour effet sa translocation du cytosol vers la surface des gouttelettes lipidiques. Les produits finaux de l'hydrolyse des TAG sont relargués par l'adipocyte. Le glycérol passe la membrane plasmique par diffusion facilitée grâce à une aquaporine (AQP7)²⁴⁴ et les AGL sont relargués grâce à une protéine de transport, FABP4 (Fatty Acid Binding Protein 4).

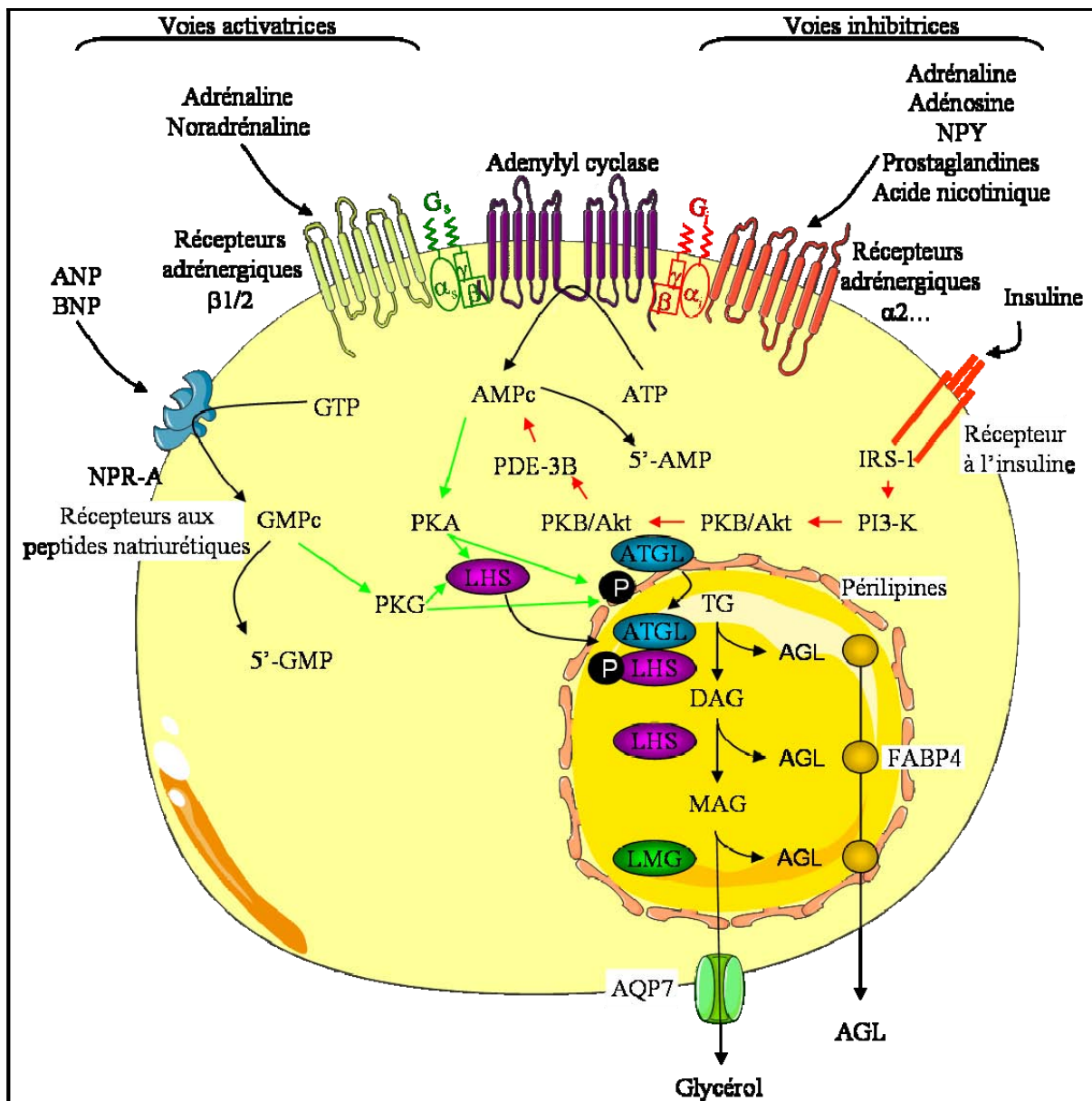


Figure 21 : Contrôle de la lipolyse dans l'adipocyte humain.

Les catécholamines activent les récepteurs α_2 -adrénergiques et $\beta_{1/2}$ -adrénergiques modulant négativement et positivement l'activité de l'adénylyl-cyclase respectivement. Outre le récepteur α_2 -AR, de nombreux autres récepteurs sont couplés négativement à l'AC. C'est notamment le cas des récepteurs à l'adénosine, aux prostaglandines, au neuropeptide Y (NPY) et à l'acide nicotinique. L'AC produit de l'AMPc qui va activer une protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA). L'insuline possède une action antilipolytique. Son mécanisme d'action implique la phosphatidylinositol 3 kinase (PI3-K), la protéine kinase B (PKB/Akt) et la phosphodiesterase-3B (PDE-3B) qui diminue les taux intracellulaires d'AMPc transformé en 5'-AMP. L'ANP et le BNP stimulent le NPR-A dont l'activité guanylyl-cyclase génère du GMPc. Le GMPc stimule une protéine kinase dépendante du GMPc (PKG ou cGK-I). La PKA et la PKG activent par phosphorylation les périlipines et la lipase hormonosensible (LHS) qui va transloquer à la vacuole lipidique et participer, avec l'adipocyte triacylglycérol lipase (ATGL) et la monoglycéride lipase (LMG), à l'hydrolyse des triglycérides (TG) en glycérol et acides gras libres (AGL).

b) Fonctions sécrétoires

Outre ses fonctions métaboliques, le TA a une importante activité de sécrétion, particulièrement due au relargage d'acide gras lors de périodes de jeûne²⁴⁵. Il produit et sécrète un grand nombre de facteurs reconnus pour avoir des activités auto- et paracrines mais aussi endocrine. Le terme « adipokine » a d'abord été proposé pour désigner les facteurs sécrétés par les adipocytes puis étendu à l'ensemble des facteurs bio-actifs produits par le TA que ce soit par les adipocytes ou par les autres types cellulaires qui le composent (cf. paragraphe III.3.2). Les adipokines sont d'une grande diversité en terme de fonctions physiologiques, elles participent au métabolisme lipidique, à l'homéostasie glucidique, au contrôle du tonus vasculaire et à l'angiogenèse ainsi qu'à la réponse immunitaire et inflammatoire, à la régulation de l'appétit et aux fonctions reproductives. La découverte de la première sécrétion adipocytaire a été la lipoprotéine lipase²⁴⁶. Toutefois, c'est avec la découverte de la leptine, hormone spécifiquement synthétisée par les adipocytes et intervenant dans le contrôle de la prise alimentaire, que le TA a acquis son statut d'organe endocrine²⁴⁷. De nombreux autres facteurs ont par la suite été décrits pour être sécrétés par le TA, on en dénombre plus de 250 parmi lesquels on peut trouver²⁴⁸: des hormones (stéroïdes et glucocorticoïdes), des cytokines (TNF α , IL-6, IL-8, MCP-1), des facteurs de croissance (FGF, TGF β , VEGF), des protéases (MMP-2 et -9) et leurs inhibiteurs (TIMP-1 et -3, PAI-1), des éléments de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine). Leurs actions peuvent être classées en différentes fonctions biologiques impliquées dans : le métabolisme des lipides et des lipoprotéines, le tonus vasculaire et l'angiogénèse, le métabolisme et l'homéostasie énergétique, la sensibilité à l'insuline, les réponses immunitaire et inflammatoire et le remodelage de la matrice extracellulaire (Figure 22). Seule la leptine et l'adiponectine sont des sécrétions spécifiques de l'adipocyte, l'ensemble des autres facteurs peuvent être exprimés à la fois par les adipocytes et les autres types cellulaires composant le TA. Des différences dans l'activité et dans le type de sécrétions ont été décrites chez l'homme entre le TA sous-cutané et viscéral²⁴⁹, mais aussi en fonction de l'état d'obésité (par exemple : augmentation de la sécrétion de leptine et diminution de l'adiponectine chez les individus obèses) et enfin entre l'homme et la souris.

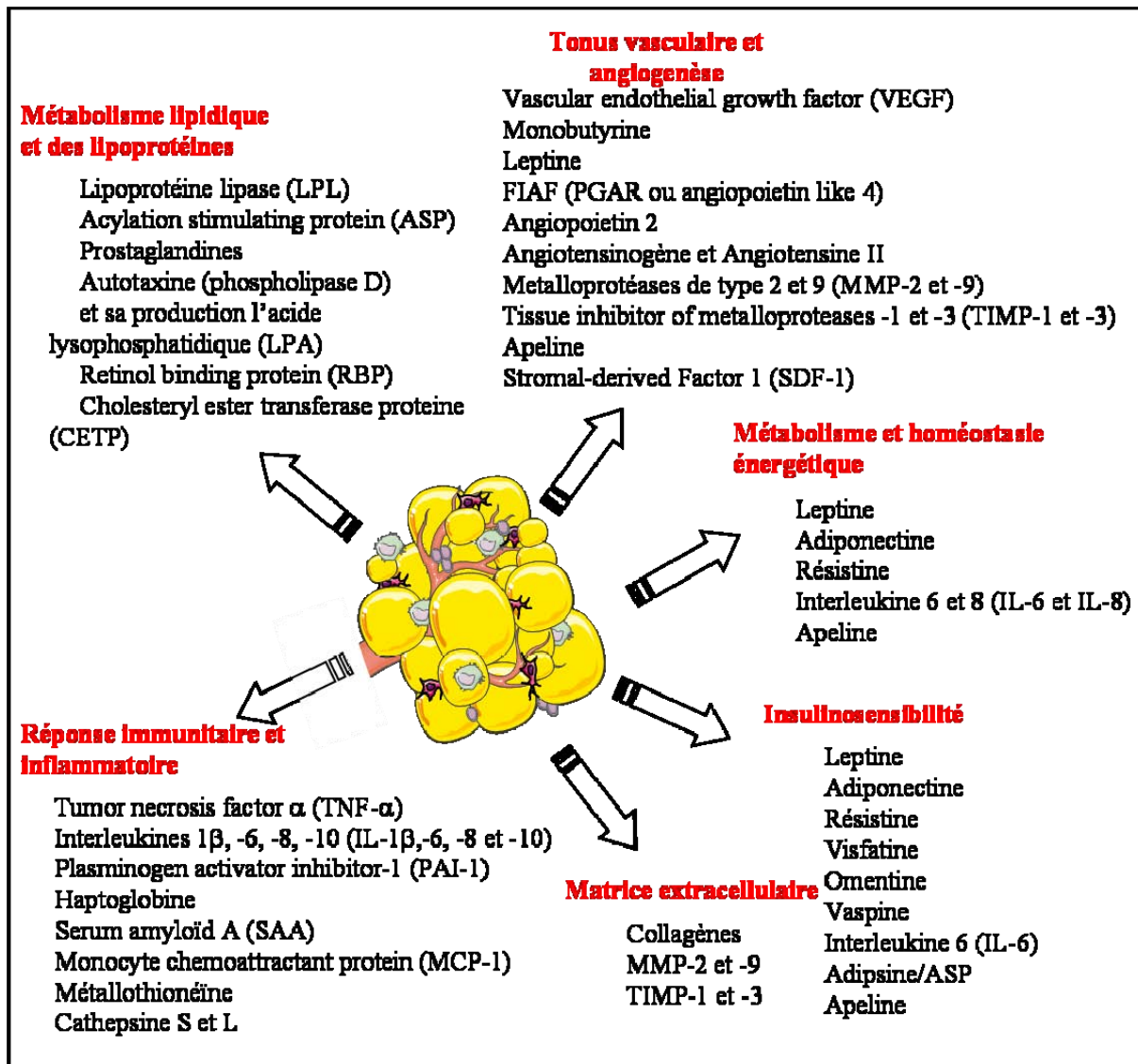


Figure 22 : Les sécrétions du tissu adipeux.

III.3. Origine, développement et composition

III.3.1. Origine et développement

Le TA, comme les muscles et les os, est généralement décrit pour être dérivé de CSM issues du feuillet mésodermique de l'embryon.

Jusqu'à récemment, il était admis que les adipocytes bruns et blancs provenaient du même progéniteur mésenchymateux puisque la différenciation de ces deux types cellulaires nécessite l'intervention du facteur de transcription PPAR γ ²⁵⁰⁻²⁵³. Cependant, les fonctions distinctes du TA brun et blanc suggèrent que ces deux tissus pourraient provenir de précurseurs différents.

En effet, il a récemment été montré par l'utilisation de modèles murins, d'un part par le groupe de Spiegelman que les adipocytes bruns dérivait d'un précurseur myogénique exprimant Myf-5 dont l'origine est différente de celle des adipocytes blancs²⁵⁴ et d'autre part par le groupe de Giacobino, que les cellules humaines CD34⁺ dérivant du muscle squelettique mais pas du TA blanc avaient des capacités de différenciation en adipocytes bruns²⁵⁵. Le contrôle de l'engagement de ces cellules progénitrices dans la voie adipogénique brune ou myogénique semblerait être régi par le facteur de transcription PRDM16²⁵⁴. Ces résultats corroborent les données d'expression génique qui avaient observé que les adipocytes du TA brun présentaient une signature myogénique²⁵⁶ ainsi qu'avec la découverte d'adipocytes bruns infiltrés dans les muscles squelettiques de certaines souris²⁵⁷.

L'origine des précurseurs des adipocytes n'est pas claire. Chez l'embryon, l'apparition d'adipocytes est concomitante à l'apparition du système vasculaire, à partir du 3^{ème} mois de vie intra-utérine, au niveau des organes primitifs qui sont retrouvés à tous les endroits où peut se trouver du TA à l'âge adulte²⁵⁸. Des études *in vitro* utilisant des cellules souches embryonnaires murines et confirmées *in vivo* ont montré qu'il existait plusieurs sous-types de cellules souches mésenchymateuses, certaines dérivant du mésoderme et d'autres du neuroectoderme. En effet, des études ont montré que les CSM aussi bien que les adipocytes générés à partir de cellules souches embryonnaires traitées par de l'acide rétinoïque dérivait du neuroectoderme/crête neurale plus que du mésoderme²¹¹. De plus, de la même façon que d'autres cellules d'origine mésenchymateuses, telles que les chondrocytes et les ostéocytes, les adipocytes blancs ont une origine différente le long de l'axe antéro-postérieur : dans la région céphalique, ils proviennent de la crête neurale alors que dans le tronc ils dériveraient du mésoderme²⁵⁹. Ces différences d'origine et de développement du TA pourraient expliquer les variations fonctionnelles qui existent entre les différents dépôts de TA blanc²⁶⁰ et l'association plus spécifique de certains dépôts à des désordres métaboliques. Chez l'adulte, les CSM de la moelle osseuse ont un potentiel adipogénique ce qui pose l'hypothèse que le progéniteur adipocytaire pourrait aussi être un « colony-forming-unit fibroblast » mobilisé depuis la moelle osseuse dans la circulation sanguine et adressé au TA. En effet, certaines cellules sanguines circulantes peuvent exprimer une capacité de différenciation adipocytaire²⁶¹. De plus, une étude réalisée chez des souris soumises à un régime gras a permis de montrer par l'utilisation d'approches de repopulation de cellules de la moelle osseuse par des cellules souches qui expriment une protéine fluorescente verte (GFP) que certains adipocytes des dépôts profonds pourraient être originaires de la moelle osseuse²⁶². Cependant, ces données restent discutables puisqu'au même moment, une autre équipe montrait que des cellules

progénitrices de la moelle osseuse ne différencient pas en adipocyte *in vivo* et donc ne participent pas à l'augmentation du nombre d'adipocytes qui a lieu lors de la croissance du TA²⁶³.

III.3.2. Composition cellulaire du tissu adipeux blanc

Le TA présente une grande hétérogénéité cellulaire. Outre les adipocytes matures qui sont la composante cellulaire majeure, le TA renferme une fraction non-adipocytaire nommée la fraction stroma-vasculaire (FSV) (Figure 23). Ces deux fractions peuvent être séparées, après digestion à la collagénase et centrifugation, grâce à la différence de densité entre les adipocytes qui sont gorgés de lipides et remontent à la surface et les autres types cellulaires qui sédimentent.

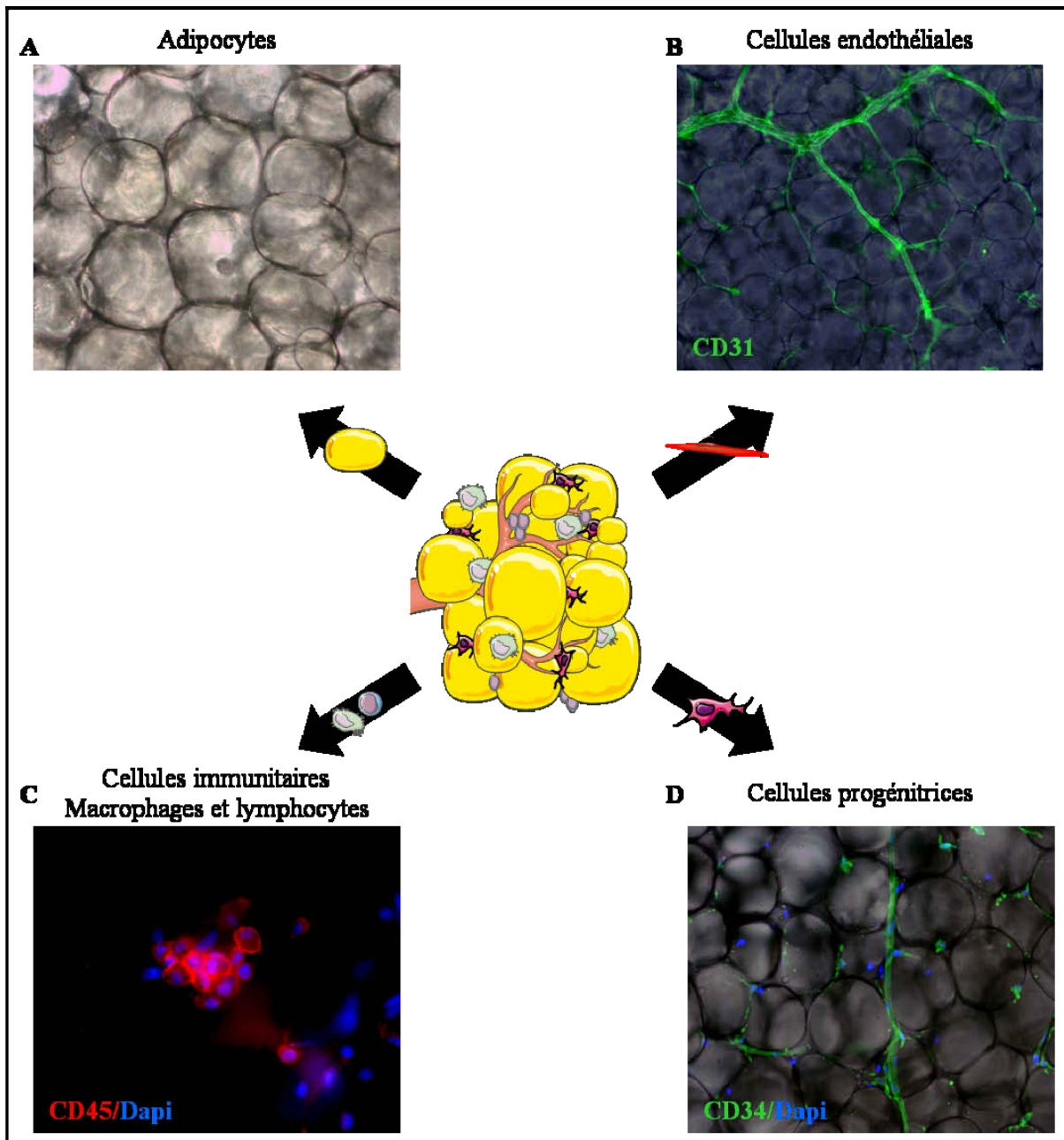


Figure 23 : Composition cellulaire du TA.

- **L'adipocyte** représente le type cellulaire majoritaire (Figure 23 A). C'est la cellule métaboliquement active du TA, il stocke l'énergie sous forme de TG (processus de lipogenèse) et la libère sous forme d'AG libres (processus de lipolyse) (cf. paragraphe III.2.2.a)). La capacité de stockage des adipocytes dans une vacuole lipidique unique entourée de protéines spécifiques (les périlipines) qui peut représenter 95% du volume cytoplasmique confère au TA une grande plasticité. Le diamètre d'un adipocyte gorgé de lipides peut varier de 15 à 150 μm voire plus chez des individus obèses. Dans ce cas, il s'agit d'hypertrophie

adipocytaire ^{264, 265}. Lorsque la capacité de stockage des adipocytes est atteinte, ceci lors d'obésités massives, une augmentation du nombre d'adipocyte ou hyperplasie adipocytaire ^{264, 265} résultant de la différenciation de précurseurs locaux ou recrutés a été suspectée à partir d'analyse quantitative d'adipocytes matures en fonction de leur taille (cf. paragraphe III.4.1).

- **Les cellules endothéliales – la vasculature** (Figure 23 B). Le TA est un tissu extrêmement vascularisé, chaque adipocyte étant entouré par un ou plusieurs capillaires dont le réseau serait équivalent à celui du muscle squelettique ²⁶⁶. Les cellules endothéliales capillaires du TA sont caractérisées par les marqueurs CD34⁺/CD31⁺ et leur pourcentage au sein de la FSV reste constant avec l'augmentation de l'IMC suggérant que la croissance de la masse grasse est associée à une néovascularisation ²⁶⁷. Cette dépendance du TA vis-à-vis de son réseau vasculaire a été confirmée par l'utilisation de facteurs anti-angiogéniques dans des modèles de souris obèses qui ont limité le développement de la masse grasse ^{268, 269}. L'induction, de manière spécifique, de l'apoptose des cellules endothéliales du TA a provoqué la réversion de l'obésité chez la souris ²⁷⁰. Ainsi, le réseau vasculaire joue un rôle déterminant dans la croissance mais également dans le maintien de la masse grasse. Les mécanismes impliqués dans l'extension du réseau vasculaire lors du développement du TA ne sont pas connus. Cependant, les adipocytes sécrètent de nombreux facteurs angiogéniques, comme nous l'avons vu plus haut (cf. paragraphe III.2.2.b) ²⁷¹, dont la production est augmentée avec l'obésité ²⁷². Bien que de récents travaux ont montré que l'expansion du réseau capillaire au cours d'une obésité induite chez la souris était due à une angiogenèse (formation de vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants) et non à une vasculogenèse (différenciation de cellules souches en cellules endothéliales) avec un recrutement des CSM de la moelle osseuse ²⁷³, une utilisation locale des cellules souches/progénitrices présentes au sein du TA n'est pas à exclure lors de l'extension du réseau. Malgré sa forte vascularisation, le TA présente des zones locales d'**hypoxie** qui ont d'abord été montrées chez la souris par l'utilisation du marqueur de l'hypoxie, le pimonidazole ²⁷⁴, et confirmées par la mesure de la pression partielle en oxygène dans le TA de souris ²⁷⁵ et dans le TA humain ²⁷⁶. Autant le TA de personnes normo-pondérées que celui de personnes obèses se trouve avoir des zones hypoxiques et cette situation augmente avec l'obésité (6.8 % vs 5.8 % d'O₂, normo-pondéré vs obèse) ²⁷⁶. Cet état hypoxique du TA peut être la conséquence de la taille adipocytaire qui excède souvent 100 µm qui est la limite de diffusion de l'oxygène mais aussi la conséquence d'une dysfonction endothéliale (Villaret A, 2009, en préparation).

- **Les cellules immunitaires** (Figure 23 C). La présence de **macrophages** au sein du TA a été suggérée il y a longtemps par les histologistes (Tedeschi. 1965. Pathological anatomy of adipose tissue) et cette observation a été reprise en 2003 dans le TA de l'homme et de la souris ^{277, 278}. Des observations récentes suggèrent l'implication de cette population cellulaire dans l'installation d'un état pro-inflammatoire, au sein du TA, lors de son développement excessif ainsi qu'un rôle de ces cellules dans l'installation de l'état d'insulinorésistance associée à l'obésité. Leur proportion et leur phénotype varient lors de la mise en place de l'obésité. En effet, il y a une accumulation de macrophages dans le TA humain et murin, à la fois due à une infiltration de monocytes circulants ²⁷⁹ et/ou à une prolifération locale de macrophages résidents ²⁸⁰. Chez l'homme, le nombre de macrophages présents dans le TA est positivement corrélé avec l'IMC ^{280, 281}. Les macrophages du TA sont hétérogènes concernant leur phénotype. Des études chez la souris soumise à un régime gras ont montré que les macrophages recrutés avaient un phénotype plus inflammatoire (phénotype M1) que les macrophages résidents des souris non-obèses. D'autres investigations ont montré que les macrophages nouvellement infiltrés étaient préférentiellement recrutés autour des adipocytes nécrotiques alors que les macrophages résidents étaient plus interstitiels et de phénotype M2 ^{282, 283}. Les études de notre laboratoire ont montré que les macrophages du TA humain avaient un phénotype anti-inflammatoire mais étaient capable de sécréter des médiateurs pro-inflammatoires ce qui signifie que ces macrophages ne sont pas strictement polarisés M1 ou M2 ²⁸⁰. Outre les macrophages, le TA renferme une autre population de cellules immunes, les **lymphocytes**. La présence de lymphocytes résidents dans le stroma de TA a d'abord été montrée par cytométrie de flux dans le TA de rongeurs ²⁸⁴ puis chez l'homme par analyses des marqueurs géniques et par immunohistochimie ²⁸⁵⁻²⁸⁷. Les travaux de notre équipe ont montré que le TA sous-cutané humain renferme majoritairement des lymphocytes T CD3⁺, avec une proportion équivalente de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires et CD8⁺ cytotoxiques, dont la quantité est positivement corrélée à l'IMC ²⁸⁸ et à la prise de poids chez la souris ²⁸⁹ contrairement aux lymphocytes T régulateurs ²⁹⁰. Les lymphocytes précèdent l'infiltration du TA par les macrophages ²⁸⁹ et tiennent un rôle dans l'initiation de l'inflammation du TA ²⁹¹. Le rôle de ces cellules immunitaires, macrophages et lymphocytes, dans le TA, n'est pas encore clairement établi mais des évidences de plus en plus nombreuses laissent penser que ces cellules immunes tiendraient un rôle dans le développement de l'inflammation du TA associée à l'obésité et dans la genèse des pathologies associées à l'obésité et participeraient notamment au développement de l'insulinorésistance ^{292, 293}.

- **Les cellules souches/progénitrices** (Figure 23 D). La présence de cellules progénitrices dans le TA a été suggérée dès que Bjorntorp a montré que la croissance du TA chez l'homme au cours de l'obésité est le résultat d'une hypertrophie adipocytaire (augmentation de la taille adipocytaire) suivie d'une hyperplasie adipocytaire (augmentation du nombre d'adipocyte)²⁶⁵. L'adipocyte étant une cellule mature incapable de proliférer^{294, 295}, l'augmentation du nombre d'adipocytes dans le TA de personnes obèses est expliquée par une différenciation de précurseurs adipocytaires ou préadipocytes présents dans la FSV. En effet, lorsque la FSV est mise en culture, les cellules immunes présentes dans le TA restent en suspension dans le milieu ou adhèrent peu alors que d'autres cellules adhèrent au plastique. Après des étapes de lavage pour éliminer toutes les cellules peu ou pas adhérentes, la mise en culture en conditions adipogéniques (facteurs favorisant la différenciation adipocytaire tels que l'insuline, la triiodothyronine, la transferrine, le cortisol et des agonistes de PPAR γ) des cellules adhérentes conduit à la formation de cellules ayant toutes les caractéristiques d'adipocytes matures (expression de transcripts spécifiques, activités de lipogenèse et lipolyse, activités sécrétoires telle que la production de leptine)^{296, 297}. Outre leurs capacités adipogéniques, de nombreux laboratoires ont par la suite montré que les cellules de la FSV, selon les conditions de culture, peuvent acquérir les marqueurs de multiples types cellulaires^{80, 298}. Ainsi, les cellules de la FSV ont des activités ostéogénique²⁹⁹, chondrogénique³⁰⁰, myogénique^{80, 301}, peuvent se différencier en cellules du lignage neuronal^{302, 303}, endothélial³⁰⁴, cardiaque³⁰⁵, hépatocytaire^{306, 307}, et même en cellules produisant de l'insuline³⁰⁸. C'est ainsi qu'elles sont appelées Adipose-derived stem/stromal/progenitor cells (ASCs). Afin d'isoler et de caractériser l'identité de la population de cellules progénitrices présentes dans la FSV, notre groupe a développé une technique d'isolement des différentes populations cellulaires de la FSV du TA humain qui se fonde sur l'utilisation de billes magnétiques couplées à des anticorps dirigés contre les marqueurs de surface: CD34 (marqueur des cellules souches hématopoïétiques et des cellules endothéliales capillaires), CD14 (marqueur des monocytes et macrophages), CD31 (marqueur des cellules endothéliales et des cellules de la lignée hématopoïétique) et CD3 (marqueur des lymphocytes T) (Figure 24).

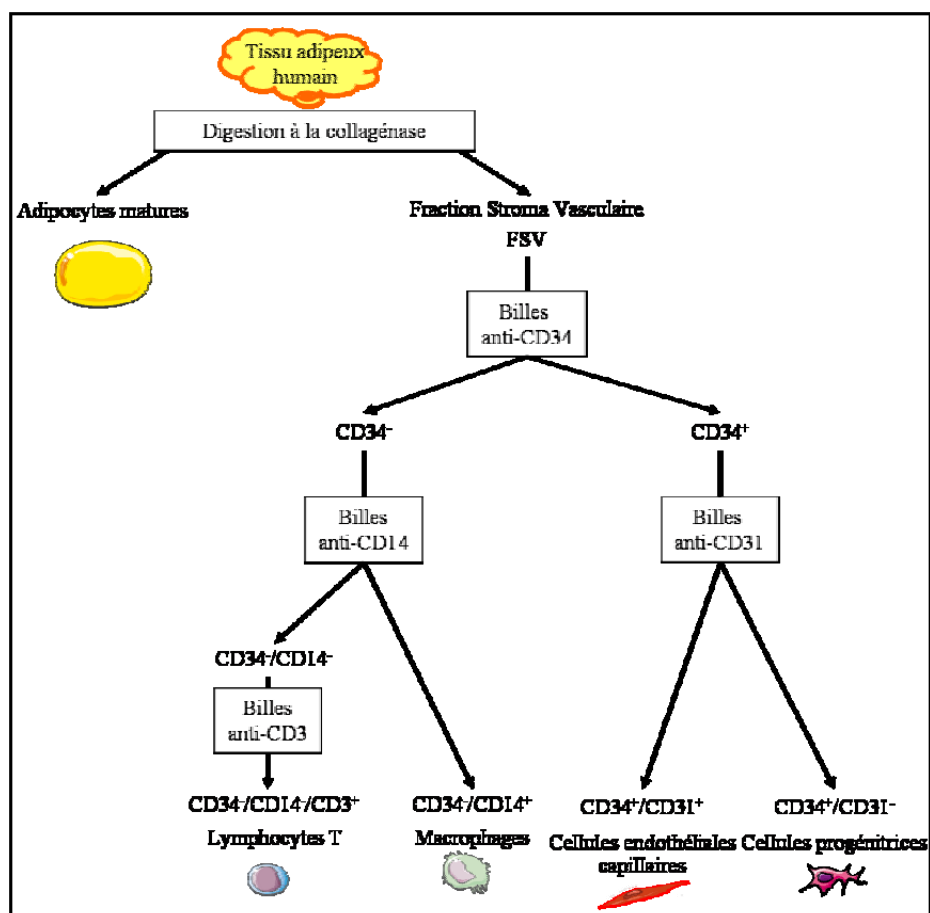


Figure 24 : Isolement des différents types cellulaires du tissu adipeux humain.

Nous avons ainsi pu montrer que les cellules positives pour le marqueur CD34 et négatives pour le marqueur CD31 ($CD34^+/CD31^-$) sont la seule population cellulaire présente dans la FSV capable de présenter une différenciation adipocytaire en condition adipogénique³⁰⁹. Malgré l'expression du marqueur CD34, normalement exprimé par les CSH, les cellules $CD34^+/CD31^-$ humaines ne sont pas dotées d'activité hématopoïétique en conditions de culture adaptées³⁰⁹. Cependant, il a récemment été montré que certaines cellules $CD45^-$ de la FSV de TA humain, dans des conditions d'isolement et de culture différentes et spécifiques, pouvaient former *in vitro* des colonies hématopoïétiques³¹⁰ confirmant l'activité hématopoïétique des cellules du TA montrée par l'injection de cellules de la FSV de souris pouvant reconstituer l'hématopoïèse de souris létalement irradiées³¹¹. En plus des capacités adipogéniques, cette population cellulaire $CD34^+/CD31^-$ possède, en milieu de culture endothélial, la capacité d'exprimer des marqueurs endothéliaux et de s'organiser en structures semblables à des capillaires. Elle est aussi capable de participer *in vivo* à la revascularisation d'un membre de souris volontairement ischémié lorsqu'elles sont injectées²⁶⁷. Ces résultats

indiquent que la fraction cellulaire CD34⁺/CD31⁻ de la FSV du TA humain, n'ayant subi aucune phase de culture *in vitro*, présente des propriétés de cellules progénitrices capables de donner des cellules qui expriment les marqueurs phénotypiques des adipocytes et des cellules endothéliales. Cependant, il reste à déterminer si cette population cellulaire est une population de cellules souches multipotentes ou bien constituée d'un mélange de cellules progénitrices unipotentes par des approches d'analyse clonale. Ce type d'approche, a également été réalisé non pas à partir des cellules souches/progénitrices CD34⁺/CD31⁻ isolées mais sur des ASCs isolées à partir de TA de jeunes donneurs (de 1 mois à 7 ans) et conduit à l'isolement des « human Multipotent Adipose-Derived Stem (hMADS) cells ». En effet, ces cellules, en plus d'être une population de cellules immatures, à caryotype normal, avec une grande capacité d'auto-renouvellement *in vitro*, possèdent des capacités de différenciation en de multiples lignages cellulaires de type mésenchymateux au niveau d'une seule cellule³⁰¹. Elles gardent tous leurs potentiels même après une intense expansion contrairement aux ASCs isolées à partir du TA adulte qui voient leurs capacités de différenciation changer en fonction du nombre de passage des cellules³¹². Ces résultats d'analyse clonale retrouvés à partir des ASCs ont montré que plusieurs clones cellulaires pouvaient se différencier en différents lignages, suggérant que les ASCs seraient des cellules souches multipotentes et non pas un mélange de progéniteurs³¹³.

De nombreux groupes ont étudié les marqueurs de surfaces des ASCs isolées à partir de TA humain mais aussi d'autres espèces. Le profil d'expression est relativement controversé et varie selon que l'on analyse des cellules natives ou cultivées mais aussi en fonction du nombre de passages et de l'adhérence au plastique^{314, 315}. Par exemple, la présence de l'antigène Stro-1, marqueur classique des CSM, est débattue sur les ASCs^{80, 316}. Les cellules fraîchement isolées CD34⁺/CD31⁻ présentent un immunophénotype différent des CSM puisqu'elles n'expriment pas le marqueur CD105 propre aux CSM³⁰⁹ et sont positives pour le marqueur CD34 qui n'est pas exprimé par les CSM. Toutefois, il est important de noter que la quantité de CSM dans la moelle osseuse étant très faible et que leur isolement nécessitant une étape d'expansion *in vitro*⁵², aucune étude n'a, à notre connaissance, caractérisé les CSM fraîchement isolées. De plus, l'expression de nombreux marqueurs de surface est modulée par les conditions de culture et l'état de prolifération des cellules³¹⁷. En revanche, les ASCs, isolées par leur propriété d'adhérence au plastique, sont elles positives pour le marqueur mésenchymateux CD105 et négatives pour le marqueur hématopoïétique CD34. Néanmoins, après plus de deux passages en culture, les ASCs expriment les caractéristiques d'adhésion, les récepteurs, les enzymes de surface, les protéines de la matrice extracellulaire et du

cytosquelette qui sont associées au phénotype des CSM (Tableau 3). Malgré les différences dans les méthodes d'isolement et de culture, l'immunophénotype des ASCs cultivées est relativement constant entre les différents laboratoires.

Tableau 3 : Immunophénotype des ASCs humaines.

	Positives	Négatives
Molécules d'adhésion	CD9, CD29, CD49d/e, CD54, CD105, CD166	
Récepteurs	CD44, CD71	
Enzymes	CD10, CD13, CD73, aldéhyde déhydrogénase	
Molécules de la MEC	CD90, CD146, collagène de type I et III, ostéopontine, ostéonectine	
Cytosquelette	α -smooth muscle actin, vimentine	
Cellules hématopoïétiques		CD14, CD31, CD45
Cascade du complément	CD55, CD59	
Antigène d'histocompatibilité	HLA-ABC	HLA-DR
Cellules souches	CD34, ABCG2	
Cellules stromales	CD29, CD44, CD73, CD90, CD166	
Péricytes	NG2, CD140b	

D'après Gimble JM, 2007.

De fait, l'expression des marqueurs de surface des ASCs ressemble à celui des CSM de la moelle osseuse et à celui des cellules satellites du muscle. Cependant, des analyses complémentaires des marqueurs de surface des cellules progénitrices du TA fraîchement isolées seraient nécessaires pour déterminer leur immunophénotype réel et ainsi comprendre le rôle joué par les conditions de culture dans l'expression ou la non-expression de marqueurs cellulaires. Chez la souris, les cellules progénitrices adipocytaires ont été identifiées dans la fraction cellulaire $\text{Lin}^-/\text{CD29}^+/\text{CD34}^+/\text{Sca-1}^+/\text{CD24}^+$. Cette population cellulaire est la seule de la FSV du TA blanc murin à être capable, *in vitro*, de stocker des triglycérides et d'exprimer des marqueurs adipocytaires. De plus, lorsque des cellules de souris normales sont injectées à des souris lipodystrophiques A-ZIP, ces cellules sont en mesure de reconstituer des dépôts de TA normaux mais aussi d'améliorer le diabète associé, démontrant leur

fonctionnalité *in vivo*³¹⁸. Une autre étude publiée au même moment montrait que Sca-1 était le biomarqueur des CSM présentant un potentiel à devenir des adipocytes matures³¹⁹.

Il est à noter que certaines équipes suggèrent que les précurseurs adipocytaires pourraient être originaires d'une dédifférenciation des adipocytes matures³²⁰. Cependant, peu de données sont en accord avec cette hypothèse et l'on peut supposer que cette dédifférenciation apparente des adipocytes pourrait être due à une contamination des adipocytes matures par des cellules progénitrices qui sont restées accrochées à leur membrane.

Récemment, des cellules périvasculaires, principalement des péricytes, ont été identifiées comme étant les CSM des organes adultes, suggérant ainsi que les vaisseaux sanguins seraient une réserve de cellules progénitrices⁸⁷. Une étude chez la souris a montré que les précurseurs adipocytaires résidaient dans la vasculature du TA³²¹. Cette observation a été confirmée pour les cellules progénitrices du TA humain^{322, 323}. Cependant, bien que les ASCs cultivées et repiquées semblent exprimer les marqueurs des péricytes NG2, CD140b ou CD146, l'expression de ces marqueurs par les cellules progénitrices *in vivo* et fraîchement isolées reste à être montrée. La localisation des cellules progénitrices au sein du TA doit encore être confirmée par l'utilisation de marqueurs autres que ceux des péricytes et par de la microscopie en trois dimensions.

III.4. Rôle potentiel des cellules souches dans le développement du tissu adipeux

La croissance du TA nécessite la mise en place de nouveaux adipocytes mais aussi une extension du réseau vasculaire ce qui laisse penser que les cellules progénitrices, par leurs capacités adipogénique mais aussi angiogénique, pourraient jouer un rôle dans le développement du TA.

III.4.1. Rôle potentiel dans la différenciation adipocytaire ou adipogénèse

Modèles d'études. De nombreux modèles de culture cellulaire notamment des lignées cellulaires ont été utilisés pour étudier d'un point de vue moléculaire les différentes étapes de la différenciation adipocytaire³²⁴. Les lignées cellulaires précurseurs des adipocytes se répartissent en deux classes majeures : les lignées préadipocytaires unipotentes et les lignées cellulaires fibroblastiques pluripotentes.

Les **lignées préadipocytaires** sont des cellules déjà déterminées qui permettent l'étude des évènements moléculaires responsables de la différenciation adipocytaire proprement dite, à savoir la conversion du préadipocyte en adipocyte. Les lignées préadipocytaires les plus utilisées sont **les lignées murines 3T3-L1 et 3T3-F442A**. Les **lignées fibroblastiques pluripotentes** (les cellules hMADS) sont des CSM. Ces cellules non déterminées constituent de bons modèles d'étude pour la compréhension des évènements précoces de la différenciation adipocytaire, notamment de l'étape d'engagement dans la voie adipocytaire³⁰¹. Des **cultures primaires de préadipocytes** murins et humains ont aussi été utilisées pour étudier ce processus de différenciation adipocytaire.

Il est cependant important de souligner que la majorité des études réalisées pour décrypter les différentes étapes impliquées dans l'adipogenèse ont été réalisées dans des lignées murines. L'existence de différences physiologiques entre les cultures primaires et les lignées de préadipocytes ainsi que les variations inter-espèces font que les mécanismes entrant en jeu dans l'adipogenèse, chez l'homme, restent encore à être clarifiés.

Etapas de la différenciation adipocytaire. Les CSM deviennent des préadipocytes quand elles s'engagent dans le lignage adipeux et qu'elles ne sont plus capables de différencier en d'autres lignages mésenchymateux. Cette étape initiale de la différenciation adipocytaire est connue sous le terme de **détermination**. La seconde phase de l'adipogenèse est la **différenciation terminale** au cours de laquelle les préadipocytes acquièrent toutes les caractéristiques des adipocytes matures (Figure 25).

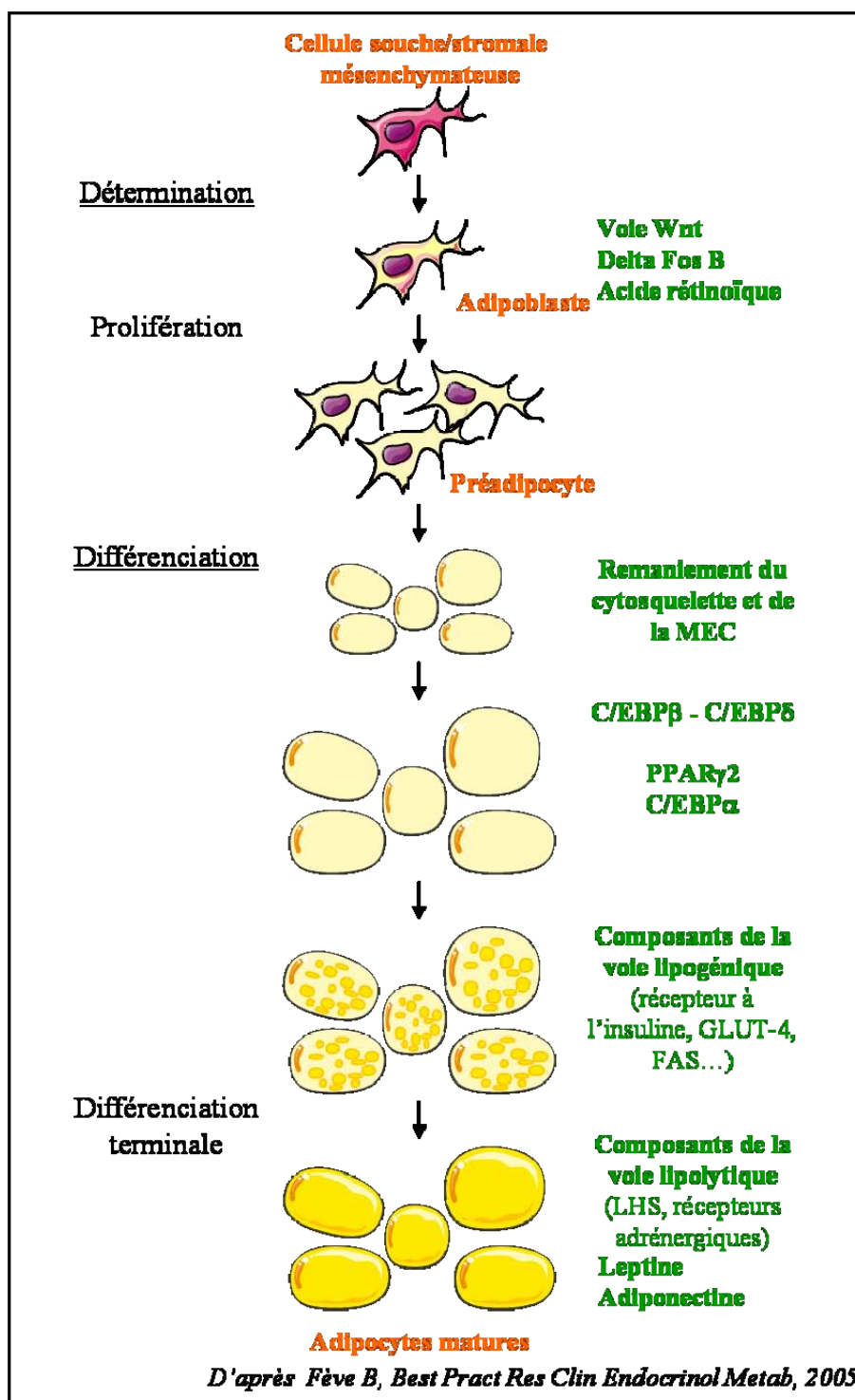


Figure 25 : Les étapes de la différenciation adipocytaire.

In vitro, après une première étape de détermination des CSM vers le lignage adipocytaire, les adipoblastes prolifèrent jusqu'à confluence avant leur engagement vers la voie de différenciation adipocytaire proprement dite et deviennent alors des préadipocytes. La différenciation adipocytaire se caractérise par l'apparition successive de marqueurs précoces,

tardifs puis très tardifs. L'engagement des préadipocytes dans le processus s'accompagne par l'expression de marqueurs précoces tels que l'IGF-1 et par un remodelage du cytosquelette et de la MEC du préadipocytes. Dans la phase de maturation terminale, ces cellules acquièrent l'équipement nécessaire à la lipogenèse (récepteur à l'insuline, Glut4, aP2, FAS...) qui leur permet d'accumuler dans leur cytoplasme des gouttelettes lipidiques qui augmentent de taille et finissent par fusionner. Parallèlement, elles expriment les protéines impliquées dans la voie lipolytique. Enfin, se mettent en place les capacités de synthèse et de sécrétion des adipokines. Ainsi, au cours de l'adipogenèse, les cellules subissent à la fois des modifications morphologiques, enzymatiques et biochimiques.

a) La détermination adipocytaire

La détermination adipocytaire des précurseurs adipeux vers le lignage adipocytaire paraît être contrôlée par de nombreuses voies de signalisation, notamment celle de delta fos B, de l'acide rétinoïque, de Wnt et Notch, des « Bone Morphogenic Protein » (BMPs) mais aussi Hedgehog. A faible concentration, l'**acide rétinoïque** favorise l'adipogenèse en inhibant la différenciation ostéogénique alors que le **facteur delta fos B** a une action opposée³²⁵. L'activation de la voie de signalisation **Wnt** inhibe l'adipogenèse en bloquant l'induction de PPAR γ et C/EBP α et induit la différenciation ostéogénique et myogénique³²⁶. Quant à la voie de signalisation **Notch**, elle favorise l'engagement des CSMs dans le lignage ostéogénique et inhibe donc l'adipogenèse³²⁷. Les **BMPs** de la superfamille de TGF β jouent un rôle critique dans l'engagement des CSM dans le lignage adipocytaire. La protéine BMP-4 a été montrée pour stimuler la différenciation des CSM en adipocyte³²⁸ alors que BMP-2 et BMP-7 induisent la différenciation ostéogénique et inhibent l'adipogenèse des CSM et ce de façon concentration dépendante^{329, 330}. Enfin, la voie de signalisation **Hedgehog** aurait des propriétés anti-adipogéniques en inhibant les facteurs de transcription clé de la différenciation adipocytaire (C/EBP β , PPAR γ) et en augmentant l'expression de protéines anti-adipogéniques (Wnt)^{331, 332}.

b) Contrôle transcriptionnel de la différenciation adipocytaire

La différenciation terminale consiste en une cascade d'évènements transcriptionnels (Figure 26). La première vague implique une induction transitoire de C/EBP β (CCAAT/Enhancer

Binding Proteins) et δ qui induisent directement l'expression de C/EBP α et PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor), régulateurs centraux de l'adipogénèse.

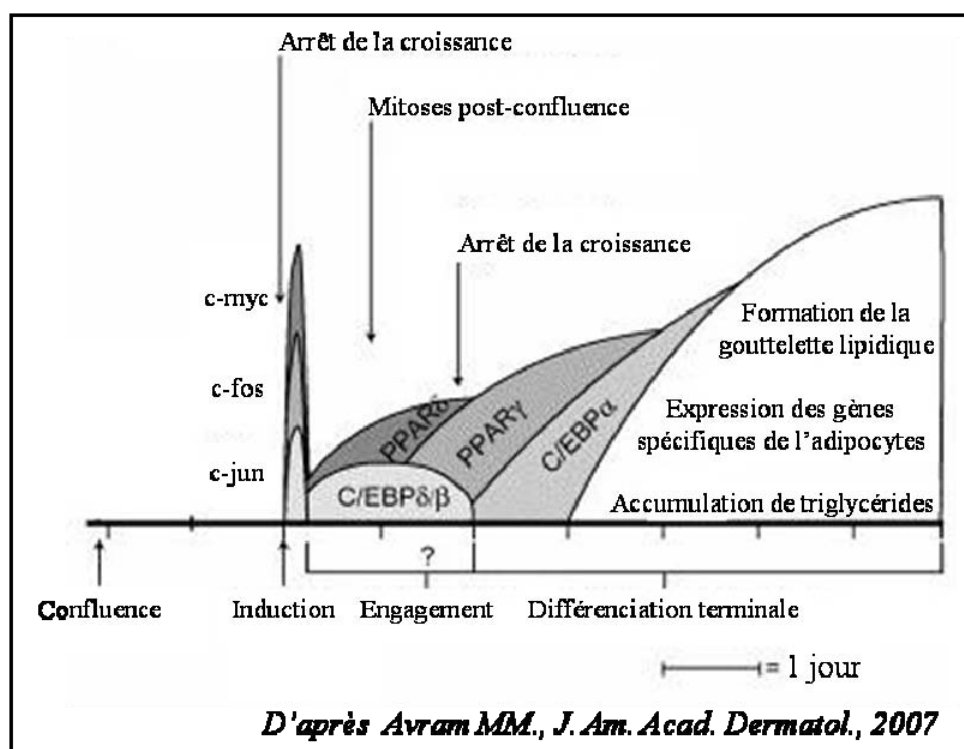


Figure 26 : Progression des facteurs de transcription au cours de l'adipogénèse dans les préadipocytes de la lignée 3T3-L1.

PPAR γ PPAR γ est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires hormonaux qui régulent des fonctions cellulaires et métaboliques importantes. L'épissage alternatif du gène de PPAR γ donne deux isoformes de la protéine, PPAR γ 1 et PPAR γ 2. Alors que PPAR γ 1 est exprimé de façon ubiquitaire, seul PPAR γ 2 est spécifique de l'adipocyte³³³. Son expression est induite très précocement au cours de l'adipogénèse et constitue un régulateur majeur de ce processus. PPAR γ est à la fois nécessaire et suffisant à l'adipogénèse³³⁴. Une surexpression de PPAR γ est suffisante pour induire une différenciation adipocytaire dans des fibroblastes de souris et soutenir le programme de différenciation adipogénique^{250, 253}. Aucun facteur n'a été découvert pour promouvoir l'adipogénèse en absence de PPAR γ . De plus, la plupart des facteurs pro-adipogéniques semblent fonctionner en activant, au moins en partie, l'expression ou l'activité de PPAR γ . Le ligand endogène de PPAR γ reste inconnu, néanmoins plusieurs métabolites lipidiques, incluant les acides gras polyinsaturés et les eicosanoïdes, peuvent se

fixer à ce récepteur³³⁵. Les thiazolidinediones (TZD), médicaments utilisés comme anti-diabétiques, sont aussi des ligands de PPAR γ . Après s'être lié à son ligand, PPAR γ s'hétérodimérise au récepteur de l'acide 9-cis-rétinoïque (RXR) et ils vont reconnaître spécifiquement des éléments de réponse PPRE (« PPAR Responsive Element ») situé dans les régions promotrices des gènes cibles de PPAR γ . PPAR γ induit l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique parmi lesquels la LPL, l'ACC et aP2³³⁴. PPAR γ n'est pas seulement crucial pour l'adipogenèse mais il est aussi nécessaire au maintien du stade différencié de l'adipocyte³³⁶.

C/EBP. La famille des C/EBP comprend plusieurs membres codés, C/EBP α , C/EBP β et C/EBP δ , par des gènes différents et exprimés dans l'adipocyte. L'expression de ces facteurs de transcription, inducteurs de l'adipogenèse, est soumise à une régulation temporelle très fine lors de la différenciation adipocytaire^{337, 338}. En effet, les sous-types C/EBP β et C/EBP δ , induits par les activateurs de la voie de l'AMPc et par les glucocorticoïdes^{337, 339}, sont exprimés précocement par le préadipocyte et de façon transitoire. Ils jouent un rôle crucial dans le processus adipogénique en induisant l'expression du sous-type C/EBP α . De nombreuses études ont démontré un rôle majeur de C/EBP α dans la différenciation adipocytaire. Une surexpression de C/EBP α dans des cellules fibroblastiques murines permet l'induction de la différenciation adipocytaire³⁴⁰. C/EBP α assure l'activation de nombreux gènes adipocytaire ainsi que sa propre transactivation afin de contribuer au maintien de l'état différencié³⁴¹. Induite en aval de PPAR γ 2, la protéine C/EBP α contrôle l'expression des gènes des protéines sécrétées (leptine, adiponectine...) mais aussi de la sensibilité à l'insuline tels que GLUT4 et du récepteur à l'insuline³⁴² et prend le relais de C/EBP β et C/EBP δ pour maintenir l'expression de PPAR γ 2 dans les adipocytes matures³⁴³.

PPAR γ peut induire la différenciation adipocytaire en l'absence de C/EBP α tandis que C/EBP α n'est pas capable d'initier ce programme en l'absence de PPAR γ . La différenciation adipocytaire serait ainsi contrôlée par l'action synergique de facteurs de transcription dominée par PPAR γ .

c) Facteurs pro et anti-adipogéniques

Le processus d'adipogenèse que nous venons d'aborder est hautement contrôlé par de nombreux facteurs de nature très variée: hormones, cytokines, nutriments et molécules de

signalisation cellulaire. Les principaux facteurs connus sont présentés dans la Tableau 4 et classés selon leur effet pro- ou anti-adipogénique.

Tableau 4 : Facteurs extracellulaires et molécules de signalisation régulant la différenciation adipocytaire.

	Facteurs pro-adipogéniques	Facteurs anti-adipogéniques
Hormones	Hormone de croissance, Prolactine, Insuline, T3, Glucocorticoïdes, Vitamine D (selon les modèles), Prostaglandines I2 et J2, Angiotensinogène (via la synthèse de prostaglandines)	Déhydroépiandrostérone, Vitamine D (selon les modèles), Endothéline, Résistine, Prostaglandines F2 α Leptine
Cytokines et facteurs de croissance	IGF1 (insulin-like growth factor 1), LIF (leukaemia inhibitory factor), FGF-10 (fibroblast growth factor-10), BMPs (Bone morphogenetic proteins), MCSF (macrophage colony stimulating factor), Adiponectine	EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), TGF- α et β (transforming growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), TNF- α (tumor necrosis factor α), Interleukine 1, 6 et 8, Interféron γ
Nutriments	Acides gras, glucose, acides aminés	
Molécules de signalisation	AMPc, H ₂ O ₂ (à faibles doses), Ras et Erk1 et 2 (à un stade précoce et transitoire), MAP Kinase p38, Phosphatidy-inositol 3-kinase, Protéine kinase B	Protéine kinase C, MAP kinase Erk1 et 2 (à un stade tardif), Kinase AMP- dépendante (AMPK), c-Jun amino- terminal kinases (JNK)
Autres	Voie NF- κ B	Prof 1, Wnt10b

III.4.2. Rôle potentiel dans l'angio/vasculogénèse

Comme nous l'avons vu précédemment, le TA est un tissu très vascularisé dont le maintien et la croissance dépendent étroitement de son réseau vasculaire (cf. paragraphe III.3.2).

Pendant longtemps, il a été accepté que l'extension du réseau vasculaire mature et fonctionnel chez l'adulte fût uniquement due à la prolifération et à la migration de cellules endothéliales matures à partir d'un vaisseau préexistant, processus appelé **angiogénèse**. A l'âge adulte, elle est particulièrement importante et indispensable au cours de nombreux processus physiologiques tels que le cycle ovarien chez la femme et les processus physiologiques de réparation mais aussi dans les processus pathologiques, en particulier pour la croissance des tumeurs, le développement des métastases. Il existe deux différents mécanismes d'angiogénèse : **l'angiogénèse par bourgeonnement** et **l'angiogénèse par intussusception**.

L'angiogénèse par bourgeonnement. Le mécanisme de l'angiogénèse par bourgeonnement est le mieux décrit (Figure 27). C'est processus finement régulé par une balance entre des facteurs pro- et antiangiogéniques qui impliquent des interactions entre les cellules endothéliales, leur membrane basale (MB) et les cellules périendothéliales, *i.e.* les cellules musculaires lisses ou les péricytes (pour revue ³⁴⁴). Brièvement, l'angiogénèse est initiée par l'activation des cellules endothéliales, le vaisseau existant subit une déstabilisation et une vasodilatation. Une hyperperméabilité vasculaire se développe via l'intervention du VEGF et d'une redistribution des molécules d'adhésion. La dégradation de la MB permet la libération de facteurs angiogéniques séquestrés dans la MEC (VEGF, bFGF, Ang-1), ce qui améliore la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Une fois la structure tubulaire formée, le vaisseau subit une maturation qui implique la synthèse de nouveaux supports matriciels (MEC et MB) ainsi que le recrutement de cellules péri-endothéliales (péricytes) qui vont stabiliser le vaisseau néo-formé.

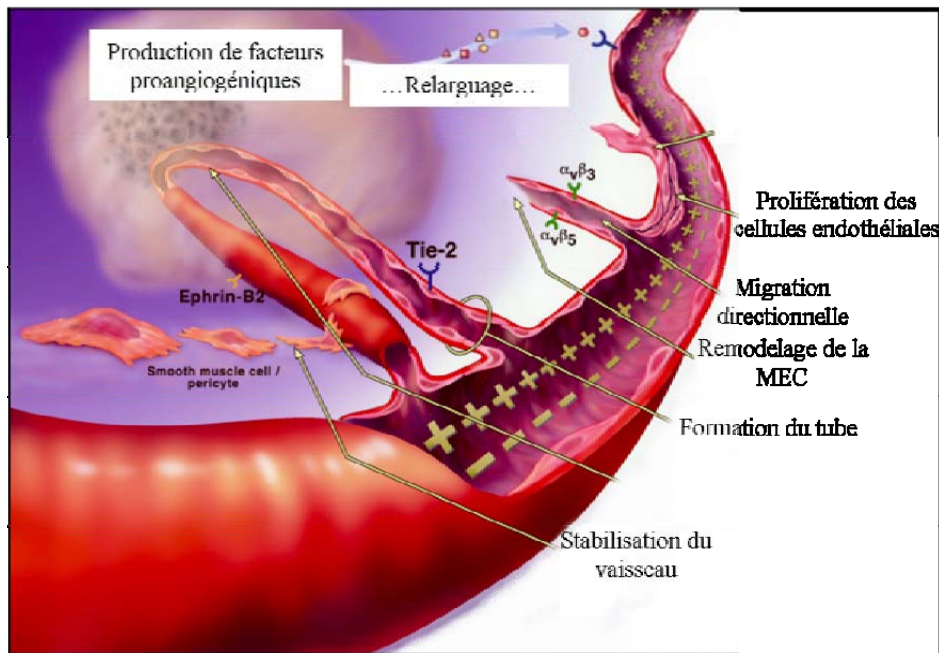


Figure 27 : Angiogenèse par bourgeonnement.

L'angiogenèse par intussusception. Dans ce phénomène d'angiogenèse, les parois endothéliales du vaisseau préexistant se rapprochent et fusionnent, ce qui crée une séparation à l'intérieur de la lumière vasculaire pour diviser le vaisseau en deux et aboutir à la formation de deux vaisseaux de diamètre inférieur (pour revue ³⁴⁵) (Figure 28). Ce processus peut se découper en trois étapes : 1) les cotés opposés de la lumière vasculaire établissent une zone de contact ; 2) les jonctions des cellules endothéliales sont réorganisées pour permettre aux facteurs de croissance et aux cellules de pénétrer dans la lumière vasculaire ; 3) des péricytes et des myofibroblastes sont recrutés à la zone de contact, sécrètent du collagène et fournissent une MEC pour stabiliser les vaisseaux néo-formés. Ce processus d'angiogenèse permet l'augmentation du nombre de capillaires sans qu'il y soit associé une augmentation du nombre de cellules endothéliales.

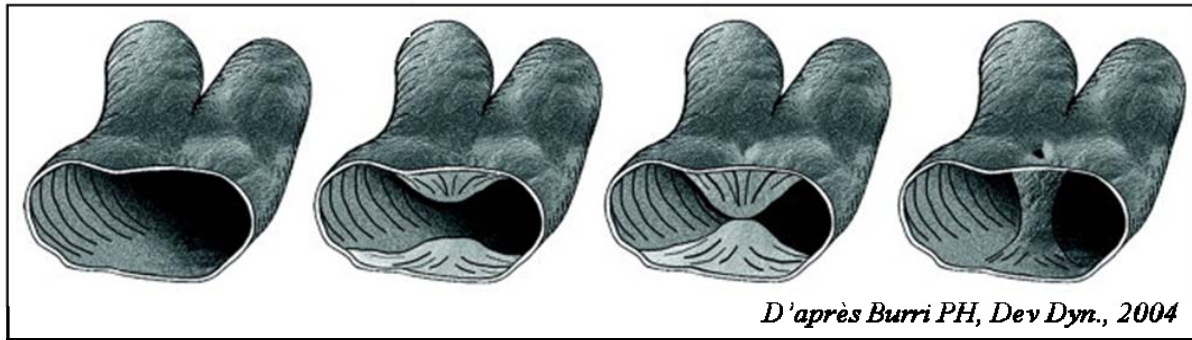


Figure 28 : Angiogenèse par intussusception.

L'extension du réseau vasculaire peut aussi être la conséquence d'une **vasculogénèse** qui se définit comme la différenciation de cellules précurseurs en cellules endothéliales et qui a été considérée comme participant exclusivement au développement vasculaire lors de l'embryogenèse. Cependant, ce dogme a été renversé lorsqu'il a été reporté que des cellules progénitrices hématopoïétiques CD34⁺ de la moelle osseuse pouvaient être mobilisées dans la circulation sanguine, chez l'adulte, et différencier *ex vivo* en cellules endothéliales^{346, 347}. Ces cellules nommées « **cellules endothéliales progénitrices** » (CEP), en conditions de culture adaptées, adoptent les caractéristiques des cellules endothéliales matures : elles s'organisent en réseaux, expriment certains marqueurs spécifiques tel que le vWF, incorporent les LDL acétylés et *in vivo* s'insèrent aux vaisseaux dans les sites d'ischémie. D'un point de vue phénotypique, les CEP expriment les marqueurs CD34, CD133 et VEGF-R2³⁴⁸. Cependant, il semblerait que cette expression ne concerne que les CEP les plus immatures et que les CEP circulantes soient positives pour les marqueurs CD34 et VEGF-R2 mais perdent le marqueur CD133 et commencent à exprimer les marqueurs de surfaces des cellules endothéliales matures³⁴⁹. Ces cellules représentent un faible pourcentage des cellules mononucléaires circulantes sanguines, chez un individu sain il y aurait 0,002 % de CEP dans le sang soit approximativement de 70 à 210 cellules/mL³⁴⁸. Elles contribueraient à l'extension de l'endothélium vasculaire dans différentes situations post-natales comme par exemple dans le cas de la croissance du réseau vasculaire dans les tumeurs³⁵⁰⁻³⁵². Cependant des études récentes menées chez la souris et chez l'homme ont remis en cause l'existence des CEP originaires de la moelle osseuse^{353, 354}. En effet, ces travaux suggèrent que les cellules hématopoïétiques recrutées au niveau de sites angiogéniques en réponse à diverses cytokines, facteurs de croissance ou hormones, ne s'incorporent pas aux vaisseaux néo-formés mais favorisent la croissance des vaisseaux par les facteurs qu'elles sécrètent.

Le réseau vasculaire, chez l'adulte, résulte donc de l'intervention coordonnée des mécanismes de vasculogénèse et d'angiogénèse

Il a clairement été démontré que le développement de la masse grasse qui a lieu avec la mise en place de l'obésité est associé et dépend d'une extension du réseau vasculaire. Cette augmentation de la vasculature peut être la conséquence d'une angiogénèse associée à une vasculogénèse. En effet, on ne peut pas exclure d'une part que le TA, via ses capacités sécrétoires, pourrait induire le recrutement de CEP et d'autre part, que les cellules progénitrices présentes au sein de la masse grasse pourraient intervenir dans l'extension du réseau vasculaire nécessaire à la croissance du TA. Les cellules progénitrices du TA pourraient donner de nouvelles cellules endothéliales grâce à leur capacité de différenciation endothéliale *in vitro* et *in vivo*²⁶⁷ et ainsi elles participeraient à une vasculogénèse, mais également à la stabilisation des vaisseaux compte tenu de leur localisation³²³ et ainsi stimuler la prolifération des cellules endothéliales du TA par leurs sécrétions de nombreux facteurs pro-angiogéniques^{355, 356}.

OBJECTIFS

Comme nous venons de l'évoquer, le TA contient des cellules souches/progénitrices ayant de multiples potentiels de différenciation mais dont le phénotype ainsi que la localisation ne sont pas clairement définis. De plus, lors de la mise en place de l'obésité, le TA subit de nombreux changements (métaboliques, sécrétoires et modifications cellulaires (hypertrophie/hyperplasie adipocytaires et infiltration de cellules immunes)) qui pourraient influencer la « biologie » des cellules souches/progénitrices. **L'objectif de mon travail de thèse a été de mieux caractériser les cellules souches/progénitrices CD34⁺/CD31⁻ du TA humain à l'état natif et de comprendre l'influence de leur microenvironnement et de l'état d'obésité sur leurs capacités de prolifération, de différenciation et de migration. Ces études ont ainsi permis de caractériser l'influence de la « niche adipeuse » sur la « biologie » des cellules souches/progénitrices natives du TA et leurs potentielles implications dans le développement du TA qui a lieu lors de la mise en place de l'obésité.**

Cette partie « résultats » va s'articuler autour de quatre questions.

1) Quels sont la localisation et le phénotype des cellules souches/progénitrices natives ?

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés à la localisation et à la caractérisation phénotypique des cellules souches/progénitrices natives et aux différences d'expression des marqueurs membranaires mentionnés dans la littérature. En effet, l'expression de certains marqueurs membranaires par les cellules souches/progénitrices du TA, notamment le marqueur CD34 et les marqueurs des péricytes, fait débat. Déterminer précisément le phénotype des cellules progénitrices natives du TA permettra de déterminer leur localisation et ainsi de voir *in situ* des cellules souches de type mésenchymateux dans leur microenvironnement.

2) Quel est le rôle du microenvironnement sur l'activité de prolifération des cellules souches/progénitrices CD34⁺/CD31⁻ ?

Dans une deuxième partie, nous nous sommes focalisés sur l'activité de prolifération des cellules souches/progénitrices CD34⁺/CD31⁻. Sachant que la composition cellulaire ainsi que les sécrétions du TA changent avec l'état de l'obésité, l'objectif de ce travail a été d'étudier la prolifération des cellules CD34⁺/CD31⁻ *in situ* ainsi que le contrôle de leur prolifération par les facteurs du microenvironnement dans lequel elles résident.

3) Quel est le rôle du microenvironnement sur les capacités de différenciation des cellules souches/progénitrices CD34⁺/CD31⁻ ?

Dans une troisième partie, sachant que les cellules souches/progénitrices possèdent des capacités adipogéniques et angiogéniques, nous nous sommes axés sur le contrôle de l'engagement des cellules souches/progénitrices dans ces deux différentes voies. Dans un premier temps, l'effet de l'état de l'obésité sur l'engagement dans la voie adipocytaire a été étudié sur les cellules progénitrices fraîchement isolées. Puis, après mise au point d'une condition de culture permettant l'étude simultanée de leurs capacités adipogéniques et angiogéniques, les effets des sécrétions des partenaires cellulaires des cellules progénitrices (adipocytes, cellules endothéliales capillaires ou CECs et macrophages) sur leur activité de différenciation ont été étudiés *in vitro*.

4) Quelle est le rôle du microenvironnement sur la migration/mobilisation des cellules souches/progénitrices CD34⁺/CD31⁻ ?

Dans la dernière partie de ce travail, la migration/mobilisation des cellules progénitrices a été étudiée. Le but de cette étude a été, dans un premier temps, d'évaluer le pouvoir chémoattractant des sécrétions des différentes populations cellulaires présentes dans le TA sur la migration des cellules souches/progénitrices *in vitro*, et dans un second temps, d'étudier la migration *in vivo* chez la souris et plus particulièrement les effets des modifications de l'axe SDF-1/CXCR4 via l'utilisation d'un antagoniste, l'AMD3100.

RESULTATS

I. Caractérisation immunophénotypique et génétique des cellules souches/progénitrices du TA et localisation dans la niche adipeuse

Alors que les cellules souches/stromales mésenchymateuses isolées à partir de la moelle osseuse ont été décrites pour la première fois en 1976⁵¹, les cellules souches/progénitrices du TA ont elles été découvertes plus tardivement^{80, 298}. Du fait de cette récente découverte, le profil d'expression de marqueurs membranaires est relativement controversé et varie selon que l'on analyse des cellules natives ou cultivées mais aussi en fonction du nombre de passages et de l'adhérence au plastique^{314, 315}. De nombreuses études s'intéressent à la caractérisation phénotypique et à l'origine des cellules souches/progénitrices du TA. Cependant, un débat récurrent existe concernant leur identité à l'état natif ainsi que leur localisation tissulaire (périvasculaire et/ou stromale).

Dans cette étude, nous nous proposons de clarifier le phénotype des cellules souches/progénitrices issues du TA humain par une analyse des marqueurs de surface sur les cellules natives mais aussi après mise en culture en se concentrant sur les marqueurs controversés notamment le marqueur CD34 et les marqueurs des péricytes. Parallèlement, grâce à l'immunophénotypage des cellules natives, la localisation tissulaire des cellules souches/progénitrices sera effectuée par des expériences d'immunohistochimie par fluorescence sur tissu entier et leur caractérisation moléculaire pour leur statut souche sera également étudiée. Enfin, un travail a été mené en parallèle chez la souris afin d'appréhender les différences interspécifiques éventuelles.

I.1. Caractérisation des cellules souches/progénitrices du TA chez l'homme.

Publication 1 : Human native adipose stem/progenitor cells are positive for the CD34 antigen and are scattered in the stroma of subcutaneous adipose tissue.

Marie Maumus, Julie-Anne Peyrafitte, Anne Bouloumié, Louis Casteilla, Coralie Sengenès and Philippe Bourin. En cours de préparation.

Human native adipose stem/progenitor cells are positive for the CD34 antigen and are scattered in the stroma of subcutaneous adipose tissue

Marie Maumus*¹, Julie-Anne Peyrafitte*², Anne Bouloumié¹, Louis Casteilla², Coralie Sengenès¹ and Philippe Bourin³

***These authors contributed equally to the study**

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U858, Université Toulouse III Paul Sabatier, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, Equipe n°1 AVENIR, IFR31, Toulouse, France.

² Université Toulouse III Paul Sabatier, UMR 5241 Métabolisme, Plasticité et Mitochondrie, BP 84225, Toulouse, France.

³EFS-PM, Laboratoire de thérapie cellulaire, Toulouse, France.

Corresponding authors:

Coralie SENGENES, e-mail: coralie.sengenes@inserm.fr

Philippe BOURIN, e-mail: philippe.bourin@efs.sante.fr

Introduction

For long time, adipose tissue (AT) has been only considered as the main energy store of the organism. Then twenty years ago, it was discovered that AT was also able to secrete a large variety of proteins, including cytokines, chemokines and hormone-like factors, such as leptin, adiponectin and resistin which are named adipokines {Wang, 2008 #854}. Adipokines participate not only in AT regulation and energy homeostasis but also in many other functions such as inflammation, immunity and reproduction {Lafontan, 2005 #820}. More recently it was reported that AT hosts a population of multipotent progenitors called adipose derived stromal cells or ASCs {Zuk, 2001 #624; Zuk, 2002 #671}. Those progenitors have the ability to give rise to osteoblasts, chondrocytes and adipocytes {Zuk, 2001 #624}. They could also participate and/or support angiogenesis or vascular repair in ischemic limbs {Planat-Benard, 2004 #629; Rehman, 2004 #644; Miranville, 2004 #628} and display immunomodulatory properties both *in vitro* and *in vivo* {Puissant, 2005 #812; Yanez, 2006 #813}.

While a number of studies investigating the characterization of ASCs have been performed, disparate and non-consensual parameters were described. Among them, the recurrent questions concerning their surface immunophenotype, their tissue location, their homology to bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) and the nature of native cells from which ASCs are derived are still under intense debate. Though all reports agree with the classical MSC surface immunophenotype that is CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD45⁻ and CD14⁻ {De Ugarte, 2003 #672; Wagner, 2005 #818; Kern, 2006 #814; Mitchell, 2006 #817; Yoshimura, 2006 #819}, the expression of many others are not always reported or contested. Among them, CD34 antigen expression has focused most of attention. Indeed, some authors proposed the existence of two progenitor cell populations within AT, a cell subset derived from CD34⁺ cells and AT-MSCs which would be derived from CD34⁻ cells {Yanez, 2006 #813}. Another debated question concerns the origin of native ASCs. Indeed, although Crisan et al. recently proposed that MSCs originate from pericyte population lacking CD34 antigen expression, Traktuev suggested a CD34⁺ pericyte origin for AT-progenitor cells {Crisan, 2008 #815; Traktuev, 2008 #816}. The present study was designed to clarify the surface immunophenotype of native human AT-progenitor cells with a particular interest for the CD34 marker and pericyte markers CD140b, NG2 and α SMA. To achieve this goal, CD34⁺ and CD34⁻ cells were sorted from human AT and the surface immunophenotype was analyzed

before and after culture and was compared to the one of human BM-MSCs. Moreover, *in situ* localization of CD34⁺ progenitor cells in intact human AT was carried out and immunophenotype was studied *in situ*. Finally, molecular characterization of AT-progenitor cells and the effects of AT growth on their molecular profile were evaluated.

The present work demonstrates that conversely to human BM-MSCs, native AT multipotent progenitor cells are positive for the CD34 antigen (distinguished from leukocyte and capillary endothelial populations with the CD45⁻ and CD31⁻ phenotypes respectively). The large majority of AT-progenitor cells are localized in AT stroma, some are found nearby AT-capillaries but rarely exhibit a pericytic position. Moreover, while CD34 antigen expression was inversely correlated to AT-progenitor cell expansion in culture, the expression of pericyte makers NG2, CD140b and α SMA were found to be induced by cell culture. Finally, changes in AT-progenitor cell microenvironment occurring during AT extensive development induced AT-progenitor cell molecular profile modifications toward an adipogenic phenotype.

Materials and methods

AT sampling and SVF isolation

Human subcutaneous AT was obtained from Caucasian women undergoing plastic surgery for lean (BMI<25) and class I (30≤BMI<35) patients, and bariatric surgery for class II-III patients (BMI≥35) with stable weight for at least 3 months before fat collection. All patients gave their informed consent. The protocol has been conducted in accordance with the Declaration of Helsinki guidelines and approved by the local ethical committee. AT-derived SVF was isolated from subcutaneous AT by collagenase digestion as previously described {Puissant, 2005 #812; Sengenès, 2007 #711}. AT-SVF cells were subsequently used for flow cytometry analyses or cell culture.

AT-CD34⁺ progenitor cell magnetic sorting and cell culture

Human AT-derived CD34⁺ and CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells were isolated from AT-derived SVF using CD34 nanoparticles from either MACS® Cell Separation Technology (CD34⁺ purity was 81.5 ± 2.5 % and less than 0.5 % for positive and negative fractions respectively) or StemCell Technologies® (CD34⁺ cell fraction purity was 92.9 ± 0.8 %) according to the manufacturer's instructions and as previously described {Miranville, 2004 #628}. AT-derived progenitor cells were plated at 4000 cells/cm² in Minimum Essential Medium (MEM) Alpha supplemented with 2 or 10% foetal calf serum (FCS) for 1 week and harvested with trypsin/EDTA. Cells were counted and flow cytometry analyses were performed. In order to study the effects of passaging on the cell surface immunophenotype, cells were grown to confluence after the initial plating in medium supplemented with 10% FCS. Adherent cells were released with trypsin/EDTA in order to perform cytometry analyses (native cells to passage 3 were used).

Human BM-MNCs isolation and culture

BM of healthy donors was obtained from filters used during the preparation of allogeneic hematopoietic grafts. BM-MNCs were obtained by BM density gradient (d=1.077) centrifugation. BM-MNCs were plated at a density of 100000–150000 cells/cm² in α-MEM/10% FCS. After 2 days, non-adherent cells were harvested and adherent cells were detached by the use of trypsin/EDTA. Cells were subsequently used for flow cytometry analyses and clonogenic assay.

Clonogenic assay

AT-CD34⁺ and CD34⁻ cells were plated in MEM- α supplemented with 10% FCS at low density (16 cells/cm²). After 2 weeks, cells were rinsed with Phosphate Buffer Saline (PBS), fixed in methanol and stained with 6 % Giemsa. Colony-forming unit fibroblasts (CFU-F) derived colonies were enumerated. Colonies containing more than 50 cells were counted and CFU-F frequency was calculated by dividing colony number by the number of seeded cells. Two-day adherent BM-MNCs and non-adherent cells were seeded in MEM- α supplemented with 10% FCS (1000 and 40000 cells/cm², respectively) for 11 days and then colonies were stained with 6 % Giemsa and counted.

Adipogenic differentiation

Confluent native CD34⁺ and CD34⁻ cells were induced to undergo adipogenic differentiation using MEM- α medium supplemented with 10% FCS, 1 μ mol/L dexamethasone, 60 μ mol/L indomethacine (adipogenic medium) and 450 μ mol/L isobutylmethylxanthine (IMBX) for 3 days. After 3 days, medium was replaced by adipogenic medium. After 20 days, cultures were rinsed with PBS, fixed with 10% formaldehyde and lipid droplets were stained with Oil Red O solution.

Osteogenic differentiation

Native AT-derived CD34⁺ and CD34⁻ cells were plated at 4000 cells/cm² in osteogenic induction medium (MEM- α supplemented with 10% FCS, 0.1 μ mol/L dexamethasone, 50 μ mol/L ascorbic acid and 3 mmol/L sodium phosphate monobasic) for 2 weeks. Sodium phosphate monobasic was then replaced by β -glycerophosphate (10 mmol/L) and cells were cultured for 1 week. Cultures were rinsed with PBS, fixed with 10% formaldehyde and matrix mineralization was stained with alizarin red.

Flow cytometry analyses

At least 1.10⁵ cells (native or cultured AT-SVF, AT-progenitor cells or BM-MNCs) in PBS/0.5% BSA/2 mmol/L EDTA were stained with various combinations of saturating amounts of monoclonal antibodies conjugated with Peridinin-chlorophyll-protein Complex (PerCP), fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE): (supplementary methods, table 1) and their respective isotype controls (4°C, 30 min, dark). The labelled cells were analyzed by multiparameter flow cytometry (EPICS XL flow cytometer, Beckman-Coulter or

FACScanto cytometer, BD Biosciences) and FlowJo (Tree Star) or DIVA software (BD Biosciences).

Immunohistochemistry and immunocytochemistry

Immunohistochemistry analyses were performed on intact human subcutaneous AT which was minced into small pieces (2–3 mm) using a scalpel. The tissue pieces were fixed in neutral buffered 4% (w/v) paraformaldehyde (1h, RT) and blocked in PBS/ 3% BSA (30 min, RT). AT was incubated in PBS/0.1% BSA/0.2% triton/0.05% tween (IF buffer) with primary antibodies (supplementary methods, overnight, 4°C). After washing steps in IF buffer, AT was incubated for 1h with secondary antibodies or with an antibody directed against lectin (supplementary methods). Nuclei were stained with Hoescht 33258. Immunocytochemistry analyses were carried out on human native AT-CD34⁺ progenitor cells cytocentrifuged onto glass slides and fixed in cold acetone (-20°C, 20 min) and washed with Tris buffer Saline (TBS). Antigen demasking was realized in citrate buffer (30 min, 97°C). Human AT-CD34⁺ progenitor cells were cultured in LabTek chamber slides for one week and fixed in 4% paraformaldehyde (1h, RT). After washing steps (TBS) permeabilization (TBS/0.1% Triton) and blocking, cells were incubated with anti- α SMA or anti-NG2 primary antibodies (supplementary methods, Table 2) (1h or overnight respectively). Cells were incubated with corresponding secondary antibody (30 min, RT) after washing. Nuclei were stained with DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride).

RNA isolation and real-time PCR

Total RNA was extracted from CD34⁺/CD31⁻ cells using the Rneasy kit (Qiagen, France) and the RNA concentrations determined using a fluorimetric assay (Ribogreen, Invitrogen). RNA (0.5 μ g) was reverse-transcribed (RT) using the “Superscript II” (Invitrogen) (Random Hexamers and dNTPs were from Invitrogen). RT was also carried out without the superscript enzyme on RNA samples. Primers for the LPL, GPDH were provided by Applied Biosystems (Assays on demand, Courtaboeuf, France) and RunX2, osteocalcin, primers were designed by Primer Express® software v2.0 (Applied Biosystems) and Nanog, Oct-4 and hTERT were kindly provided by Dr P Bourin (supplementary methods, Table 3). The amplification reaction was carried out on 15 ng of cDNA samples in 96-well plates (Applied Biosystems) in a GeneAmp 7500 sequence detection system. The PCR mixture contained either 5 μ l Taqman primers (5X prediluted in water) or 300 nmol/L for aP2 and 10 μ L of 2X Taqman PCR master Mix or 10 μ L of 2X SyberGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). All reactions were

performed under the same conditions: 50°C (2 min), 95°C (10 min), followed by 40 cycles of 95°C (15 sec) and 60°C (1 min). The results were analyzed with the GeneAmp 7500 software and all the values were normalized to 18S rRNA levels.

Statistics

The statistical analysis was performed with GraphPad Software (San Diego, USA). Values are given as mean \pm SE mean of (n) separate experiments. The comparisons between different groups were analyzed by Anova test followed by post-hoc Dunnet multiple comparison tests or with a Mann Whitney test for 2 groups. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Phenotypic evolution of human AT-SVF during primary culture and comparison to BM-MNCs.

ASCs are considered as MSCs and as such are described as CD34⁻ cells. Therefore, together with standard MSCs markers (CD73, CD13), the expression of CD34 antigen in freshly harvested human AT-SVF and BM and after 2 days of culture was performed using flow cytometry. As presented in figure 1A, short term culture of AT-SVF was associated with an increase in percentage of cells expressing MSCs marker CD13 and CD73 and a decrease in percentage of cells positive for the leukocyte marker CD45. Moreover, after 2 days of culture, more than 80% of the cells expressed CD34 antigen. Freshly harvested BM-MNCs contained less than 5% of CD34⁺ cells and conversely to human AT-SVF, after 2 days of culture the adherent cell fraction contained no more CD34⁺ cells (figure 1B).

In parallel an extensive phenotypic analysis of human AT-SVF was performed before and after 8 days of culture. The culture of human AT-SVF led to clearly phenotype homogenization (table 1) and no marked phenotype evolution was evidenced between the first and the second passage (data not shown). As shown in table 1, a large variety of MSCs markers (CD9, CD10, CD13, CD49e, CD73, CD90 and CD166) were expressed by more than 95% of cultured AT-SVF whereas haematopoietic markers (CD3, CD6, CD11c, CD14, CD15, CD16, CD18, CD41, CD50, CD115 and CD150) had almost completely disappeared. Finally, stem cells markers ABCG2 was also lost after *in vitro* culture (table 1).

Comparison of CFU-F activity of native CD34⁺ and CD34⁻ cells from human AT with BM-MNCs. Adipogenic and osteogenic activities of native CD34⁺ and CD34⁻ cells from human AT.

CFU-F activities were assessed in freshly harvested AT-SVF and BM-MNCs sorted in CD34⁺ and CD34⁻ populations or adherent and not adherent cell fractions respectively. Similarly to AT-SVF cells, the CD34⁺ sorted population gave rise to a morphologically homogeneous fibroblast-like population at the end of primary culture (data not shown). In contrast, no AT-derived CD34⁻ cells were recovered at the end of culture time. Furthermore and as shown in figure 2A CFU-F was restricted to the CD34⁺ cell population. CFU-F frequency in the BM-MNC adherent and non-adherent cell fractions was assessed. As presented in figure 2B it was more than 30 times increased in the adherent fraction as compared to the non adherent one. Adipogenic and osteogenic differentiation potentials of AT sorted cell subsets were

investigated. After confluence and induction of adipogenic differentiation process, lipid accumulation, revealed by Oil Red O staining and triglyceride content quantification (data not shown), were detected in the CD34⁺ cell fraction (figure 2C-D). Finally, three weeks after induction of osteogenic differentiation process, matrix mineralization was observed in the CD34⁺ cell fraction (figure 2E-F). In the same conditions, neither osteogenesis nor adipogenesis was detected in the AT-derived CD34⁻ cell fraction.

Phenotypic characterization of AT-CD34⁺ progenitor cells: CD34 antigen expression is inversely correlated to cell expansion.

Because of conflicting results regarding CD34 expression of AT progenitor cells, we hypothesized that changes in CD34 expression could be related to cell expansion and/or passaging. Therefore, freshly harvested human AT-CD34⁺ cells were cultured in 2% or 10 % FCS for 7 days and CD34 antigen expression was analyzed by flow cytometry. In parallel the expression of standard MSCs and haematopoietic markers was also studied for the 2 culture conditions. As expected, cell yield was more than 5 times higher in the medium containing 10% FCS as compared to the one containing 2% FCS (not shown). Whatever the considered medium (2 or 10% FCS), there was a continuous enrichment in CD13, CD29, CD73 and CD90 positive cells (figure 3A). In contrast, although CD34 antigen was detected at the surface of about 70% of the cells grown in the medium containing 2% FCS, its expression fell to 20% when medium was supplemented with 10% FCS (figure 3A). To better analyze the effect of FCS content and CD34 antigen expression on AT-progenitor cells, the correlation between AT progenitor cell expansion after 8 days of culture and the expression of CD34 antigen was performed. A statistically significant negative correlation was found between AT progenitor cell fold expansion and CD34 expression (figure 3B). Finally, to determine whether the decrease CD34⁺ cells during *in vitro* culture came from a down-regulation of CD34 protein or mRNA expression, CD34 antigen expression was analyzed by real-time qRT-PCR. In freshly harvested AT-SVF cells, the relative amount of CD34 mRNA normalized to ubiquitin mRNA was 103.2 ± 8.3 (arbitrary units), while CD34 protein, studied by flow cytometry was found on $42.2 \pm 6.9\%$ of the cells. Subsequent *in vitro* expansion led to a 80-fold decrease of CD34 mRNA level (1.3 ± 1.0 arbitrary units) compared to SVF cells which was associated to a 1.8-fold decrease of CD34⁺ cells observed by flow.

Phenotypic characterization of AT-CD34⁺ progenitor cells: *in situ* localization.

To examine the spatial relationship between the blood vessels and AT-progenitor cells, intact human AT was used. Capillary network was visualized using lectin or CD31 antibodies which produced identical staining patterns (data not shown). AT-progenitor cells were localized using CD34 antibodies and distinguished from leukocyte and capillary endothelial populations with the CD45 and lectin or CD31 antibodies respectively while the adipocytes were detected using phase contrast imaging. Human AT capillaries, characterized by aligned cells positive for lectin, CD31 or CD34 markers were distributed among adipocytes (figure 4). Interestingly CD34 staining patterns revealed CD34 positive cells mainly located in AT stroma (figure 4A-B-E). CD34⁺ cells were also found at the vicinity of capillaries (figure 4A-B-D). To discriminate CD34⁺ AT-progenitor cells from AT-capillary endothelial cells, double staining with lectin and anti-CD34 (figure 4B, E) or anti-CD31 and anti-CD34 (figure 4C, D) was performed on intact human AT. As presented in figure 4 B, D and E, the findings that AT-CD34⁺ progenitor cells are scattered throughout AT stroma were confirmed since CD34⁺/CD31⁻ or CD34⁺/Lectin⁻ cells were found in a large amount in AT stroma, sometimes close to capillaries and very seldom in adhesion to AT capillaries (figure 4C).

Phenotypic characterization of AT-CD34⁺ progenitor cells: *in situ* and *in vitro* analysis of pericyte marker expression.

To better characterize native AT-CD34⁺ progenitor cells, the expression of pericyte markers NG2 and CD140b was performed in intact human AT. The double staining of AT with CD31 and NG2 or CD140b revealed that perivascular NG2 (figure 5A) or CD140b (figure 5D) positive cells were found on AT capillaries (CD31 positive network). The further analysis of NG2 or CD140b positive cells using CD34 antigen staining was carried out. Although NG2 or CD140b positive cells were found in perivascular location in intact human AT, the cells were not found to be CD34⁺ (figure 5B,C and 5E, F for NG2 and CD140b respectively). To further study such an observation, the analysis of NG2 or CD140b marker expression by freshly isolated native AT-SVF was performed using flow cytometry approach and CD34, CD31, CD140b and NG2 antibodies. Few cells expressing pericyte markers were found in native AT-SVF since 1.8 ± 0.4 % and 12.7 ± 3.5 % of the total cells were found positive for NG2 or CD140b markers respectively and less than 2% were AT-CD34⁺ progenitor cells (data not shown). Additionally, *in vitro* experiments were carried out to study the effects of *in vitro* culture on the expression of several pericyte markers such as NG2, CD140b and α -SMA by AT-CD34⁺ progenitor cells. Using flow cytometry analysis the expression of NG2 and CD140b were found to be increased by the culture process (3.5 and 5 fold increase

respectively, figure 5G). The increase in NG2 and α -SMA expressions by AT-CD34⁺ progenitor cells during cell culture was confirmed using immunocytochemistry approach (figure 5H, I).

Molecular characterization of AT-CD34⁺ progenitor cells.

To define the stemness state of native AT-CD34⁺ progenitor cells, the expression of stem cell genes was investigated and compared to the one of ESCs. Although expressed to a lesser extent than in ESCs, Oct-4 and Nanog genes were found in native AT-CD34⁺ progenitor cells whereas hTERT expression was not detected (table 2). Finally, the effects of the microenvironment in which AT-CD34⁺ progenitor cells reside on their differentiation potentials were investigated. The expression of several genes involved in adipogenic and osteogenic commitment and/or differentiation process were studied in native AT-CD34⁺ progenitor cells originating from class I to class III obese patients. Of interest, AT development (class II to class III obese patients) was associated with a decrease in AT-CD34⁺ progenitor cell content (1.5 fold decrease, n=59, p<0.05, figure 6A). As shown in figure 6B and C the gene expressions of GPDH and LPL were dramatically increased in class II-III obese patients as compared to class I one. Interestingly, the expression of osteogenic genes such as Runx2 and Osteocalcin were not detected and not changed whatever the degree of obesity (figure 6D and E).

Discussion

In the present work, we demonstrated that CFU-F from human AT are restricted to CD34⁺ cell population in contrast to human BM. We also provided evidence that native AT-derived progenitor cells are CD34 positive the expression of which is inversely correlated to AT progenitor cell expansion. In intact human AT, CD34⁺ progenitor cells were found scattered within AT, that is for a minority close to capillaries and for the large majority in AT-stroma. Moreover, human AT-CD34⁺ progenitor cells were not found to express pericyte markers in their native state. Finally we show for the first time that AT excessive development is associated with a dramatic increase in adipogenic molecular marker (LPL and GPDH) expression by human AT-CD34⁺ progenitor cells together with a large decrease in AT-CD34⁺ progenitor cell population content suggesting an activation of adipogenic differentiation program in order to support adipocyte hyperplasia which occurs in severe forms of obesity.

CD34 belongs to the family of single-pass transmembrane sialomucin proteins which comprises 3 members, CD34, Podocalyxin and Endoglycan {Nielsen, 2008 #821}. Since 25 years, CD34 has been widely used as a marker to identify and isolate haematopoietic stem and progenitor cells {Weissman, 2008 #822}. More recently CD34 antigen has been employed to help identify other tissue-specific stem or progenitor cells such as satellite muscle cells and epidermal precursors {Nielsen, 2008 #821}. It is also widely used as a marker of vascular endothelial cells {Fina, 1990 #824; Baumhueter, 1994 #823; Young, 1995 #825}, endothelial progenitor cells {Asahara, 1997 #829}, fibrocytes {Barth, 2007 #826}, human decidual stromal cells {Garcia-Pacheco, 2001 #827} and keratocytes {Espana, 2004 #828}. The general consensus is that culture-expanded MSCs are negative for CD34 antigen, but its expression on freshly harvested MSCs is a matter of debate. Indeed, almost all reports found that MSCs are contained in the BM-derived CD34⁻ fraction which led the International Society for Cell therapy to a statement position {Dominici, 2006 #772}. Rare works have reported that human CD34⁺ BM-derived cells can be found and give rise to fibroblast-like stromal elements bearing an osteogenic and chondrogenic differentiation potentials {Simmons, 1991 #831; Chen, 1997 #832; Kaiser, 2007 #833}. Interestingly they also showed that MSCs are found in greater amount in the CD34⁻ fraction suggesting putative CD34⁻ cell contamination during, cell sorting procedure. In the present study, adherent human BM-MNCs, containing the great majority of CFU-F, did not express CD34 antigen after 2 days of culture. Minority of CFU-F in the non-adherent cell fraction was also found. Anyway, the design of our study could not allow us to determine whether CFU-F originated from a

CD34^{low} fraction or from loosely adherent CD34⁻ cells. As for MSCs, the expression of CD34 antigen by AT-derived progenitor cells is still debated. Here, we have shown that in human AT-derived SVF, CFU-F were included in the CD34⁺ fraction which was able, conversely to AT-derived CD34⁻ fraction, to form lipid droplets or matrix mineralization under adipogenic or osteogenic culture conditions. Our data are in agreement with our previous results {Miranville, 2004 #628; Sengenès, 2005 #630} and those of all the groups that have studied the cells before culture {Boquest, 2005 #836; Mitchell, 2006 #817; D'Andrea, 2008 #835; Rodeheffer, 2008 #782}. Moreover, CD34 marker expression was shown to be directly correlated to AT-derived cell expansion in the present work. CD34 membrane expression is known to be downregulated as hematopoiesis progresses {Weissman, 2008 #822} but interestingly such a downregulation seemed to be a consistent feature of other stromal cells, as stromal-derived keratocytes, which have been reported as initially isolated as CD34-positive cells, to lose their CD34 expression upon *in vitro* expansion {Espana, 2004 #828}. Therefore, in their native state and conversely to human BM-MSCs, human AT-derived progenitor cells are contained in the CD34⁺ cell fraction, providing a mechanism to enrich or purify them directly from the heterogeneous AT-SVF cells. Whether the downregulation of CD34 expression is an *in vitro* consequence or the result of a more committed phenotype as what occurs with the differentiation of haematopoietic stem cells remains undefined. With the aim to better characterize AT-derived CD34⁺ progenitor cells, we performed immunohistochemistry analysis on intact human AT. The use of intact human AT, where 3-dimensional tissue structure is maintained, revealed that human AT-CD34⁺ progenitor cells are scattered in AT. The findings are not consistent with those of earlier studies showing that MSCs from multiple organs, including AT, could have a perivascular origin exhibiting pericyte features {Traktuev, 2008 #816; Crisan, 2008 #815}. Indeed, the present work showed that human AT-CD34⁺ progenitor cells were mostly located in the stroma of subcutaneous AT, even if some AT-CD34⁺ progenitor cells were found in the neighbourhood of capillary network, they rarely exhibited a pericytic position. Interestingly, similar results were found in mouse subcutaneous AT, since the authors reported that mouse AT-derived progenitor cells were found in the deeper layers of AT and in the neighbourhood of microvessels {Yamamoto, 2007 #799}. Together with a periendothelial location, AT-MSCs have been described to express both pericyte and mesenchymal markers. We have investigated the expression of pericyte markers CD140b and NG2 by human AT-CD34⁺ progenitor cells in human intact AT. Although our staining data clearly show that some AT-CD34⁺ progenitors are close to capillaries, they were invariably negative for CD140b or NG2 markers. Both flow cytometry

and immunocytochemistry analysis confirmed those results since NG2 and CD140b markers were not expressed on native AT-CD34⁺ progenitor cells and were only induced by the culture process. This could explain why opposite results are found in some studies since AT-derived progenitor cells were found positive for NG2 and CD140b after 2 days of postadherence to plastic {Traktuev, 2008 #816}. Moreover, our results are in accordance with a recent study displaying immunohistological details regarding AT endothelial network and showing that CD34 staining did not localize with pericytic markers in human AT {Lin, 2008 #783}. Of interest, NG2 marker had been described in mouse subcutis-derived adipocytes {Kadoya, 2008 #847}. In order to better define the stemness state of AT-CD34⁺ progenitor cells, the expression of Oct4 and Nanog genes were investigated. Indeed, the molecular mechanisms governing embryonic stem (ES) cell pluripotency have provided insights into the role of transcription factors such as Oct4 and Nanog in maintaining ES cells in the undifferentiated state. Remarkably, these pluripotency factors, have also been shown to participate in the reprogramming of differentiated cells back to pluripotent states {Takahashi, 2006 #837; Yu, 2007 #838}. Oct4 and Nanog genes have been detected in a variety of somatic tissue-derived cells, with the most often-cited cell type being BM-MSCs {Jiang, 2002 #839; D'Ippolito, 2004 #840; Kucia, 2006 #841; Lin, 2008 #842} and also in cultured AT-derived MSCs. Although less expressed than in ES cells, Oct4 and Nanog genes were found to be expressed in human AT-CD34⁺ progenitor cells in their native state, suggesting a hallmark of pluripotency. It is anyway important to note that Oct4 retrotransposons, unable to compensate for loss of the original Oct4 gene, are actively transcribed in both normal and transformed cells and could contribute to false positive signals that we cannot rule out {Liedtke, 2007 #844; Lengner, 2008 #843}. Similar to Oct4 and Nanog, the catalytic subunit of human telomerase (hTERT) is more described as a stem cell marker for ESCs than for adult stem/progenitor cells. Telomerase has been reported as expressed in cultured AT-derived MSCs {Kang, 2004 #849; Jun, 2004 #850; Rodriguez, 2005 #661; Madonna, 2008 #852}. Therefore, our findings report for the first time that hTERT was not detected in human native AT-CD34⁺ progenitor cells.

Finally, the effects of AT microenvironment changes on AT-CD34⁺ progenitor cell adipogenic or osteogenic commitment were studied. Excessive AT development was associated with an increase in the expression of adipogenic differentiation genes whereas the those of osteogenic differentiation process were not modified. The excessive development of human AT results from both hypertrophy of preexisting adipocytes and hyperplasia due to the formation of new adipocytes {Hirsch, 1976 #688; Hausman, 2001 #758}. Because adipocytes

are terminally differentiated cells and, as such, are considered incapable of division {Hausman, 2001 #758; Butterwith, 1997 #853}, the apparent increase in adipocyte number is thought to originate from adipogenesis and/or the proliferation/differentiation of adipocyte progenitor cells (preadipocytes). In addition, a recent study following C¹⁴ levels in AT has confirmed that the adipocytes continuously turn over in adult humans {Spalding, 2008 #781}. We have recently demonstrated that indeed excessive AT development in human is associated with an increase in the number of mature adipocytes together with an increase in progenitor cell proliferation {Maumus, 2008 #780}. The results indicate that although proliferation was positively correlated with the degree of obesity, AT-CD34⁺ progenitor cell number is decreased in class II-III obese patients. Furthermore, the levels of LPL and GPDH gene expressions were dramatically increased in native AT-CD34⁺ progenitor cells originating from class II-III obese patients as compared to class I obese. These findings suggest that the pool of AT-CD34⁺ progenitor cells is utilized, so the decrease in progenitor cell number, in order to support adipocyte hyperplasia, observed in class II-III obese patients, since adipogenic differentiation program is activated in AT-CD34⁺ progenitor cells.

To conclude, we are providing original data regarding the immunophenotype of native human AT-CD34⁺ progenitor cells, their location within AT and their stemness state and propose arguments to understand previously reported discrepancies. Furthermore, our data strongly suggest that human AT-CD34⁺ progenitor cells do participate *in vivo* to adipogenesis which occurs during AT excessive development. Regarding the importance of AT microenvironment changes on AT-CD34⁺ progenitor cell commitment, continued studies are needed to help elucidate the fundamental conditions necessary to facilitate the development of viable and safer tissue engineering applications using AT-CD34⁺ progenitor cells.

Table 1: Phenotypic characterization of native and cultured ASC

	Native cells	Cultured cells
Mesenchymal markers		
CD9	51 ± 0.2	97.4 ± 1.5
CD10	63.6 ± 3.4	98.9 ± 0.3
CD13	81.9 ± 3.4	99.7 ± 0.04
CD49e	80.3 ± 3.7	100 ± 0.05
CD55	42.1 ± 6.9	99.7 ± 0.06
CD73	70 ± 4.01	98.4 ± 0.4
CD90	73.7 ± 4.9	99.6 ± 0.2
CD166	0.2 ± 0.05	97.3 ± 0.7
Hematopoietic markers		
CD3	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.1
CD6	5.5 ± 1.6	4 ± 0.6
CD11c	0 ± 0	0.4 ± 0.06
CD14	0.2 ± 0.2	0.6 ± 0.1
CD15	0.6 ± 0.2	1.5 ± 0.6
CD16	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0
CD18	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.2
CD41	0.9 ± 0.3	1.7 ± 0.8
CD50	1.5 ± 0.6	0.4 ± 0.1
CD115	0 ± 0	0.2 ± 0.1
CD150	0 ± 0	0.3 ± 0.1
ABCG2	6.4 ± 1.2	0.9 ± 0.1

Table 2: Embryonic marker expression of native CD34+ cells compared to embryonic stem cells.

	CD34+ cells (Arbitrary units)	Embryonic stem cells (Arbitrary units)
Oct-4	30.5 ± 19.2	89.9
Nanog	2.2 ± 1	5.26
hTERT	Not detected	1.64

Legends

Figure 1: Phenotypic characterization of native AT-SVF and BM-MNCs by flow cytometry analyses and effect of culture on AT-CD34⁺ cell phenotype.

Multiparameter FACS analyses were performed using different cell surface markers: CD45 (FITC), CD13 (FITC), CD73 (PE) and CD34 (PC5) antibodies, on native native SVF cells (**A**, black bars) and on BM-MNCs (**B**, black bars) and after 2 days of culture in MEM- α /10%FCS (grey bars). Results are presented as the percentage of positive cells and are expressed as means \pm SEM for 27 to 30 separate experiments.

Figure 2: CFU-F activity and adipogenic and osteogenic differentiation of CD34⁺ and CD34⁻ cells.

Colony-forming unit fibroblast (CFU-F) assays were investigated with AT-derived CD34⁺ and CD34⁻ cells (**A**) and with BM-MNC (**B**) by low-density culture and Giemsa staining. CFU-F were quantified in AT-derived cells and in BM-MNC by counting. AT-derived CD34⁺ and CD34⁻ cells were cultured under adipogenic conditions during 3 weeks and lipid accumulation was stained (**C**) and quantified (**D**) by Oil Red O. AT-derived CD34⁺ and CD34⁻ cells were cultured under osteogenic conditions during 3 weeks and matrix mineralization was stained (**E**) and quantified (**F**) with alizarin red.

Figure 3: Phenotype of native and cultured isolated CD34⁺ cells.

(**A**) Isolated CD34⁺ cells from the SVF were analysed by flow cytometry using CD34 (PC5), CD45 (FITC), CD13 (FITC), CD29 (FITC), CD73 (PE) and CD90 (FITC) antibodies, before (black bars) and after culture in MEM- α supplemented with 2% (white bars) or 10% FCS (grey bars) during 8 days. Data presented are expressed in percentage as mean \pm SEM of positive staining-cells for 3-16 separate experiments. (**B**) Isolated CD34⁺ cells from the SVF were plated at 4000 cell/cm² in MEM- α /10%FCS during 1 week. After 1 week of culture, the percentage of CD34⁺ cells was evaluated by flow cytometry analysis and the number of harvested cells per cm² was counted. Results are presented as the percentage of CD34⁺ cells after 1 week of culture versus the fold-expansion factor at day 8 (number of harvested ASC divided by the number of seeded SVF cells at day 0).

Figure 4: *In situ* AT-MSC localisation

Human subcutaneous AT was stained with an anti-CD34 (green) and adipocytes were visualized by phase contrast (A). Capillaries were stained with an anti-lectin or anti-CD31 (green) antibodies and progenitor cells were localised with an anti-CD34 (red) antibody. Nuclei were stained with Hoescht 33258 (blue). Representative microscopy analyses from 3 independent experiments are shown (magnification x400).

Figure 5: Pericyte marker expression in AT

Human subcutaneous AT were stained with an anti-NG2 (green) and an anti-CD31 (red) (A) or an anti-CD34 (red) antibodies (B-C), with anti-CD31 (green) and an anti-CD140b (red) antibodies (D), anti-CD34 (red) and an anti-CD140b (green) antibodies (E-F). Representative microscopy analyses from 3 independent experiments are shown (magnification x400).

(G) Flow cytometry analyses were performed using pericyte markers CD140b and NG2 on native AT-derived SVF cells (black bars) and on cultured one (grey bars). Data are presented in percentage as mean \pm SEM of positive cells for 3 separate experiments. CD34⁺ cells were centrifuged on cytospin slides before culture (H) or cultured (G) on Labtek chamber slides for 1 week. Slides were double labelled with anti-NG2 (green) and anti- α SMA (red) antibodies. Nuclei were stained with Dapi (blue).

Figure 6: Influence of obesity on CD34⁺ cell number, adipogenic and osteogenic marker gene expression in stem/progenitor cells.

Two colour flow cytometry analyses were performed on freshly harvested SVF using fluorescent-labeled antibodies directed against CD34 PerCP and CD31 FITC. CD34⁺/CD31⁻ cell number (normalized per gram of adipose tissue) was determined in obese class I (30<BMI<35, n=38) and in obese class II-III (BMI>35 kg/m², n=59) patients, *P<0.05 (A). The mRNA expressions of the adipocyte markers GPDH (B) and LPL (C) and osteogenic markers RunX2 (D) and Osteocalcin (E) were determined in freshly harvested CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells by real time RT-PCR analysis. The results obtained were normalized to the levels of 18S rRNA and expressed in arbitrary unit (A.U.). The presented data are mean \pm SEM for 4-8 independent experiments, * P<0.05 class I versus class II-III.

Acknowledgments

The authors are grateful to Pauline Decaunes (INSERM U858), David Estève (INSERM U858) and Mireille André (CNRS UMR 5241) for their invaluable technical assistance.

Supplementary Methods

Table 1: monoclonal antibodies used for flow cytometry analysis

Monoclonal antibodies	Fluorochromes	Clone	Isotype	
Anti-human CD3	FITC	UCHT1	Mouse IgG1	Immunotech
Anti-human CD6	PE	UMCD6	Mouse IgG1	Ancell
Anti-human CD9	FITC	209306	Mouse IgG2b	R&D Systems
Anti-human CD10	PE	HI10a	Mouse IgG1	BD Pharmingen
Anti-human CD11c	PE	BU15	Mouse IgG1	Immunotech
Anti-human CD13	FITC	WM15	Mouse IgG1	eBioscience
Anti-human CD14	FITC	RMO52	Mouse IgG2a	Immunotech
Anti-human CD15	FITC	HI98	Mouse IgM	eBioscience
Anti-human CD16	PE	CB16	Mouse IgG1	eBioscience
Anti-human CD18	FITC	CLB-LFA-1/1	Mouse IgG1	eBioscience
Anti-human CD29	FITC	MEM-101A	Mouse IgG1	eBioscience
Anti-human CD34	PC5	581	Mouse IgG1	BD Pharmingen
Anti-human CD41	PE	HIP8	Mouse IgG1	eBioscience
Anti-human CD44	FITC	G44-26	Mouse IgG2b	BD Pharmingen
Anti-human CD45	FITC	J33	Mouse IgG1	Immunotech
Anti-human CD49e	PE	IIA1	Mouse IgG1	BD Pharmingen
Anti-human CD50	FITC	TP1/25.1	Mouse IgG2a	eBioscience
Anti-human CD73	PE	AD2	Mouse IgG1	BD Pharmingen
Anti-human CD90	FITC	5E10	Mouse IgG1	BD Pharmingen
Anti-human CD115	PE	12-3A3-1B10	Rat IgG1	eBioscience
Anti-human CD150	PE	A12	Mouse IgG1	eBioscience
Anti-human CD166	PE	3A6	Mouse IgG1	BD Pharmingen
Anti-human ABCG2	PE	5D3	Mouse IgG2b	R&D Systems

Abbreviations: FITC, fluorescein isothiocyanate ; IgG, immunoglobulin ; PE, phycoerythrin ; PC5, PE-cyanin 5.

Table 2: antibodies used for immunohistochemistry

Antibodies	Concentration used	
<i>Primary antibodies</i>		
Mouse monoclonal CD31	1/100	DakoCytomation
Mouse monoclonal CD34 class III	1/50	AbD Serotec
Rabbit monoclonal CD34	1/50	Epitomics
Rabbit polyclonal NG2	1/50	Millipore
Rabbit monoclonal CD140b	1/20	Abcam
Lectin AlexaFluor 488 conjugate	1/100	Invitrogen
Mouse monoclonal α SMA	1/100	DakoCytomation
<i>Secondary antibodies</i>		
AlexaFluor 488 goat anti-mouse	1/200	Invitrogen
AlexaFluor 546 goat anti-mouse	1/200	Invitrogen
AlexaFluor 488 goat anti-rabbit	1/200	Invitrogen
AlexaFluor 546 goat anti-rabbit	1/200	Invitrogen

Table 3: Assay on demand used for gene expression assay

Primers	reference
LPL	Hs00173425_m1
GPDH	Hs00193386_m1
Osterix	Hs00541729_m1

Table 4: Primers used for gene expression assay

Primers	Forward	Reverse	Concentration used
RunX2	ATTCCTGTAGATCCGAGCACC	GCTCACGTCGCTCATTTTGC	300 nmol/L final
osteoprotegerin	AGCACCTGTAGAAAACACAC	ACACTAAGCCAGTTAGGCGTAA	300 nmol/L final
osteocalcin	CACTCCTCGCCCTATTGGC	CCCTCCTGCTTGGACACAAAG	300 nmol/L final

Figure 1

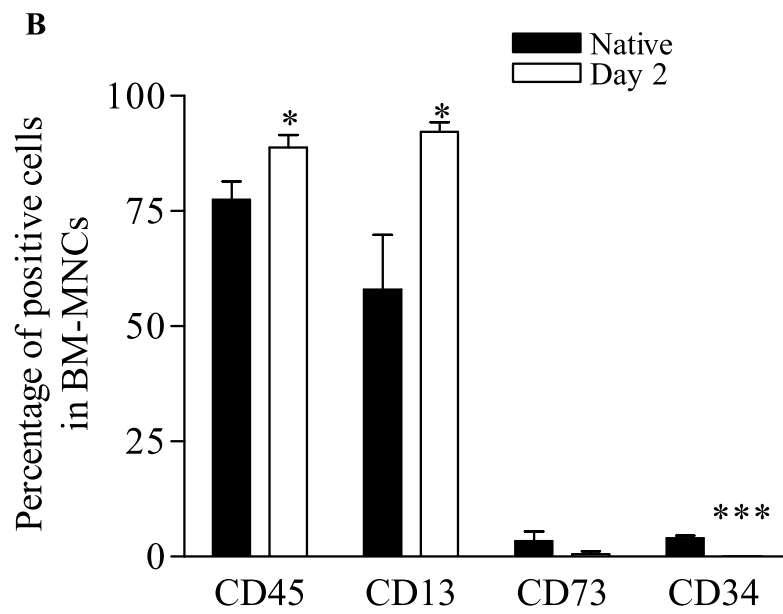
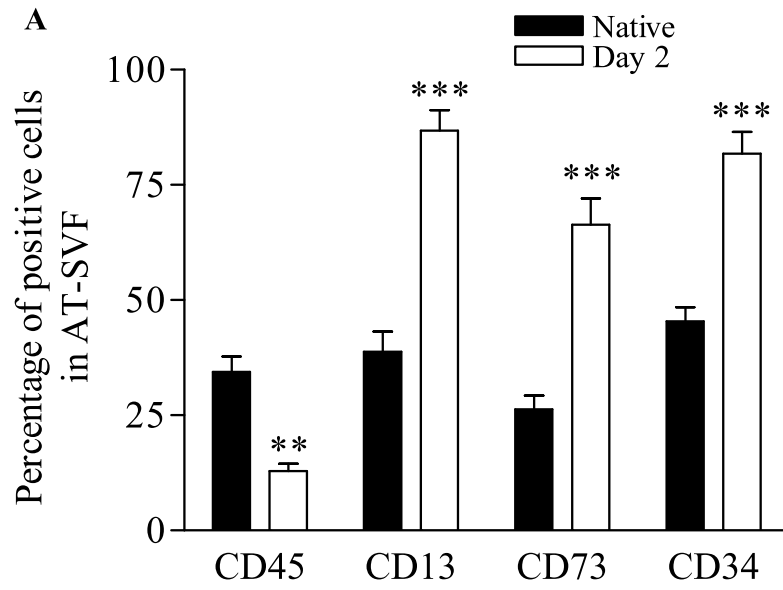


Figure 2

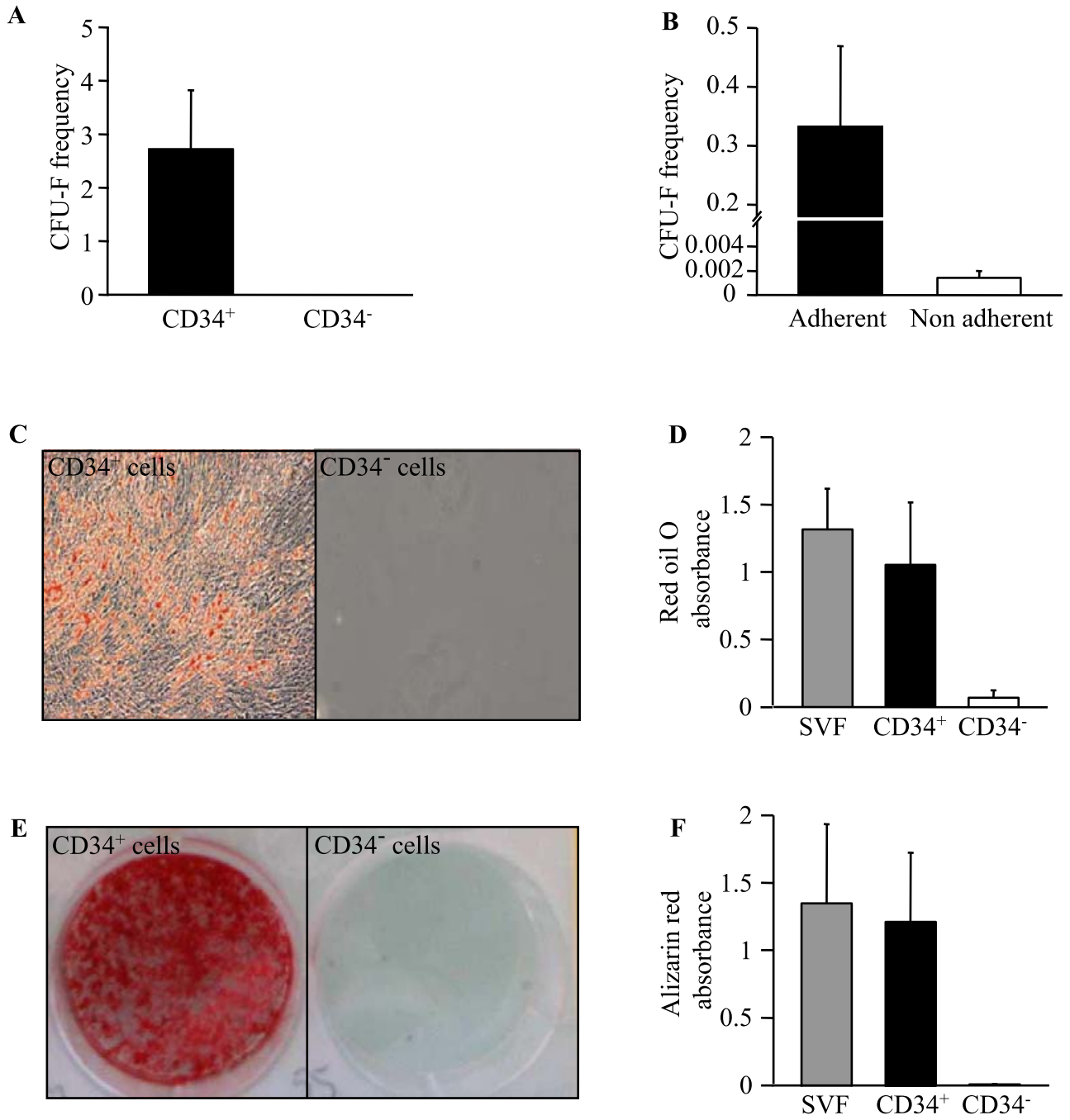


Figure 3

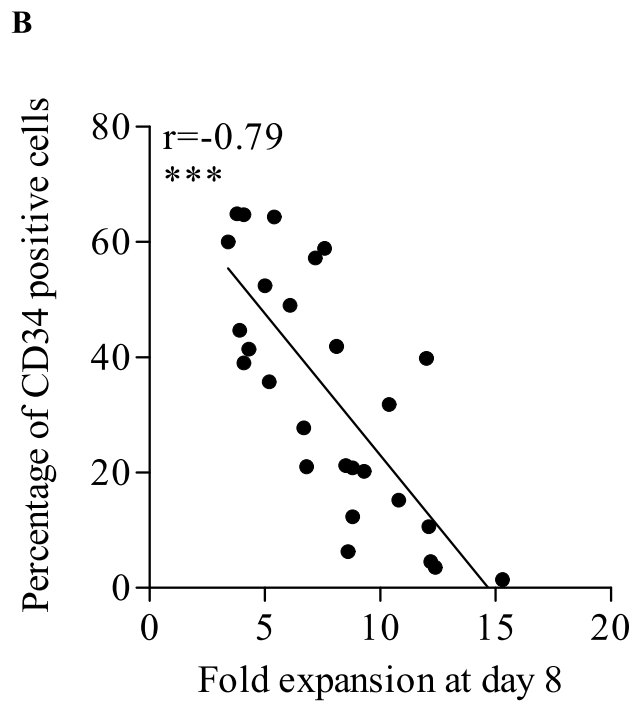
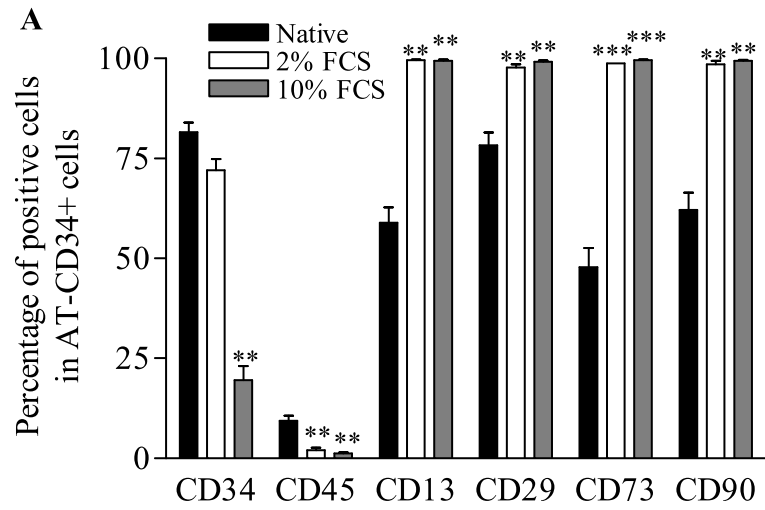


Figure 4

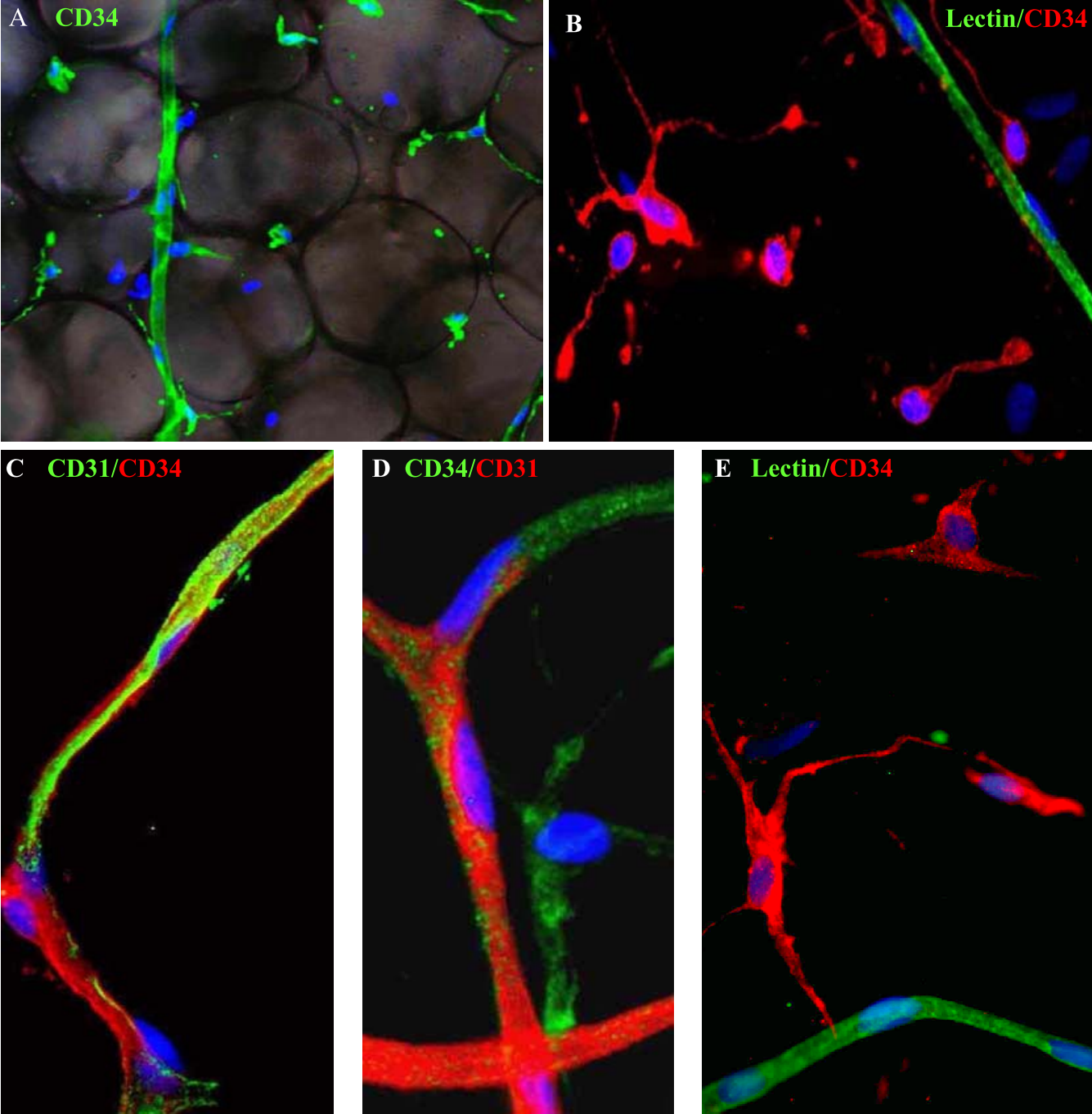


Figure 5

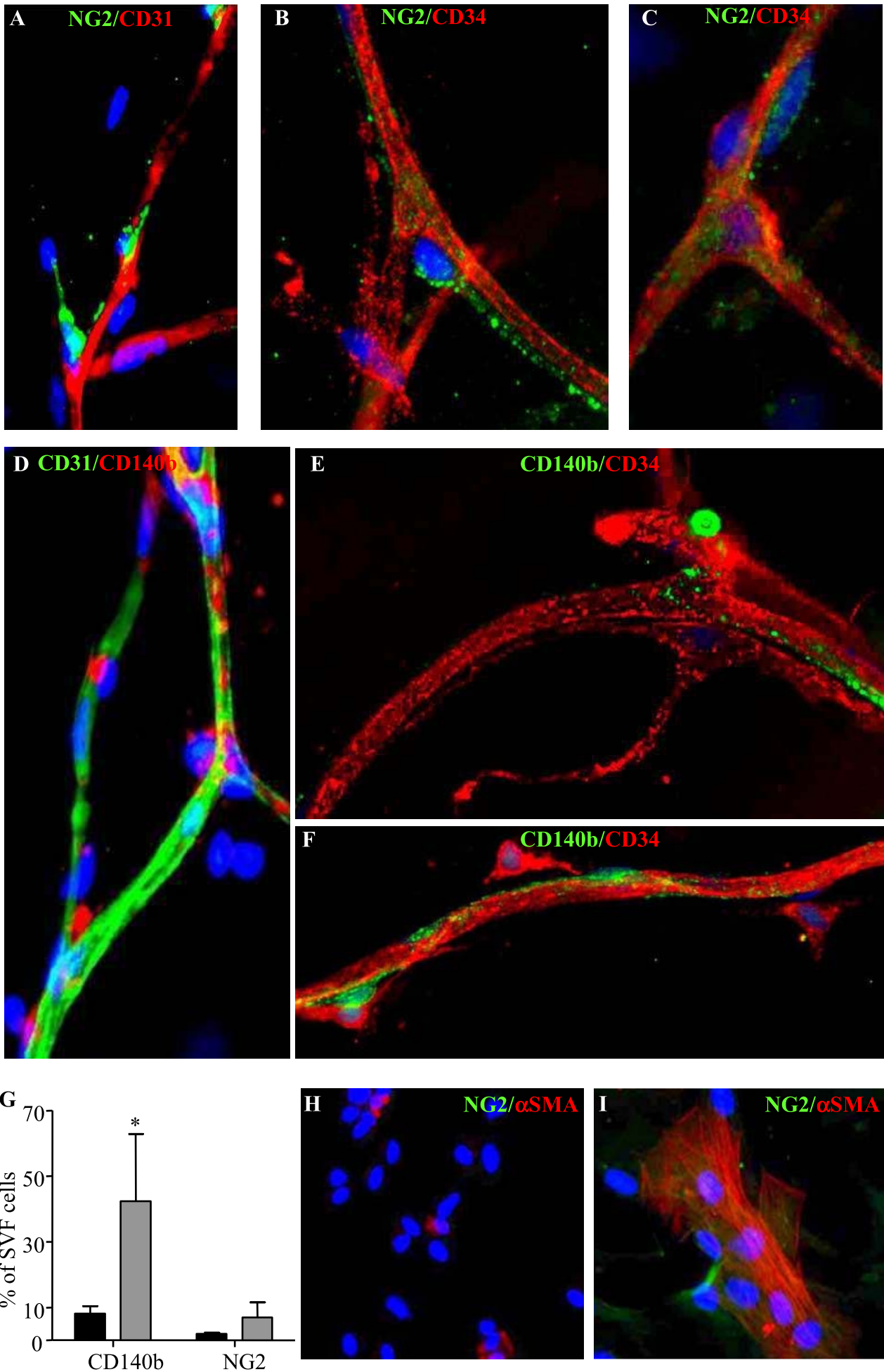
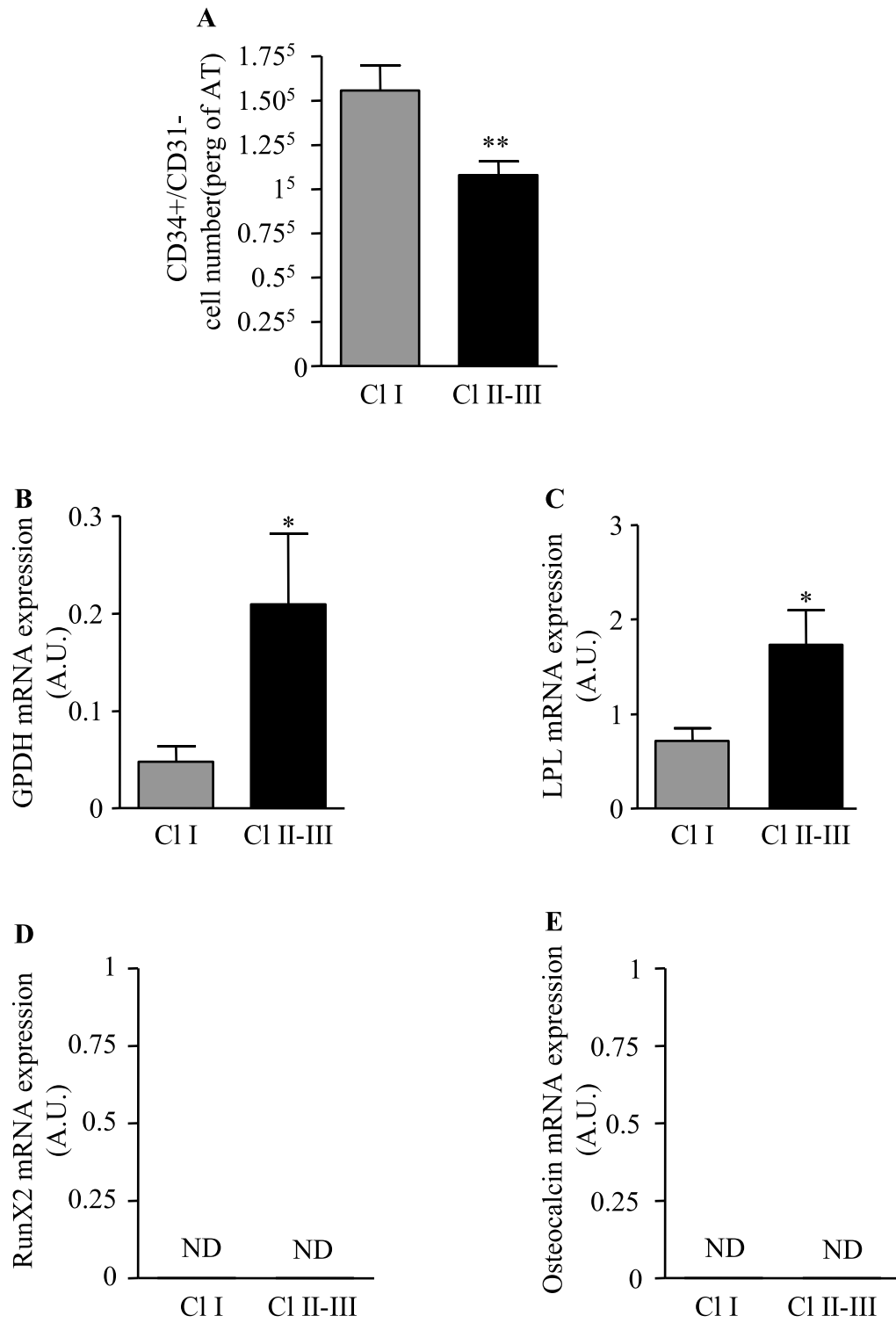


Figure 6



Discussion :

Cette étude a permis de clarifier le débat qui existe dans la littérature à propos de l'expression du marqueur membranaire CD34 par les cellules progénitrices du TA. Nous avons montré que **les cellules progénitrices natives du TA capables de former les CFU-F et ayant les potentiels adipogéniques et ostéogéniques *in vitro* sont contenues dans la population CD34⁺ de la FSV.** L'expression du marqueur CD34 par les cellules progénitrices disparaît proportionnellement à leur capacité proliférative *in vitro*, ce qui explique le fait que les études étudiant le phénotype des cellules progénitrices du TA en les isolant par leur propriété d'adhérence au plastique après des étapes d'amplification trouvent que les cellules sont négatives pour le marqueur CD34^{80, 322, 357}. De plus, l'amplification des cellules progénitrices *in vitro* fait apparaître les marqueurs des cellules mésenchymateuses CD13, CD29, CD73 et CD90. Les cellules progénitrices CD34⁺ du TA, cultivées dans les mêmes conditions d'obtention des CSM de la moelle osseuse, acquièrent un phénotype mésenchymateux et possèdent les mêmes capacités.

La mise en évidence de l'expression spécifique du marqueur CD34 par les cellules souches/progénitrices natives du TA a permis d'utiliser ce marqueur comme outil pour isoler et étudier ces cellules sans les mettre en culture mais aussi pour pouvoir les localiser dans leur microenvironnement. ***In situ*, des expériences d'immunohistochimie sur TA entier ont permis de définir que la localisation majoritaire des cellules progénitrices est une localisation stromale, entre les adipocytes, et qu'une faible proportion se localise le long des vaisseaux sanguins, comme déjà montré dans la littérature^{323, 358}.** De plus, les cellules CD34⁺ perivasculaire du TA n'expriment pas les marqueurs classiques des péricytes CD140b et NG2. Les cellules progénitrices CD34⁺ et les péricytes contenus dans le TA, *in vivo*, seraient donc deux types cellulaires différents mais présenteraient des potentiels de différenciation identiques *in vitro*⁸⁸.

Enfin, nous avons vu que le degré d'obésité pouvait moduler le nombre de cellules progénitrices présentes dans le TA ainsi que leur expression de certains marqueurs adipocytaires (GPDH et LPL) suggérant un engagement de certaines cellules progénitrices dans la voie adipocytaire pour créer de nouveaux adipocytes. Ces résultats mettent en évidence le rôle potentiel des cellules progénitrices, qui n'a jamais été montré *in vivo*, dans le développement du TA humain qui a lieu avec la mise en place de l'obésité. Par ailleurs, il semble important de prendre ces données en compte lors de l'utilisation en thérapie cellulaire des cellules progénitrices du TA isolées chez les patients excessivement obèses car ces

cellules déjà engagées dans la voie adipocytaire pourraient préférentiellement se différencier en adipocyte et créer des dépôts de TA à des endroits non voulus.

I.2. Caractérisation des cellules souches/progénitrices chez la souris.

La FSV du TA de souris, comme celle de l'homme, contient une population cellulaire issue du lignage hématopoïétique qui exprime le marqueur CD45 et une non-hématopoïétique négative pour le marqueur CD45 (Figure 29 A). Cependant, alors que chez l'homme la proportion de cellules immunes est d'environ 30% des cellules de la FSV, chez la souris cette population atteint 50%. Toutes les cellules positives pour le marqueur Sca-1, marqueur équivalent du CD34 chez l'homme, sont aussi positives pour le marqueur CD34. Toutefois, au sein des cellules Sca-1⁺/CD34⁺ existent 2 populations cellulaires : une exprimant le marqueur CD45 et l'autre négative pour ce marqueur (Figure 29 A).

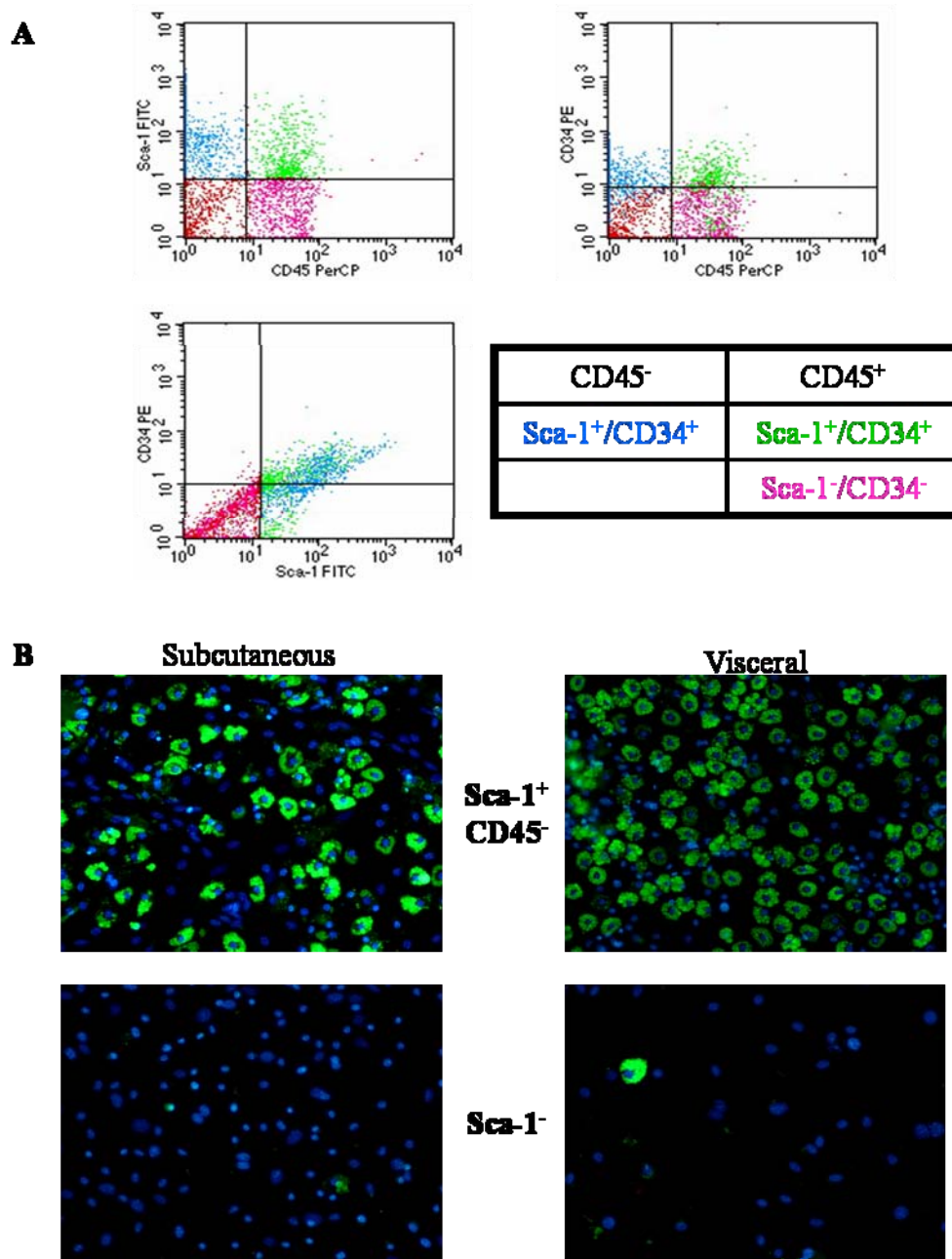


Figure 29 : Caractérisation des populations cellulaires composant la FSV du TA de souris et identification des cellules progénitrices.

Analyses de cytométrie en flux faites sur les cellules de la FSV du TA en utilisant les anticorps Sca-1-FITC, CD45-PerCP et CD34-PE (A). Les cellules de la FSV de TA sous-cutané et viscéral ont été séparées grâce à des billes magnétiques couplées à des anticorps dirigés contre le marqueur Sca-1. Après séparation, les cellules Sca-1⁺ et Sca-1⁻ ont été mises en culture et seules les cellules non-hématopoïétiques CD45⁻ ont adhéré à la boîte de culture. Après 10 jours dans un milieu permettant la différenciation adipocytaire (ECBM supplémenté de 2% de sérum de veau fœtal, d'insuline 66 nmol/L, de transferrine 10 µg/mL, de T3 1 nmol/L et de cortisol 100 nmol/L), les cellules sont fixées, les TG sont marqués au Bodipy (vert) et les noyaux au Hoechst (bleu) (grossissement x200) (B).

Afin de déterminer la population cellulaire renfermant les cellules possédant les capacités adipogéniques, les cellules de la FSV du TA sous-cutané et du TA viscéral de souris ont été isolées puis triées à l'aide de billes magnétiques couplées à un anticorps dirigé contre le marqueur de surface Sca-1. Après sélection, les cellules Sca-1⁺ et Sca-1⁻ ont été mises en culture. Seules les cellules non-hématopoïétiques CD45⁻ ont adhéré à la boîte de culture. Après 10 jours dans un milieu permettant la différenciation adipocytaire (ECBM supplémenté de 2 % de sérum de veau fœtal, d'insuline 66 nmol/L, de transferrine 10 µg/mL, de T3 1 nmol/L et de cortisol 100 nmol/L), seules les cellules positives pour le marqueur Sca-1 sont marquées au Bodipy (marqueur des lipides neutres en vert) (Figure 29 B) aussi bien dans le TA sous-cutané que viscéral. **Les cellules progénitrices du TA de souris sont donc contenues dans la fraction cellulaire Sca-1⁺/CD34⁺/CD45⁻.**

Comme pour l'homme, des expériences d'immunohistochimie sur TA entier de souris nous ont permis de localiser les cellules progénitrices au sein du TA de souris. Comme présenté sur la Figure 30 A, nous pouvons voir que le marquage Sca-1 (vert) marque à la fois des cellules isolées et des capillaires. La Figure 30 B montre que certaines cellules Sca-1⁺ isolées sont de petite taille et positives pour le marqueur CD45 (rouge). Ces cellules Sca-1⁺/CD45⁺ correspondent donc aux leucocytes. Enfin, nous pouvons voir dans le stroma du TA, à proximité des capillaires positifs pour la lectine (vert), des cellules positives pour le marqueur Sca-1 (rouge) et n'exprimant pas la lectine, de plus grosse taille que les cellules Sca-1⁺/CD45⁺ et de forme fibroblastique qui correspondent aux cellules progénitrices (Figure 30 C).

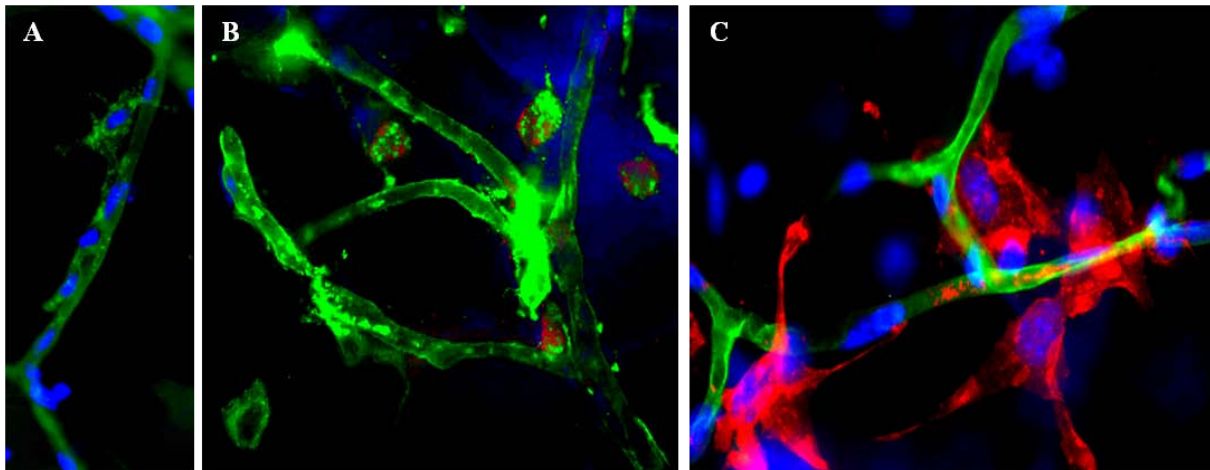


Figure 30 : Localisation des cellules progénitrices du TA de souris.

Immunohistochimie sur TA sous-cutané de souris marqué avec (A) des anticorps anti-Sca-1 (vert), (B) des anticorps anti-Sca-1 (vert) et anti-CD45 (rouge) et (C) avec des anticorps anti-Sca-1 (rouge) et anti-lectine (vert). Les noyaux des cellules sont marqués au Dapi (bleu).

Discussion :

Ces résultats ont permis de définir que la population cellulaire $Sca-1^+/CD34^+/CD45^-$ de la FSV du TA de souris contenait les cellules précurseurs capables de se différencier en adipocyte *in vitro*. Ces données sont en accord avec des précédentes études réalisées chez la souris qui avaient pour but l'identification des progéniteurs adipocytaires *in vivo*^{318, 319, 321}. Dans ces travaux, les auteurs ont montré que les cellules positives pour le marqueur membranaire Sca-1 possédaient le potentiel adipogénique. Alors qu'il est difficile de déterminer, chez l'homme, si les CSM de la moelle osseuse sont identiques aux cellules progénitrices du TA notamment à cause des différences d'expression du marqueur CD34, les expériences d'identification des cellules progénitrices du TA chez la souris pourraient amener des éléments de réponse. En effet, les souris invalidées pour le gène Sca-1 ont un défaut d'ostéogénèse et d'adipogénèse³⁵⁹ et les CSM de souris expriment le marqueur Sca-1⁵⁷. Cependant, nous ne savons pas si cette population cellulaire $Sca-1^+/CD34^+/CD45^-$ est capable de se différencier *in vivo*. En effet, il a été montré que seule la faible sous-population exprimant le marqueur CD24 présente dans la fraction $Sca-1^+/CD34^+/CD45^-$ (0,08 % des cellules de la FSV) était capable de se différencier *in vivo* en adipocytes fonctionnels³¹⁸. Néanmoins, si seulement 0,08 % des cellules de la FSV sont capables de se différencier en

adipocytes *in vivo*, quel est le rôle physiologique de toutes les cellules différenciant en adipocytes *in vitro*, au sein du TA ? Sont-elles simplement des cellules de soutien *in vivo* ?

Comme dans le TA humain, les cellules progénitrices Sca-1⁺/CD34⁺/CD45⁻ ont à la fois une localisation périvasculaire et stromale. Ces données diffèrent avec les résultats retrouvés dans la littérature qui ont identifié les précurseurs adipocytaires avaient seulement une localisation périvasculaire ³²¹. Si les précurseurs adipocytaires ont réellement une seule localisation tissulaire le long des capillaires, une question subsiste ; quelle est cette population de cellules qui exprime les mêmes marqueurs mais qui se trouve entre les adipocytes ?

Mise à part la différence d'expression du marqueur Sca-1 entre l'homme et la souris, nous avons montré que **les cellules progénitrices humaines et murines étaient contenues dans la fraction cellulaire CD34⁺/CD45⁻ de la FSV et étaient localisées au sein du TA majoritairement entre les adipocytes.**

Comme nous le verrons par la suite, ces expériences nous ont permis de valider les données obtenues chez l'homme dans le modèle murin et ce pour une utilisation ultérieure concernant la mobilisation des cellules souches/progénitrices du TA.

II. Effet du microenvironnement sur la prolifération des cellules souches/progénitrices CD34⁺/CD31⁻ du TA humain.

Le microenvironnement dans lequel résident les cellules souches adultes joue un rôle essentiel dans le contrôle de leur prolifération et leur auto-renouvellement. Ce contrôle étroit de leur prolifération est indispensable non seulement au maintien du stock de cellules souches pouvant se différencier, dès que nécessaire, en cellules matures, mais aussi pour empêcher un échappement du système qui pourrait conduire à un processus de cancérisation. Les cellules souches/progénitrices CD34⁺/CD31⁻ du TA sont capables de proliférer *in vitro* avec un temps de doublement de population de 33 heures²⁶⁷. Cependant aucune évidence n'existe quant à leur capacité de prolifération *in vivo* et les facteurs potentiellement impliqués dans le contrôle de leur auto-renouvellement restent à définir.

Le but de cette étude a été d'évaluer le statut prolifératif des cellules souches/progénitrices CD34⁺/CD31⁻ du TA sous-cutané humain et de déterminer les facteurs pouvant moduler l'auto-renouvellement du stock local de cellules CD34⁺/CD31⁻. Des études *in vitro* ont été entreprises sur les cellules souches/progénitrices CD34⁺/CD31⁻ fraîchement isolées pour analyser les effets du microenvironnement dans lequel elles résident et en particulier les effets des sécrétions des adipocytes, des CECs et des macrophages mais aussi les effets d'une atmosphère hypoxique.

Publication 2 : Evidence of in situ proliferation of adult adipose tissue-derived progenitor cells: influence of fat mass microenvironment and growth.

Maumus M, Sengenès C, Decaunes P, Zakaroff-Girard A, Bourlier V, Lafontan M, Galitzky J, Bouloumié A. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Oct;93(10):4098-106.

Evidence of *in Situ* Proliferation of Adult Adipose Tissue-Derived Progenitor Cells: Influence of Fat Mass Microenvironment and Growth

Marie Maumus, Coralie Sengenès, Pauline Decaunes, Alexia Zakaroff-Girard, Virginie Bourlier, Max Lafontan, Jean Galitzky, and Anne Bouloumié

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unit 858, Université Toulouse III Paul Sabatier, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, Institut Fédératif de Recherche 31, 31432 Toulouse, France

Context: Adipocyte formation in human adult adipose tissue (hAT) originates from resident progenitor cell differentiation in the stroma vascular fraction of the AT. The processes involved in the self-renewal of this cell population remain to be defined.

Objective: The objective was to study *in situ* and *in vitro* hAT progenitor cell (defined as CD34⁺/CD31⁻ cells) proliferation.

Design and Participants: *In situ* progenitor cell proliferation was assessed by immunohistochemistry and flow cytometry analyses on hAT from lean to obese subjects using the proliferation marker Ki-67. The effects of adipokines, hypoxia, and conditioned media (CM) from adipocytes, capillary endothelial cells, and macrophages isolated by an immunoselection approach were studied on hAT progenitor cell growth. Cell death in hAT was assessed by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-fluorescein end labeling method.

Results: Ki-67-positive staining was observed in AT progenitor cells. Fat mass enlargement in obese patients was associated with an increased Ki-67⁺ progenitor cell population together with a new fraction of small adipocytes and increased cell death. HIF-1 α mRNA expression in freshly harvested progenitor cells was positively correlated with body mass index. Adipocyte- and capillary endothelial cell-CM, hypoxia, leptin, IL-6, lysophosphatidic acid, and vascular endothelial growth factor, all increased hAT progenitor cell proliferation *in vitro*. Macrophage-CM had an antiproliferative effect that was suppressed by an antioxidant.

Conclusions: The fraction of proliferative progenitor cells in adult hAT is modulated by the degree of adiposity. Changes in the progenitor cell microenvironment involving adipokines, hypoxia, and oxidative stress might play a key role in the control of the self-renewal of the local pool of AT progenitor cells. (*J Clin Endocrinol Metab* 93: 4098–4106, 2008)

The excessive development of human adipose tissue (AT) results from both hypertrophy of preexisting adipocytes and hyperplasia due to the formation of new adipocytes (1, 2). Hypertrophy which consists of excessive triglyceride accumulation in mature adipocytes, is due to both positive energy balance and reduced lipolysis. It is the initial event occurring during the establishment of obesity (3). In severe forms of obesity, an apparent increase in number of adipocytes follows

the mature adipocyte hypertrophy (4, 5). Interestingly, Spalding *et al.* (6) recently showed that the number of mature fat cells is constant in adulthood in lean and obese individuals. Furthermore, the authors suggest that mature adipocytes exhibit a high turnover rate, indicating that fat cell number is tightly regulated during adulthood. Because adipocytes are terminally differentiated cells and, as such, are considered incapable of division (2, 7), the apparent increase in adipocyte

0021-972X/08/\$15.00/0

Printed in U.S.A.

Copyright © 2008 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2008-0044 Received January 7, 2008. Accepted July 28, 2008.

First Published Online August 5, 2008

Abbreviations: AT, Adipose tissue; BMI, body mass index; BrdU, bromo-2'-deoxyuridine; CEC, capillary endothelial cell; CM, conditioned media; ECBM, endothelial cell basal medium; FCS, fetal calf serum; HIF-1 α , hypoxia-inducible factor-1 α ; LPA, lysophosphatidic acid; NAC, N-acetyl cysteine; SVF, stroma-vascular fraction; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling; VEGF-A, vascular endothelial growth factor A.

number is thought to originate from adipogenesis, the proliferation/differentiation of adipocyte progenitor cells (preadipocytes). Adipogenesis has been extensively studied *in vitro* on several cell models such as established murine preadipocyte cell lines and primary cultures of stroma-vascular fraction (SVF) cells in adipogenic culture conditions (8, 9). It was reported in mice that adipocytes may derive from circulating bone marrow cells (10), whereas a recent study found the opposite and suggests that bone-marrow-derived cells do not contribute in any way to AT development (11). Whatever the final issue of this debated question in rodents, clinical studies are requested to investigate adipogenesis in human AT. The exact nature of human preadipocytes still remains elusive. Because of the difficulty in studying cell turnover in humans, few data are available concerning human adipocyte precursor renewal within AT, although such a process is necessary to maintain a pool of preadipocytes to be recruited during AT enlargement. Our previous studies showed that human preadipocytes are present in the AT-derived SVF. Using a combination of cell surface markers, CD34 (mucosialin) expressed on hematopoietic stem cells and capillary endothelial cells (CECs), CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1), expressed on leukocytes and endothelial cells and CD14 (lipopolysaccharide receptor), expressed on myeloid cells, the main cell types composing the AT-SVF were defined as AT CECs (CD34⁺/CD31⁺), AT macrophages (CD34⁺/CD14⁺), and AT progenitor cells (CD34⁺/CD31⁻) (12). The CD34⁺/CD31⁻ cell fraction was the only one, among the SVF-derived cells, to differentiate into adipocytes (13). Additionally, the CD34⁺/CD31⁻ cells exhibited angiogenic potential (14) and were therefore defined as progenitor cells.

The present study was undertaken to evaluate the *in situ* proliferative status of the CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells in human sc AT and to determine whether self-renewal of a local pool of human progenitor cells could be modulated by adipocyte hypertrophy and/or hyperplasia. *In vitro* studies were performed on freshly isolated CD34⁺/CD31⁻ cells to analyze the effects of local changes in the microenvironment in which the progenitor cells reside, notably the effects on the proliferative responsiveness of CD34⁺/CD31⁻ cells of secreted factors originating from adipocytes, AT-CECs, and AT-macrophages as well as low oxygen tension.

Materials and Methods

Materials

Chemicals were from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). Collagenase NB4 was from Serva (Coger, Paris, France). CD34⁺ and CD14⁺ cell selection kits were from StemCell Technologies (Grenoble, France), and the CD31⁺ cell selection kit was from Dynal (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Culture media were from Promocell (Heidelberg, Germany). Flow cytometry antibodies were from BD Biosciences (Le-Pont-de-Claix, France). Adiponectin, leptin, and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) were from Peptidech (Levallois-Perret, France) and IL-6 from R&D Systems (Lille, France). Lysophosphatidic acid (LPA) was a gift from Dr. Saulnier-Blache [Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unit 858, France].

Patients

Human abdominal sc AT was obtained from a group of normal to class I obese women undergoing plastic surgery (dermolipectomy and/or liposuction) [n = 61, body mass index (BMI) ranging from 20.8–34 kg/m²; mean age = 42 ± 1 yr] (15) and from a group of class II to class III obese women (n = 25, BMI ranging from 35–55 kg/m²; mean age = 40 ± 3 yr) undergoing vertical banded Mason gastroplasty, with a stable weight for at least 3 months before surgery (supplemental data 1, published as supplemental data on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>). The AT samples were immediately processed after removal. The protocol has been conducted in accordance with the Declaration of Helsinki guidelines and was approved by the Institutional Research Board of INSERM and the Toulouse University Hospital.

Isolation of the cell types from human AT

Mature adipocytes and SVF were harvested as previously described (12, 16). The SVF cells were isolated using an immunoselection/depletion approach (14, 17). Freshly isolated CD34⁺/CD31⁻ cells (progenitor cells), CD34⁺/CD31⁺ cells (AT-CECs) and CD34⁺/CD14⁺ cells (AT-macrophages) were cultured in appropriate media.

Isolation of human foreskin fibroblasts

Human foreskin fibroblasts were prepared according to a modified version of Rheinwald and Green protocol (18). The cells were cultured in DMEM/10% fetal calf serum (FCS) (passages 3–14 were used).

Adipocyte diameter determination

After isolation from dermolipectomies (normal to class I obese individuals) or sc fat biopsies (class II and III obese patients) (n = 51, BMI ranging from 20.8–55 kg/m²), mature adipocytes were suspended in endothelial cell basal medium (ECBM, containing no growth factors)/0.5% BSA (1/10, vol/vol), and 5 μl cell suspension was placed onto plastic slides. Three distinct calibrated fields were taken to measure manually adipocyte diameters with NIS software (Nikon, Champigny-sur-Marne, France). Fat cell-like shapes were labeled with the nucleus dye 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Among them, 94 ± 1% were nucleated and identified as adipocytes (85 ± 7 and 99 ± 1%, for small and large size adipocytes, respectively).

Preparation of conditioned media (CM)

To prepare CM from the different cell fractions composing AT, cells were isolated from 21 abdominal liposuctions (BMI = 30.2 ± 0.9 kg/m²). Adipocytes were plated in fibrin gels (12), and basal medium (*i.e.* ECBM/0.1% BSA) was added. After 24 h, the adipocyte-CM was collected, centrifuged (20,000 × g for 3 min at room temperature), and stored at -20°C until further use. The AT-CECs were plated on fibronectin-coated plates (5 μg/cm²) in endothelial cell growth medium-microvascular. At confluence, AT-CECs were rinsed, and basal medium was added. Twenty-four hours later, CM was collected, centrifuged, and stored at -20°C. AT-macrophages were plated in basal medium supplemented or not with N-acetyl cysteine (NAC) for 24 h. The CM was collected, centrifuged and stored at -20°C until further use.

Immunohistochemistry and cell death measurement

Immunohistochemistry analyses were performed on freshly harvested human sc AT cut into small pieces and fixed in neutral buffered 4% (wt/vol) paraformaldehyde (24 h at room temperature). The microwave antigen retrieval was performed in citrate buffer (10 mmol/liter, pH 6) three times for 7 min each. The AT was permeabilized in PBS/0.1% Triton (20 min) followed by an overnight incubation in PBS/2% BSA with mouse monoclonal CD34 antibody (Santacruz, Le Perray-en-Yvelines, France) (1/50), rabbit polyclonal Ki-67 antibody (Dako, Trappes, France) (1/50), or mouse polyclonal hypoxia-inducible factor-1α (HIF-

1 α) antibody (R&D Systems) (1/20). AT was then incubated for 1 h with the corresponding fluorescent-labeled second antibodies (goat anti-mouse or goat antirabbit coupled to AlexaFluor 488 or 546) (Invitrogen) (1/200). Cell death was evaluated by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling (TUNEL) assays according to the manufacturer's instructions (Roche, Meylan, France). Briefly, after fixation and permeabilization (PBS/0.5% Triton/0.1% sodium citrate for 20 min at room temperature) AT pieces were incubated in the dark with the TUNEL reaction mixture or with the control solution (for negative controls) for 1 h at 37 C in a humidified atmosphere. Nuclei were

stained with Hoescht 33258 (Invitrogen). After washes, AT pieces were mounted between two slides, and positive TUNEL cells (green nuclei) were determined under fluorescent microscope analyses (Nikon) on three fields for each AT sample.

Cell proliferation assay

The CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells (or foreskin-derived fibroblasts) (n = 14; BMI = 28.5 \pm 1.6 kg/m²) were plated at a density of 1.10⁴ cells/cm² in ECBM/10% FCS. After 24 h, cells were rinsed and treated with ECBM/0.1% BSA (control), 5% FCS (positive control), adipocyte-, CECs-, or macrophage-CM in normoxia or with ECBM/0.1% BSA in hypoxia chamber (1% O₂; Sanyo, Avon, France). Progenitor cells were also treated with adiponectin (1, 10, and 100 ng/ml), IL-6 (1, 10, and 100 ng/ml), leptin (1, 10, and 50 ng/ml), LPA (0.1, 1, and 10 μ mol/l), or VEGF-A (0.1, 1 and 10 ng/ml). After 48 h, bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) was added to the medium (20 μ l at 100 μ mol/liter) for 6 h. The cell proliferation index was evaluated according to the manufacturer's instructions (Roche).

Flow cytometry analysis

AT-fixed SVF (CellFix; BD Bioscience; vol/vol, 4 C, 30 min) were permeabilized (20 h at -20C in 70% ethanol). At least 1 \times 10⁵ cells in PBS/0.5% BSA/2 mmol/liter EDTA were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated Ki-67 antibody, peridinin chlorophyll protein (PerCP)-conjugated CD34 antibody and phycoerythrin (PE)-conjugated CD14 antibody or the respective isotype controls. The labeled cells were analyzed by multiparameter flow cytometry using a FACSCalibur flow cytometer and the CellQuest Pro software (BD Bioscience).

RNA isolation and real-time PCR

Total RNA was extracted from CD34⁺/CD31⁻ cells or human foreskin fibroblasts using the RNeasy kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) and the RNA concentrations determined using a fluorometric assay (Ribogreen; Invitrogen). RNA (0.5 μ g) was reverse-transcribed using the Superscript II (Invitrogen) (Random Hexamers and dNTPs were from Invitrogen). Reverse transcription was also carried out without the superscript enzyme on RNA samples. Primers for the adiponectin receptors (Adipo R1, Adipo R2), the leptin receptor, the VEGF receptors (VEGF-R1, VEGF-R2, and VEGF-R3), the IL-6 receptor, and HIF-1 α were provided by Applied Biosystems (Courtaboeuf, France) (assay on demand: hs00360422_m1, hs00226105_m1, hs00174497_m1, hs00176573_m1, hs00176676_m1, hs00176607_m1, hs00169842_m1, and hs00153153_m1, respectively). The primers for the LPA receptor (LPA1R) were forward, 5'-TGGGCCATTTTCAACTTGGT-3', and reverse, 5'-TCTGGCGAACATAGC-CAAAGA-3'. The amplification reaction was carried out on 15 ng of cDNA samples in 96-well plates (Applied Biosystems) in a GeneAmp 7000 sequence detection system. The PCR mixture contained either 5 μ l TaqMan primers (5 \times prediluted in water) or 900 nmol/liter for LPA1R and 10 μ l 2 \times TaqMan PCR Master Mix or 10 μ l 2 \times SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). All reactions were performed

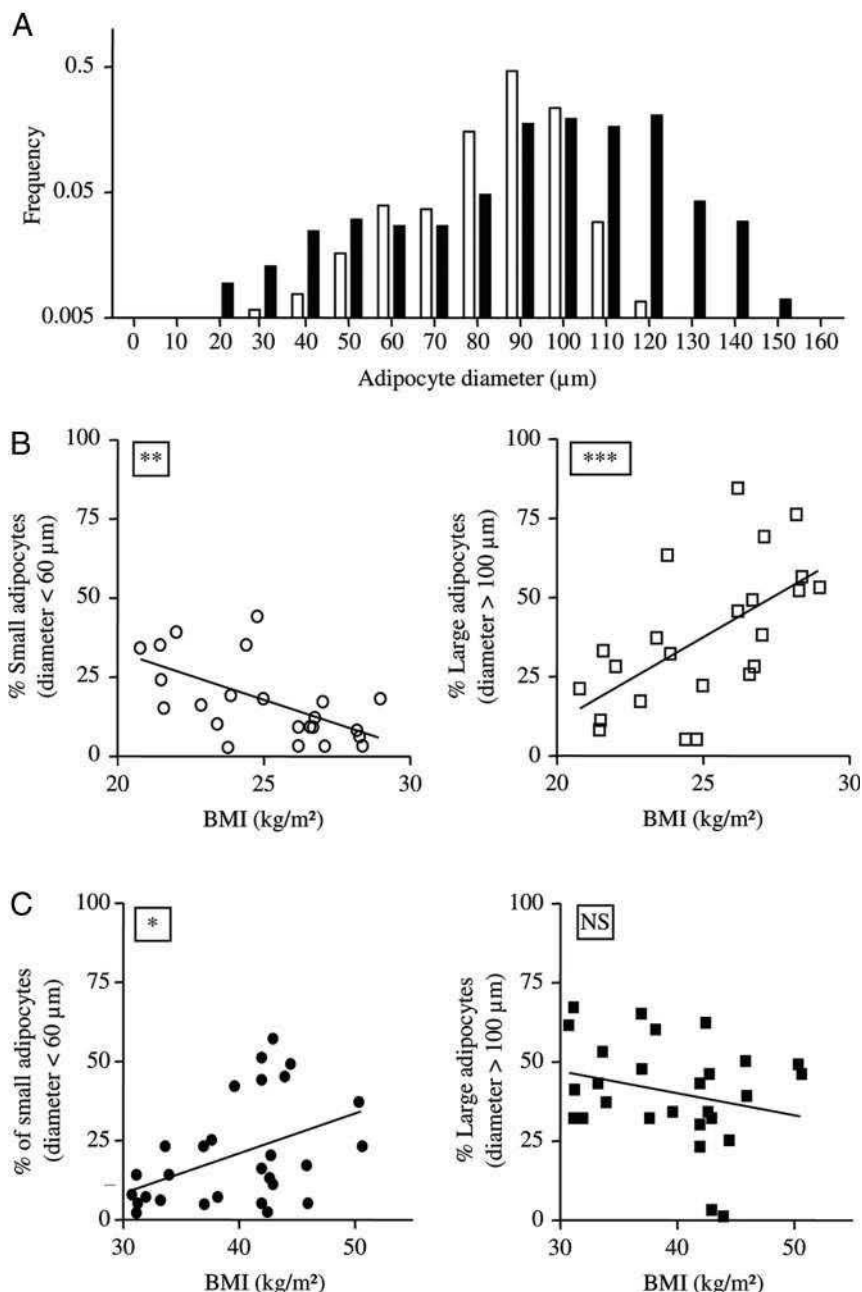


FIG. 1. Evolution of adipocyte size and number with the growth of human sc AT. A, Adipocytes from human sc AT of lean/overweight (BMI < 30 kg/m²; n = 23; white bars) and obese (BMI \geq 30 kg/m²; n = 28; black bars) patients were isolated for counting and diameter determination. Results are expressed as frequency and presented in log₁₀ scale. B and C, Correlations between the percentage of small (diameter < 60 μ m, \circ and \bullet) and large (diameter > 100 μ m, \square and \blacksquare) adipocytes according to the BMI in lean/overweight patients (B, white symbols; **, P < 0.01, Spearman r = -0.55, n = 23; and ***, P < 0.001, Spearman r = 0.62, n = 23, respectively) and in obese patients (C, black symbols; *, P < 0.05, Spearman r = -0.40, n = 28; and P = nonsignificant, Spearman r = -0.23, n = 28, respectively).

under the same conditions: 50 C for 2 min, 95 C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 C for 15 sec and 60 C for 1 min. The results were analyzed with the GeneAmp 7500 software, and all the values were normalized to 18S rRNA levels.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed with GraphPad Software (San Diego, CA). Correlations were analyzed with a Spearman test. Values are given as mean ± SEM of (n) separate experiments. The comparisons between different groups were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett *post hoc* test or with a Student’s *t* test for two groups. Differences were considered significant when *P* < 0.05.

Results

Changes in adipocyte size distribution with the growth of human sc AT

Fat cell size distribution was determined in AT from lean to overweight patients (20 < BMI < 30 kg/m²; n = 23) and was compared with the obese patients (BMI ≥30 kg/m²; n = 28). As shown in Fig. 1A, the most representative population of adipocytes, with a mean diameter of 90 μm in lean/overweight AT, shifted to 100–120 μm in obese AT. Moreover, the frequency of very small adipocytes (diameter 20–40 μm) increased from 0.015 in lean/overweight AT to 0.045 in obese AT. To further analyze the influence of the degree of adiposity on adipocyte size, adipocytes were classified according to their diameter (*i.e.* large with a diameter more than 100 μm and small with a diameter less than 60 μm), and their percentage within the whole adipocyte population was determined. As shown in Fig. 1B, increased adiposity in lean to overweight patients was negatively correlated with the percentage of small adipocytes but positively with that of large adipocytes. The further increase in fat mass seen in obese patients was characterized by stabilization or a statistically non-significant decrease in the percentage of large adipocytes together with an increase in the percentage of smaller adipocytes (Fig. 1C).

Changes in cell death with the growth of human sc AT

Cell death in human sc AT was assessed by TUNEL in lean/overweight (n = 9) and in obese patients (n = 9). As shown in Fig. 2A, occasional TUNEL-positive cells were observed in lean/overweight AT (mean value of 5 ± 2% of the total nuclei), whereas a clear increase was seen in obese AT (Fig. 2B) (mean value of 20 ± 6% of total nuclei, *P* < 0.05; Fig. 2C).

Changes in the proliferation rate of the CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells with the growth of human sc AT

The expression of the Ki-67 protein that is expressed during all active phases of the cell cycle (G₁, S, G₂, and mitosis) but absent from resting cells (G₀) was studied in the sc AT of lean/overweight and obese patients. As shown in a representative histological assay (Fig. 3A), immunohistochemistry revealed the presence of cells positive for CD34 in the stromal compartment surrounding mature adipocytes and defined as progenitor cells. Among the progenitor cells, Ki-67-positive cells were identified (Fig. 3A). To quantify the number of proliferative progenitor

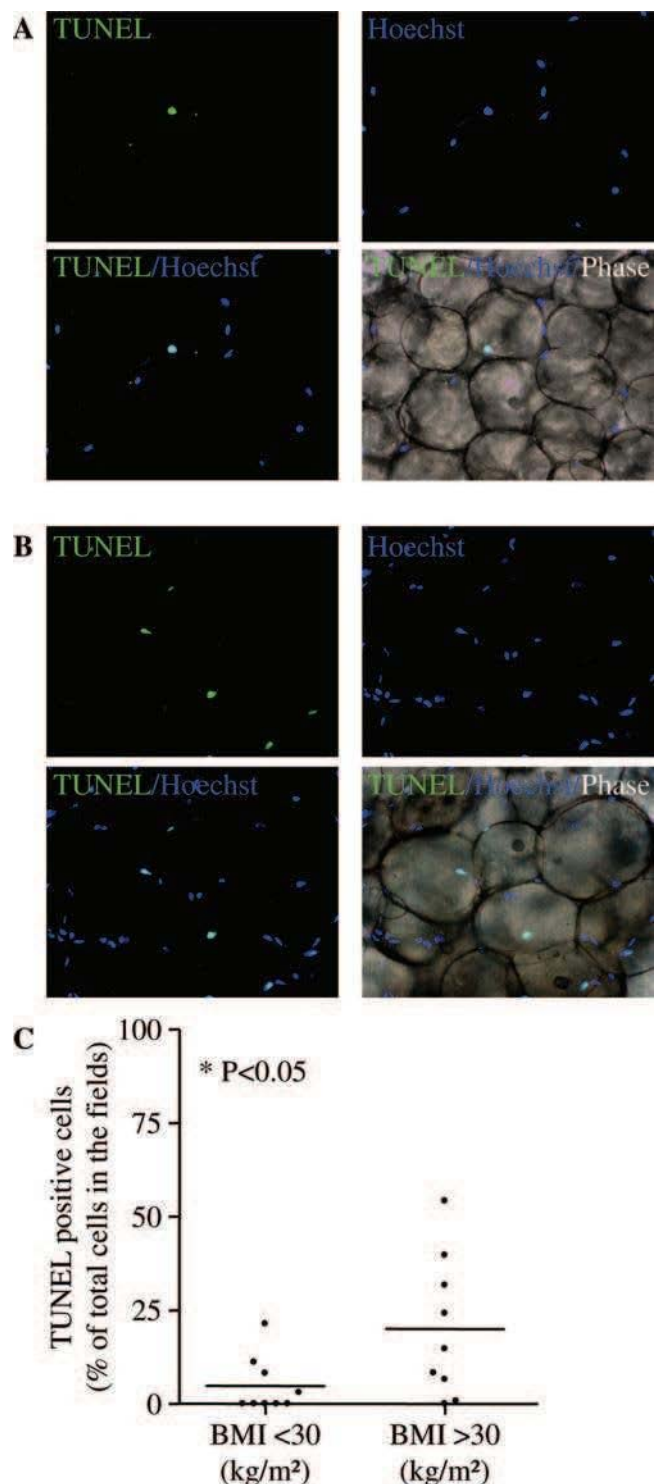


FIG. 2. Effect of human sc AT growth on cell death. A and B, Representative photomicrographs of TUNEL staining (green) and nuclei (blue) in fixed and permeabilized human sc AT of lean/overweight patients (BMI <30 kg/m²) (A) and obese patients (BMI ≥30 kg/m²) (B) (original magnification, ×200); C, mean values of TUNEL-positive cells expressed as percentage of the total cell number in nine lean/overweight patients and nine obese patients determined on three independent microscopic fields for each adipose tissue sample. *, *P* < 0.05, lean/overweight vs. obese.

cells, flow cytometry analyses were performed on the SVF from the sc AT of lean to obese patients using the peridinin chlorophyll protein (PerCP)-conjugated CD34 antibody together with the fluorescein isothiocyanate-conjugated Ki-67 antibody. The per-

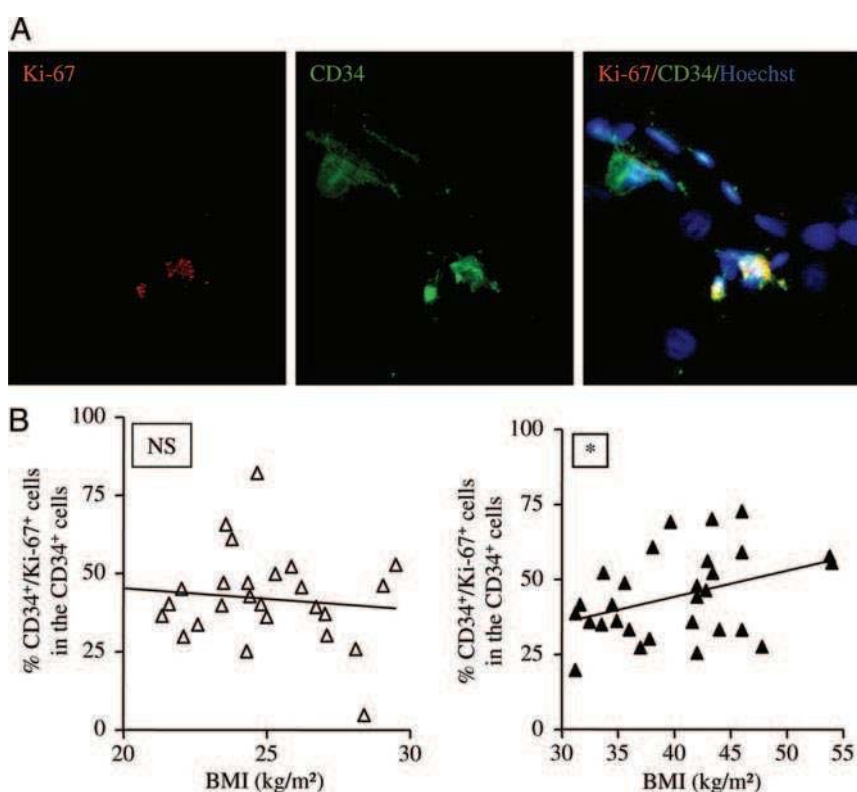


FIG. 3. Effect of human sc AT growth on the expression of Ki-67 in AT-progenitor cells. A, Representative photomicrographs of immunohistochemical analyses in fixed and permeabilized human sc AT stained with Ki-67-antibody (red), CD34-antibody (green), and Hoescht 33258 (original magnification, $\times 200$). B, Two-color flow cytometry analyses were performed on freshly harvested SVF using fluorescent-labeled antibodies directed against CD34 and Ki-67. The percentage of CD34⁺/Ki-67⁺ cells within the CD34⁺ cell population according to BMI is shown in lean/overweight patients (BMI < 30 kg/m², Δ ; $P =$ nonsignificant; Spearman $r = 0.008$; $n = 26$) and in obese patients (BMI ≥ 30 kg/m², \blacktriangle ; $*$, $P < 0.05$; Spearman $r = 0.34$; $n = 29$).

centage of progenitor cells positive for Ki-67 remained constant with increasing BMI in the SVF of lean/overweight patients (Fig. 3B; $n = 26$). Interestingly, positive Ki-67 progenitor cell percentage was positively correlated with the BMI in obese patients (Fig. 3B; $n = 29$; $P < 0.05$). As shown in Fig. 3B, large inter-obese individual differences exist; one cannot rule out that they might be the consequence of each patient's weight history (weight cycling, pregnancy, and number of diet restriction periods). Even though the present work was not designed as a follow-up study, prebariatric data such as obesity duration and waist circumference were retrieved from 16 class II to class III obese patients of a group of 25 (supplemental data 1). Obesity duration was not correlated with the BMI or with the percentage of progenitor cells positive for Ki-67 (not shown). Finally, the age of the patients included in the present work was not correlated to the percentage of progenitor cells positive for Ki-67 (not shown).

Local control of CD34⁺/CD31⁻ progenitor cell proliferation by adipokines

Freshly harvested AT progenitor cells were treated for 48 h with CM originating from mature adipocytes, AT-CECs, and AT-macrophages. Their proliferation was determined by BrdU incorporation assays as well as by nuclei counting after Hoescht staining. As shown in Fig. 4A, CM originating from mature adipocytes and from AT-CECs increased the proliferation of the AT progenitor cells as shown by the enhanced

BrdU incorporation (Fig. 4A) and nuclei number (data not shown). The stimulatory effects of the adipocyte- and CEC-derived CM on the progenitor cell proliferation was cell type specific because they did not affect the proliferation activity of human foreskin-derived fibroblasts treated under the same conditions (Fig. 4B). Finally, the growth responsiveness of the AT progenitor cells to adipokines known to be derived from adipocytes and CECs and whose production is known to be related to fat mass growth, such as leptin, adiponectin, LPA, IL-6, and VEGF-A, was studied. First, the expression of their corresponding receptors in the AT progenitor cells was determined by real-time PCR analysis and compared with the one of human foreskin-derived fibroblasts. As described in Table 1, the AT progenitor cells specifically expressed the mRNA transcripts encoding for the receptor for leptin (LEPR), adiponectin (Adipo R1 and R2), LPA, IL-6, the VEGF-R2 for the VEGF-A receptor as well as VEGF-R1 and -R3. Leptin triggered a concentration-dependent increase in BrdU incorporation (Fig. 4C) whereas adiponectin was without effect (data not shown). In parallel, VEGF-A, LPA, and IL-6 increased the proliferation of the

progenitor cells (Fig. 4D).

AT macrophage-derived CM led to a reduction in the proliferation rate of the progenitor cells (Fig. 5). To investigate whether reactive oxygen species could be responsible for the antiproliferative effect of macrophage-CM, an antioxidant, NAC, was also added. As shown in Fig. 5, the presence of NAC abolished the antiproliferative effect of macrophage-CM.

Local control of progenitor cell proliferation by oxygen tension

The potential presence of a hypoxic area within human sc AT was investigated by immunohistochemistry. As shown in Fig. 6A, the hypoxia-sensitive transcription factor HIF-1 α could be identified in human sc AT. Moreover, the expression of HIF-1 α was determined by real-time PCR analysis in the progenitor cells isolated from sc AT from patients with increasing BMI. As shown in Fig. 6B, the expression of HIF-1 α in CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells was positively correlated with the BMI of the patients. Finally, the proliferation rate of the CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells was studied using BrdU incorporation assays under 20 and 1% O₂ in a hypoxia chamber for 48 h. As shown in Fig. 6C, hypoxia increased the BrdU incorporation by the CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells (1.7 \pm 0.3-fold compared with normoxic conditions; $n = 6$; $P < 0.05$).

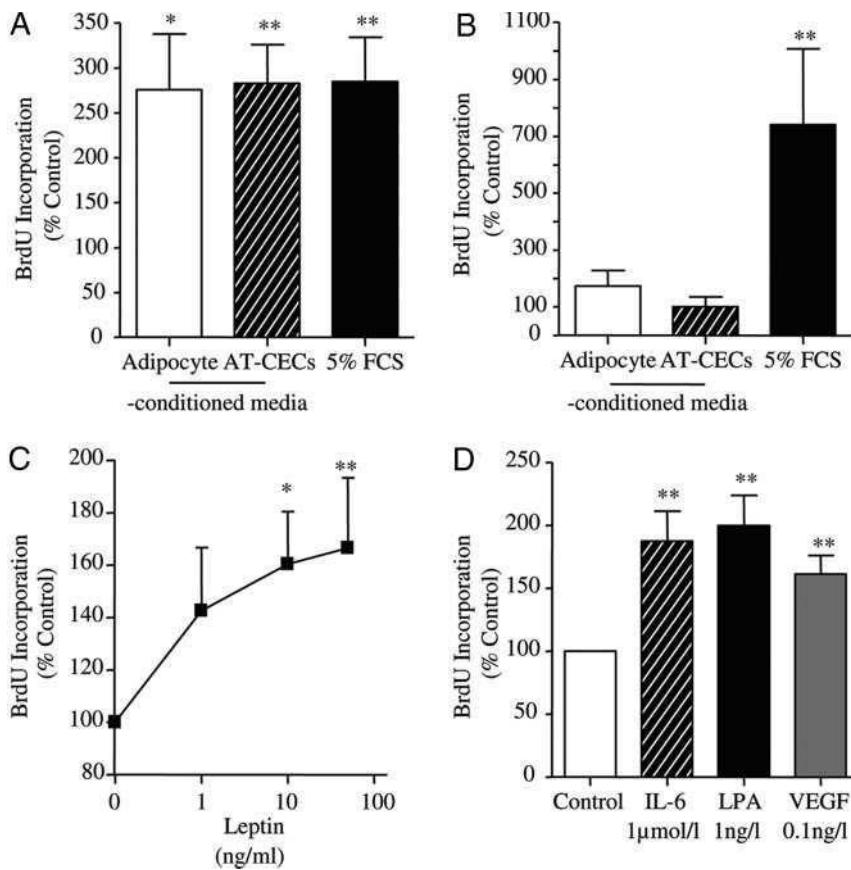


FIG. 4. Effects of adipokines on CD34⁺/CD31⁻ progenitor cell proliferation. The effects of CM from adipocytes and CECs were evaluated on the proliferation of CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells (A) and compared with human foreskin-derived fibroblasts (B). Concentration response curves of leptin (C) and maximal concentration effects of LPA, IL-6, and VEGF-A (D) on the proliferation of the CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells are presented. Proliferation was evaluated by BrdU incorporation assays. Results are expressed as the percentage of control (basal medium) and are presented as means ± SEM from eight to 10 separate experiments. *, P < 0.05; **, P < 0.01.

Discussion

The present study demonstrates that human AT progenitor cells characterized by the expression of the mucosalin CD34 and the

TABLE 1. mRNA receptor expression of adipokines receptors by freshly harvested CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells and human foreskin fibroblasts

Receptor	mRNA expression (AU) in CD34 ⁺ /CD31 ⁻ progenitor cells	mRNA expression (AU) in human foreskin fibroblasts
LEPR	1.17 ± 0.34	ND ^a
Adipo R1	0.84 ± 0.24	0.05 ± 0.04 ^a
Adipo R2	0.48 ± 0.14	ND ^a
LPA R	2.03 ± 0.62	0.60 ± 0.11 ^a
IL-6 R	1.15 ± 0.42	ND
VEGF-R1	0.07 ± 0.04	ND
VEGF-R2	0.42 ± 0.31	ND
VEGF-R3	0.05 ± 0.03	ND

The mRNA expression of the receptors was determined in CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells and human foreskin fibroblasts. Total RNAs were extracted from cells and reverse transcribed, and real-time RT-PCR analysis was performed using specific cDNA primers. The results obtained were normalized to the levels of 18S rRNA and expressed in arbitrary unit (AU). The presented data are mean ± SEM for four to eight independent experiments. ND, Not detectable.

^a P < 0.05 progenitor cells vs. fibroblasts.

lack of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) exhibit *in situ* expression of markers of proliferative activity, the proportion of which increases in obese patients. Moreover, *in vitro* assays showed that the growth of AT progenitor cells is modulated by the AT microenvironment and more particularly by soluble factors originating from adjacent cells (adipocytes, AT-CECs, and AT-macrophages) and by hypoxia.

The enlargement of the human fat mass is associated with two major cell changes in adipocytes: size enlargement and increased number (3). In the present study covering a BMI range from 20–55 kg/m², the progressive development of adipocyte hypertrophy was characterized by the concomitant increase in large adipocytes and reduction in small adipocytes in lean to overweight patients. Such a phenomenon may be explained by an increase in lipogenic activity due to positive energy balance leading to higher BMI. Further increases in the degree of adiposity in obese patients were associated with the gradual replenishment of a pool of small adipocytes, whereas the fraction of large adipocytes remained constant or tended to decrease. This observation fits with previous reports showing that hyperplasia follows hypertrophy in patients during fat mass increment (1, 3). Moreover, and in accordance with Spalding *et al.* (6), cell death in human AT was found. Altogether,

the present results suggest that cell death occurring in AT might be, in addition to adipocyte hypertrophy and hyperplasia, a contributor to the remodeling events that take place in the growing fat mass. The appearance of small adipocytes in the AT of obese patients was more likely related to the formation of new adipo-

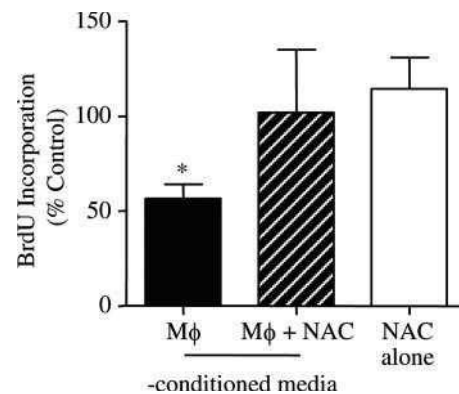


FIG. 5. Effects of macrophage-secreted factors on CD34⁺/CD31⁻ progenitor cell proliferation. CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells were treated for 48 h with macrophage (Mφ)-CM, in the presence or absence of the antioxidant NAC (0.5 mmol/liter). Proliferation was evaluated by BrdU incorporation assays. Results are expressed as the percentage of control (basal medium) and are presented as means ± SEM from five to seven separate experiments. *, P < 0.05.

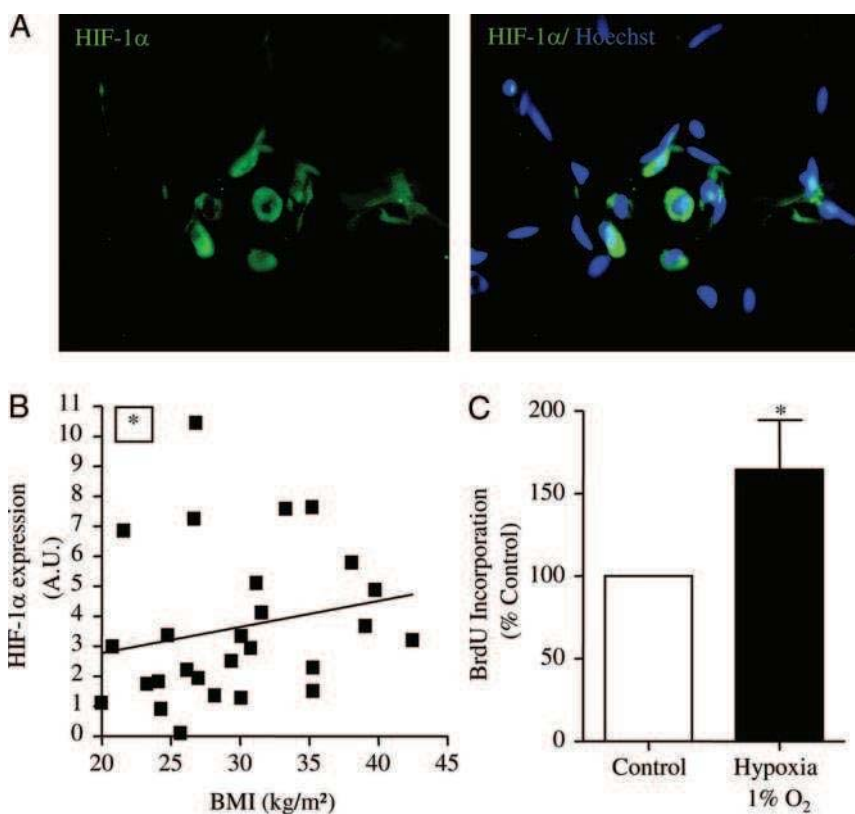


FIG. 6. Control of progenitor cell proliferation by low oxygen tension. A, Representative photomicrographs of immunohistochemical analyses of fixed and permeabilized human sc AT stained with HIF-1 α antibody (green) and Hoechst 33258 (original magnification, $\times 200$); B, correlation between HIF-1 α mRNA levels in freshly harvested progenitor cells according to BMI ($P < 0.05$; Spearman $r = 0.36$; $n = 27$); C, CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells were incubated for 48 h in basal medium in normoxia (20% O₂) (control) or in hypoxia (1% O₂). Proliferation was evaluated by BrdU incorporation assays. Results are expressed as a percentage of control (basal medium) and are presented as mean \pm SEM from six separate experiments. *, $P < 0.05$.

cytes rather than an increased lipolysis because the proportion of hypertrophic adipocytes was not statistically altered. The formation of new adipocytes is thought to occur via the differentiation of the preadipocytes. Although several lines of evidence show that human preadipocytes are present in the AT-SVF, the exact nature of this cell population needs to be clearly defined (19). Moreover, whether this cell population is resident within the fat mass and/or originates from the recruitment of bone marrow-derived circulating progenitor cells, as recently suggested in mice (10), remains to be determined, because conflicting results have been recently published (11). The study of Nishimura *et al.* (20) in db/db obese mice has shown that newly formed adipocytes originated from AT stromal cells that had recently undergone cell division. Moreover, postconfluent mitosis and clonal expansion have been described as being required for the final expression of the adipogenic differentiation program in established preadipocyte cell lines (21). Finally, the study of Strawford *et al.* (22) demonstrated, using heavy water labeling, the presence of proliferating cells within the human sc AT. The present study demonstrates stromal cells that coexpress CD34 and the proliferation marker Ki-67 (23, 24). Because our previous reports defined the stromal CD34⁺ cells as endothelial and adipocyte progenitor cells (13, 14), this result indicates that human AT contains proliferating progenitor cells located in the

stromal fraction. Moreover, although a basal level of proliferative cells in lean/overweight patients with large interindividual differences was observed, adipocyte hyperplasia in obese patients was associated with an increase in the proportion of progenitor cells expressing the proliferative marker. Even though a potential effect of weight cycling on the control of progenitor cell proliferation cannot be ruled out, our results are in agreement with the study of Neese *et al.* (25) showing, by the use of heavy water labeling, an increased proliferation rate within the AT of obese *vs.* lean mice. In addition, obesity duration correlated neither with the percentage of progenitor cells expressing Ki-67 molecular marker of proliferation nor with the age of the class II to class III obese patients. Our results are in agreement with the study of Spalding *et al.* (6) because they propose, on one hand, that adipocyte number stays constant during adulthood, the number of which is the balance between adipocyte death and generation, and, on the other hand, that adipocyte cell number in adult obese subjects is not caused by a prolonged expansion period in adulthood. Whether proliferation could be considered as an index of progenitor cell entry into adipogenesis and/or a mechanism to replenish the local pool of immature progenitor cells of the expanding AT remains to be determined. The observation that the in-

creased progenitor cell proliferation was associated with adipocyte hypertrophy suggests that hypertrophied adipocytes could control the growth of AT-derived progenitor cells. Changes in the production of adipokines such as leptin, IL-6, and LPA, described as being increased with the adipocyte size (26, 27), may be key players in such a process. In addition, hypoxia, recently reported to occur in the AT of obese mice (28), might also be considered as a consequence of an increased adipocyte diameter (29, 30). To note, there is no direct evidence of hypoxia in human AT. Freshly harvested AT progenitor cells expressed receptors for leptin, IL-6, and LPA and thus could be targets for such factors released in their neighborhood. Moreover, immunohistochemistry showed stromal cells positive for HIF-1 α within AT, the expression of which was positively correlated with BMI. HIF-1 α expression has been described to be increased in the entire AT of obese *vs.* lean subjects (31). To note, in addition to its major role in low oxygen sensing, studies performed on various preadipocyte models showed an increased expression of HIF-1 α during adipogenesis and under normoxic culture conditions (32–34). Moreover, the pharmacological inhibition of HIF-1 α activity led to the abrogation of adipocyte formation (34), strongly suggesting that HIF-1 α could control adipogenesis. Thus, it is tempting to speculate that the HIF-1 α transcript level increase with BMI in the progenitor cells might be related

to adipogenic events. CM originating from mature adipocytes, as well as leptin, IL-6, and LPA, stimulated the AT progenitor cell proliferation. Such an effect of leptin, IL-6, and LPA has already been described in established rodent preadipocyte cell lines or primary cultures of AT-derived SVF (35, 36). In addition, hypoxic culture conditions and CM from AT-CECs as well as the proangiogenic and hypoxia-regulated VEGF enhanced the growth of progenitor cells, suggesting that in addition to the direct effects of adipokines and hypoxia, the proliferation of the AT progenitor cells might be modulated by indirect effects through endothelial-derived hypoxia-sensitive factors. Such an observation is in agreement with Hutley *et al.* showing that factors secreted by human AT-derived endothelial cells promoted the human preadipocytes' proliferation (37). AT progenitor cells are considered to be mesenchymal stem cells (38). Interestingly recent investigations suggest that oxygen tension affects the physiology of mesenchymal stem cells including growth and *in vitro* development (39). Finally, the effects of macrophage-derived secretions were also studied. Macrophage accumulation within AT is associated with fat mass enlargement (12). Histological analyses have shown that macrophages localize to crown-like structures at sites of adipocyte death, the frequency of which is positively correlated with adipocyte size or inflammation (40, 41). In the same way, we found enhanced cell death in the AT from obese patients using the TUNEL method. Conflicting results were recently published by Spalding *et al.* (6) reporting no adipocyte death rate increase in obese patients, which might be explained by the use of a different approach. It is anyway tempting to speculate that adipocyte hypertrophy may be a triggering signal for macrophage accumulation. In the present study, macrophage-CM reduced the proliferation rate of the AT progenitor cells. This effect was suppressed in the presence of the antioxidant NAC, suggesting that reactive oxygen species produced by AT macrophages are able to inhibit the AT progenitor growth. Such an antiproliferative effect mediated by oxidative stress has been reported in the 3T3-L1 preadipocyte cell line (42).

Taken together, the present results demonstrate that human AT progenitor cells *in situ* exhibit a proliferative potential that is modulated by fat mass enlargement. The microenvironment in which the AT progenitor cells reside plays a key role in the regulation of the progenitor growth via the balance between proliferative signals originating from paracrine soluble factors released by the cellular partners of the AT-progenitor cells, adipocytes, endothelial cells, and oxygen tension. The antiproliferative reactive oxygen species derived from macrophages also contribute to the control of these progenitor cells. Adipocyte hypertrophy and/or death might also trigger the initial signals leading to increased AT-progenitor cell proliferation. Such an hypothesis is in agreement with the early observations of Hirsch and Batchelor (1) showing that new adipocyte formation occurs in AT once mature adipocytes have reached a critical size. Considering recent results in rodents demonstrating that blood-bone contribution to adipogenesis does not happen with detectable frequency, the study of fat cell progenitor proliferation/differentiation determinants *in vivo* remains a challenge.

Acknowledgments

We acknowledge Dr. Chiotasso and Dr. Bénarous for their help in obtaining AT samples and Dr. Chavanas for the human foreskin fibroblasts.

Address all correspondence and requests for reprints to: Sengenès Coralie, Equipe 1/INSERM U858, Hôpital Rangueil Bat L4, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 04, France. E-mail: coralie.sengenès@inserm.fr.

This work was supported by INSERM/Midi-Pyrénées Regional Authority, Afero-Roche grant.

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose.

References

- Hirsch J, Batchelor B 1976 Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab* 5:299–311
- Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ 2001 The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* 2:239–254
- Bjorntorp P 1974 Size, number and function of adipose tissue cells in human obesity. *Horm Metab Res Suppl* 4:77–83
- Sjostrom L, Bjorntorp P 1974 Body composition and adipose cellularity in human obesity. *Acta Med Scand* 195:201–211
- Hirsch J, Fried SK, Edens NK, Leibel RL 1989 The fat cell. *Med Clin North Am* 73:83–96
- Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Naslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Ryden M, Frisen J, Arner P 2008 Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453:783–787
- Butterwith SC 1997 Regulators of adipocyte precursor cells. *Poult Sci* 76:118–123
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS 1998 Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78:783–809
- Rosen ED, Spiegelman BM 2000 Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:145–171
- Crossno Jr JT, Majka SM, Grazia T, Gill RG, Klemm DJ 2006 Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow-derived circulating progenitor cells. *J Clin Invest* 116:3220–3228
- Koh Y, Kang S, Lee H, Choi TS, Lee H, Cho C, Koh G 2007 Bone marrow-derived circulating progenitor cells fail to transdifferentiate into adipocytes in adult adipose tissues in mice. *J Clin Invest* 117:3684–3695
- Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumie A 2004 From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 53:1285–1292
- Sengenès C, Lolmede K, Zakaroff-Girard A, Busse R, Bouloumie A 2005 Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* 205:114–122
- Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A 2004 Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 110:349–355
- World Health Organization 2000 Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of WHO consultation. Tech Rep Ser 894. Geneva: World Health Organization; 1–253
- Hauner H, Entenmann G 1991 Regional variation of adipose differentiation in cultured stromal-vascular cells from the abdominal and femoral adipose tissue of obese women. *Int J Obes* 15:121–126
- Curat CA, Wegner V, Sengenès C, Miranville A, Tonus C, Busse R, Bouloumie A 2006 Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia* 49:744–747
- Rheinwald JG, Green H 1975 Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6:331–343
- Gesta S, Tseng YH, Kahn CR 2007 Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131:242–256
- Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Hosoya Y, Yamashita H, Fujita H, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S 2007 Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes* 56:1517–1526
- Tang QQ, Otto TC, Lane MD 2003 Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:44–49
- Strawford A, Antelo F, Christiansen M, Hellerstein MK 2004 Adipose tissue

- triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with $^2\text{H}_2\text{O}$. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E577–E588
23. Endl E, Gerdes J 2000 The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 257:231–237
 24. Scholzen T, Gerdes J 2000 The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182:311–322
 25. Neese RA, Misell LM, Turner S, Chu A, Kim J, Cesar D, Hoh R, Antelo F, Strawford A, McCune JM, Christiansen M, Hellerstein MK 2002 Measurement in vivo of proliferation rates of slow turnover cells by $^2\text{H}_2\text{O}$ labeling of the deoxyribose moiety of DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15345–15350
 26. Ferry G, Tellier E, Try A, Gres S, Naime I, Simon MF, Rodriguez M, Boucher J, Tack I, Gesta S, Chomarat P, Dieu M, Raes M, Galizzi JP, Valet P, Boutin JA, Saulnier-Blache JS 2003 Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem* 278:18162–18169
 27. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H 2007 Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1023–1033
 28. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I 2007 Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 56:901–911
 29. Lolmede K, Durand de Saint Front V, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumie A 2003 Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:1187–1195
 30. Trayhurn P, Wood JS 2004 Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92:347–355
 31. Canello R, Henegar C, Viguier N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumie A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clement K 2005 Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54:2277–2286
 32. Imagawa M, Tsuchiya T, Nishihara T 1999 Identification of inducible genes at the early stage of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 254:299–305
 33. Irwin R, LaPres JJ, Kinser S, McCabe LR 2007 Prolyl-hydroxylase inhibition and HIF activation in osteoblasts promotes an adipocytic phenotype. *J Cell Biochem* 100:762–772
 34. Floyd ZE, Kilroy G, Wu X, Gimble JM 2007 Effects of prolyl hydroxylase inhibitors on adipogenesis and hypoxia inducible factor 1 α levels under normoxic conditions. *J Cell Biochem* 101:1545–1557
 35. Valet P, Pages C, Jeannoton O, Daviaud D, Barbe P, Record M, Saulnier-Blache JS, Lafontan M 1998 α 2-Adrenergic receptor-mediated release of lysophosphatidic acid by adipocytes. A paracrine signal for preadipocyte growth. *J Clin Invest* 101:1431–1438
 36. Wagoner B, Hausman DB, Harris RB 2006 Direct and indirect effects of leptin on preadipocyte proliferation and differentiation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:R1557–R1564
 37. Hutley LJ, Herington AC, Shurety W, Cheung C, Vesey DA, Cameron DP, Prins JB 2001 Human adipose tissue endothelial cells promote preadipocyte proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E1037–E1044
 38. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH 2002 Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13:4279–4295
 39. Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T 2007 Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358:948–953
 40. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS 2005 Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46:2347–2355
 41. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield 2nd JW, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS 2007 Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 56:2910–2918
 42. Carriere A, Fernandez Y, Rigoulet M, Penicaud L, Casteilla L 2003 Inhibition of preadipocyte proliferation by mitochondrial reactive oxygen species. *FEBS Lett* 550:163–167

Résultats complémentaires :

De nombreuses études ont montré que l'obésité est souvent associée à un diabète de type 2 ce qui se traduit par une augmentation des concentrations plasmatiques d'insuline et de glucose qui peuvent agir au niveau du TA du fait de son riche réseau vasculaire. En effet, l'insuline et le glucose agissent au niveau de l'adipocyte en modulant la lipolyse et en servant de substrats à la synthèse des TG, respectivement. Nous avons donc évalué l'effet de concentrations élevées de glucose et d'insuline sur la prolifération des cellules CD34⁺/CD31⁻. Comme présenté dans la Figure 31 A, la concentration de 2 g/L de glucose augmente la prolifération de $1,63 \pm 0,26$ ($p < 0,05$, $n=6$) fois, par rapport aux cellules cultivées en milieu contrôle (ECBM/0,1% BSA), normoglycémique (glucose à 1 g/L). Il est important de noter qu'il a été montré que de fortes concentrations de glucose pouvaient augmenter la synthèse d'ADN de cellules souches neurales embryonnaires de souris en bloquant ces cellules en phase S du cycle cellulaire³⁶⁰. Or, notre étude démontre que lorsqu'on soumet les cellules progénitrices du TA à de fortes concentrations de glucose (2 g/L), l'incorporation de BrdU est augmentée. Toutefois à ce stade, nous ne savons pas si le nombre de cellules est réellement augmenté ou bien si comme dans l'étude de Fu *et al.* les cellules sont bloquées en phase S. Pour s'affranchir de ce problème, il faudra réaliser une analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux des cellules progénitrices CD34⁺/CD31⁻ stimulées par le glucose afin de déterminer la phase du cycle cellulaire dans laquelle elles se situent. L'insuline ne présente aucun effet proliférant significatif à la concentration de 1 nmol/L (Figure 31 B), alors qu'une concentration de 100 nmol/L d'insuline entraîne une augmentation d'incorporation de BrdU de $1,67 \pm 0,16$ ($p < 0,05$, $n=6$) fois par rapport au contrôle. Cependant à cette forte concentration d'insuline, l'insuline se lie à son récepteur mais aussi au récepteur de l'IGF-1 (Insulin Growth Factor-1) qui est connu pour stimuler la prolifération des CSM³⁶¹. Ces 2 paramètres, glucose et insuline, pourraient contrôler la prolifération des cellules CD34⁺/CD31⁻ au sein du TA et notamment l'augmentation de la prolifération qui a lieu dans le TA de patients présentant une obésité sévère, état souvent associé à des concentrations plasmatiques de glucose et d'insuline plus élevées.

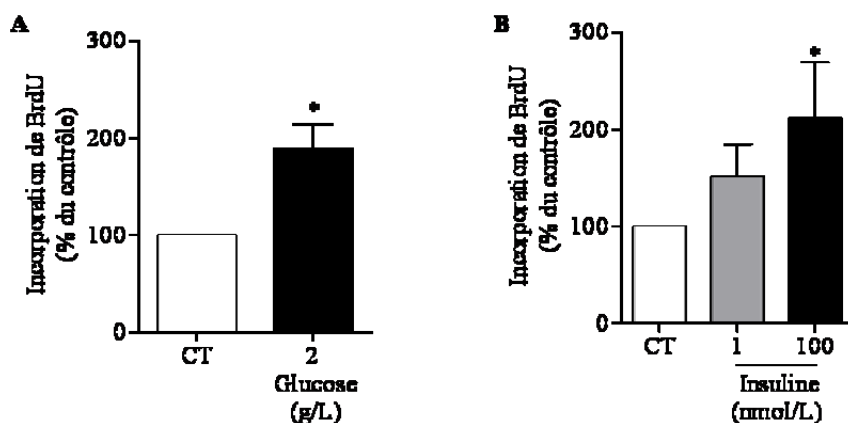


Figure 31 : Effet du glucose et de l'insuline sur la prolifération des cellules progénitrices CD34⁺/CD31⁻.

Les cellules progénitrices CD34⁺/CD31⁻ de la FSV du TA, ensemencées à faible densité (10000 cellules/cm²), sont mises en culture dans de l'ECBM/0,1% BSA en présence de glucose (2 g/L) (A) ou d'insuline (1 et 100 nmol/L) (B) pendant 48h. Après ces 48h, du BrdU est rajouté au milieu de culture pendant 6h. La prolifération est exprimée en pourcentage du contrôle (cellules cultivées en milieu basal (ECBM/0,1% BSA)) (*p<0,05, n = 5 à 7).

Discussion :

L'ensemble de ce travail a permis de montrer pour la première fois que les cellules souches/progénitrices CD34⁺/CD31⁻ exprimaient des marqueurs de prolifération *in situ* et dont l'expression augmente chez des patients obèses. De plus, des expériences *in vitro* nous ont permis de montrer que la prolifération des cellules souches/progénitrices du TA était contrôlée par le microenvironnement dans lequel elles résident et plus particulièrement par des facteurs solubles originaires des cellules adjacentes aux cellules CD34⁺/CD31⁻ (adipocytes, CECs et macrophages) mais aussi par une atmosphère hypoxique.

La croissance de la masse grasse chez l'homme est associée à deux changements majeurs dans la population adipocytaire : un accroissement de la taille d'une part et du nombre d'autre part ²⁶⁵. Dans cette étude dont les patients ont un IMC allant de 20 à 55 kg/m², le développement progressif du TA est caractérisé par une hypertrophie adipocytaire ce qui se traduit par une augmentation de la proportion des gros adipocytes et une diminution des petits adipocytes chez les patients normo-pondérés et en surpoids. L'augmentation du degré d'obésité chez les patients obèses (IMC>30 kg/m²) est associée à une hyperplasie adipocytaire qui se définit par une augmentation du nombre des petits adipocytes qui sont probablement

issus de la différenciation des cellules progénitrices alors que la fraction des grands adipocytes reste constante. Ces résultats sont en accord avec de précédentes études basées sur la quantification des seuls adipocytes matures, qui ont suggéré que l'hyperplasie adipocytaire suivait l'hypertrophie lors de la prise de poids^{264, 265}. Par la datation au carbone 14 incorporé à l'ADN génomique lors des tests des bombes nucléaires de 1955 à 1963, de récents travaux ont montré que le nombre d'adipocytes s'installe pendant l'enfance et l'adolescence, reste constant chez l'adulte normo-pondéré et obèse de poids constant et se renouvelle de 10 % par an³⁶². Cependant les patients de cette cohorte sont en stabilisation pondérale alors que dans notre étude le TA est obtenu à partir de patients ayant subi de la chirurgie plastique et qui ont probablement pris du poids à l'âge adulte. Il ne peut donc pas être exclu que les personnes qui prennent progressivement du poids à l'âge adulte augmentent, dans un premier temps, leur taille adipocytaire puis une fois la taille adipocytaire maximale atteinte, dans un second temps, recrutent de nouvelles cellules adipeuses à partir de cellules précurseurs engagées (préadipocytes) ou de cellules de types mésenchymateux. **L'utilisation du marqueur de prolifération Ki-67 a permis de montrer que la prolifération basale observée chez les patients normo-pondérés et en surpoids est augmentée chez les patients obèses parallèlement à l'augmentation de l'hyperplasie adipocytaire et de la mort cellulaire dans le TA.** Nous pouvons donc spéculer que l'hyperplasie adipocytaire d'un côté et la mort cellulaire d'un autre induisent la prolifération des cellules CD34⁺ afin de maintenir un stock constant de cellules progénitrices capables de donner de nouveaux adipocytes à tout moment. En effet, il a récemment été montré que des souris soumises à un régime gras présentent une hyperplasie adipocytaire de leur TA sous-cutané³⁶³. Des expériences d'injection de BrdU ont montré par ailleurs que la prolifération des cellules progénitrices du TA était augmentée dans ces conditions et que certains petits adipocytes étaient marqués au BrdU suggérant que les cellules progénitrices ayant proliféré se sont par la suite différencié en adipocytes³⁶³. Les cellules souches adultes sont des cellules rares qui prolifèrent peu et sont le plus souvent en phase de quiescence (cf. introduction paragraphe I.1). L'importante proportion de cellules CD34⁺/CD31⁻ en prolifération dans le TA laisserait ainsi penser que cette population est davantage une population de cellules progénitrices qu'une population de cellules dites souches. Des expériences d'injection de BrdU chez la souris ont permis de définir que les cellules souches quiescentes, retenant le marquage pendant une longue période, sont inférieures à 1 % des cellules de la FSV et qu'elles se localisent aussi bien entre les adipocytes que le long des vaisseaux³⁶⁴. Des expériences complémentaires telles que

l'analyse du cycle cellulaire en cytométrie de flux seraient à envisager pour étudier l'état de quiescence des cellules CD34⁺/CD31⁻ du TA humain et ainsi définir la population cellulaire la plus immature et sa localisation exacte au sein du TA.

La présente étude montre que le TA humain contient, dans sa FSV, des cellules qui co-expriment le marqueur CD34⁺ et le marqueur de prolifération Ki-67. Parmi toutes les cellules de la FSV, les CECs et les cellules progénitrices sont positives pour le marqueur CD34⁺ ^{267, 309}, il n'est pas impossible d'exclure qu'une proportion de cellules CD34⁺ exprimant le Ki-67 soit des cellules endothéliales en prolifération participant à l'angiogenèse qui accompagne la croissance du TA lors de la mise en place de l'obésité ^{365, 366}. En effet, des limitations technologiques ne nous ont pas permis de faire des triples marquages CD34/CD31/Ki-67. Des expériences complémentaires seraient donc nécessaires pour discriminer les cellules progénitrices en prolifération des CECs.

Enfin, cette étude montre que les cellules progénitrices du TA prolifèrent en réponse des sécrétions des adipocytes et en particulier la leptine, l'IL-6 et le LPA, en réponse aux sécrétions des CECs et plus précisément le VEGF mais aussi lorsqu'elles sont soumises à une atmosphère hypoxique. Toutes ces sécrétions ^{367, 368} ainsi que l'état hypoxique du TA ²⁷⁶ sont augmentés avec l'obésité ce qui pourraient conduire à une hyper-prolifération des cellules progénitrices dont le nombre ne cesserait d'augmenter si elles n'étaient pas utilisées par l'organisme. Cependant, les expériences de cytométrie de flux nous ont permis de montrer que le nombre de cellules progénitrices CD34⁺/CD31⁻ par gramme de tissu n'augmente pas de la même façon que leur prolifération, en effet leur nombre diminue dans le TA de patients obèses de classe II-III par rapport au TA de patients de classe I (publication 1) laissant penser que les cellules progénitrices sont utilisées chez les obèses classe II-III.

L'ensemble de ce travail a montré pour la première fois que les cellules progénitrices du TA humain présentent une activité de prolifération *in situ* qui est modulée par la croissance du TA. Le microenvironnement dans lequel elles résident joue un rôle essentiel dans le contrôle de leur prolifération.

III. Effet du microenvironnement sur les potentialités de différenciation des cellules souches/progénitrices.

Outre son implication dans le contrôle de la prolifération et de la quiescence, un des rôles de la niche des cellules souches est le contrôle de leur différenciation. Les cellules progénitrices CD34⁺/CD31⁻ du TA sont capables, en milieu de culture adipogénique, de stocker des TG et d'avoir une activité lipolytique³⁰⁹ et en milieu de culture endothélial, d'exprimer des marqueurs endothéliaux et de s'organiser en structures semblables à des capillaires²⁶⁷. Ainsi, la population de cellules CD34⁺/CD31⁻ peut être considérée comme un stock local de progéniteurs avec des activités adipogénique et angiogénique qui pourraient jouer un rôle dans la formation des adipocytes mais aussi des capillaires qui accompagne le développement de la masse grasse²⁷¹.

III.1. Engagement dans la voie adipogénique.

Dans la publication 1, nous avons montré que les niveaux de transcrits de la GPDH et de la LPL, marqueurs dont l'expression augmente au cours de l'adipogenèse, dans les cellules progénitrices CD34⁺/CD31⁻ isolées à partir de TA de patients obèses de classe II-III (IMC>35 kg/m²) étaient significativement plus importants que chez les patients obèses de classe I (30<IMC<35 kg/m²). En parallèle, le nombre de cellules progénitrices CD34⁺/CD31⁻ par gramme de TA a été évalué et le nombre de cellules progénitrices diminue dans le TA des patients obèses classe II-III par rapport aux classe I. Dans la publication 2, nous avons montré que la proportion des petits adipocytes était augmentée avec l'état d'obésité sans que celle des gros adipocytes ne soit changée. **Prises collectivement, ces données indiquent que les cellules progénitrices CD34⁺/CD31⁻ du TA pourraient s'engager dans la voie adipocytaire pour créer de nouveaux adipocytes lors de l'expansion excessive du TA chez les patients obèses de classe II-III.** Cet engagement dans la voie adipogénique semble spécifique puisque lorsque l'on s'intéresse à l'expression des gènes impliqués dans la différenciation ostéogénique, les cellules progénitrices CD34⁺/CD31⁻ natives, de patients classe I ou de classe II-III, n'expriment pas les facteurs de transcription impliqués dans la voie ostéogénique RunX2 et ostéix ni les protéines ostéoprotégérine et ostéocalcine (publication 1).

III.2. Engagement dans la voie angiogénique.

Nous venons de voir que, *in situ*, les cellules progénitrices CD34⁺/CD31⁻ semblent s'engager dans la voie adipocytaire chez les patients obèses de classe II-III. Cependant, les cellules progénitrices CD34⁺/CD31⁻ sont non seulement douées de potentiels adipogéniques mais aussi de potentiels angiogéniques. *In vitro*, dans des conditions de culture endothéliales, elles s'organisent en réseaux positif pour le marqueur endothélial CD31 et, *in vivo*, elles participent à la revascularisation d'un membre de souris volontairement ischémié lorsqu'elles sont injectées²⁶⁷. Il est donc possible que les cellules CD34⁺/CD31⁻ participent à l'extension du réseau vasculaire qui accompagne la croissance du TA qui a lieu au cours de l'obésité²⁷¹. Cependant, en l'absence de marqueur spécifique de l'engagement dans la voie endothéliale dans la littérature, nous ne pouvons pas évaluer l'engagement des cellules progénitrices CD34⁺/CD31⁻ dans cette voie au cours de l'obésité comme nous avons pu le faire pour l'engagement adipocytaire en étudiant les transcrits spécifiques. En effet, au cours de la différenciation endothéliale à partir de cellules ES, les cellules immatures expriment très vite et de façon concomitante les marqueurs des cellules endothéliales matures tels que les marqueurs CD34, CD31, Von Willebrand factor (vWF), le récepteur au VEGF (VEGF-R2) ou VE-Cadherine (VE-CAD)³⁶⁹. En sélectionnant les cellules progénitrices du TA sur l'expression du marqueur CD34 et l'absence d'expression du marqueur CD31, nous sommes dans l'impossibilité de voir les cellules progénitrices engagées dans la voie angiogénique qui expriment rapidement le marqueur CD31. De plus il est impossible de discriminer, dans la fraction CD31⁺ du TA, les cellules progénitrices en voie de différenciation des cellules endothéliales matures puisqu'elles expriment les mêmes marqueurs (CD34, CD31, vWF, VEGF-R2, VE-CAD).

Par ailleurs, un milieu de culture (le milieu mixte) permettant la co-expression des potentiels adipogéniques et angiogéniques par les cellules souches/progénitrices CD34⁺/CD31⁻ a été mis en place au laboratoire³⁷⁰. L'utilisation de ce milieu de culture a permis de tester l'effet des sécrétions des adipocytes, des CECs et des macrophages sur les potentiels adipogéniques et angiogéniques des cellules progénitrices. Après 8 jours de culture, les cellules CD34⁺/CD31⁻ traitées avec les MC de macrophages (publication 4 en annexe), avec les MC d'adipocytes ou avec les MC de CECs (Figure 32) présentent une forte diminution du marquage des TG à l'huile rouge et donc du stockage des TG et une augmentation de la longueur du réseau positif

pour le marqueur endothélial CD31 par rapport aux cellules contrôle (Figure 32). **Il semblerait donc que les sécrétions des macrophages, des adipocytes et des CECs possèdent des effets anti-adipogéniques et pro-angiogéniques sur les cellules progénitrices CD34⁺/CD31⁻ dans ces conditions de culture.** Notons que les effets anti-proliférant des MC de macrophages et les effets proliférant des MC d'adipocytes et de CECs décrits dans la publication 2 sont masqués dans ces conditions de culture (Figure 32) du fait d'une prolifération de base très importante induite par le milieu de culture sélectionné.

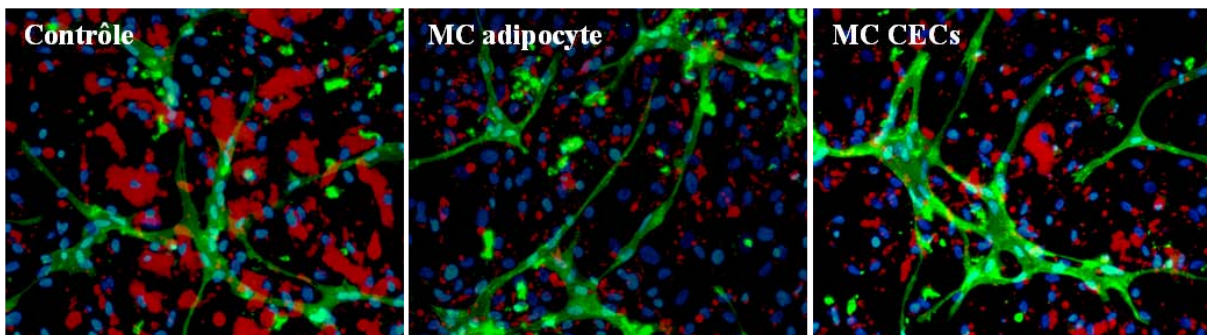


Figure 32 : Effet des milieux conditionnés (MC) des adipocytes et des CECs du TA sur l'adipogenèse et l'angiogenèse des progénitrices CD34⁺/CD31⁻.

Les cellules CD34⁺/CD31⁻ sont ensemencées à 120 000 cellules/cm² et cultivées en milieu contrôle (1:1 milieu mixé:ECBM/0,1% BSA), en MC d'adipocyte (1:1 milieu mixé:MC adipo) ou en MC de CECs (1:1 milieu mixé:MC CECs). Après 8 jours, les cellules sont fixées et marquées à l'huile rouge, au Hoechst (un colorant nucléaire) et avec un anticorps dirigé contre le CD31. Des photographies représentatives de 3 expériences indépendantes sont présentées (grossissement x200).

Les MC des adipocytes et des CECs ont été analysés sur des membranes « array » permettant la détection simultanée de 79 protéines (Figure 33). Parmi les facteurs produits par l'adipocyte, outre les chemokines (Gro, Gro- α , CCL5, CCL13, CCL20), la leptine^{371, 372} mais aussi le VEGF ont des effets angiogéniques qui pourraient être responsables de l'effet pro-angiogénique et anti-adipogénique^{373, 374} des MC d'adipocytes (Figure 33 A). Parmi les facteurs sécrétés par les CECs (Figure 33 B), le VEGF pourrait être responsable des effets pro-angiogéniques observés lors du traitement des cellules progénitrices par les MC des CECs. Cependant, les CECs sécrètent aussi de l'HGF dont l'effet angiogénique a non seulement été montré comme jouant une fonction centrale dans l'angiogenèse du TA³⁷⁵ mais aussi comme ayant un effet additif à celui du VEGF³⁷⁶. Notons aussi que ces 2 types

cellulaires sécrètent aussi de l'oncostatine M et du MCP-1 connus pour leurs effets angiogéniques^{377, 378} et anti-adipogéniques³⁷⁹. **Les effets angiogéniques des MC d'adipocytes et de CECs semblent donc dus à l'action combinée de plusieurs facteurs sécrétés plutôt qu'à l'effet d'un facteur isolé.**

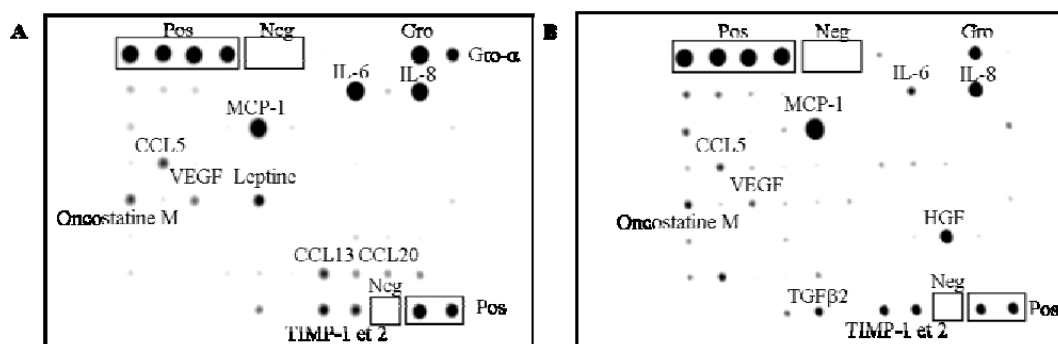


Figure 33 : Profil sécrétoire des adipocytes et des CECs.

Photographies représentatives de membranes de cytokines array réalisées à partir d'un mélange de milieux conditionnés d'adipocytes (A) et de CECs (B). pos = contrôle positif ; neg = contrôle négatif

Discussion :

Pris collectivement, ces résultats suggèrent que les sécrétions des adipocytes, des CECs mais aussi des macrophages, dans nos conditions de culture, ont des effets anti-adipogéniques et pro-angiogéniques sur les cellules progénitrices CD34⁺/CD31⁻ du TA alors que, paradoxalement *in situ*, les cellules progénitrices semblent s'engager dans la voie adipocytaire chez les obèses de classe II-III. La majorité des sécrétions orienteraient donc les cellules progénitrices présentes dans le TA dans la voie angiogénique et non pas vers le lignage adipocytaire. L'ensemble des sécrétions des cellules présentes dans le microenvironnement dans lequel résident les cellules progénitrices ayant des effets pro-angiogéniques, la question qui se pose à présent est de savoir quel est l'origine et la nature des facteurs impliqués dans l'engagement, observé *in situ*, des cellules progénitrices dans la voie adipogénique. Dans les derniers résultats présentés, nous avons pu voir que, dans nos conditions de culture, les sécrétions de facteurs du microenvironnement ne favorisent pas l'adipogenèse. Par conséquent, la piste d'une origine systémique des facteurs pro-adipogéniques reste à envisager. En effet, les facteurs circulants tels que l'insuline, le glucose, le cortisol, les acides gras différents de ceux relargués par les adipocytes lors de la lipolyse

(agonistes naturels de PPAR γ) sont connus d'une part pour être augmentés avec l'obésité et d'autres part pour avoir des effets pro-adipogéniques. Ces facteurs systémiques pourraient donc être impliqués dans l'engagement des cellules progénitrices que l'on observe *in situ* avec l'augmentation de marqueurs adipocytaires chez les patients présentant une obésité sévère. Il serait donc intéressant de tester l'effet de plasmas de patients obèses avec éventuellement des taux d'AG différents par rapport à des plasmas de patients normopondérés sur l'engagement des cellules progénitrices dans la voie adipogénique.

Toutefois, il est possible que les effets observés des MC des adipocytes, des CECs et des macrophages soient les conséquences des conditions de culture très proliférantes du fait de la teneur en sérum (2 %) et en facteurs de croissance associées à une hétérogénéité de la population CD34⁺/CD31⁻. En effet, les cellules progénitrices triées par billes magnétique ne sont jamais totalement pures (pureté des cellules CD34⁺/CD31⁻ = 92,9 \pm 0,8 %) et peuvent être contaminées à la fois par des CECs composant les capillaires du TA et par des cellules endothéliales progénitrices circulantes³⁸⁰.

Les CECs contaminantes pourraient avoir un effet anti-adipogénique puisqu'il a récemment été montré que les CECs, via des contacts cellule-cellule et via leurs sécrétions, inhibent la différenciation adipocytaire des cellules progénitrices³⁸¹. Cependant, l'augmentation du réseau positif pour le marqueur CD31 pourrait être due à une contamination cellulaire des cellules progénitrices par des cellules progénitrices endothéliales circulantes. En effet, chez l'adulte, l'augmentation du réseau de capillaires peut être supportée par deux processus : par la migration et réplique de cellules endothéliales matures préexistantes (processus d'angiogenèse) et/ou par la différenciation endothéliale de cellules circulantes immatures (les cellules progénitrices endothéliales circulantes) provenant de la moelle osseuse (processus de vasculogenèse)³⁴⁶. Ces cellules progénitrices circulantes se distinguent par l'expression des marqueurs CD34, CD133 et VEGFR2³⁴⁸. Or la FSV du TA renferme une faible proportion de cellules CD133⁺ (<5%)²⁶⁷ qui pourrait ne pas être des cellules résidentes au TA mais une contamination par des cellules sanguines et notamment par les cellules endothéliales progénitrices circulantes et ainsi être responsable de l'activité angiogénique des cellules CD34⁺/CD31⁻ du TA.

Encore beaucoup de questions restent en suspens concernant le réel potentiel de différenciation endothéliale des cellules progénitrices et auxquelles il est difficile de répondre par le manque de marqueurs spécifiques de l'engagement dans la voie de différenciation

endothéliale. Si les cellules progénitrices n'ont pas de vrai potentiel de différenciation endothéliale, elles ont cependant un réel pouvoir angiogénique par les facteurs qu'elles sécrètent^{356, 382} comme on peut le voir avec leur participation à la revascularisation d'un membre ischémié de souris.

Par ailleurs, il n'est pas connu si les cellules qui s'engagent dans la voie adipogénique et angiogénique ont besoin de proliférer avant de différencier. Concernant l'adipogenèse dans les lignées murines de préadipocytes (3T3-L1, 3T3-F442A), la première étape de la différenciation adipocytaire *in vitro* est l'arrêt de croissance lorsque les cellules sont arrivées à confluence et les cellules en prolifération n'accumulent pas de gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme, même en présence de stimulateurs hormonaux, jusqu'à ce qu'elles soient confluentes. Après l'induction de la différenciation, les cellules confluentes subissent une nouvelle série de division cellulaire, les mitoses post-confluence³⁸³. Par contre, les préadipocytes humain issus de culture primaire différencient en adipocyte même en présence d'agents alkylant inhibant la mitose³⁸⁴. Il est possible que les préadipocytes en culture primaire isolés à partir de TA humain aient déjà subis une expansion clonale *in vivo*^{324, 385}. L'effet de la prolifération sur la différenciation adipocytaire dans les modèles humains reste donc un large domaine d'investigation.

En plus d'être très proliférant, le milieu mixte est aussi extrêmement adipogénique. Au bout de 10 jours de culture, nous arrivons quasiment à 100 % de différenciation. Il est donc difficile d'observer un effet pro-adipogénique se rajouter à l'adipogenèse de base. Dans le but de pouvoir observer une modulation de l'adipogenèse, la mise en place d'un milieu adipogénique minimum induisant une adipogenèse modérée est en cours de réalisation.

Ces études révèlent toute la complexité des conditions expérimentales visant à mimer une situation physiologique. Est-il possible de créer les conditions environnementales intra tissulaires par des approches *in vitro* ? Faut-il songer à de nouvelles stratégies expérimentales pour étudier le rôle du microenvironnement sur la différenciation des cellules souches/progénitrices ?

IV. Effet du microenvironnement sur la migration des cellules souches/progénitrices.

La mise en évidence d'un réservoir de cellules progénitrices dans le TA humain pose la question de leur origine. En effet, il peut s'agir soit d'une population cellulaire résidant dans le TA et capable d'auto-renouvellement (cf. paragraphe II), soit du résultat d'un recrutement sélectif de cellules circulantes par le TA. Il serait également possible que les cellules progénitrices résidentes du TA puissent être mobilisées pour aller coloniser d'autres organes. Le microenvironnement, par les sécrétions de facteurs solubles, régule la migration des cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses^{386, 387}. Le but de cette étude a été, dans un premier temps, d'analyser *in vitro* les signaux provenant du microenvironnement sur la migration des cellules progénitrices CD34⁺/CD31⁻ du TA, puis, dans un second temps, d'étudier le rôle de la migration des cellules progénitrices *in vivo* dans le développement de l'obésité.

IV.1. Etudes *in vitro*.

Publication 3 : Chemotaxis and differentiation of human adipose tissue CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells: role of stromal derived factor-1 released by adipose tissue capillary endothelial cells.

Sengenès C, Miranville A, Maumus M, de Barros S, Busse R, Bouloumié A. Stem Cells. 2007 Sep;25(9):2269-76.

Chemotaxis and Differentiation of Human Adipose Tissue CD34⁺/CD31⁻ Progenitor Cells: Role of Stromal Derived Factor-1 Released by Adipose Tissue Capillary Endothelial Cells

CORALIE SENGENÈS,^a ALEXANDRA MIRANVILLE,^b MARIE MAUMUS,^a SANDRA DE BARROS,^a RUDI BUSSE,^b ANNE BOULOUMIÉ^a

^aInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U858, AVENIR Team, I2MR, Paul Sabatier University, IFR31, Toulouse, France; ^bInstitute of Cardiovascular Physiology, Johann Wolfgang Goethe University, Frankfurt am Main, Germany

Key Words. Human CD34⁺ cells • Stromal derived factor-1 • Endothelial differentiation • Chemotaxis • CXCR-4 • Matrigel Microvasculature • Progenitor cells

ABSTRACT

The native CD34⁺/CD31⁻ cell population present in the stroma-vascular fraction of human adipose tissue (hAT) displays progenitor cell properties since they exhibit adipocyte- and endothelial cell-like phenotypes under appropriate stimuli. To analyze the signals within hAT regulating their phenotypes, the influence of hAT-derived capillary endothelial cells (CECs) was studied on the chemotaxis and differentiation of the hAT-CD34⁺/CD31⁻ cells. Conditioned medium from hAT-CECs led to a strong chemotaxis of the hAT-CD34⁺/CD31⁻ cells that was inhibited with pretreatments with pertussis toxin, CXCR-4 antagonist, or neutralizing antibodies. Furthermore, hAT-CECs produced and secreted the CXCR-4 ligand, that is, the stromal derived factor-1 (SDF-1). Finally, hAT-CECs induced the differen-

tiation of hAT-CD34⁺/CD31⁻ cells toward an endothelial cell (EC) phenotype. Indeed, hAT-CECs and -CD34⁺/CD31⁻ cell coculture stimulated in a two-dimensional system the expression of the EC CD31 marker by the hAT-progenitor cells and, in a three-dimensional approach, the formation of capillary-like structures via a SDF-1/CXCR-4 dependent pathway. Thus, the migration and differentiation of hAT progenitor cells are modulated by hAT-CEC-derived factors. SDF-1, which is secreted by hAT-derived CECs, and its receptor CXCR-4, expressed by hAT-derived progenitor cells, may promote chemotaxis and differentiation of hAT-derived progenitor cells and thus contribute to the formation of the vascular network during the development of hAT. *STEM CELLS* 2007;25:2269–2276

Disclosure of potential conflicts of interest is found at the end of this article.

INTRODUCTION

The excessive human adipose tissue (hAT) development is associated with adipocyte hypertrophy and hyperplasia [1, 2] as well as an extension of the capillary network [3–5]. The processes involved in the increased number of mature adipocytes as well as the neovascularization within the fat mass are still to be clearly defined. We have described a cell population, present in the native stroma-vascular fraction (SVF) of hAT, characterized as positive for the hematopoietic stem cell marker CD34 and negative for the endothelial cell marker CD31. The CD34⁺/CD31⁻ cell population was the only cell population of the SVF under adipogenic culture conditions among the capillary endothelial cells (CECs), the macrophages, and the cells negative for the CD34, CD31, and CD14 markers able to express adipocyte-specific markers and metabolic lipolytic and lipogenic activities. Furthermore, under endothelial cell culture conditions, the CD34⁺/CD31⁻ cells changed their morphology and organization and expressed endothelial cell (EC)-specific markers such as CD31 and von Willebrand factor [5]. In vivo, their injection led to an increase in blood flow and capillary density within the

ischemic muscle in the athymic mouse model of hindlimb ischemia, whereas injection with native hAT-derived CD34⁺ cells exerted no effects [5]. Other laboratories have reported similar proangiogenic abilities of the whole adipose tissue (AT) adherent SVF cells [6, 7]. The further characterization of the native CD34⁺/CD31⁻ cells has shown that they did not express the classic mesenchymal stem cell markers (CD105 and Stro-1) and displayed different features from the adult hematopoietic stem cells since they did not form blood colony in hematopoietic assays [8]. Thus, the native CD34⁺/CD31⁻ cell population of hAT can be considered a local pool of adipocyte as well as endothelial progenitor cells that might play a role in the formation of adipocytes but also of capillaries accompanying the development of the fat mass. Since the microenvironment, that is, soluble factors such as the stromal derived factor-1 (SDF-1) [9–11], cellular, and extracellular matrix components have been shown to regulate the biology of hematopoietic and mesenchymal stem cells [12–14], the present study was undertaken to characterize the effects of signals arising from hAT microenvironment on the chemotaxis and differentiation of the hAT progenitor cells. Our data delineate the concept that hAT-derived CECs induce the chemotaxis and support the endothelial

Correspondence: Coralie Sengenès, Ph.D., Team 1, “Vascular network, progenitor cells and immune cells from adipose tissue,” Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U858/I2MR, BP84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France. Telephone: +33 5 6114 5975; Fax: +33 5 6125 5116; e-mail: coralie.sengenès@toulouse.inserm.fr Received March 14, 2007; accepted for publication May 17, 2007; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* May 24, 2007. ©AlphaMed Press 1066-5099/2007/\$30.00/0 doi: 10.1634/stemcells.2007-0180

differentiation potential of the hAT-derived progenitor cells via the SDF-1/CXCR-4 axis within hAT.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of the SVF from hAT

Human AT was obtained from individuals undergoing plastic surgery by lipoaspiration. The study was approved by the ethical committees of Toulouse and Frankfurt am Main hospital universities. Subcutaneous AT was obtained from a total of 38 individuals (mean body mass index: 26.07 ± 1.01 kg/m²). The AT was digested using collagenase (300 U/ml in phosphate-buffered saline [PBS], 2% bovine serum albumin [BSA], pH 7.4) for 30 minutes under constant shaking. Following removal of the floating mature adipocytes, the lower layer containing the SVF was centrifuged (300g, 10 minutes) and the pellet resuspended in erythrocyte lysis buffer (155 mmol/l NH₄Cl; 5.7 mmol/l K₂HPO₄; 0.1 mmol/l EDTA, pH 7.3) for 10 minutes. After successive filtrations through 100-, 70-, and 40- μ m sieves, the cells were resuspended in PBS/2% fetal calf serum (FCS).

Isolation of the CD34⁺/CD31⁻ Progenitor Cells and the CD34⁺/CD31⁺ CECs from the SVF of hAT

CD34⁺ cells were isolated from the SVF using CD34-coupled magnetic microbeads as previously described [5]. Briefly, the SVF was incubated (room temperature, 15 minutes) with the StemCell Technologies (St. Katharinen, Germany, <http://www.stemcell.com>) positive selection cocktail. Following the addition of magnetic nanoparticles, cells were recovered by successive magnetic sorting steps. The CD34⁺ cells were suspended in PBS/0.1% BSA. The CD34⁺ population was depleted from the CD31⁺ cells using Dynal Biotech (Hamburg, Germany, <http://www.dynalbiotech.com>) CD31-coupled magnetic microbeads (50 μ l/ml). After incubation (4°C, 20 minutes), the cell suspension containing the beads, suspended in 10 ml of PBS/0.1% BSA, was exposed to the magnet for 1 minute. The magnetic bead-free fraction, the CD34⁺/CD31⁻ cells (hAT-derived progenitor cells), was collected, centrifuged (250g, 10 minutes), and suspended in the culture medium and the CD34⁺/CD31⁺ cell fraction (hAT-derived CECs) was removed from the magnet and suspended in endothelial cell culture medium. The CD34⁺/CD31⁻ cell content of the selected fraction was $92.2\% \pm 1.2\%$.

Cell Culture

The hAT-derived CECs were cultured in Endothelial Cell Growth Medium MV (ECGM-MV) (PromoCell, Heidelberg, Germany, <http://www.promocell.com>) on human fibronectin coated culture dishes. Human AT-derived CECs were used until passage 2 [5, 15]. The human AT-derived progenitor cells were cultured in Endothelial Cell Basal Medium (ECBM, which contains no growth factors) (PromoCell) supplemented with 10% FCS. Progenitor cells were used until passage 1 [5]. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated [16] and cultured until passage 8.

Preparation of Conditioned Media and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Human AT-derived CECs, hAT-derived progenitor cells, hAT-resident macrophages (CD14⁺/CD31⁺) that were isolated as previously described [15], and HUVECs were incubated with an equal amount of basal ECBM supplemented with 0.1% BSA for 24 hours. Mature adipocytes (400,000 cells) were included in fibrin gels (1.5 mg fibrinogen/ml ECBM supplemented with 25 units/ml α -thrombin) and cultured in ECBM supplemented with 0.1% BSA for 24 hours. Control gels were prepared without adipocytes. The conditioned media were collected, centrifuged (1,000g, 10 minutes, 4°C), and stored at -70°C until use. Release of SDF-1 was measured in conditioned media by enzyme-linked immunosorbent assay according to the instructions of the manufacturer (RayBiotech Inc., Norcross, GA, <http://www.raybiotech.com>). Note that the SDF-1 levels were measured in conditioned media from P0, P1, and P2

human AT-derived CECs and no statistical significant differences were found (not shown).

Transmigration Assay

Transmigration assays of hAT-derived progenitor cells were performed using 8- μ m pore HTS FluoroBlock inserts (Falcon; BD Biosciences, San Diego, <http://www.bdbiosciences.com>) coated with bovine gelatin (0.15 mg/cm²). The progenitor cells were loaded at 50,000 cells per insert (upper chamber) and conditioned media, SDF-1 in the presence or not of AMD3100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, <http://www.sigmaaldrich.com>) or CXCR-4 neutralizing antibody (clone 12G5; R&D Systems Inc., Minneapolis, <http://www.rndsystems.com>), were added to the lower chamber. The cells were allowed to migrate into the lower chamber for 20–24 hours. After the assays, the inserts were fixed (4% paraformaldehyde) and the nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole. For blocking experiments, the progenitor cells were preincubated with the indicated inhibitors at 37°C for 1 hour. The cell transmigration was quantified by counting the number of nuclei using a computer-assisted microscope (Nikon, Düsseldorf, Germany, <http://www.nikon.com>) at three distinct positions.

RNA Extraction and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay

Total RNAs were extracted from human mature adipocytes, hAT-CD34⁺/CD31⁻ cells, hAT-macrophages, and hAT-CD34⁺/CD31⁺ CECs using the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany, <http://www1.qiagen.com>). RNA concentrations were determined using a fluorometric assay (RiboGreen). RNA (0.5 μ g) was reverse-transcribed using the SuperScript III RNase H RT system (Invitrogen, Carlsbad, CA, <http://www.invitrogen.com>) according to the manufacturer's instructions (random hexamers and deoxynucleoside-5'-triphosphates were from Life Technologies, Rockville, MD, <http://www.lifetech.com>). Reverse transcription was also performed without superscript enzyme on RNA samples to ensure the absence of contaminating genomic DNA. Primers for human SDF-1 (CXCL12), hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), and CXCR-4 were provided by Applied Biosystems (Assay-On-Demand: Hs00171022_m1, Hs00153153_m1, and Hs00607978_m1, respectively; Foster City, CA, <http://www.appliedbiosystems.com>). All amplification reactions were performed in duplicate from 20 ng cDNA using the Mx4000 Multiplex Quantitative PCR System (Stratagene, La Jolla, CA, <http://www.stratagene.com>) using the following conditions: 50°C for 2 minutes and 95°C for 10 minutes followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. Results were analyzed with Stratagene MX4000 software, and all values were normalized to the levels of the ribosomal RNAs.

Coculture Between hAT-Derived CECs and hAT-Derived CD34⁺/CD31⁻ Progenitor Cells

Human AT-derived CECs plated at 60,000 cells per cm² were cultured in ECGM-MV on human fibronectin-coated 48-well cell culture plates until confluence. Then, hAT-derived progenitor cells were labeled with PHK26 according to the instructions of the manufacturer (Sigma-Aldrich) and 2,000–3,000 cells per well were placed in each well in ECBM/2% SVF. After 10 days of coculture, the cocultured cells were fixed and stained with the indicated antibodies.

Three-Dimensional Coculture Model

Human AT-derived CECs plated at 60,000 cells per cm² were cultured in ECGM-MV on human fibronectin-coated 48-well cell culture plates. Once confluent, the hAT-CECs were covered with 200 μ l of unpolymerized BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced (BD Biosciences) and incubated at 37°C for 30–45 minutes. Human AT-derived progenitor cells were harvested with trypsin and labeled with PHK26 according to the instructions of the manufacturer. The progenitor cells were resuspended in ECBM/0.1% BSA and 2,000–3,000 cells per well were loaded onto the matrigel-coated wells (200 μ l of cell suspension per well). After 24 hours of "coculture," progenitor cell tube formation (red fluorescent net-

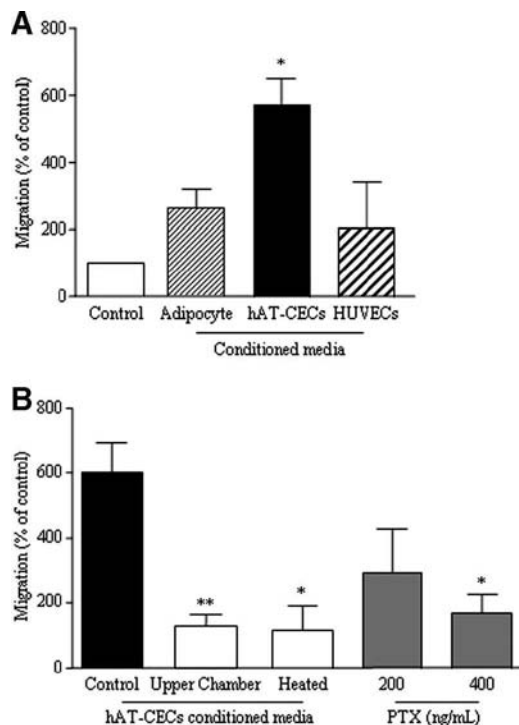


Figure 1. Human adipose tissue (AT)-derived CECs induce the chemotaxis of hAT-derived CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells. **(A):** Transwell migration of human AT-derived progenitor cells in the presence of control medium (Control) or conditioned media from adipocytes ($n = 14$), hAT-CECs ($n = 21$), and HUVECs ($n = 3$). * $p < .001$ when compared with control migration. **(B):** Transwell migration of hAT-derived progenitor cells in response to hAT-CEC conditioned medium in the lower chamber (hAT-CEC conditioned medium), in the upper chamber (upper chamber hAT-CECs) ($n = 3$), after 1-hour preincubation with increasing concentrations of pertussis toxin ($n = 4$) or after protein denatured hAT-CEC-conditioned medium (heated AT-CECs) ($n = 4$). * $p < .01$, ** $p < .001$ when compared with migration induced by hAT-CEC-conditioned medium. Abbreviations: CECs, capillary endothelial cells; hAT, human adipose tissue; HUVECS, human umbilical vein endothelial cells; PTX, pertussis toxin.

work) was assessed with a computer-assisted microscope (Nikon). Microphotographs of the center of each well were taken, and tube formation was quantified by measuring the total tube length using Lucia image software (Nikon, Tokyo, <http://www.nikon.com>). Tube formation of progenitor cells alone was used as a control. For blocking experiments, the progenitor cells were preincubated with the indicated inhibitors at 37°C for 1 hour.

Immunocytochemistry

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and immunostained with anti-human CXCR-4 monoclonal antibody (Abcam, Cambridge, U.K., <http://www.abcam.com>) (1:50) or platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) monoclonal antibody (Dako, Glostrup, Denmark, <http://www.dako.com>) (1:10) followed by staining with fluorescently labeled secondary antibody (1:200) (Invitrogen).

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm SEM from at least three independent experiments. Statistical analysis was performed by Student's *t* test or one-way analysis of variance followed by a Bonferroni post hoc test when appropriate. Differences were considered significant when $p < .05$.

www.StemCells.com

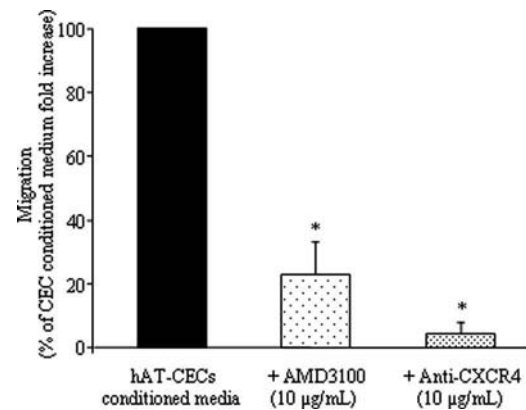


Figure 2. The stromal derived factor-1/CXCR-4 axis is involved in the hAT-derived progenitor cell chemotaxis toward hAT-CEC conditioned media. Transwell migration of hAT-derived progenitor cells in the presence of hAT-derived CEC-conditioned media after 1 hour of preincubation with 10 µg/ml of the CXCR-4 antagonist AMD3100 (+AMD3100) ($n = 6$) or with 10 µg/ml of an anti-CXCR-4 neutralizing antibody (+Anti-CXCR-4) ($n = 6$). * $p < .01$ when compared with migration induced by hAT-CEC-conditioned media. Abbreviations: CECs, capillary endothelial cells; hAT, human adipose tissue.

RESULTS

AT-Derived CECs Induce the Chemotaxis of the CD34⁺/CD31⁻ Cells

The effect of hAT-CECs on the migration of hAT-derived CD34⁺/CD31⁻ cells was assessed in modified Boyden chamber assays consisting of two cell chambers separated by a polycarbonate filter (8-µm pores). The lower chamber was filled up with control media or 24 hour-conditioned media from confluent hAT-CECs, mature adipocytes, or confluent HUVECs, and the cell suspension of hAT-derived CD34⁺/CD31⁻ cells was placed in the upper chamber. Cells that migrated across the filter and attached to the under part of the filter after 24 hours were counted after nuclei staining. As depicted in Figure 1A, conditioned media from mature adipocytes or from HUVECs did not induce any cell migration. Conversely, conditioned media from hAT-CECs led to the robust migration of the CD34⁺/CD31⁻ cells (5.7 ± 0.7 -fold increase, $n = 21$, $p < .001$). Human AT-CEC conditioned media failed to induce the migration of hAT-derived CD34⁺/CD31⁻ cells after protein denaturation of the conditioned media (Fig. 1B). Moreover, the stimulatory effect of conditioned media derived from hAT-CECs was lost when the conditioned media were applied in the upper chamber together with the CD34⁺/CD31⁻ cells. Taken together, the results showed that secreted proteins from hAT-CECs stimulated the directed chemotactic migration of the hAT-derived CD34⁺/CD31⁻ (Fig. 1B). In addition, preincubation of hAT-derived progenitor cells with increasing concentrations of pertussis toxin (PTX) (200 and 400 ng/ml) led to a concentration-dependent inhibition of the hAT-CEC-mediated migration ($76\% \pm 9\%$ of inhibition for 400 ng/ml of PTX, $p < .001$, $n = 4$) (Fig. 1B).

The CXCR-4/SDF-1 Axis Is Involved in the Chemotaxis of the CD34⁺/CD31⁻ Cells Mediated by AT-Derived CECs

To further identify the nature of the factor(s) involved in such an effect, the CD34⁺/CD31⁻ cells were preincubated with a CXCR-4 antagonist (AMD3100, 10 µg/ml) or with neutralizing anti-CXCR-4 antibody (10 µg/ml), and the effect of hAT-CEC conditioned media was then assessed. As shown in Figure 2, the

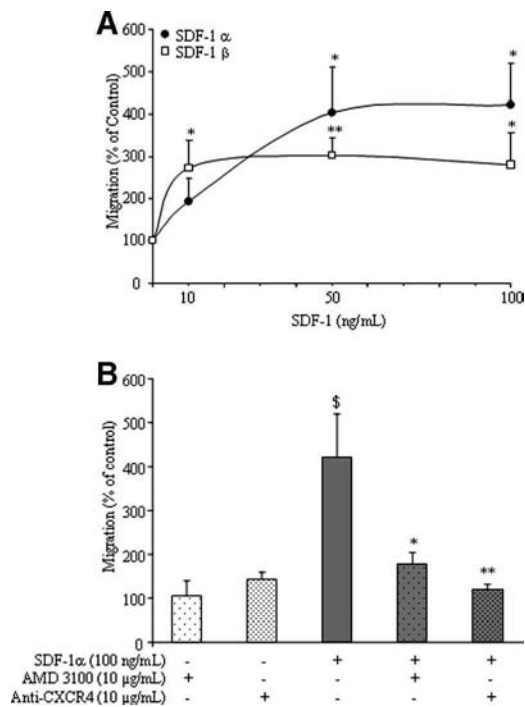


Figure 3. Functionality of the CXCR-4/SDF-1 axis in human adipose tissue. **(A):** Human adipose tissue (AT)-derived progenitor cells were exposed to increasing concentrations of SDF-1 α or SDF-1 β (10–100 ng/ml), and transwell migration was evaluated after 24 hours ($n = 3$ –8); * $p < .01$ and ** $p < .001$ compared with control. **(B):** Human AT-derived progenitor cells were preincubated (1 hour) with 10 μ g/ml CXCR-4 antagonist AMD3100 ($n = 3$) or with 10 μ g/ml anti-CXCR-4 neutralizing antibody ($n = 3$). Transwell migration toward 100 ng/ml SDF-1 α was then evaluated after 24 hours. $\$ p < .001$ compared with control, * $p < .01$ and ** $p < .001$ compared with SDF-1 α induced migration. Abbreviation: SDF-1, stromal derived factor-1.

hAT-CEC-mediated chemotaxis was suppressed when the progenitor cells were incubated with AMD3100 or with anti-

CXCR-4 neutralizing antibody (77% \pm 11% and 96% \pm 4% of inhibition, respectively, $p < .01$, $n = 6$). Moreover, as depicted in Figure 3A, increasing concentrations of recombinant SDF-1 α or -1 β , ligands for the CXCR-4, induced a concentration-dependent chemotaxis of hAT-derived progenitor cells that was significantly inhibited when the progenitor cells were preincubated with AMD3100 (58% \pm 7% of inhibition, $p < .01$, $n = 3$) or neutralizing anti-CXCR-4 antibody (72% \pm 3% of inhibition, $p < .01$, $n = 3$) (Fig. 3B). Of note, the chemotaxis of the CD34⁺/CD31⁻ cells toward granulocyte monocyte colony stimulating factor (20–100 ng/ml), stem cell factor (20–100 ng/ml), monocyte chemoattractant protein 1 (1–20 ng/ml), and interleukin 8 (20 ng/ml) was also evaluated, and none of the chemokines induced a statistically significant migration (data not shown).

CXCR-4 Is Expressed on CD34⁺/CD31⁻ Cells and SDF-1 Is Produced by hAT-Derived CECs

The expression of CXCR-4 in hAT-derived CD34⁺/CD31⁻ cells was then investigated by real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis. The results showed that transcripts for CXCR-4 were present in hAT-derived CD34⁺/CD31⁻ cells (Fig. 4B). Moreover, as presented in Figure 4A, the CXCR-4 protein expression was detected by immunocytochemistry on hAT-CD34⁺/CD31⁻ cells. Additionally, there was a positive correlation between the level of transcripts encoding for CXCR-4 in hAT progenitor cells and the one of HIF-1 α in the corresponding hAT-CECs (Fig. 4B, $p = .04$, $n = 14$). In parallel, SDF-1 mRNA expression was assessed in hAT-derived CECs and compared with the one of HUVECs and other cells from the SVF such as hAT-macrophages. As depicted in Figure 4C, the SDF-1 mRNA was mainly expressed by hAT-derived CECs and was below Ct values of 40 in HUVECs. Consistent with the mRNA expression, SDF-1 release was significantly higher in hAT-derived CECs as compared with other cell fractions present in AT-derived SVF such as macrophages (412.2 \pm 92.9 pg/ml vs. 34.4 \pm 18.1 pg/ml, respectively, $p < .001$, $n = 3$ –9) (Fig. 4D). The production of SDF-1 by HUVECs was 42

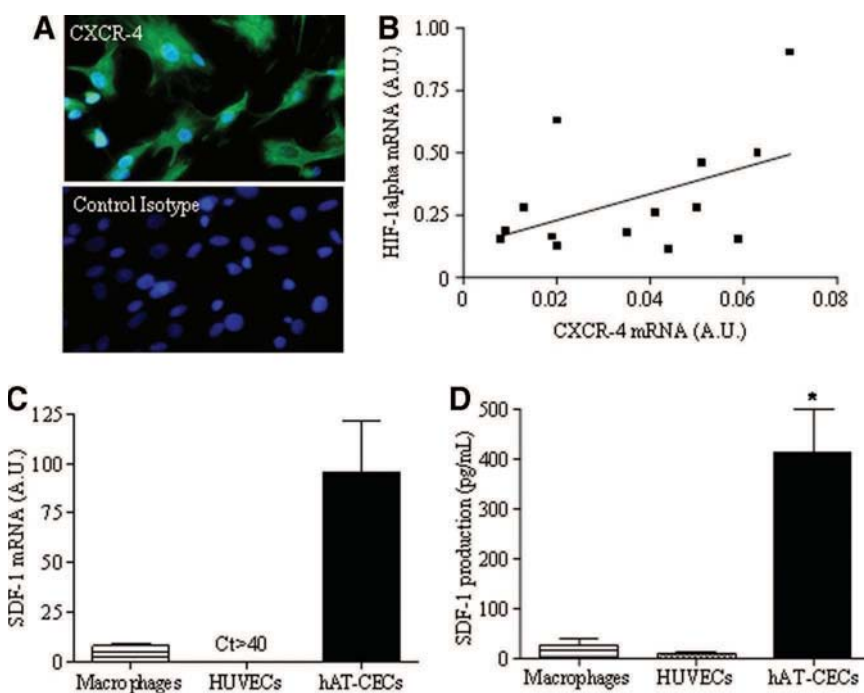


Figure 4. Expression of SDF-1 and CXCR-4 in hAT. **(A):** Upper panel: hAT-derived CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells were fixed and stained with antibodies directed against CXCR-4 receptor followed by fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated secondary antibodies. Lower panel: hAT-CD34⁺/CD31⁻ cells were stained with FITC-conjugated secondary antibodies. Representative fluorescence microscopy analysis is shown from $n = 3$. **(B):** Correlation between mRNA levels of CXCR-4 in hAT-progenitor cells and HIF-1 levels in hAT-CECs quantified by real-time polymerase chain reaction (PCR) experiments ($p = .04$, $n = 14$). **(C):** SDF-1 mRNA expression in hAT-macrophages ($n = 3$), HUVECs ($n = 4$), and hAT-CECs ($n = 6$) quantified by real-time PCR experiments. **(D):** Enzyme-linked immunosorbent assay of 24-hour conditioned media from hAT-macrophages ($n = 3$), HUVECs ($n = 4$), and hAT-CECs ($n = 9$). * $p < .05$ versus macrophage SDF-1 secretion. Abbreviations: A.U., arbitrary units; CECs, capillary endothelial cells; hAT, human adipose tissue; HIF-1, hypoxia inducible factor-1; HUVECs, human umbilical vein endothelial cells; SDF-1, stromal derived factor-1.

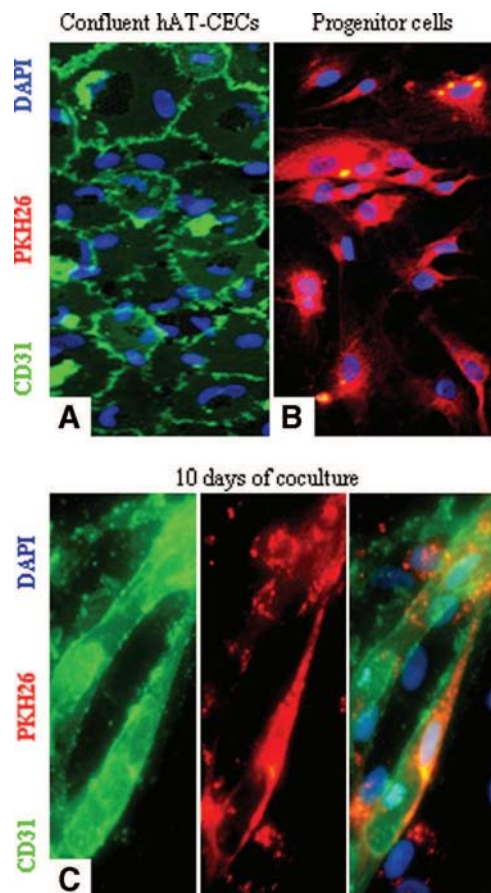


Figure 5. Human AT-derived progenitor cells incorporate into the network formed by hAT-CECs and express platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1). (A): Confluent hAT-CECs were fixed and stained with antibodies directed against PECAM-1 followed by fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated secondary antibodies. (B): Confluent PKH26 hAT-CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells were fixed and stained with antibodies against PECAM-1 followed by FITC-conjugated secondary antibodies. (C): Confluent hAT-CECs were cultured in the presence of PKH26-labeled hAT-derived progenitor cells for 10 days of coculture in endothelial basal medium/2% fetal calf serum. Cells were fixed and stained with antibodies directed against PECAM-1 followed by FITC-conjugated secondary antibodies. Representative fluorescence microscopy analysis is shown from $n = 3$ independent experiments. Abbreviations: CECs, capillary endothelial cells; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; hAT, human adipose tissue.

times lower than the one of hAT-CECs (9.84 ± 3.81 pg/ml, $n = 4$).

AT-Derived CECs Support the Differentiation of AT-Derived Progenitor Cells Toward an Endothelial Cell Phenotype

Coculture experiments of hAT-derived CECs and CD34⁺/CD31⁻ cells were performed. Human AT-derived CD34⁺/CD31⁻ cells were labeled with PKH26 and seeded onto confluent hAT-derived CECs (Fig. 5A). After 10 days of coculture, CD31 expression in the formal CD31 negative AT-derived progenitor cells (Fig. 5B) was analyzed. hAT-derived CECs formed a dense CD31 positive network into which PKH26 positive AT-derived progenitor cells incorporated and expressed the CD31 marker (Fig. 5C). To further analyze the effect of the hAT-derived CECs on the differentiation of the CD34⁺/CD31⁻ cells, a three-dimensional coculture model was developed. PKH26 labeled CD34⁺/CD31⁻ cells were seeded on the top of

a growth factor-reduced matrigel under which confluent hAT-derived CECs were present or not. As shown in Figure 6A, CD34⁺/CD31⁻ cells alone did neither migrate nor form capillary-like structures. Interestingly, the presence of hAT-derived ECs under the matrigel dramatically promoted the organization of hAT-CD34⁺/CD31⁻ cells into branched structures and pseudotubes ($360\% \pm 48\%$ of the total length obtained with hAT-CD34⁺/CD31⁻ cells alone, $p < .01$, $n = 7$) (Fig. 6B). Given the chemotactic effect mediated by the CXCR-4/SDF-1 axis, we studied the involvement of this system in the hAT-CEC-dependent tube formation by using a neutralizing anti-CXCR-4 antibody, the CXCR-4 antagonist AMD3100, or pertussis toxin (not shown). As depicted in Figure 6C and 6D, the tube formation induced by hAT-derived CECs was significantly inhibited in a concentration-dependent manner by the inhibitors ($24\% \pm 12\%$ and $67\% \pm 5\%$ of inhibition with $10 \mu\text{g/ml}$ and $100 \mu\text{g/ml}$ AMD3100, respectively; $41\% \pm 15\%$ and $93\% \pm 2\%$ of inhibition for $10 \mu\text{g/ml}$ and $20 \mu\text{g/ml}$ neutralizing anti-CXCR-4 antibody, respectively; $85\% \pm 0.5\%$ of inhibition for 200 ng/ml pertussis toxin, $n = 4-7$).

DISCUSSION

Although reports show that adipogenesis and angiogenesis are tightly correlated during the growth of fat mass [3, 17–20], little is known about the mechanisms that regulate the extension of its vasculature. In the present study we report that hAT-derived CECs induce the chemotaxis of hAT-derived progenitor cells. Moreover, we demonstrate that the presence of hAT-derived CECs promotes the differentiation and organization of hAT-derived hAT-CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells into capillary-like structures via a SDF-1/CXCR-4-dependent pathway.

In the last years, several reports have contributed to the evidence that the SVF cells are phenotypically heterogeneous and can express under specific culture conditions adipogenic, osteogenic, chondrogenic, and myogenic lineage markers but also endothelial, epithelial, and neural markers [5, 8, 21–23]. We have previously shown that native immunoselected CD34⁺/CD31⁻ cells present in the hAT-derived SVF display angiogenic and adipogenic potentials. Indeed, this cell population is able to differentiate into adipocyte-like cells [8] and into endothelial-like cells in vitro and in vivo to promote the neovascularization of ischemic muscle in mice [5]. Similar results were also described using adherent hAT-SVF [6, 7]. The mechanisms underlying such proangiogenic effects are still to be defined. Although the hAT-derived progenitor cells were shown to integrate into vessels in vivo [5, 6], they could also contribute to neovascularization through the production of proangiogenic factors [7, 24]. Nevertheless, such a population of progenitor cells may participate locally to the extension of the blood capillary network known to be associated with fat mass development. The present study was undertaken to analyze the potential crosstalk within the hAT between hAT-CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells and CECs. Indeed, the EC barrier has already been shown to interact with progenitor/stem cells [25–27]. Human AT-derived CECs specifically stimulated the migration of hAT-derived CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells through the release of soluble proteins. Human AT-derived CECs induced a chemotactic response since no random motility was observed when the cells were incubated in the same compartment with endothelial cell-derived conditioned media. Moreover, since hAT-derived CD34⁺/CD31⁻ progenitor cell chemotaxis was inhibited in the presence of pertussis toxin, which specifically prevents activation of Gi proteins coupled to chemokine receptors, the involvement of a chemokine ligand/receptor interaction was strongly

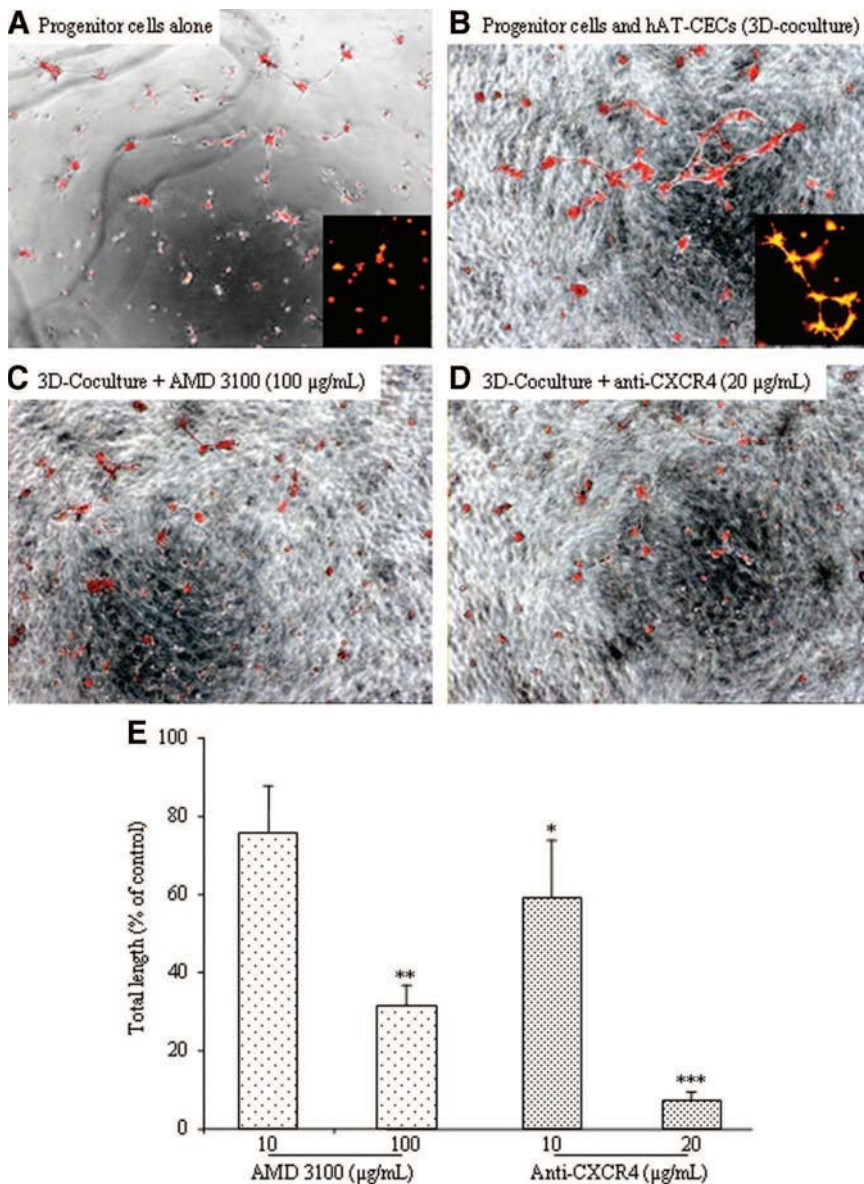


Figure 6. hAT-CECs induce the formation of capillary-like structures by hAT-derived progenitor cells via the stromal derived factor-1/CXCR-4 axis. hAT-CECs were cultured until confluence. Once confluent, hAT-CECs were covered with matrigel and PKH26 labeled hAT-derived progenitor cells were seeded onto the matrigel. After 24 hours, tube length was measured. **(A):** Representative pictures of hAT-derived progenitor cells alone (phase microscopy and fluorescent microscopy analyses, inset picture). **(B):** Representative picture of hAT-derived progenitor cells cocultured with hAT-CECs (phase microscopy and fluorescent microscopy analyses, inset picture). **(C, D):** Representative picture of 1-hour pretreated hAT-progenitor cells with AMD3100 (100 $\mu\text{g/ml}$) **(C)** or neutralizing anti-CXCR-4 (20 $\mu\text{g/ml}$) antibody **(D)** that were cocultured with hAT-CECs (phase microscopy and fluorescent microscopy analyses, inset picture). **(E):** Total length of the network formed by PKH26 labeled hAT-derived progenitor cells pretreated or not with increasing concentrations of AMD3100 or a neutralizing CXCR-4 antibody. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$ when compared with the network formed by adipose tissue (AT)-derived progenitor cells in the presence of AT-CECs ($n = 4-7$). Abbreviations: 3D, three-dimensional; CECs, capillary endothelial cells; hAT, human adipose tissue.

suggested. Finally, when CXCR-4 from hAT-CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells was neutralized by antibodies [28] or by the CXCR-4 antagonist (AMD3100) [29], hAT-derived CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells failed to migrate in response to hAT-derived CEC conditioned medium. Since real-time PCR and immunocytochemistry analyses showed the expression of CXCR-4 in native hAT-derived CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells, the present results demonstrate that activation of CXCR-4 of the hAT-derived CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells is involved in the hAT-derived CEC-dependent chemotaxis. In agreement, earlier work reported immunoreactivity to CXCR-4 in hAT [30], and a recent publication showed that CXCR-4 overexpression in hAT-stromal cells regulated cell motility [31]. The sole ligand of CXCR-4, described so far, is the CXCL12 chemokine also known as SDF-1 [32-34]. SDF-1, initially described as a product of bone marrow stromal cells [35], is expressed by several tissues including dendritic cells, endothelial cells and pericytes from normal skin [36], osteoblasts, and ECs from the bone marrow [37-39] and astrocytes and neurons from the brain [40]. SDF-1 exists as two isoforms, α and β , originating from alternative splicing of the CXCL12 gene [41-43]. Human AT-CECs

expressed and released more SDF-1 than the other cell types present in hAT. Moreover, SDF-1 was detected in very low amounts in conditioned media from HUVECs that did not stimulate the CD34⁺/CD31⁻ progenitor cell chemotaxis. Human AT-progenitor cells exhibited a concentration-dependent chemotaxis toward SDF-1 α and SDF-1 β that was inhibited in the presence of CXCR-4 antagonist or neutralizing antibodies. Taken together, the present findings suggest that SDF-1 released by hAT-CECs plays a major role in the CXCR-4-mediated chemotaxis of hAT-progenitor cells, although further experiments are needed to clearly rule out the involvement of other endothelial-derived factors. The couple SDF-1/CXCR-4 plays a pivotal role in multiple checkpoints of stem/progenitor cell biology in the bone marrow compartment including survival, proliferation, mobilization, and homing [10, 44, 45]. In a two-dimensional coculture system, hAT-derived progenitor cells were shown to incorporate into the network formed by hAT-CECs and to express the EC marker CD31, suggesting that hAT-CECs may, in addition to their effect on the migration, regulate the differentiation of hAT-CD34⁺/CD31⁻. To better define the role of paracrine factors, three-dimensional coculture

experiments were performed. The results clearly showed that hAT-derived progenitor cells migrate and assemble into capillary-like structures only in the presence of hAT-CECs. Moreover, when CXCR-4 either was antagonized or neutralized, hAT-progenitor cells failed to appropriately migrate and assemble into tubular structures on matrigel substrate.

Taken together, the present results show that hAT-derived CECs, through their production of paracrine factors such as SDF-1, modulate the migration but also the differentiation and organization of the hAT-derived CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells through the activation of CXCR-4. CXCR-4 mRNA levels are known to be upregulated by hypoxia through HIF-1 activation via the hypoxia responsive element in the 5' region of the CXCR4 gene [46, 47]. In the murine AT, hypoxic areas have been shown to be associated with obesity [48]. Interestingly, the mRNA levels of CXCR-4 from the CD34⁺/CD31⁻ were found to be positively correlated to HIF-1 α transcripts of the CECs. A recent publication has reported that the recruitment of CXCR-4 positive progenitor cells to regenerating foci or tissues was mediated by hypoxic gradients via HIF-1 induced expression of CXCR-4/SDF-1 axis [28]. Moreover, SDF-1 expression in ischemic tissue has been shown to primarily localize in ECs [36]. It is thus tempting to speculate that hypoxia within the hAT may promote the migration of resident hAT-derived CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells at active sites of neovascularization in the fat mass.

All together, the present results show that the migration and differentiation of hAT-derived progenitor cells are modulated by factors originating from hAT-derived CECs. The SDF-1/CXCR-4 axis appears to play a key role. Such an effect may be involved in the recruitment of hAT-derived progenitor cells to foci where SDF-1 is highly expressed such as neovascularization sites to promote the extension of the capillary network that occurs during the growth of the fat mass.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Valérie Wegner and Pauline Decaunes for their excellent technical assistance. We also thank Dr. Marie Sanson for her special help with HUVECs. This work was supported by grants from AVENIR INSERM, Alexander von Humboldt Foundation, and Sofja Kovalevskaja Price (Humboldt Foundation and the German Federal Ministry of Education and Research).

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicate no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- Hirsch J, Batchelor B. Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab* 1976;5:299–311.
- Bjorntorp P, Sjostrom L. Adipose tissue cellularity. *Int J Obes* 1979;3: 181–187.
- Crandall DL, Hausman GJ, Kral JG. A review of the microcirculation of adipose tissue: Anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation* 1997;4:211–232.
- Bouloumie A, Lolmede K, Sengenès C et al. Angiogenesis in adipose tissue. *Ann Endocrinol (Paris)* 2002;63:91–95.
- Miranville A, Heeschen C, Sengenès C et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 2004;110:349–355.
- Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: Physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004;109:656–663.
- Rehman J, Traktuev D, Li J et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004;109: 1292–1298.
- Sengenès C, Lolmede K, Zakaroff-Girard A et al. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* 2005; 205:114–122.
- Aiuti A, Webb IJ, Bleul C et al. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34⁺ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 1997;185:111–120.
- Lapidot T, Kollet O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia* 2002;16:1992–2003.
- Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M et al. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *STEM CELLS* 2006;24:1254–1264.
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche. *Cell* 2004;116:769–778.
- Shen Q, Goderie SK, Jin L et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 2004;304: 1338–1340.
- Kaplan RN, Psaila B, Lyden D. Niche-to-niche migration of bone-marrow-derived cells. *Trends Mol Med* 2007;13:72–81.
- Curat CA, Miranville A, Sengenès C et al. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: Induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 2004;53:1285–1292.
- Busse R, Lamontagne D. Endothelium-derived bradykinin is responsible for the increase in calcium produced by angiotensin-converting enzyme inhibitors in human endothelial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1991;344:126–129.
- Zhang QX, Magovern CJ, Mack CA et al. Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: Mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. *J Surg Res* 1997;67:147–154.
- Fukumura D, Ushiyama A, Duda DG et al. Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis. *Circ Res* 2003;93:e88–97.
- Brakenhielm E, Cao R, Gao B et al. Angiogenesis inhibitor, TNP-470, prevents diet-induced and genetic obesity in mice. *Circ Res* 2004;94: 1579–1588.
- Neels JG, Thinnès T, Loskutoff DJ. Angiogenesis in an in vivo model of adipose tissue development. *FASEB J* 2004;18:983–985.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211–228.
- De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett* 2003;89:267–270.
- Rodríguez AM, Elabd C, Amri EZ et al. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 2005;87:125–128.
- Nakagami H, Maeda K, Morishita R et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2542–2547.
- Papayannopoulou T. Bone marrow homing: The players, the playfield, and their evolving roles. *Curr Opin Hematol* 2003;10:214–219.
- Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood* 2005;106:1901–1910.
- Schmidt A, Ladage D, Steingen C et al. Mesenchymal stem cells trans-migrate over the endothelial barrier. *Eur J Cell Biol* 2006;85:1179–1188.
- Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004;10:858–864.
- De Clercq E. Inhibition of HIV infection by bicyclams, highly potent and specific CXCR4 antagonists. *Mol Pharmacol* 2000;57:833–839.
- Hazan U, Romero IA, Cancelli R et al. Human adipose cells express CD4, CXCR4, and CCR5 [corrected] receptors: A new target cell type for the immunodeficiency virus-1? *FASEB J* 2002;16:1254–1256.
- Cho HH, Kyoung KM, Seo MJ et al. Overexpression of CXCR4 increases migration and proliferation of human adipose tissue stromal cells. *Stem Cells Dev* 2006;15:853–864.
- Kucia M, Reza R, Miekus K et al. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: Pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *STEM CELLS* 2005;23:879–894.
- Stellos K, Gawaz M. Platelets and stromal cell-derived factor-1 in progenitor cell recruitment. *Semin Thromb Hemost* 2007;33:159–164.

- 34 Busillo JM, Benovic JL. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta* 2007;1768:952–963.
- 35 Bleul CC, Farzan M, Choe H et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996;382:829–833.
- 36 Salvucci O, Yao L, Villalba S et al. Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. *Blood* 2002;99:2703–2711.
- 37 Imai K, Kobayashi M, Wang J et al. Selective secretion of chemoattractants for haemopoietic progenitor cells by bone marrow endothelial cells: A possible role in homing of haemopoietic progenitor cells to bone marrow. *Br J Haematol* 1999;106:905–911.
- 38 Ponomaryov T, Peled A, Petit I et al. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest* 2000;106:1331–1339.
- 39 Yun HJ, Jo DY. Production of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and expression of CXCR4 in human bone marrow endothelial cells. *J Korean Med Sci* 2003;18:679–685.
- 40 Tanabe S, Heesen M, Yoshizawa I et al. Functional expression of the CXC-chemokine receptor-4/fusin on mouse microglial cells and astrocytes. *J Immunol* 1997;159:905–911.
- 41 Tashiro K, Tada H, Heilker R et al. Signal sequence trap: A cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 1993;261:600–603.
- 42 Shirozu M, Nakano T, Inazawa J et al. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 1995;28:495–500.
- 43 De La Luz Sierra M, Yang F, Narazaki M et al. Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. *Blood* 2004;103:2452–2459.
- 44 Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol* 2002;30:973–981.
- 45 Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension* 2005;45:321–325.
- 46 Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J et al. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* 2003;425:307–311.
- 47 Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L et al. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: Implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest* 2006;86:1221–1232.
- 48 Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 2007;56:901–911.

Discussion :

L'ensemble de ce travail a permis de montrer pour la première fois que les cellules endothéliales du TA, par leur production de facteurs solubles dont le facteur chémoattractant SDF-1, modulent la migration des cellules souches/progénitrices CD34⁺/CD31⁻ du TA et leur activité angiogénique. Le couple SDF-1/CXCR4 pourrait donc jouer un rôle central dans le recrutement des cellules progénitrices et dans l'induction de leur différenciation en cellules endothéliales afin de participer à la néovascularisation qui accompagne la croissance du TA. Il est connu que le recrutement des cellules progénitrices CXCR4⁺ dans les tissus en régénération est médié par des gradients d'hypoxie qui induit l'expression de SDF-1 via HIF-1 α ³⁸⁸. Dans le TA, l'expression dans les cellules progénitrices du récepteur au SDF-1, le CXCR4, corrélant positivement avec l'expression de HIF-1 α dans les cellules endothéliales, il est tentant de spéculer que le recrutement des cellules CD34⁺/CD31⁻ se fait au niveau des zones hypoxiques, qui ont été montrées dans le TA humain²⁷⁶, pour supporter un processus angiogénique. Toutefois, les cellules CD34⁺/CD31⁻ du TA pourraient aussi être mobilisée du TA vers d'autres sites d'ischémie pour une éventuelle réparation comme en sont capables les CSM pour contribuer à la réparation des lésions cérébrales³⁸⁹, osseuses³⁹⁰ ou cardiaques³⁹¹. Le SDF-1 existe sous plusieurs isoformes issues de l'épissage alternatif du gène CXCL12 : le SDF-1 α , β , γ , δ , ϵ et ϕ ³⁹². De façon intéressante, alors que l'analyse de l'expression des transcrits du SDF-1 n'a pas posé de problème, la mise en évidence de la production de SDF-1 par les cellules endothéliales du TA a été techniquement plus complexe et possible grâce à l'utilisation d'un seul kit de détection qui ne précisait pas l'isoforme du SDF-1. Cette observation laisse penser que le SDF-1 sécrété par le TA est une forme spécifique peu commune. Cependant des expériences supplémentaires sont à réaliser pour confirmer le rôle du couple dans SDF-1/CXCR4 *in vivo* et son implication dans le développement du TA.

IV.2. Etudes *in vivo*.

Nous venons de voir que les CECs du TA exerçaient, *in vitro*, un fort pouvoir chémoattractant sur les cellules progénitrices CD34⁺/CD31⁻ du TA humain via la sécrétion de SDF-1. De plus, il a récemment été montré que le couple SDF-1/CXCR4 pourrait être impliqué dans l'infiltration des cellules immunes, notamment des lymphocytes T, qui est associée avec le développement du TA²⁸⁵. Afin de confirmer ces observations faites *in vitro* et comprendre le

rôle de l'axe SDF-1/CXCR4 *in vivo* sur le développement du TA et sa composition cellulaire, des expériences d'injection chroniques d'un antagoniste au récepteur CXCR4, le composé AMD3100³⁹³, ont été faites chez des souris.

Des souris mâles C57Bl/6 de 6 semaines ont reçu des injections d'AMD3100 (AMD) à la dose de 2.5 mg/kg ou une solution saline (contrôle) en administration sous-cutanée, à raison de 3 fois par semaine pendant 2 semaines. Au sacrifice, le poids total des souris, celui de la masse maigre et de la masse grasse ont été déterminés. Le sang, la moelle osseuse et les TA sous-cutané et viscéral (TA périgonadique et TA périrénal) ont été prélevés afin d'en déterminer la composition cellulaire par cytométrie de flux. (Figure 34 pour protocole)

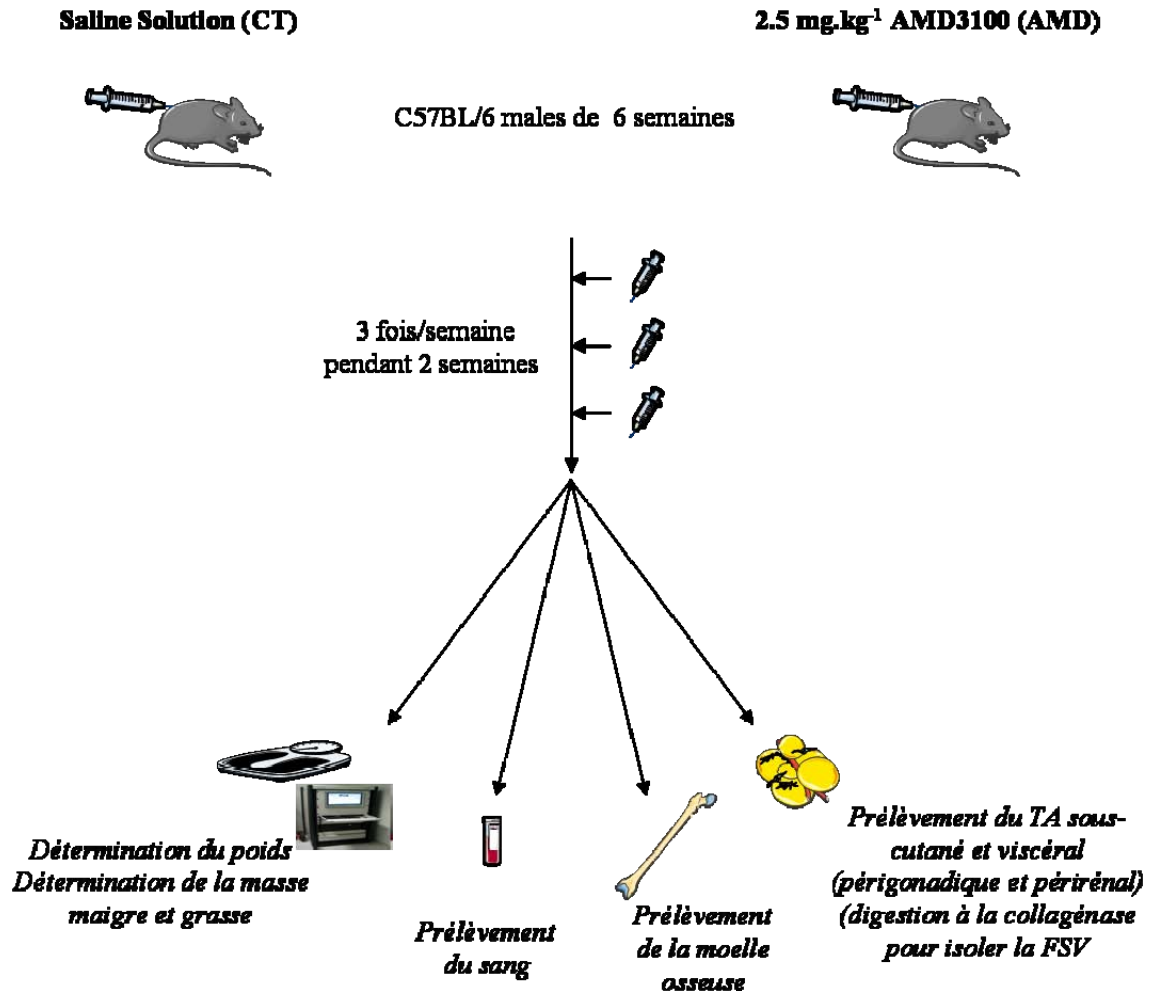


Figure 34 : Protocole de l'effet chronique de l'AMD3100 sur le poids des souris et la composition cellulaire du TA.

Des souris males C57Bl/6 de 6 semaines ont reçu des injections d'AMD3100 ou de solution saline à raison de 3 fois par semaine pendant 2 semaines. Après 2 semaines de traitement, le poids des souris a été déterminé par pesée et la quantité de masse maigre et de masse grasse évaluée par résonance magnétique. Au sacrifice, le sang, la moelle osseuse et le TA sous-cutané et viscéral ont été prélevés et leurs compositions cellulaires en cellules progénitrices et immunes ont été évaluées par cytométrie en flux.

IV.2.1. Effets de l'AMD3100 sur le poids corporel.

Après 2 semaines d'injections répétées, les souris traitées à l'AMD3100 ont un poids total augmenté (24.4 g vs 25.3 g, contrôle vs traité, $p < 0.05$, $n = 6$, Figure 35 A) associé à une augmentation de leur masse grasse (Figure 35 C) sans modification de leur masse maigre (Figure 35 B). Prises collectivement, ces données montrent que des souris ayant subi un

traitement chronique à l'AMD3100 ont un contenu en masse grasse plus élevé que des souris contrôle.

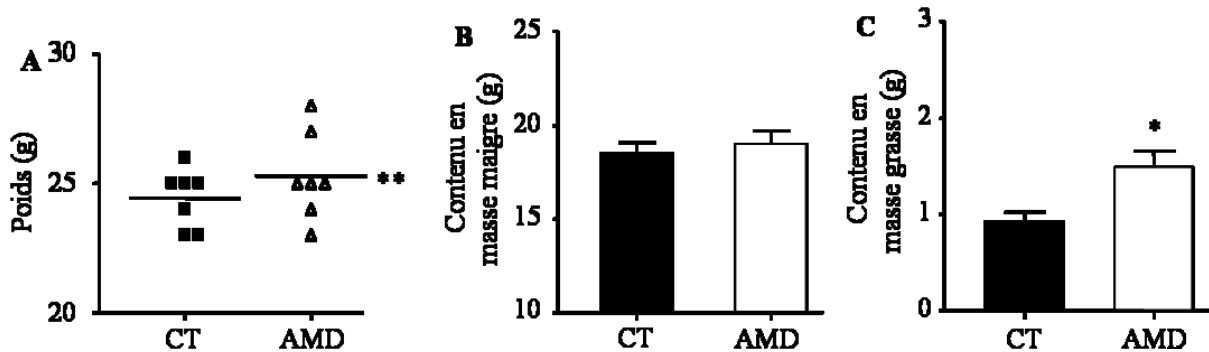


Figure 35 : Effets de l'AMD3100 sur le poids et la composition corporelle des souris.

Après 2 semaines d'un traitement chronique à l'AMD3100, le poids des souris contrôle (CT) et traitées (AMD) âgées de 6 semaines au début du protocole (A) a été évalué par pesée. Le contenu en masse maigre (B) et en masse grasse (C) a été déterminé par résonance magnétique. * $P < 0,05$, contrôle vs traité, $n = 6$ dans chaque groupe.

IV.2.2. Effets de l'AMD3100 sur la composition cellulaire du sang et de la moelle osseuse.

Les souris traitées à l'AMD3100 ont un pourcentage de cellules Sca-1⁺ sanguines augmenté (Figure 36 A) ainsi que le pourcentage des cellules Sca-1⁺/CD34⁺ (Figure 36 B) et celui de la population CD45⁺ (Figure 36 C). Cette augmentation de cellules Sca-1⁺ et Sca-1⁺/CD34⁺ dans la circulation sanguine en réponse à une perturbation du couple SDF-1/CXCR4 suggère une mobilisation des cellules des cellules souches/progénitrices.

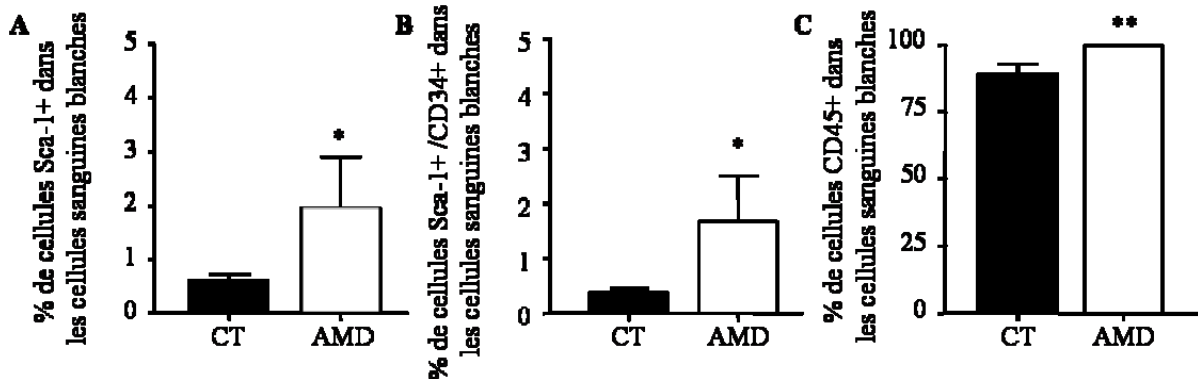


Figure 36 : Effets de l'AMD3100 sur la composition cellulaire sanguine.

Après 2 semaines d'un traitement chronique à l'AMD3100, le sang des souris contrôle (CT) et traitées (AMD) a été prélevé au sacrifice. Le pourcentage de cellules Sca-1⁺ (A), des cellules Sca-1⁺/CD34⁺ (B) et CD45⁺ (C) a été déterminé par cytométrie en flux. *P<0,05, **P<0,01 contrôle vs traité, n=4 dans chaque groupe.

L'étude de la composition cellulaire de la moelle osseuse a permis de confirmer la mobilisation des cellules souches/progénitrices depuis la moelle osseuse vers la circulation sanguine. En effet, le pourcentage de cellules Sca-1⁺ dans la moelle osseuse passe de 3.2 ± 0.2 % chez les animaux contrôle à 1.7 ± 0.3 % chez les animaux traités à l'AMD3100 ($p < 0.05$, Figure 37 A). En revanche, la quantité de cellules CD45⁺ ne varie pas (Figure 37 C). Comme attendu, l'augmentation concomitante du pourcentage de cellules souches/progénitrices dans le sang avec la diminution de la même population cellulaire dans la moelle osseuse montre qu'en réponse au traitement à l'AMD3100, les cellules souches/progénitrices de la moelle osseuse sont mobilisées dans la circulation sanguine. Cette mobilisation s'accompagne d'un changement morphologique de la moelle osseuse. En effet, comme le montre la Figure 37 D, la moelle osseuse des souris traitées contient plus d'adipocytes que la moelle osseuse des souris contrôle.

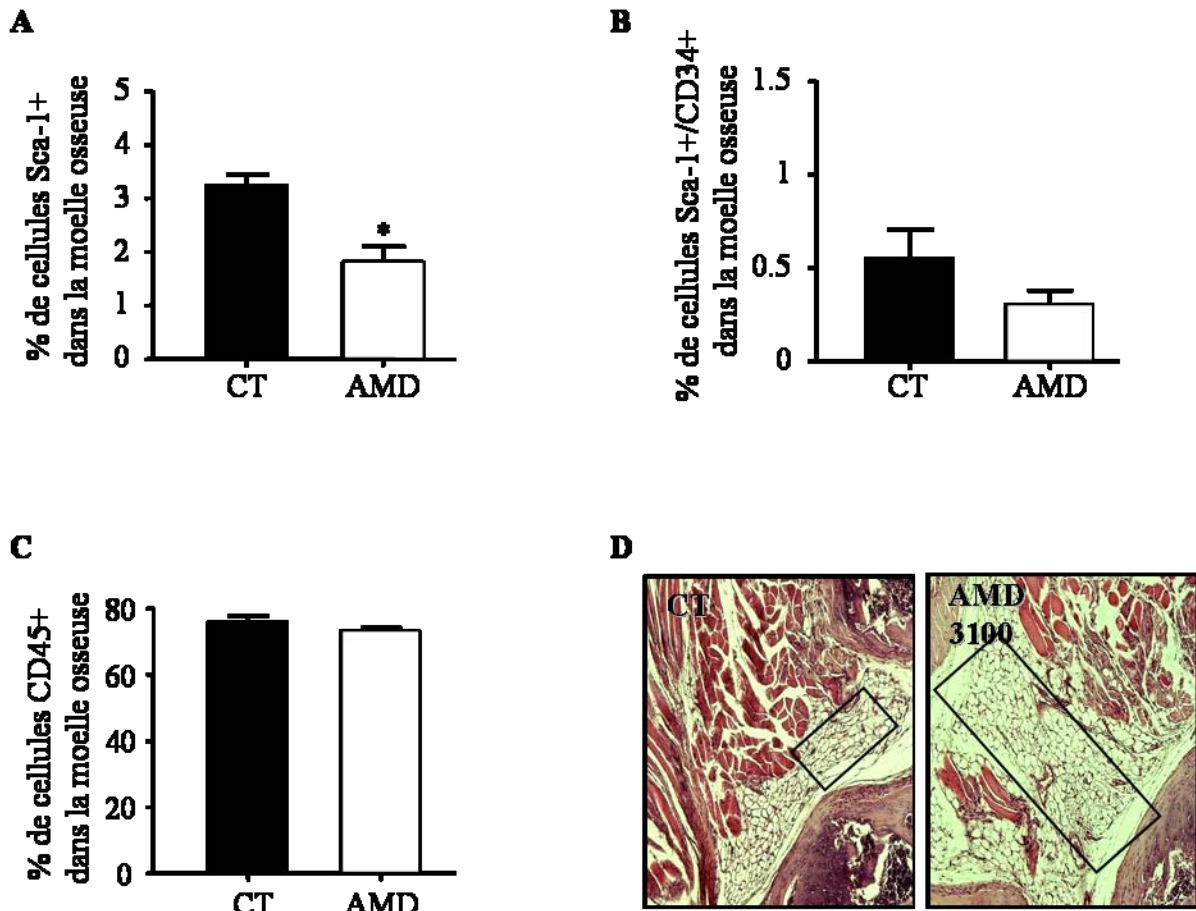


Figure 37 : Effets de l'AMD3100 sur la composition cellulaire de la moelle osseuse.

Après 2 semaines d'un traitement chronique à l'AMD3100, la moelle osseuse des souris contrôle (CT et traitées (AMD) a été prélevé au sacrifice. Le pourcentage de cellules Sca-1⁺ (A), des cellules Sca-1⁺/CD34⁺ (B) et CD45⁺ (C) a été déterminé par cytométrie en flux. Les fémurs des souris ont été fixés et inclus en paraffine. Les coupes réalisées ont été colorées à l'hémalun-éosine. Des photographies représentatives de 4 expériences indépendantes sont présentées (grossissement x200) (D). *P<0,05, contrôle vs traité, n=4 dans chaque groupe.

IV.2.3. Effets de l'AMD3100 sur la composition cellulaire du TA.

Les souris traitées à l'AMD3100 ont le poids de leurs TA sous-cutané et viscéral significativement augmenté par rapport aux souris contrôle (Figure 38 A et B). Concernant l'effet de l'administration chronique d'AMD3100 sur la composition cellulaire du TA, l'AMD3100 induit une diminution significative de 10.5 % de cellules Sca-1⁺ dans le TA sous-cutané (Figure 38 A, p<0.05, n=4) et parmi les cellules Sca-1⁺, c'est la population CD45⁻ qui diminue (Figure 38 C). Le TA sous-cutané des souris traitées à l'AMD3100 contient une proportion de cellules immunitaires CD45⁺ plus importante que le TA des souris contrôle

(43.5 ± 0.5 % vs 61.6 ± 5.8 %, contrôle vs traité, $p < 0.05$, $n=4$ dans chaque groupe) (Figure 38 E). En revanche, le traitement chronique à l'AMD3100 n'a aucun effet sur la composition cellulaire du TA viscéral des souris (Figure 38 B, D et E)

En conclusion, un traitement chronique à l'AMD3100 induit des changements de composition cellulaire de la FSV avec une diminution du contenu en cellules progénitrices et une augmentation des cellules immunes. De plus, ces changements sont observés uniquement dans le TA sous-cutané et suggèrent que la dynamique cellulaire n'est pas la même suivant la localisation anatomique du TA.

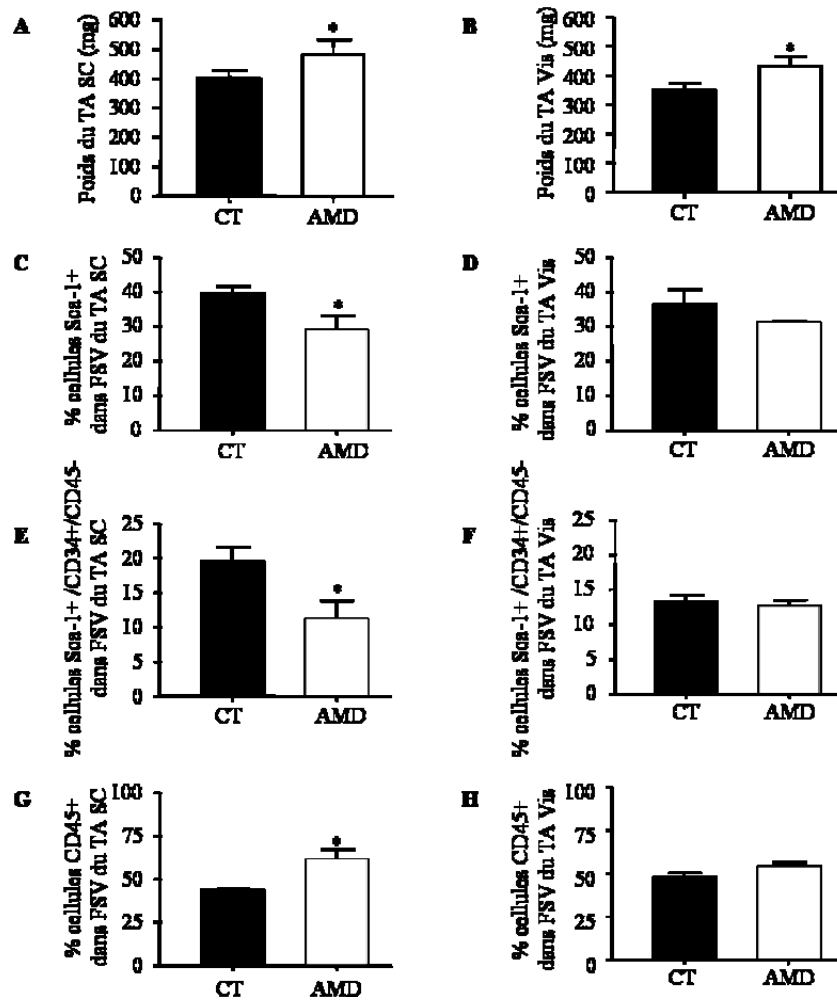


Figure 38 : Effets de l'AMD3100 sur la composition cellulaire du TA sous-cutané (SC) et viscéral (Vis).

Après 2 semaines d'un traitement chronique à l'AMD3100, le TA sous-cutané (A, C, E et G) et viscéral (B, D, F et H) des souris contrôle (CT) et traitées (AMD) a été prélevé et pesé (A et B) au sacrifice. Après digestion à la collagénase, le pourcentage de cellules Sca-1⁺ (C et D), des cellules Sca-1⁺/CD34⁺/CD45⁻ (E et F) et CD45⁺ (G et H) a été déterminé par cytométrie en flux. *P<0,05, **P<0,01 contrôle vs traité, n=4 dans chaque groupe.

Discussion :

Cette étude préliminaire a montré que l'AMD3100 en traitement chronique induit une mobilisation des cellules souches/progénitrices de la moelle osseuse comme lors de son utilisation classique en traitement aigu³⁹⁴. Cette mobilisation est accompagnée d'une réorganisation morphologique de la moelle osseuse conduisant à une augmentation de son contenu en adipocytes. Parallèlement au changement de composition cellulaire du sang et de la moelle osseuse, les souris traitées à l'AMD3100 voient leur contenu en masse grasse

augmenté. Ce développement du TA s'accompagne, au sein de la FSV, d'une diminution de la proportion des cellules progénitrices dans le TA, identifiées Sca-1⁺/CD34⁺/CD45⁻, et d'une augmentation de la proportion des leucocytes. De façon surprenante, ces changements de proportions cellulaires touchent seulement le TA sous-cutané. L'ensemble de ces résultats suggère que le couple SDF-1/CXCR4 joue un rôle, *in vivo*, dans le développement du TA. De plus, il est tentant de spéculer que le TA sous-cutané, contrairement au TA viscéral, serait susceptible d'accomplir des échanges de cellules avec la moelle osseuse. Cependant, cette diminution de cellules progénitrices dans le TA sous-cutané des souris traitées à l'AMD3100 pourrait aussi être la conséquence d'un engagement dans la voie adipocytaire ou d'une différenciation adipocytaire puisque ces souris voient leur poids augmenté. En effet, il a récemment été montré que des souris soumises à un régime gras présentaient une hyperplasie adipocytaire de leur TA sous-cutané et un hypertrophie adipocytaire du TA viscéral ³⁶³. Cependant, le manque de marqueur spécifique des cellules progénitrices du TA ne permet ni de définir l'origine des cellules mobilisées dans le sang, ni de déterminer si l'augmentation de cellules progénitrices sanguines est la conséquence d'une mobilisation des cellules de la moelle osseuse et/ou du TA, ni même de déterminer si les cellules circulantes peuvent se nicher dans le TA. L'analyse de la FSV du TA de souris C57Bl/6-Ly5.1 (CD45.1) irradiées puis réhabilitées avec des cellules C57Bl/6-Ly5.2 (CD45.2) en régime normo ou hyperlipidique, traitées ou non à l'AMD3100, pourrait permettre de mieux comprendre la dynamique des échanges de cellules immunes entre la moelle osseuse et le TA. Toutefois cette approche ne permet pas de répondre à la question du TA comme lieu de nichage des cellules souches circulantes ainsi que l'importance du couple SDF-1/CXCR4 dans le développement du TA puisque les cellules progénitrices du TA n'expriment pas le marqueur CD45. Par contre, l'utilisation de cellules isolées à partir de moelle osseuse de souris GFP réinjectées à des souris normales irradiées ou l'injection de cellules isolées à partir de souris CXCR4^{-/-} à des souris CXCR4^{+/+} irradiées ³⁹⁵ apporterait certainement quelques éléments de réponse. Cependant des résultats contradictoires quant à la mobilisation des cellules de la moelle osseuse vers le TA subsistent à ce jour pour que l'on puisse trancher ^{262, 263}. Enfin, on peut espérer que la sortie des cellules progénitrices du TA vers la circulation va pouvoir être étudiée grâce à une technique de perfusion du TA *in situ* chez la souris grâce à une collaboration avec l'équipe de Pr Valet de l'unité INSERM U858. Cette technique qui isole le TA sous-cutané inguinal de la souris de la circulation sanguine, permet non seulement

de perfuser spécifiquement au TA un produit d'intérêt mais aussi, en réponse à ce produit, de récupérer des facteurs sécrétés par le TA ou des cellules mobilisées dans la circulation.

*CONCLUSION –
PERSPECTIVES*

Ce travail de thèse avait pour but de mieux caractériser le phénotype des cellules souches/progénitrices CD34⁺/CD31⁻ du TA humain à l'état natif et de définir leur localisation au sein du tissu ainsi que le rôle du microenvironnement dans lequel elles résident, dans le contrôle de leurs capacités de prolifération, de différenciation et de migration.

Le TA est un organe complexe ayant un rôle important dans la gestion des stocks lipidiques mais aussi contenant en son sein une population importante de cellules souches et/ou progénitrices qui ont des capacités de différenciation nécessaires à la croissance du tissu dans le cas de la mise en place de l'obésité. Ces cellules expriment, à l'état natif, le marqueur CD34 ce qui a permis de les visualiser *in situ* et de déterminer leur localisation majoritairement stromale et peu périvasculaire. La croissance du TA qui a lieu lors de la mise en place et du développement de l'obésité a pour conséquence un changement du microenvironnement au sein même du tissu par des modifications métaboliques et sécrétoires mais aussi de populations cellulaires. Ces changements auraient comme effets d'augmenter l'activité de prolifération des cellules souches/progénitrices pour maintenir un stock constant de cellules que le tissu pourrait utiliser pour créer de nouveaux adipocytes chez les personnes présentant une obésité sévère et ainsi participer à la croissance du TA.

Nous avons montré que les activités CFU-F, adipogéniques et ostéogéniques, dans le TA, étaient portées par la population cellulaire CD34⁺ qui exprime de nombreux marqueurs membranaires mésenchymateux de référence (CD13, CD29, CD73 et CD90). Ainsi, nous avons clarifié le phénotype de cette population cellulaire quant à l'expression du marqueur CD34 et des marqueurs des péricytes. En effet, ce travail de thèse montre qu'à l'état natif, les cellules souches/progénitrices du TA sont positives pour le marqueur CD34 et expriment peu ou pas les marqueurs des péricytes tels que CD140b, CD146, NG2 ou l' α SMA. En revanche, lorsque ces cellules sont mises en culture, elles perdent l'expression du CD34 et se mettent à exprimer des marqueurs des péricytes et ce d'autant plus qu'elles prolifèrent. Ces travaux confirment l'importance des conditions de culture sur la transformation phénotypique qui peut se produire *in vitro*.

Au sein du TA, certaines cellules souches/progénitrices CD34⁺ se localisent le long des vaisseaux sanguins mais on les retrouve majoritairement localisées dans le stroma du TA *i.e.* entre les adipocytes. Le phénotypage des cellules souches/progénitrices du TA à l'état natif, qui ont des caractéristiques semblables aux CSM isolées à partir de la moelle osseuse, a été

une étape essentielle dans l'étude des cellules souches/progénitrices de type mésenchymateux car elle a permis pour la première fois de voir et de localiser des CSM *in vivo*, ce qui n'avait jamais pu être fait au niveau de la moelle osseuse.

Le nombre des cellules souches/progénitrices du TA évolue en fonction de l'état d'obésité et, de façon intéressante, les personnes présentant une obésité massive hyperplasique (IMC > 35 kg/m²) voient une diminution du nombre de ces cellules associée à une augmentation de leur expression en gènes de l'adipogenèse (GPDH et LPL) suggérant ainsi leur engagement dans la voie adipocytaire pour potentiellement supporter la formation de nouveaux adipocytes. Cette observation suggère pour la première fois chez l'homme, le rôle *in vivo* de ces cellules souches/progénitrices, dans le développement du TA. Les cellules souches/progénitrices isolées chez des patients obèses massifs pourraient donc préférentiellement se différencier en adipocytes, ce qui soulève la question de leur éventuelle utilisation comme outil en thérapie cellulaire chez ce type de patient.

Nous avons également pu montrer que la fraction cellulaire CD34⁺/CD31⁻ contient un pool de cellules souches/progénitrices supportant à la fois des potentialités adipogéniques et angiogéniques. Une condition de culture, bien que préliminaire, nous a permis d'étudier simultanément les capacités adipogéniques et angiogéniques de ces cellules ainsi que de montrer que les sécrétions des adipocytes, des cellules endothéliales et des macrophages semblent orienter les cellules souches/progénitrices dans la voie angiogénique. Cependant, la question essentielle que pose ces résultats est celle de déterminer si les cellules CD34⁺/CD31⁻ constitue un mélange de cellules uni-, bi- ou multipotentes. En effet, plusieurs données suggèrent que cette population n'est pas homogène. Notons que, l'adipogenèse et l'angiogenèse n'atteignent jamais 100% des cellules. Cette observation, ajoutée à celle de l'expression hétérogène des marqueurs de surface d'une part et d'autre part, à la localisation tissulaire à la fois faiblement périvasculaire et majoritairement stromale, semble suggérer que les cellules CD34⁺/CD31⁻ constituent une population hétérogène. Il est ainsi possible de spéculer que les cellules CD34⁺/CD31⁻ selon leur localisation tissulaire présentent des potentialités différentes. Ainsi, une expérience d'analyse clonale associée à un tri cellulaire encore plus sélectif par l'utilisation d'un trieur de cellules (FACS) pourrait permettre de déterminer l'homogénéité ou l'hétérogénéité de cette population cellulaire. Cependant, ce type d'analyse nécessite une étape de prolifération *in vitro* qui, comme nous l'avons vu, modifie l'expression de certains marqueurs de surface et dont l'effet sur le devenir cellulaire est à définir puisque jusqu'à présent nos études ont été réalisées sur des cellules en culture

primaire. Notons que nos résultats préliminaires montrent que les cellules CD34⁺/CD31⁻ perdent leur capacité angiogénique après le premier passage alors que leur potentiel adipogénique est maintenu (données personnelles).

La présence, au sein du TA humain, de cellules aux potentiels semblables à ceux des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse pose la question de leur origine ainsi que celle de leur mobilisation potentielle. En effet, cette population cellulaire pourrait être résidente et capable d'auto-renouvellement, comme nous avons pu le voir dans ce travail de thèse. Mais il est également possible de spéculer sur le fait que ces cellules sont le résultat d'un recrutement par le TA à partir de cellules circulantes issues de la moelle osseuse comme l'ont suggérés les travaux de Hong *et al.* ²⁶¹. En effet, nous avons vu qu'en réponse aux sécrétions des cellules endothéliales du TA et notamment en réponse au SDF-1, les cellules souches/progénitrices sont capables de migrer. De plus, le TA sécrétant de nombreuses protéases telles que MMP-2 et -9 (publication 3) ou la cathepsine S ³⁹⁶ impliquées dans le remodelage matriciel qui a lieu au cours de la mise en place de l'obésité, pourraient aussi être impliquées dans la mobilisation des cellules souches/progénitrices CD34⁺/CD31⁻ puisque le rôle des MMP est connu dans la mobilisation des CSM ³⁹⁷. Par leurs capacités de migration, les cellules souches/progénitrices CD34⁺/CD31⁻ pourraient donc être recrutées dans le TA mais pourraient tout aussi bien être mobilisées vers des sites d'ischémie ou d'inflammation pour une éventuelle utilisation par l'organisme. Par ailleurs, du fait de la sécrétion de SDF-1 par les plaques d'athéromes qui se forment au cours du phénomène d'athérosclérose ³⁹⁸, les cellules souches/progénitrices du TA pourraient être recrutées et participer, avec les macrophages spumeux, à la création ou à la croissance de la plaque. Bien que le potentiel migratoire des cellules souches/progénitrices CD34⁺/CD31⁻ a été montré *in vitro*, des expériences complémentaires *in vivo* sont indispensables afin de savoir si elles peuvent réellement entrer ou sortir du TA et sont en cours d'étude au laboratoire.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux effets du microenvironnement sur la prolifération, la différenciation et la mobilisation des cellules CD34⁺/CD31⁻. Cependant, les cellules souches/progénitrices du TA sont, après les adipocytes, le type cellulaire le plus représenté au sein du TA, elles représentent entre 40 et 60 % des cellules de la fraction stroma-vasculaire et sécrètent de nombreux facteurs. Comme les CSM de la moelle osseuse, les cellules souches/progénitrices du TA possèdent des effets immunomodulateurs en étant capables de supprimer la prolifération de lymphocytes T ²⁰². Le

TA renferme de nombreuses cellules immunitaires dont le nombre augmente avec l'obésité (Publication 4 et 5 en annexe) et malgré l'état d'inflammation de bas niveau qui s'installe chez le patient obèse, les macrophages du TA ne présentent paradoxalement pas de phénotype pro-inflammatoire mais un phénotype plutôt de type réparateur. Il est donc tentant de spéculer que les cellules souches/progénitrices, par leurs effets immunomodulateurs, puissent être responsables du phénotype des macrophages mais aussi des autres cellules immunes telles que les lymphocytes présentes dans le TA. Des expériences de co-culture de macrophages ou de lymphocytes avec des cellules souches/progénitrices du TA permettraient l'étude des effets immunomodulateurs.

Comme nous le voyons, de nombreuses questions persistent encore concernant la nature des cellules souches/progénitrices du TA. Malgré les fortes similitudes qu'il existe entre les cellules souches/progénitrices du TA et les CSM de la moelle osseuse d'un point de vue morphologique, phénotypique, et par leurs capacités de différenciation *in vitro* ou leurs propriétés immunomodulatrices, des expériences comparatives à partir de cellules triées CD34⁺ de la moelle osseuse et du TA permettraient d'apporter dans un premier temps d'apporter des éléments de réponse. Il est intéressant de préciser que des expériences de transfert adoptif de cellules issues de la moelle osseuse de souris GFP (green fluorescent protein) dans des souris « normales » soumises à un régime riche en graisse afin de définir si les CSM de la moelle osseuse colonisent le TA et participe à sa croissance ont été réalisées. Ces données suggèrent qu'au cours du développement du TA qui a lieu avec l'obésité, les nouveaux adipocytes formés ne proviennent pas ou en très petit nombre de cellules issues de la moelle osseuse^{262, 263}. Ces résultats ne permettent pas de déterminer l'origine des cellules souches/progénitrices résidentes du TA mais il est tentant de spéculer que les cellules souches mésenchymateuses du TA et de la moelle osseuse soient des cellules identiques dont la domiciliation se fait dans des étapes précoces du développement.

La présence de cellules souches/progénitrices en aussi grand nombre au sein du TA suggère leur importance dans le développement de ce tissu, cependant leur réel potentiel de différenciation *in vivo* ainsi que leur fonctionnalité reste un large domaine d'investigation. Sont-elles aussi nombreuses au sein du tissu dans le but de se différencier en adipocytes ? Leur nombre est-il aussi important à cause de l'environnement proliférant qui règne au sein du TA ou à cause d'une production de facteurs chimiottractants qui attirent des cellules souches de type mésenchymateux circulantes ? Afin de vérifier leurs réelles capacités de différenciation *in vivo* et leur participation au développement du TA, la stratégie

expérimentale idéale serait de faire exprimer spécifiquement aux cellules souches/progénitrices du TA une molécule fluorescente pour pouvoir suivre leur *in vivo*. Cependant, le manque de marqueur spécifique des cellules souches/progénitrices du TA ne permet pas d'envisager cette approche expérimentale pour le moment et constitue un véritable challenge et une perspective à ce travail de thèse.

Pour conclure, nous pouvons dire que les cellules souches/progénitrices du TA humain expriment le marqueur CD34 à l'état natif et le perdent en culture en même temps qu'elles gagnent l'expression des marqueurs mésenchymateux de référence et péricytaire. De plus, au sein du TA, elles ont une localisation majoritairement stromale.

Enfin, nous avons ainsi pu montrer que le TA fournit aux cellules souches/progénitrices qu'il contient, un support structural mais aussi des informations contrôlant leurs activités de prolifération, de migration et de différenciation et ainsi de caractériser la « niche adipeuse » des cellules souches/progénitrices natives du TA et son influence dans le développement du TA et nous proposons le schéma suivant (Figure 39).

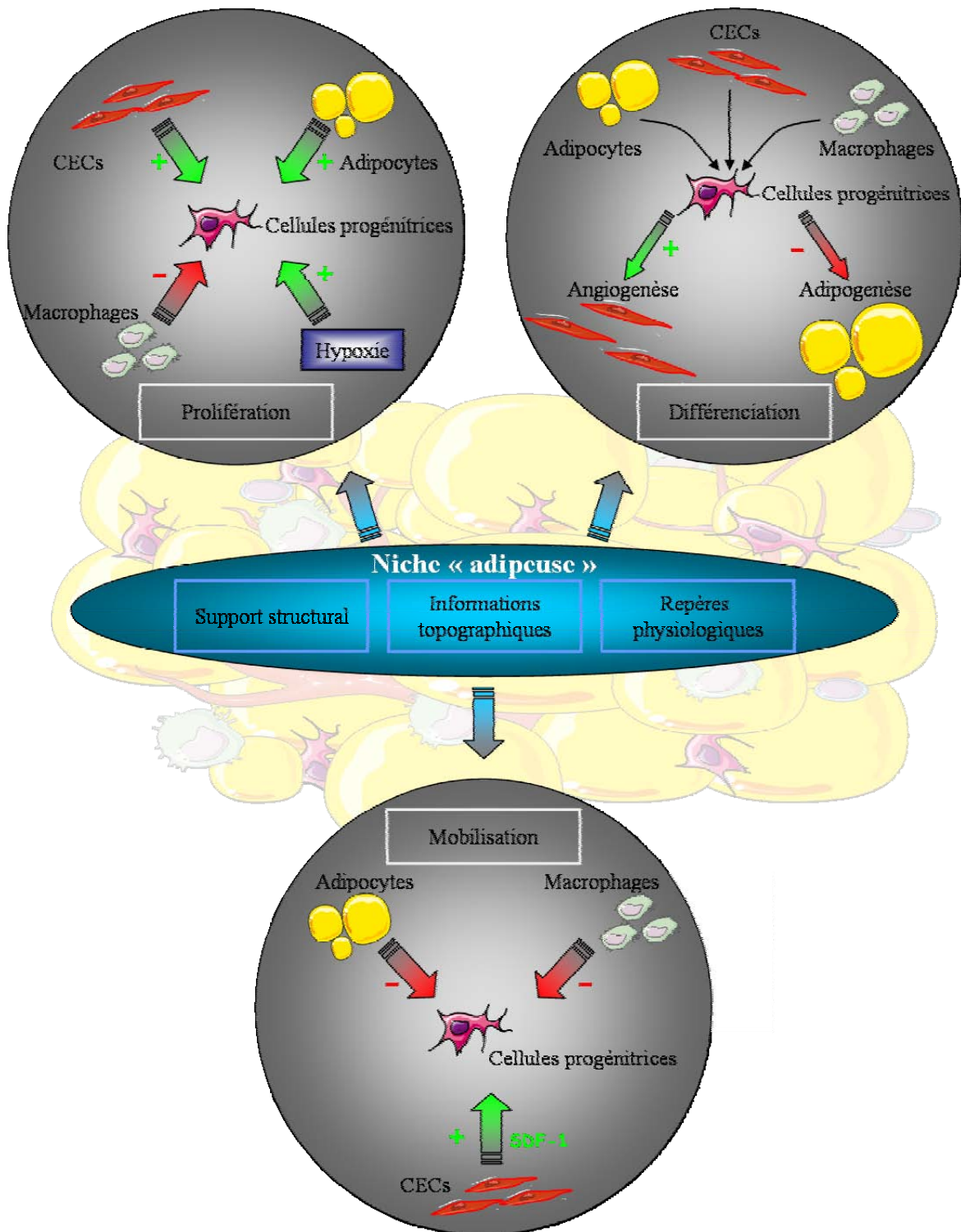


Figure 39 : Rôle de la niche "adipeuse" sur la prolifération, différenciation et migration des cellules souches/progénitrices CD34⁺/CD31⁻ du TA.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUE

1. Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature*. 2006;441.
2. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292:154-156.
3. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78:7634-7638.
4. Burdon T, Smith A, Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol*. 2002;12:432-438.
5. Gertsenstein M, Lobe C, Nagy A. ES cell-mediated conditional transgenesis. *Methods Mol Biol*. 2002;185:285-307.
6. Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA, Vallier L. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*. 2007;448:191-195.
7. Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, Gardner RL, McKay RD. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*. 2007;448:196-199.
8. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145-1147.
9. Allegrucci C, Young LE. Differences between human embryonic stem cell lines. *Hum Reprod Update*. 2007;13:103-120.
10. Andrews PW, Benvenisty N, McKay R, Pera MF, Rossant J, Semb H, Stacey GN. The International Stem Cell Initiative: toward benchmarks for human embryonic stem cell research. *Nat Biotechnol*. 2005;23:795-797.
11. Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, Amit M, Andrews PW, Beighton G, Bello PA, Benvenisty N, Berry LS, Bevan S, Blum B, Brooking J, Chen KG, Choo AB, Churchill GA, Corbel M, Damjanov I, Draper JS, Dvorak P, Emanuelsson K, Fleck RA, Ford A, Gertow K, Gertsenstein M, Gokhale PJ, Hamilton RS, Hampl A, Healy LE, Hovatta O, Hyllner J, Imreh MP, Itskovitz-Eldor J, Jackson J, Johnson JL, Jones M, Kee K, King BL, Knowles BB, Lako M, Lebrin F, Mallon BS, Manning D, Mayshar Y, McKay RD, Michalska AE, Mikkola M, Mileikovsky M, Minger SL, Moore HD, Mummery CL, Nagy A, Nakatsuji N, O'Brien CM, Oh SK, Olsson C, Otonkoski T, Park KY, Passier R, Patel H, Patel M, Pedersen R, Pera MF, Piekarczyk MS, Pera RA, Reubinoff BE, Robins AJ, Rossant J, Rugg-Gunn P, Schulz TC, Semb H, Sherrer ES, Siemen H, Stacey GN, Stojkovic M, Suemori H, Szatkiewicz J, Turetsky T, Tuuri T, van den Brink S, Vintersten K, Vuoristo S, Ward D, Weaver TA, Young LA, Zhang W. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol*. 2007;25:803-816.
12. Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, Schafer X, Lun Y, Lemischka IR. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature*. 2006;442:533-538.
13. Brimble SN, Sherrer ES, Uhl EW, Wang E, Kelly S, Merrill AH, Jr., Robins AJ, Schulz TC. The cell surface glycosphingolipids SSEA-3 and SSEA-4 are not essential for human ESC pluripotency. *Stem Cells*. 2007;25:54-62.
14. Hansson MG, Helgesson G, Wessman R, Jaenisch R. Commentary: isolated stem cells--patentable as cultural artifacts? *Stem Cells*. 2007;25:1507-1510.
15. Priest RE, Marimuthu KM, Priest JH. Origin of cells in human amniotic fluid cultures: ultrastructural features. *Lab Invest*. 1978;39:106-109.
16. Polgar K, Adany R, Abel G, Kappelmayer J, Muszbek L, Papp Z. Characterization of rapidly adhering amniotic fluid cells by combined immunofluorescence and phagocytosis assays. *Am J Hum Genet*. 1989;45:786-792.

17. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschlager M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod.* 2003;18:1489-1493.
18. De Coppi P, Bartsch G, Jr., Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* 2007;25:100-106.
19. Izumi M, Pazin BJ, Minervini CF, Gerlach J, Ross MA, Stolz DB, Turner ME, Thompson RL, Miki T. Quantitative comparison of stem cell marker-positive cells in fetal and term human amnion. *J Reprod Immunol.* 2009.
20. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, Fibbe WE, Kanhai HH. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood.* 2003;102:1548-1549.
21. Ditadi A, de Coppi P, Picone O, Gautreau L, Smati R, Six E, Bonhomme D, Ezine S, Frydman R, Cavazzana-Calvo M, Andre-Schmutz I. Human and murine amniotic fluid c-Kit+Lin- cells display hematopoietic activity. *Blood.* 2009;113:3953-3960.
22. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126:663-676.
23. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature.* 2007;448:318-324.
24. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131:861-872.
25. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 2007;318:1917-1920.
26. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature.* 2008;451:141-146.
27. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science.* 2008;322:949-953.
28. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science.* 2008;322:945-949.
29. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Scholer HR, Duan L, Ding S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell.* 2009;4:381-384.
30. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.* 2008;26:101-106.
31. Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, Arauzo-Bravo MJ, Ruau D, Han DW, Zenke M, Scholer HR. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature.* 2008;454:646-650.
32. Page RL, Ambady S, Holmes WF, Vilner L, Kole D, Kashpur O, Huntress V, Vojtic I, Whitton H, Dominko T. Induction of Stem Cell Gene Expression in Adult Human Fibroblasts without Transgenes. *Cloning Stem Cells.* 2009.
33. Fuchs E. The tortoise and the hair: slow-cycling cells in the stem cell race. *Cell.* 2009;137:811-819.
34. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisen J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science.* 2009;324:98-102.

35. Till JE, Mc CE. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 1961;14:213-222.
36. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:35-71.
37. Weissman IL, Shizuru JA. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood.* 2008;112:3543-3553.
38. Coulombel L. Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene.* 2004;23:7210-7222.
39. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 2005;121:1109-1121.
40. Bertoncello I, Hodgson GS, Bradley TR. Multiparameter analysis of transplantable hemopoietic stem cells: I. The separation and enrichment of stem cells homing to marrow and spleen on the basis of rhodamine-123 fluorescence. *Exp Hematol.* 1985;13:999-1006.
41. Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell.* 1991;66:85-94.
42. Wolf NS, Kone A, Priestley GV, Bartelmez SH. In vivo and in vitro characterization of long-term repopulating primitive hematopoietic cells isolated by sequential Hoechst 33342-rhodamine 123 FACS selection. *Exp Hematol.* 1993;21:614-622.
43. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med.* 2001;7:1028-1034.
44. Sarkadi B, Homolya L, Szakacs G, Varadi A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol Rev.* 2006;86:1179-1236.
45. Mouthon MA, Fouchet P, Mathieu C, Sii-Felice K, Etienne O, Lages CS, Boussin FD. Neural stem cells from mouse forebrain are contained in a population distinct from the 'side population'. *J Neurochem.* 2006;99:807-817.
46. Motohashi N, Uezumi A, Yada E, Fukada S, Fukushima K, Imaizumi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Muscle CD31(-) CD45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts. *Am J Pathol.* 2008;173:781-791.
47. Passegue E, Wagers AJ, Giuriato S, Anderson WC, Weissman IL. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med.* 2005;202:1599-1611.
48. Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:3120-3125.
49. Bradford GB, Williams B, Rossi R, Bertoncello I. Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp Hematol.* 1997;25:445-453.
50. Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lio P, Macdonald HR, Trumpp A. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell.* 2008;135:1118-1129.
51. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976;4:267-274.

52. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-147.
53. Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res*. 2003;34:565-571.
54. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*. 2009;217:318-324.
55. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25:2739-2749.
56. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008;26:2287-2299.
57. Nadri S, Soleimani M. Isolation murine mesenchymal stem cells by positive selection. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2007;43:276-282.
58. Delia D, Lampugnani MG, Resnati M, Dejana E, Aiello A, Fontanella E, Soligo D, Pierotti MA, Greaves MF. CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *Blood*. 1993;81:1001-1008.
59. Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol*. 2000;151:1221-1234.
60. Trempus CS, Morris RJ, Bortner CD, Cotsarelis G, Faircloth RS, Reece JM, Tennant RW. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *J Invest Dermatol*. 2003;120:501-511.
61. Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*. 1995;18:1417-1426.
62. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res*. 1998;16:406-413.
63. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 2000;164:247-256.
64. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*. 2002;109:1291-1302.
65. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*. 2002;30:896-904.
66. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999;103:697-705.
67. Xie QP, Huang H, Xu B, Dong X, Gao SL, Zhang B, Wu YL. Human bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into insulin-producing cells upon microenvironmental manipulation in vitro. *Differentiation*. 2009;77:483-491.
68. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol*. 1996;166:585-592.
69. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*. 1998;176:57-66.

70. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007;110:3499-3506.
71. Le Blanc K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*. 2007;262:509-525.
72. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002;99:3838-3843.
73. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003;75:389-397.
74. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004;103:4619-4621.
75. Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, Ibatici A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005;90:516-525.
76. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005;105:4120-4126.
77. Tabera S, Perez-Simon JA, Diez-Campelo M, Sanchez-Abarca LI, Blanco B, Lopez A, Benito A, Ocio E, Sanchez-Guijo FM, Canizo C, San Miguel JF. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica*. 2008;93:1301-1309.
78. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 2006;24:74-85.
79. Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2009;106:984-991.
80. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13:4279-4295.
81. Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, McGonagle D. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004;50:817-827.
82. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006;119:2204-2213.
83. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-317.
84. Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica*. 2009;94:258-263.
85. Harris J. Differentiated cells and the maintenance of tissues. *Molecular Biology of The Cell*. New York; 1994.
86. Haniffa MA, Wang XN, Holtick U, Rae M, Isaacs JD, Dickinson AM, Hilkens CM, Collin MP. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol*. 2007;179:1595-1604.

87. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Peault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008;3:301-313.
88. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Madrid JF, Varela H, Valladares F, Acosta E, Martin-Vasallo P, Diaz-Flores L, Jr. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol*. 2009;24:909-969.
89. Bagley RG, Weber W, Rouleau C, Teicher BA. Pericytes and endothelial precursor cells: cellular interactions and contributions to malignancy. *Cancer Res*. 2005;65:9741-9750.
90. Mlodzik K, Loffing J, Le Hir M, Kaissling B. Ecto-5'-nucleotidase is expressed by pericytes and fibroblasts in the rat heart. *Histochem Cell Biol*. 1995;103:227-236.
91. Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA, Jr., Orellana MD, Freitas MC, Neder L, Santos AR, Peres LC, Jamur MC, Zago MA. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol*. 2008;36:642-654.
92. Diaz-Flores L, Rodriguez E, Gayoso MJ, Gutierrez R. Growth of two types of cartilage after implantation of free autogeneic perichondrial grafts. *Clin Orthop Relat Res*. 1988:267-279.
93. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Lopez-Alonso A, Gonzalez R, Varela H. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res*. 1992:280-286.
94. Richardson RL, Hausman GJ, Champion DR. Response of pericytes to thermal lesion in the inguinal fat pad of 10-day-old rats. *Acta Anat (Basel)*. 1982;114:41-57.
95. Thomas WE. Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res Brain Res Rev*. 1999;31:42-57.
96. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*. 1990;110:1001-1020.
97. Cheng H, Leblond CP. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. III. Entero-endocrine cells. *Am J Anat*. 1974;141:503-519.
98. Cheng H, Leblond CP. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat*. 1974;141:537-561.
99. Cheng H, Leblond CP. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am J Anat*. 1974;141:461-479.
100. Bjerknes M, Cheng H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology*. 1999;116:7-14.
101. Potten CS, Booth C, Pritchard DM. The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol*. 1997;78:219-243.
102. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*. 2007;449:1003-1007.
103. Sangiorgi E, Capecchi MR. Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet*. 2008;40:915-920.
104. Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell*. 1990;61:1329-1337.
105. Alonso L, Fuchs E. The hair cycle. *J Cell Sci*. 2006;119:391-393.

106. Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell*. 2004;118:635-648.
107. Morris RJ, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, Lin JS, Sawicki JA, Cotsarelis G. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol*. 2004;22:411-417.
108. Nowak JA, Polak L, Pasolli HA, Fuchs E. Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis. *Cell Stem Cell*. 2008;3:33-43.
109. Jaks V, Barker N, Kasper M, van Es JH, Snippert HJ, Clevers H, Toftgard R. Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nat Genet*. 2008;40:1291-1299.
110. Greco V, Chen T, Rendl M, Schober M, Pasolli HA, Stokes N, Dela Cruz-Racelis J, Fuchs E. A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. *Cell Stem Cell*. 2009;4:155-169.
111. Lin KK, Andersen B. Have hair follicle stem cells shed their tranquil image? *Cell Stem Cell*. 2008;3:581-582.
112. Schmalbruch H, Lewis DM. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve*. 2000;23:617-626.
113. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*. 1961;9:493-495.
114. Christov C, Chretien F, Abou-Khalil R, Bassez G, Vallet G, Authier FJ, Bassaglia Y, Shinin V, Tajbakhsh S, Chazaud B, Gherardi RK. Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol Biol Cell*. 2007;18:1397-1409.
115. Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, Morgan JE. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell*. 2005;122:289-301.
116. Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Zaffran S, Cumano A, Partridge T, Buckingham M. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science*. 2005;309:2064-2067.
117. Kuang S, Gillespie MA, Rudnicki MA. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell*. 2008;2:22-31.
118. Zammit PS, Relaix F, Nagata Y, Ruiz AP, Collins CA, Partridge TA, Beauchamp JR. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci*. 2006;119:1824-1832.
119. Peault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, Gussoni E, Kunkel LM, Huard J. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther*. 2007;15:867-877.
120. Gnocchi VF, White RB, Ono Y, Ellis JA, Zammit PS. Further characterisation of the molecular signature of quiescent and activated mouse muscle satellite cells. *PLoS One*. 2009;4:e5205.
121. Illa I, Leon-Monzon M, Dalakas MC. Regenerating and denervated human muscle fibers and satellite cells express neural cell adhesion molecule recognized by monoclonal antibodies to natural killer cells. *Ann Neurol*. 1992;31:46-52.
122. Grinnell J. The niche relationships of the California thrasher. *Auk*. 1917:427-433.
123. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4:7-25.
124. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:11-21.
125. Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, Scadden DT. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science*. 2000;287:1804-1808.

126. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004;118:149-161.
127. Sitnicka E, Ruscetti FW, Priestley GV, Wolf NS, Bartelmez SH. Transforming growth factor beta 1 directly and reversibly inhibits the initial cell divisions of long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood*. 1996;88:82-88.
128. Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, Williams B, Webb RJ, Denhardt DT, Bertoncello I, Bendall LJ, Simmons PJ, Haylock DN. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2005;106:1232-1239.
129. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Matsuoka S, Miyamoto K, Miyazaki H, Takahashi T, Suda T. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell*. 2007;1:685-697.
130. Ficara F, Murphy MJ, Lin M, Cleary ML. Pbx1 regulates self-renewal of long-term hematopoietic stem cells by maintaining their quiescence. *Cell Stem Cell*. 2008;2:484-496.
131. Nie Y, Han YC, Zou YR. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J Exp Med*. 2008;205:777-783.
132. Liu Y, Elf SE, Miyata Y, Sashida G, Huang G, Di Giandomenico S, Lee JM, Deblasio A, Menendez S, Antipin J, Reva B, Koff A, Nimer SD. p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell*. 2009;4:37-48.
133. Horsley V, Aliprantis AO, Polak L, Glimcher LH, Fuchs E. NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells. *Cell*. 2008;132:299-310.
134. Knoblich JA. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*. 2008;132:583-597.
135. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:93-106.
136. Raymond K, Deugnier MA, Faraldo MM, Glukhova MA. Adhesion within the stem cell niches. *Curr Opin Cell Biol*. 2009.
137. Song X, Zhu CH, Doan C, Xie T. Germline stem cells anchored by adherens junctions in the Drosophila ovary niches. *Science*. 2002;296:1855-1857.
138. Song X, Xie T. DE-cadherin-mediated cell adhesion is essential for maintaining somatic stem cells in the Drosophila ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:14813-14818.
139. Kiel MJ, Acar M, Radice GL, Morrison SJ. Hematopoietic stem cells do not depend on N-cadherin to regulate their maintenance. *Cell Stem Cell*. 2009;4:170-179.
140. Irintchev A, Wernig A. Denervation and reinnervation of muscle: physiological effects. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1994;S28-30.
141. Watt FM. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *Embo J*. 2002;21:3919-3926.
142. Wagers AJ, Allsopp RC, Weissman IL. Changes in integrin expression are associated with altered homing properties of Lin(-/lo)Thy1.1(lo)Sca-1(+)-c-kit(+) hematopoietic stem cells following mobilization by cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor. *Exp Hematol*. 2002;30:176-185.
143. Sherwood RI, Christensen JL, Conboy IM, Conboy MJ, Rando TA, Weissman IL, Wagers AJ. Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle. *Cell*. 2004;119:543-554.
144. Adams GB, Chabner KT, Alley IR, Olson DP, Szczepiorowski ZM, Poznansky MC, Kos CH, Pollak MR, Brown EM, Scadden DT. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature*. 2006;439:599-603.

145. Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:5431-5436.
146. Chavakis E, Urbich C, Dimmeler S. Homing and engraftment of progenitor cells: a prerequisite for cell therapy. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;45:514-522.
147. Kollet O, Dar A, Shivtiel S, Kalinkovich A, Lapid K, Sztainberg Y, Tesio M, Samstein RM, Goichberg P, Spiegel A, Elson A, Lapidot T. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med*. 2006;12:657-664.
148. Ara T, Tokoyoda K, Sugiyama T, Egawa T, Kawabata K, Nagasawa T. Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity*. 2003;19:257-267.
149. Spiegel A, Kalinkovich A, Shivtiel S, Kollet O, Lapidot T. Stem cell regulation via dynamic interactions of the nervous and immune systems with the microenvironment. *Cell Stem Cell*. 2008;3:484-492.
150. Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*. 2004;104:2643-2645.
151. Ripa RS, Haack-Sorensen M, Wang Y, Jorgensen E, Mortensen S, Bindslev L, Friis T, Kastrup J. Bone marrow derived mesenchymal cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor after acute myocardial infarction: results from the Stem Cells in Myocardial Infarction (STEMMI) trial. *Circulation*. 2007;116:I24-30.
152. Belema-Bedada F, Uchida S, Martire A, Kostin S, Braun T. Efficient homing of multipotent adult mesenchymal stem cells depends on FROUNT-mediated clustering of CCR2. *Cell Stem Cell*. 2008;2:566-575.
153. Schenk S, Mal N, Finan A, Zhang M, Kiedrowski M, Popovic Z, McCarthy PM, Penn MS. Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor. *Stem Cells*. 2007;25:245-251.
154. Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, Zhao L, Nagy TR, Peng X, Hu J, Feng X, Van Hul W, Wan M, Cao X. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med*. 2009;15:757-765.
155. Holmberg J, Genander M, Halford MM, Anneren C, Sondell M, Chumley MJ, Silvany RE, Henkemeyer M, Frisen J. EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche. *Cell*. 2006;125:1151-1163.
156. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res*. 2005;15:28-32.
157. Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 2009;137:216-233.
158. Baba Y, Yokota T, Spits H, Garrett KP, Hayashi S, Kincade PW. Constitutively active beta-catenin promotes expansion of multipotent hematopoietic progenitors in culture. *J Immunol*. 2006;177:2294-2303.
159. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003;423:409-414.
160. Trowbridge JJ, Moon RT, Bhatia M. Hematopoietic stem cell biology: too much of a Wnt thing. *Nat Immunol*. 2006;7:1021-1023.
161. Duncan AW, Rattis FM, DiMascio LN, Congdon KL, Pazianos G, Zhao C, Yoon K, Cook JM, Willert K, Gaiano N, Reya T. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol*. 2005;6:314-322.

162. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol.* 2009;71:241-260.
163. Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, Clevers H. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet.* 1998;19:379-383.
164. Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, Clevers H. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev.* 2003;17:1709-1713.
165. Kuhnert F, Davis CR, Wang HT, Chu P, Lee M, Yuan J, Nusse R, Kuo CJ. Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:266-271.
166. Hoffman J, Kuhnert F, Davis CR, Kuo CJ. Wnts as essential growth factors for the adult small intestine and colon. *Cell Cycle.* 2004;3:554-557.
167. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:339-373.
168. Rochat A, Fernandez A, Vandromme M, Moles JP, Bouchet T, Carnac G, Lamb NJ. Insulin and wnt1 pathways cooperate to induce reserve cell activation in differentiation and myotube hypertrophy. *Mol Biol Cell.* 2004;15:4544-4555.
169. Otto A, Schmidt C, Luke G, Allen S, Valasek P, Muntoni F, Lawrence-Watt D, Patel K. Canonical Wnt signalling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneration. *J Cell Sci.* 2008;121:2939-2950.
170. Pan Y, Lin MH, Tian X, Cheng HT, Gridley T, Shen J, Kopan R. gamma-secretase functions through Notch signaling to maintain skin appendages but is not required for their patterning or initial morphogenesis. *Dev Cell.* 2004;7:731-743.
171. Demehri S, Kopan R. Notch signaling in bulge stem cells is not required for selection of hair follicle fate. *Development.* 2009;136:891-896.
172. Etheridge SL, Spencer GJ, Heath DJ, Genever PG. Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2004;22:849-860.
173. Ling L, Nurcombe V, Cool SM. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene.* 2009;433:1-7.
174. Hilton MJ, Tu X, Wu X, Bai S, Zhao H, Kobayashi T, Kronenberg HM, Teitelbaum SL, Ross FP, Kopan R, Long F. Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation. *Nat Med.* 2008;14:306-314.
175. Oldershaw RA, Tew SR, Russell AM, Meade K, Hawkins R, McKay TR, Brennan KR, Hardingham TE. Notch signaling through Jagged-1 is necessary to initiate chondrogenesis in human bone marrow stromal cells but must be switched off to complete chondrogenesis. *Stem Cells.* 2008;26:666-674.
176. Falco M. FDA approves human embryonic stem cell study *CNN Medical News Managing Editor*; 2009.
177. Prockop DJ. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther.* 2009;17:939-946.
178. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, Montagna D, Maccario R, Villa R, Daidone MG, Zuffardi O, Locatelli F. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res.* 2007;67:9142-9149.
179. Dean RM, Bishop MR. Graft-versus-host disease: emerging concepts in prevention and therapy. *Curr Hematol Rep.* 2003;2:287-294.
180. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnie H, Marschall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le Blanc

- K. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2006;81:1390-1397.
181. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, Shpall EJ, McCarthy P, Atkinson K, Cooper BW, Gerson SL, Laughlin MJ, Loberiza FR, Jr., Moseley AB, Bacigalupo A. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11:389-398.
182. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM, Locatelli F, Fibbe WE. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood*. 2007;110:2764-2767.
183. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, Yamagishi M, Mori H, Kangawa K, Kitamura S. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H2670-2676.
184. Menasche P. Cell transplantation in myocardium. *Ann Thorac Surg*. 2003;75:S20-28.
185. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2005;112:1128-1135.
186. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop DJ. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell*. 2009;5:54-63.
187. Mollmann H, Nef H, Elsasser A, Hamm C. Stem cells in myocardial infarction: from bench to bedside. *Heart*. 2009;95:508-514.
188. Lee JK, Jin HK, Bae JS. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce brain amyloid-beta deposition and accelerate the activation of microglia in an acutely induced Alzheimer's disease mouse model. *Neurosci Lett*. 2009;450:136-141.
189. Sugaya K, Merchant S. How to approach Alzheimer's disease therapy using stem cell technologies. *J Alzheimers Dis*. 2008;15:241-254.
190. Bouchez G, Sensebe L, Vourc'h P, Garreau L, Bodard S, Rico A, Guilloteau D, Charbord P, Besnard JC, Chalon S. Partial recovery of dopaminergic pathway after graft of adult mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson's disease. *Neurochem Int*. 2008;52:1332-1342.
191. Lee PH, Park HJ. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy as a candidate disease-modifying strategy in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Clin Neurol*. 2009;5:1-10.
192. Dai LJ, Li HY, Guan LX, Ritchie G, Zhou JX. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis. *Stem Cell Res*. 2009;2:16-25.
193. Figliuzzi M, Cornolti R, Perico N, Rota C, Morigi M, Remuzzi G, Remuzzi A, Benigni A. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve islet graft function in diabetic rats. *Transplant Proc*. 2009;41:1797-1800.
194. Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, Selig M, Godwin J, Law K, Placidi C, Smith RN, Capella C, Rodig S, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH, Abdi R. Immunomodulatory Function of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Experimental Autoimmune Type 1 Diabetes. *J Immunol*. 2009.
195. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)*. 2005;2:8.

196. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol.* 2002;30:42-48.
197. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007;56:1175-1186.
198. Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmoller M, Russo PA, Bolte H, Sherry E, Behrens E, Terheyden H. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet.* 2004;364:766-770.
199. Wakitani S, Mitsuoka T, Nakamura N, Toritsuka Y, Nakamura Y, Horibe S. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell Transplant.* 2004;13:595-600.
200. Furlani D, Li W, Pittermann E, Klopsch C, Wang L, Knopp A, Jungebluth P, Thedinga E, Havenstein C, Westien I, Ugurlucan M, Li RK, Ma N, Steinhoff G. A transformed cell population derived from cultured mesenchymal stem cells has no functional effect after transplantation into the injured heart. *Cell Transplant.* 2009;18:319-331.
201. Rosland GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, Mysliwicz J, Tonn JC, Goldbrunner R, Lonning PE, Bjerkvig R, Schichor C. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res.* 2009;69:5331-5339.
202. Yoo KH, Jang IK, Lee MW, Kim HE, Yang MS, Eom Y, Lee JE, Kim YJ, Yang SK, Jung HL, Sung KW, Kim CW, Koo HH. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol.* 2009.
203. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 2007;100:1249-1260.
204. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444:860-867.
205. Charles MA, Eschwege E, Basdevant A. Monitoring the obesity epidemic in France: the Obepi surveys 1997-2006. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16:2182-2186.
206. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004;84:277-359.
207. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293:E444-452.
208. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 2009;360:1509-1517.
209. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S, Nuutila P. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med.* 2009;360:1518-1525.
210. Au-Yong IT, Thorn N, Ganatra R, Perkins AC, Symonds ME. Brown adipose tissue and seasonal variation in people. *Diabetes.* 2009.
211. Billon N, Monteiro MC, Dani C. Developmental origin of adipocytes: new insights into a pending question. *Biol Cell.* 2008;100:563-575.
212. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell.* 2007;131:242-256.
213. Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res.* 1996;37:693-707.
214. Beigneux AP, Davies BS, Gin P, Weinstein MM, Farber E, Qiao X, Peale F, Bunting S, Walzem RL, Wong JS, Blaner WS, Ding ZM, Melford K, Wongsiriroj N, Shu X, de Sauvage F, Ryan RO, Fong LG, Bensadoun A, Young SG. Glycosylphosphatidylinositol-

- anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab.* 2007;5:279-291.
215. Young SG, Davies BS, Fong LG, Gin P, Weinstein MM, Bensadoun A, Beigneux AP. GPIHBP1: an endothelial cell molecule important for the lipolytic processing of chylomicrons. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18:389-396.
216. Kleinfeld AM, Chu P, Storch J. Flip-flop is slow and rate limiting for the movement of long chain anthroyloxy fatty acids across lipid vesicles. *Biochemistry.* 1997;36:5702-5711.
217. Schaffer JE. Fatty acid transport: the roads taken. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282:E239-246.
218. Abumrad NA, el-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem.* 1993;268:17665-17668.
219. Schaffer JE, Lodish HF. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell.* 1994;79:427-436.
220. Bell RM, Coleman RA. Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Biochem.* 1980;49:459-487.
221. Leung DW. The structure and functions of human lysophosphatidic acid acyltransferases. *Front Biosci.* 2001;6:D944-953.
222. Cases S, Smith SJ, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E, Novak S, Collins C, Welch CB, Lusis AJ, Erickson SK, Farese RV, Jr. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:13018-13023.
223. Diraison F, Moulin P, Beylot M. Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab.* 2003;29:478-485.
224. Hellerstein MK. De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects. *Eur J Clin Nutr.* 1999;53 Suppl 1:S53-65.
225. Diraison F, Yankah V, Letexier D, Dusserre E, Jones P, Beylot M. Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans. *J Lipid Res.* 2003;44:846-853.
226. Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* 2001;2:282-286.
227. Claus TH, Lowe DB, Liang Y, Salhanick AI, Lubeski CK, Yang L, Lemoine L, Zhu J, Clairmont KB. Specific inhibition of hormone-sensitive lipase improves lipid profile while reducing plasma glucose. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;315:1396-1402.
228. Langin D, Holm C, Lafontan M. Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. *Proc Nutr Soc.* 1996;55:93-109.
229. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science.* 2004;306:1383-1386.
230. Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem.* 2004;279:48968-48975.
231. Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim KH, Sul HS. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem.* 2004;279:47066-47075.

232. Bezaire V, Mairal A, Ribet C, Lefort C, Girusse A, Jocken J, Laurencikiene J, Anesia R, Rodriguez AM, Ryden M, Stenson BM, Dani C, Ailhaud G, Arner P, Langin D. Contribution of Adipose Triglyceride Lipase and Hormone-sensitive Lipase to Lipolysis in hMADS Adipocytes. *J Biol Chem.* 2009;284:18282-18291.
233. Fredrikson G, Tornqvist H, Belfrage P. Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta.* 1986;876:288-293.
234. Lafontan M, Langin D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res.* 2009;48:275-297.
235. Lafontan M, Berlan M. Fat cell alpha 2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. *Endocr Rev.* 1995;16:716-738.
236. Arner P. Catecholamine-induced lipolysis in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1999;23 Suppl 1:10-13.
237. Jensen MD. Lipolysis: contribution from regional fat. *Annu Rev Nutr.* 1997;17:127-139.
238. Path G, Bornstein SR, Gurniak M, Chrousos GP, Scherbaum WA, Hauner H. Human breast adipocytes express interleukin-6 (IL-6) and its receptor system: increased IL-6 production by beta-adrenergic activation and effects of IL-6 on adipocyte function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:2281-2288.
239. Sethi JK, Hotamisligil GS. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol.* 1999;10:19-29.
240. Sethi JK, Xu H, Uysal KT, Wiesbrock SM, Scheja L, Hotamisligil GS. Characterisation of receptor-specific TNFalpha functions in adipocyte cell lines lacking type 1 and 2 TNF receptors. *FEBS Lett.* 2000;469:77-82.
241. Sengenès C, Berlan M, De Glisezinski I, Lafontan M, Galitzky J. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *Faseb J.* 2000;14:1345-1351.
242. Lafontan M, Sengenès C, Galitzky J, Berlan M, De Glisezinski I, Crampes F, Stich V, Langin D, Barbe P, Riviere D. Recent developments on lipolysis regulation in humans and discovery of a new lipolytic pathway. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24 Suppl 4:S47-52.
243. Moro C, Crampes F, Sengenès C, De Glisezinski I, Galitzky J, Thalamas C, Lafontan M, Berlan M. Atrial natriuretic peptide contributes to physiological control of lipid mobilization in humans. *Faseb J.* 2004;18:908-910.
244. Kishida K, Kuriyama H, Funahashi T, Shimomura I, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Nishizawa H, Matsuda M, Takahashi M, Hotta K, Nakamura T, Yamashita S, Tochino Y, Matsuzawa Y. Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. *J Biol Chem.* 2000;275:20896-20902.
245. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc.* 2001;60:329-339.
246. Rodbell M. Localization of Lipoprotein Lipase in Fat Cells of Rat Adipose Tissue. *J Biol Chem.* 1964;239:753-755.
247. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372:425-432.
248. Wang P, Mariman E, Renes J, Keijer J. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J Cell Physiol.* 2008;216:3-13.
249. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology.* 2004;145:2273-2282.

250. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*. 1999;4:585-595.
251. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell*. 1999;4:597-609.
252. Nedergaard J, Petrovic N, Lindgren EM, Jacobsson A, Cannon B. PPARgamma in the control of brown adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1740:293-304.
253. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 1994;79:1147-1156.
254. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scime A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*. 2008;454:961-967.
255. Crisan M, Casteilla L, Lehr L, Carmona M, Paoloni-Giacobino A, Yap S, Sun B, Leger B, Logar A, Penicaud L, Schrauwen P, Cameron-Smith D, Russell AP, Peault B, Giacobino JP. A reservoir of brown adipocyte progenitors in human skeletal muscle. *Stem Cells*. 2008;26:2425-2433.
256. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, Hamilton DL, Gimeno RE, Wahlestedt C, Baar K, Nedergaard J, Cannon B. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:4401-4406.
257. Almind K, Manieri M, Sivitz WI, Cinti S, Kahn CR. Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:2366-2371.
258. Wassermann F. The development of adipose tissue *Adipose tissue*. Washington; 1965.
259. Billon N, Iannarelli P, Monteiro MC, Glavieux-Pardanaud C, Richardson WD, Kessar N, Dani C, Dupin E. The generation of adipocytes by the neural crest. *Development*. 2007;134:2283-2292.
260. Lafontan M, Berlan M. Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24:276-283.
261. Hong KM, Burdick MD, Phillips RJ, Heber D, Strieter RM. Characterization of human fibrocytes as circulating adipocyte progenitors and the formation of human adipose tissue in SCID mice. *Faseb J*. 2005;19:2029-2031.
262. Crossno JT, Jr., Majka SM, Grazia T, Gill RG, Klemm DJ. Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow-derived circulating progenitor cells. *J Clin Invest*. 2006;116:3220-3228.
263. Koh Y, Kang S, Lee H, Choi T-S, Lee H, Cho C, Koh G. Bone marrow-derived circulating progenitor cells fail to transdifferentiate into adipocytes in adult adipose tissues in mice. *J Clin Invest*. 2007;117:3684-3695.
264. Hirsch J, Batchelor B. Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab*. 1976;5:299-311.
265. Bjorntorp P. Size, number and function of adipose tissue cells in human obesity. *Horm Metab Res*. 1974;Suppl 4:77-83.
266. Hausberger FX, Widelitz MM. Distribution of labeled erythrocytes in adipose tissue and muscle in the rat. *Am J Physiol*. 1963;204:649-652.
267. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 2004;110:349-355.

268. Brakenhielm E, Cao R, Gao B, Angelin B, Cannon B, Parini P, Cao Y. Angiogenesis inhibitor, TNP-470, prevents diet-induced and genetic obesity in mice. *Circ Res.* 2004;94:1579-1588.
269. Rupnick MA, Panigrahy D, Zhang CY, Dallabrida SM, Lowell BB, Langer R, Folkman MJ. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:10730-10735.
270. Kolonin MG, Saha PK, Chan L, Pasqualini R, Arap W. Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. *Nat Med.* 2004;10:625-632.
271. Christiaens V, Lijnen HR. Angiogenesis and development of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol.* 2009.
272. Silha JV, Krsek M, Sucharda P, Murphy LJ. Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. *Int J Obes (Lond).* 2005;29:1308-1314.
273. Tam J, Duda DG, Perentes JY, Quadri RS, Fukumura D, Jain RK. Blockade of VEGFR2 and not VEGFR1 can limit diet-induced fat tissue expansion: role of local versus bone marrow-derived endothelial cells. *PLoS One.* 2009;4:e4974.
274. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes.* 2007;56:901-911.
275. Ye J, Gao Z, Yin J, He Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293:E1118-1128.
276. Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, Rood JC, Burk DH, Smith SR. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes.* 2009;58:718-725.
277. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112:1796-1808.
278. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;112:1821-1830.
279. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Hosoya Y, Yamashita H, Fujita H, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes.* 2007;56:1517-1526.
280. Bourlier V, Zakaroff-Girard A, Miranville A, De Barros S, Maumus M, Sengenès C, Galitzky J, Lafontan M, Karpe F, Frayn KN, Bouloumie A. Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation.* 2008;117:806-815.
281. Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumie A. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes.* 2004;53:1285-1292.
282. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007;117:175-184.
283. Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ, Saltiel AR. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes.* 2008;57:3239-3246.
284. Caspar-Bauguil S, Cousin B, Galinier A, Segafredo C, Nibbelink M, Andre M, Casteilla L, Penicaud L. Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. *FEBS Lett.* 2005;579:3487-3492.

285. Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P, Barth TF, Dragun D, Skurk T, Hauner H, Bluher M, Unger T, Wolf AM, Knippschild U, Hombach V, Marx N. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1304-1310.
286. Poggi M, Jager J, Paulmyer-Lacroix O, Peiretti F, Gremeaux T, Verdier M, Grino M, Stepanian A, Msika S, Burcelin R, de Prost D, Tanti JF, Alessi MC. The inflammatory receptor CD40 is expressed on human adipocytes: contribution to crosstalk between lymphocytes and adipocytes. *Diabetologia.* 2009;52:1152-1163.
287. Henegar C, Tordjman J, Achard V, Lacasa D, Cremer I, Guerre-Millo M, Poitou C, Basdevant A, Stich V, Viguerie N, Langin D, Bedossa P, Zucker JD, Clement K. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol.* 2008;9:R14.
288. Duffaut C, Zakaroff-Girard A, Bourlier V, Decaunes P, Maumus M, Chiotasso P, Sengenès C, Lafontan M, Galitzky J, Bouloumie A. Interplay Between Human Adipocytes and T Lymphocytes in Obesity. CCL20 as an Adipochemokine and T Lymphocytes as Lipogenic Modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009.
289. Duffaut C, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumie A. Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;384:482-485.
290. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, Mathis D. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med.* 2009;15:930-939.
291. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med.* 2009;15:914-920.
292. Bourlier V, Bouloumie A. Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance. *Diabetes Metab.* 2009.
293. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielinski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker DJ, Engleman E, Winer D, Dosch HM. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med.* 2009;15:921-929.
294. Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev.* 2001;2:239-254.
295. Butterwith SC. Regulators of adipocyte precursor cells. *Poult Sci.* 1997;76:118-123.
296. Deslex S, Negrel R, Vannier C, Etienne J, Ailhaud G. Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int J Obes.* 1987;11:19-27.
297. Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer EF. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest.* 1989;84:1663-1670.
298. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7:211-228.
299. Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, Paschalis EP, Wilkison WO, Gimble JM. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng.* 2001;7:729-741.
300. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290:763-769.

301. Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, Villageois A, Bagnis C, Breittmayer JP, Groux H, Ailhaud G, Dani C. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med.* 2005;201:1397-1405.
302. Kokai LE, Rubin JP, Marra KG. The potential of adipose-derived adult stem cells as a source of neuronal progenitor cells. *Plast Reconstr Surg.* 2005;116:1453-1460.
303. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;294:371-379.
304. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L, Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation.* 2004;109:656-663.
305. Fraser JK, Schreiber R, Strem B, Zhu M, Alfonso Z, Wulur I, Hedrick MH. Plasticity of human adipose stem cells toward endothelial cells and cardiomyocytes. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006;3 Suppl 1:S33-37.
306. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology.* 2007;46:219-228.
307. Aurich H, Sgodda M, Kaltwasser P, Vetter M, Weise A, Liehr T, Brulport M, Hengstler JG, Dollinger MM, Fleig WE, Christ B. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut.* 2009;58:570-581.
308. Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, Muller B, Zulewski H. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;341:1135-1140.
309. Sengenès C, Lolmede K, Zakaroff-Girard A, Busse R, Bouloumie A. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol.* 2005;205:114-122.
310. Minana MD, Carbonell-Uberos F, Mirabet V, Marin S, Encabo A. IFATS collection: Identification of hemangioblasts in the adult human adipose tissue. *Stem Cells.* 2008;26:2696-2704.
311. Cousin B, Andre M, Arnaud E, Penicaud L, Casteilla L. Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;301:1016-1022.
312. Wall ME, Bernacki SH, Lobo EG. Effects of serial passaging on the adipogenic and osteogenic differentiation potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 2007;13:1291-1298.
313. Guilak F, Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, Fermor B, Gimble JM. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol.* 2006;206:229-237.
314. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells.* 2006;24:376-385.
315. McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, Kloster A, Di Halvorsen Y, Ting JP, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells.* 2006;24:1246-1253.

316. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol.* 2001;189:54-63.
317. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol.* 2004;32:414-425.
318. Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell.* 2008;135:240-249.
319. Staszkiwicz J, Gimble JM, Manuel JA, Gawronska-Kozak B. IFATS collection: Stem cell antigen-1-positive ear mesenchymal stem cells display enhanced adipogenic potential. *Stem Cells.* 2008;26:2666-2673.
320. 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. *J Cell Physiol.* 2008;215:210-222.
321. Tang W, Zeve D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, Tallquist MD, Graff JM. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science.* 2008;322:583-586.
322. Zannettino AC, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, Gronthos S. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol.* 2008;214:413-421.
323. Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, Johnstone BH, March KL. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res.* 2008;102:77-85.
324. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 1998;78:783-809.
325. Sabatakos G, Sims NA, Chen J, Aoki K, Kelz MB, Amling M, Bouali Y, Mukhopadhyay K, Ford K, Nestler EJ, Baron R. Overexpression of DeltaFosB transcription factor(s) increases bone formation and inhibits adipogenesis. *Nat Med.* 2000;6:985-990.
326. Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A. Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20:16-24.
327. Ugarte F, Ryser M, Thieme S, Fierro FA, Navratil K, Bornhauser M, Brenner S. Notch signaling enhances osteogenic differentiation while inhibiting adipogenesis in primary human bone marrow stromal cells. *Exp Hematol.* 2009;37:867-875 e861.
328. Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:9607-9611.
329. Wang EA, Israel DI, Kelly S, Luxenberg DP. Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Factors.* 1993;9:57-71.
330. Asahina I, Sampath TK, Hauschka PV. Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells. *Exp Cell Res.* 1996;222:38-47.
331. Cousin W, Fontaine C, Dani C, Peraldi P. Hedgehog and adipogenesis: fat and fiction. *Biochimie.* 2007;89:1447-1453.
332. Fontaine C, Cousin W, Plaisant M, Dani C, Peraldi P. Hedgehog signaling alters adipocyte maturation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008;26:1037-1046.
333. Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, Flier JS, Moller DE. Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest.* 1996;97:2553-2561.
334. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 2000;14:1293-1307.

335. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem.* 2000;43:527-550.
336. Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga M. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes.* 2002;51:2045-2055.
337. Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* 1991;5:1538-1552.
338. Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20:107-114.
339. Zhang JW, Klemm DJ, Vinson C, Lane MD. Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J Biol Chem.* 2004;279:4471-4478.
340. Freytag SO, Paielli DL, Gilbert JD. Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev.* 1994;8:1654-1663.
341. Loftus TM, Lane MD. Modulating the transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 1997;7:603-608.
342. El-Jack AK, Hamm JK, Pilch PF, Farmer SR. Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPARgamma and C/EBPalpha. *J Biol Chem.* 1999;274:7946-7951.
343. Wu Z, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional activation of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11:689-694.
344. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.* 2001;49:507-521.
345. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn.* 2004;231:474-488.
346. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275:964-967.
347. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood.* 1998;92:362-367.
348. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000;95:952-958.
349. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1185-1189.
350. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med.* 2001;7:1194-1201.
351. Spring H, Schuler T, Arnold B, Hammerling GJ, Ganss R. Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:18111-18116.
352. Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick AS, Jaggi JS, Bambino K, Gupta S, Heikamp E, McDevitt MR, Scheinberg DA, Benezra R, Mittal V. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev.* 2007;21:1546-1558.

353. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007;109:1801-1809.
354. Purhonen S, Palm J, Rossi D, Kaskenpaa N, Rajantie I, Yla-Herttuala S, Alitalo K, Weissman IL, Salven P. Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:6620-6625.
355. Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, Ruiz J, Sherwood S, Heifetz A, Ludlow JW, Stricker DM, Potiny S, Green P, Halvorsen YD, Cheatham B, Storms RW, Gimble JM. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol*. 2007;212:702-709.
356. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004;109:1292-1298.
357. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005;33:1402-1416.
358. Amos PJ, Shang H, Bailey AM, Taylor A, Katz AJ, Peirce SM. IFATS collection: The role of human adipose-derived stromal cells in inflammatory microvascular remodeling and evidence of a perivascular phenotype. *Stem Cells*. 2008;26:2682-2690.
359. Bonyadi M, Waldman SD, Liu D, Aubin JE, Grynepas MD, Stanford WL. Mesenchymal progenitor self-renewal deficiency leads to age-dependent osteoporosis in Sca-1/Ly-6A null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:5840-5845.
360. Fu J, Tay SS, Ling EA, Dheen ST. High glucose alters the expression of genes involved in proliferation and cell-fate specification of embryonic neural stem cells. *Diabetologia*. 2006;49:1027-1038.
361. Scavo LM, Karas M, Murray M, Leroith D. Insulin-like growth factor-I stimulates both cell growth and lipogenesis during differentiation of human mesenchymal stem cells into adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:3543-3553.
362. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Naslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Ryden M, Frisen J, Arner P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008;453:783-787.
363. Joe AW, Yi L, Even Y, Vogl AW, Rossi FM. Depot-Specific Differences In Adipogenic Progenitor Abundance And Proliferative Response To High Fat Diet. *Stem Cells*. 2009.
364. Staszkiwicz J, Gimble J, Cain C, Dietrich M, Burk D, Kirk-Ballard H, Gawronska-Kozak B. Flow cytometric and immunohistochemical detection of in vivo BrdU-labeled cells in mouse fat depots. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;378:539-544.
365. Ledoux S, Queguiner I, Msika S, Calderari S, Rufat P, Gasc JM, Corvol P, Larger E. Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity. *Diabetes*. 2008;57:3247-3257.
366. Lijnen HR. Angiogenesis and obesity. *Cardiovasc Res*. 2008;78:286-293.
367. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*. 2004;92:347-355.
368. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between Adipocyte Size and Adipokine Expression and Secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:1023-1033.
369. Wang L. Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells. *Trends Cardiovasc Med*. 2006;16:89-94.

370. de Barros S. Les métalloprotéases matricielles 2 et 9 et la différenciation des cellules progénitrices du tissu adipeux humain. Toulouse: UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER U.F.R sciences de la vie et de la terre; 2007.
371. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*. 1998;281:1683-1686.
372. Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res*. 1998;83:1059-1066.
373. Ambati S, Kim HK, Yang JY, Lin J, Della-Fera MA, Baile CA. Effects of leptin on apoptosis and adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Pharmacol*. 2007;73:378-384.
374. Rhee SD, Sung YY, Jung WH, Cheon HG. Leptin inhibits rosiglitazone-induced adipogenesis in murine primary adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;294:61-69.
375. Bell LN, Cai L, Johnstone BH, Traktuev DO, March KL, Considine RV. A central role for hepatocyte growth factor in adipose tissue angiogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;294:E336-344.
376. Sulpice E, Ding S, Muscatelli-Groux B, Berge M, Han ZC, Plouet J, Tobelem G, Merkulova-Rainon T. Cross-talk between the VEGF-A and HGF signalling pathways in endothelial cells. *Biol Cell*. 2009;101:525-539.
377. Fearon U, Mullan R, Markham T, Connolly M, Sullivan S, Poole AR, FitzGerald O, Bresnihan B, Veale DJ. Oncostatin M induces angiogenesis and cartilage degradation in rheumatoid arthritis synovial tissue and human cartilage cocultures. *Arthritis Rheum*. 2006;54:3152-3162.
378. Niu J, Azfer A, Zhelyabovska O, Fatma S, Kolattukudy PE. Monocyte chemotactic protein (MCP)-1 promotes angiogenesis via a novel transcription factor, MCP-1-induced protein (MCPIP). *J Biol Chem*. 2008;283:14542-14551.
379. Miyaoka Y, Tanaka M, Naiki T, Miyajima A. Oncostatin M inhibits adipogenesis through the RAS/ERK and STAT5 signaling pathways. *J Biol Chem*. 2006;281:37913-37920.
380. Timmermans F, Plum J, Yoder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J. Endothelial progenitor cells: identity defined? *J Cell Mol Med*. 2009;13:87-102.
381. Rajashekhar G, Traktuev DO, Roell WC, Johnstone BH, Merfeld-Clauss S, Van Natta B, Rosen ED, March KL, Clauss M. IFATS collection: Adipose stromal cell differentiation is reduced by endothelial cell contact and paracrine communication: role of canonical Wnt signaling. *Stem Cells*. 2008;26:2674-2681.
382. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Tan J, Fishbein MC, Chen PS, March KL. IFATS collection: Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. *Stem Cells*. 2009;27:230-237.
383. Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:44-49.
384. Entenmann G, Hauner H. Relationship between replication and differentiation in cultured human adipocyte precursor cells. *Am J Physiol*. 1996;270:C1011-1016.
385. Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000;16:145-171.
386. Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med*. 1997;185:111-120.
387. Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, Wysoczynski M, Turner AR, Ratajczak J, Ratajczak MZ, Janowska-Wieczorek A. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and

- hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells*. 2006;24:1254-1264.
388. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*. 2004;10:858-864.
389. Wang Y, Deng Y, Zhou GQ. SDF-1 α /CXCR4-mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model. *Brain Res*. 2008;1195:104-112.
390. Kitaori T, Ito H, Schwarz EM, Tsutsumi R, Yoshitomi H, Oishi S, Nakano M, Fujii N, Nagasawa T, Nakamura T. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis Rheum*. 2009;60:813-823.
391. Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, Chacko M, Askari AT, Popovic ZB, Koc ON, Penn MS. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *Faseb J*. 2007;21:3197-3207.
392. Yu L, Cecil J, Peng SB, Schrementi J, Kovacevic S, Paul D, Su EW, Wang J. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene*. 2006;374:174-179.
393. De Clercq E. The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil). *Biochem Pharmacol*. 2009;77:1655-1664.
394. Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, Wood B, Hubel K, Cooper S, Hango G, Bridger GJ, Henson GW, Calandra G, Dale DC. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood*. 2003;102:2728-2730.
395. Foudi A, Jarrier P, Zhang Y, Wittner M, Geay JF, Lecluse Y, Nagasawa T, Vainchenker W, Louache F. Reduced retention of radioprotective hematopoietic cells within the bone marrow microenvironment in CXCR4 $^{-/-}$ chimeric mice. *Blood*. 2006;107:2243-2251.
396. Taleb S, Lacasa D, Bastard JP, Poitou C, Canello R, Pelloux V, Viguerie N, Benis A, Zucker JD, Bouillot JL, Coussieu C, Basdevant A, Langin D, Clement K. Cathepsin S, a novel biomarker of adiposity: relevance to atherogenesis. *Faseb J*. 2005;19:1540-1542.
397. Mannello F. Multipotent mesenchymal stromal cell recruitment, migration, and differentiation: what have matrix metalloproteinases got to do with it? *Stem Cells*. 2006;24:1904-1907.
398. Zerneck A, Shagdarsuren E, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1897-1908.

ANNEXES

Publication 4 : Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages.

Bourlier V, Zakaroff-Girard A, Miranville A, De Barros S, Maumus M, Sengenès C, Galitzky J, Lafontan M, Karpe F, Frayn KN, Bouloumié A. *Circulation*. 2008 Feb 12;117(6):806-15.

Circulation

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

American Heart
Association® 
Learn and Live™

Remodeling Phenotype of Human Subcutaneous Adipose Tissue Macrophages

V. Bourlier, A. Zakaroff-Girard, A. Miranville, S. De Barros, M. Maumus, C. Sengenès, J. Galitzky, M. Lafontan, F. Karpe, K.N. Frayn and A. Bouloumié

Circulation 2008;117;806-815; originally published online Jan 28, 2008;

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.724096

Circulation is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2008 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0009-7322. Online ISSN: 1524-4539

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/117/6/806>

Subscriptions: Information about subscribing to *Circulation* is online at
<http://circ.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>

Remodeling Phenotype of Human Subcutaneous Adipose Tissue Macrophages

V. Bourlier, PhD; A. Zakaroff-Girard, PhD; A. Miranville, PhD; S. De Barros, MSc; M. Maumus, MSc; C. Sengenès, PhD; J. Galitzky, PhD; M. Lafontan, PhD; F. Karpe, MD, PhD; K.N. Frayn, PhD, ScD; A. Bouloumié, PhD

Background—Adipose tissue macrophages (ATMs) have become a focus of attention recently because they have been shown to accumulate with an increase in fat mass and to be involved in the genesis of insulin resistance in obese mice. However, the phenotype and functions of human ATMs are still to be defined.

Methods and Results—The present study, performed on human subcutaneous AT, showed that ATMs from lean to overweight individuals are composed of distinct macrophage subsets based on the expression of several cell surface markers: CD45, CD14, CD31, CD44, HLA-DR, CD206, and CD16, as assessed by flow cytometry. ATMs isolated by an immunoselection protocol showed a mixed expression of proinflammatory (tumor necrosis factor- α , interleukin-6 [IL-6], IL-23, monocyte chemoattractant protein-1, IL-8, cyclooxygenase-2) and antiinflammatory (IL-10, transforming growth factor- β , alternative macrophage activation-associated cc chemokine-1, cyclooxygenase-1) factors. Fat mass enlargement is associated with accumulation of the CD206⁺/CD16⁻ macrophage subset that exhibits an M2 remodeling phenotype characterized by decreased expression of proinflammatory IL-8 and cyclooxygenase-2 and increased expression of lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1. ATMs specifically produced and released matrix metalloproteinase-9 compared with adipocytes and capillary endothelial cells, and secretion of matrix metalloproteinase-9 from human AT in vivo, assessed by arteriovenous difference measurement, was correlated with body mass index. Finally, ATMs exerted a marked proangiogenic effect on AT-derived endothelial and progenitor cells.

Conclusions—The present results showed that the ATMs that accumulate with fat mass development exhibit a particular M2 remodeling phenotype. ATMs may be active players in the process of AT development through the extension of the capillary network and in the genesis of obesity-associated cardiovascular pathologies. (*Circulation*. 2008;117:806-815.)

Key Words: angiogenesis ■ inflammation ■ leukocytes ■ metalloproteinases ■ obesity

Tissue macrophages exhibit a broad range of physiological functions such as the clearance of apoptotic cells and the remodeling and repair of tissues. Thought to originate from blood-circulating monocytes, they show a high degree of heterogeneity, depending mostly on the microenvironment of their anatomic locations.¹ In addition, at the site of inflammation, monocytes are recruited and differentiate into macrophages. In vitro experiments performed with mouse and human monocyte-derived macrophages have defined several activation states. Among them, the classic M1 polarization state defines the proinflammatory macrophages and initiates the inflammatory reaction, whereas the reparative antiinflammatory macrophages, or M2 state, terminate the inflammatory process.²

Clinical Perspective p 815

Several markers, including cell surface receptors, chemokines, cytokines, and free radical-producing and matrix-degrading enzymes, have been described as hallmarks of the macrophage phenotype such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and cyclooxygenase-2 (COX-2) expressed in M1 macrophages and IL-10 and transforming growth factor- β (TGF- β) in M2 macrophages.^{3,4} Conversely to the activated macrophages, the resident macrophage populations of normal or pathological tissues in humans are not fully defined. However, increasing evidence has shown that macrophages associated with pathological tissues exhibit a peculiar profile.

Received June 26, 2007; accepted November 27, 2007.

From the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Toulouse, France (V.B., A.Z.-G., S.D.B., M.M., C.S., J.G., M.L., A.B.); Université Toulouse III Paul-Sabatier, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, Equipe No. 1 AVENIR, Toulouse, France (V.B., A.Z.-G., S.D.B., M.M., C.S., J.G., M.L., A.B.); Oxford Centre for Diabetes, Endocrinology and Metabolism, University of Oxford, Oxford, UK (F.K., K.N.F.); and Department of Cardiovascular Physiology, J.-W. Goethe University, Frankfurt, Germany (A.M.).

Correspondence to Virginie Bourlier, Equipe AVENIR/INSERM U858, 1 Avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse cedex 4, France. E-mail virginie.bourlier@toulouse.inserm.fr

© 2008 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://circ.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.724096

For example, tumor-associated macrophages, characterized by the production of proangiogenic factors such as TGF- β , TNF- α , matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), have been shown to be associated with tumor progression and metastasis.⁵ Macrophages present in atherosclerotic plaques have been involved in plaque progression and recently have been shown to release gelatinase activity *in vivo*.⁶ Recently, the population of resident macrophages present in adipose tissue (ie, adipose tissue macrophages [ATMs]) has been the focus of particular attention. Overweight and obese patients are known to exhibit a higher risk of developing type 2 diabetes and cardiovascular pathologies and are characterized by a moderate plasma increase in several inflammatory markers such as acute-phase proteins, IL-6, and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1).⁷ We and others have shown that the number of macrophages in human subcutaneous and visceral ATs increases with the degree of adiposity.^{8–10} Similar data have been reported in mouse models of obesity.^{11,12} In mice, macrophage accumulation within the fat mass induced by a high-fat diet appeared to be more related to the insulin-resistant state associated with obesity than to the increase in the fat mass.¹² Indeed, distinct approaches have shown that both the recruitment and proinflammatory activation of ATMs are required for the development of insulin resistance in obese mice.^{11,13,14} Given the large heterogeneity in macrophage subsets and phenotypes and the described discrepancies between human and murine macrophages,^{3,15} the present study was undertaken to characterize the phenotype of the human ATMs, to define their contribution to the production of adipokines, and to analyze their potential changes related to the degree of adiposity, as well as their function within the fat mass.

Methods

Materials

Chemicals were from Sigma (St Quentin Fallavier, France). Collagenase NB4 was from Serva (Coger, Paris, France). Selection kits for CD34⁺ and CD14⁺ cells were from StemCell Technologies (Grenoble, France), and magnetic microbeads coupled with anti-CD31 antibodies were from Dynal Biotech (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Culture media were from Promocell (Heidelberg, Germany). Antibodies for flow cytometry analysis were from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France) or Caltag (Invitrogen).

Isolation of the Stroma-Vascular Fraction Cells and Mature Adipocytes From Human AT

Human AT was obtained from healthy women undergoing elective procedures for fat removal for esthetic purposes. Their body mass index (BMI) ranged from 20 to 30 kg/m² (ie, lean to overweight). The protocol of fat collection was approved by the Institutional Research Board of INSERM and Toulouse University Hospital. Liposuction aspirates from subcutaneous abdominal AT were processed immediately after removal. The stroma-vascular fraction (SVF) cells and mature adipocytes were isolated as previously described.^{8,16} SVF cells were further analyzed by flow cytometry (age, 42 \pm 1 years; BMI, 24.4 \pm 0.3 kg/m²; n=78). The distinct cell fractions of the SVF (age, 49 \pm 3 years; BMI, 25.5 \pm 0.7 kg/m²; n=17) were isolated using an immunoselection/depletion protocol as previously described.^{8,16} Freshly isolated CD34⁺/CD31⁻ cells de-

finied as progenitor cells, CD34⁺/CD31⁺ cells defined as capillary endothelial cells, and CD34⁻/CD14⁺ cells defined as macrophages were either lysed in RLT lysis buffer and stored at -20°C for mRNA extraction or cultured for further analysis. Conditioned media from capillary endothelial cells and macrophages were obtained from cells cultured for 24 hours in endothelial cell basal medium (ECBM)/0.1% bovine serum albumin (BSA) (200 000 cells/cm²) and from mature adipocytes as previously described.⁸

Flow Cytometry Analysis

In the flow cytometry analysis, 100 000 cells of the SVF or whole-blood samples (age, 36 \pm 1 years; BMI, 22.9 \pm 0.7 kg/m²; n=4) were incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated antibody (CD31, HLA-DR, CD16, CD62L), PerCP-conjugated antibody (CD45), phycoerythrin (PE)-conjugated antibody (CD14), and allophycocyanin (APC)-conjugated antibody (CD206, CD44, CCR2). An equal number of cells was labeled with the respective isotype control. Analyses were performed with a FACSCalibur flow cytometer and the CellQuest Pro software (BD Bioscience).

For cell sorting, mononuclear cells from the SVF were isolated by layering total SVF on Histopaque-1077 (Sigma). After centrifugation (800g for 30 minutes), ATMs were directly isolated by the CD14-coupled beads immunoselection approach and maintained overnight in ECBM/0.1%BSA. ATMs were labeled with PE-conjugated anti-CD16 or respective isotype control (BD Biosciences), and CD14⁺/CD16⁻ and CD14⁺/CD16⁺ cells were separated with an Epics ALTRA cell sorter (Beckman Coulter, Fullerton, Calif). Purity of the sorted cells was analyzed by flow cytometry (96% to 98% purity). For Ki67 experiments, isolated ATMs were permeabilized in 70% ethanol (overnight at 4°C) before labeling and flow cytometry analysis.

RNA Extraction and Real-Time Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted from ATMs and blood monocytes with the RNeasy kit (Qiagen). The RNA concentration was determined with a fluorometric assay (Ribogreen, Invitrogen). RNA was reverse transcribed with the Superscript II kit (Invitrogen). Reverse transcription also was performed without the superscript enzyme on RNA samples to ensure the absence of contaminating genomic DNA. Primers for TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-23, TGF- β , MCP-1, alternative macrophage activation-associated cc chemokine 1 (AMAC-1), iNOS, arginase 1, COX-1, COX-2, MMP-2, MMP-9, VEGF-A, lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 (LYVE-1), and lipoprotein lipase were from Applied Biosystems (Courtaboeuf, France) (Hs00174128_m1, Hs00174131_m1, Hs00174103_m1, Hs00174086_m1, Hs00372324_m1, Hs00171257_m1, Hs00234140_m1, Hs00268113_m1, Hs00167257_m1, Hs00163660_m1, Hs00168776_m1, Hs00153133_m1, Hs00234422_m1, Hs00234579_m1, Hs00173626_m1, Hs00272659_m1, and Hs00173425_m1, respectively). The amplification reaction was performed in duplicate on 15-ng cDNA samples in a final volume of 20 μ L in 96-well reaction plates (Applied Biosystems) in a GeneAmp 7500 detection system. All reactions were performed under the same conditions: 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes, 40 cycles of 95°C for 15 seconds, and 60°C for 1 minute. Results were analyzed with the GeneAmp 7500 software, and all values were normalized to the levels of 18S rRNA.

Gelatin Zymography

Proteins with gelatinolytic activity (ie, MMP-2 and MMP-9) were identified as previously described.¹⁷

In Situ Arterial and Venous MMP-9 Plasma Determination

In situ arteriovenous differences were measured in healthy subjects (age, 36.07 \pm 3.29 years; BMI, 24.82 \pm 0.67 kg/m²; n=15). They ate a low-fat evening meal and were studied the next morning after an overnight fast. The studies were approved by the Central Oxford Research Ethics Committee, and all subjects gave

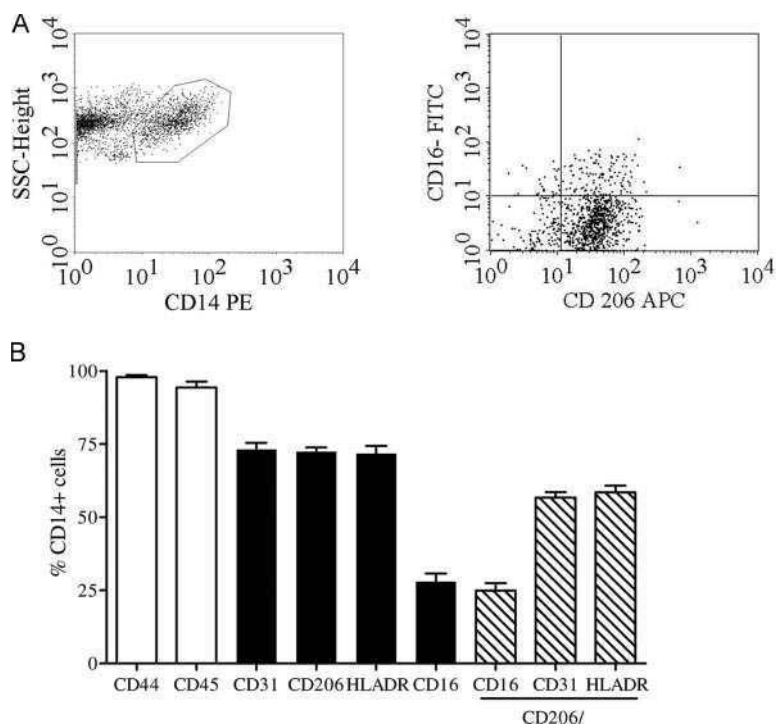


Figure 1. AT-derived CD14⁺ population. Multicolor fluorescent-activated cell sorter analyses were performed on total SVF using the fluorescence-labeled antibodies CD14-PE, CD45-PerCP, CD44-APC, CD31-FITC, HLA-DR-FITC, CD206-APC, and CD16-FITC. A, Representative dot plot analyses of SSC/CD14-PE and CD206-APC/CD16-FITC gated on the SVF CD14⁺ cells. B, Percentages of cells stained with the antibodies indicated within the CD14⁺ population of the SVF. Results are mean \pm SEM of 20 to 78 subjects.

informed consent. A catheter (22 gauge \times 10 cm; Secalon Hydrocath, Ohmeda, Swindon, UK) was introduced into a small vein on the abdominal wall and advanced into the superficial epigastric vein until its tip lay near, but superior to, the inguinal ligament. As described previously,^{18,19} blood obtained in this way has all the characteristics of the venous drainage from AT. A cannula was inserted retrogradely into a vein draining a hand that was warmed in a box (65°C) to provide arterialized blood.²⁰ After 30 minutes of rest, blood samples were taken simultaneously from the arterialized vein and subcutaneous abdominal catheter. Plasma MMP-9 was quantified with an ELISA kit (Chemicon/Millipore, St Quentin en Yvelines, France).

In Vitro Angiogenesis Assay

Tube-like formation was assessed with capillary endothelial cells isolated from AT. Then, 200 μ L per well growth factor-reduced matrigel was poured into 48-well plates and polymerized (30 minutes at 37°C). Next, 15 000 cells per well were plated on the polymerized matrigel and treated with ECBM/0.1% BSA (control) or macrophage-conditioned medium for 24 hours. The branching formation was observed by phase microscopy (Nikon, Germany), and the length of cytoplasmic extensions was measured with LUCIA image software on 3 distinct fields (Nikon, Germany).

Progenitor Cell Culture

Isolated progenitor cells (120 000 cells/cm²) were plated on fibronectin-coated 48-well plates in ECBM/10% FCS. After 24 hours, adipogenic and angiogenic differentiation was induced by ECBM supplemented with 0.5 ng/mL VEGF, 20 ng/mL insulin growth factor-1, 66 nmol/L insulin, 10 μ g/mL transferrin, 1 nmol/L triiodothyronine, and 1 μ g/mL rosiglitazone. Cells were cultured either in a mixture (vol/vol) of 2 \times defined medium and macrophage or CD14⁺/CD16⁻-conditioned medium or in a mixture (vol/vol) of 2 \times defined medium and ECBM/0.1% BSA (control). Media were changed every 2 days until day 8. Cells were then either scraped in PBS/0.2% Tween and lysed by sonication, with DNA and triglycerides determined with a fluorometric assay (Picogreen, Invitrogen) and the Sigma GPO-Trinder kit, respectively, or fixed in paraformaldehyde (10 minutes). Fixed cells were then incubated for 30

minutes in PBS/2% BSA, followed by a 2-hour incubation with CD31 mouse monoclonal antibody (1/10) (Dako, Trappes, France). After washing (PBS/0.2% Tween), cells were incubated for 1 hour with the corresponding fluorescence-labeled second antibody (goat anti-mouse coupled to AlexaFluor 488, Invitrogen) (1/100). Cells were washed and incubated for 10 minutes with 10 μ g/mL Hoescht 33258 (Invitrogen). The fluorescently labeled cells were washed with distilled water, incubated for 15 minutes with Oil Red O solution (0.3% in 60% isopropanol), and washed again before direct observation with a fluorescence microscope (Nikon).

Tissue Immunohistochemistry

Tissue immunochemical analyses were performed on freshly harvested human subcutaneous AT cut into small pieces. After fixation in acetone (30 minutes at 4°C), the tissue pieces were incubated for 15 minutes in PBS/0.1% Triton for permeabilization and for 30 minutes in PBS/2% BSA, followed by an overnight incubation with mouse monoclonal antibody against CD45 (Chemicon) and rabbit polyclonal antibody against Ki67 (Dako) (1/50). After washing (PBS/0.2% Tween), the tissue pieces were incubated for 1 hour with the corresponding fluorescent-labeled second antibodies (goat anti-mouse or goat anti-rabbit coupled to AlexaFluor 546 or 488; Invitrogen) (1/200). The pieces were washed again, incubated for 10 minutes with 10 μ g/mL Hoescht 33258, and washed once in PBS. They were then placed between 2 mounting slides and examined with a fluorescence microscope.

Statistical Analysis

Values are given as mean \pm SE for separate experiments. Correlations were performed with Spearman's rank correlation for nonnormally distributed data, and comparisons between groups were analyzed by either a paired *t* test or 1-way ANOVA, followed by a Newman-Keuls post hoc test (Prism 4, GraphPad Software). Differences were considered significant when $P < 0.05$.

The authors had full access to and take full responsibility for the integrity of the data. All authors have read and agree to the manuscript as written.

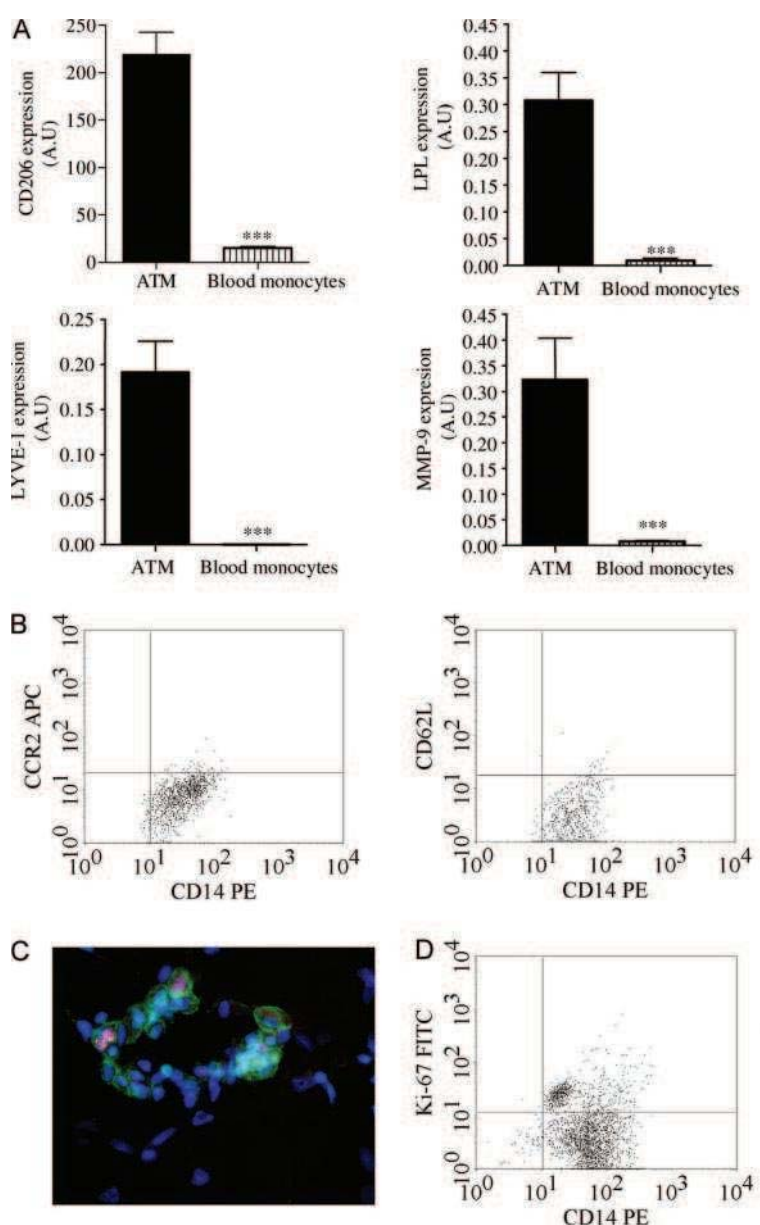


Figure 2. Characterization of ATMs as resident macrophage. A, CD206 expression determined by flow cytometry on the gated CD14⁺ population of both SVF (n=61) and blood sample (n=4) and lipoprotein lipase, MMP-9, and LYVE-1 transcript levels determined by real-time PCR analyses on both immunoselected ATMs (n=17) and blood monocytes (n=10). Values are mean±SEM (arbitrary units). B, Representative dot plot analyses of CCR2-APC/CD14-PE and CD62L-FITC/CD14-PE gated on the SVF CD14⁺ cells (n=15). C, Representative photomicrograph of immunohistochemistry analyses of whole AT using CD45 (green), Ki67 (red), and Hoescht 33258 (n=5). D, Dot plot of CD14-PE/Ki67-FITC of isolated ATM. In total, 8±2% of the CD14⁺ cells were positive for Ki67 (n=5). ***P<0.001 vs ATMs.

Results

Characterization of the CD14⁺ Cells as AT Resident Macrophages

Multiparameter fluorescent-activated cell sorter analyses were performed on freshly isolated SVF of human subcutaneous AT from lean to overweight patients. As depicted in Figure 1A and 1B, ATMs, characterized by the expression of the common leukocyte antigen CD45, the monocyte differentiation antigen CD14, the leukocyte surface glycoprotein CD44, the class II histocompatibility antigens HLA-DR, and the platelet and endothelial cell adhesion molecule CD31, were constituted mainly by cells positive for the mannose receptor CD206. Within the CD14⁺/CD206⁺ population, 2 distinct cell subsets were identified on the basis of the expression of the immunoglobulin G Fc receptor III (CD16), with the major population characterized as CD14⁺/CD206⁺/CD16⁻. Total

ATMs were isolated from the SVF by a CD14 immunoselection approach, and the expression of known markers of the macrophage differentiation, ie, CD206, lipoprotein lipase, and MMP-9, was studied in freshly isolated ATMs and blood monocytes by flow cytometry and real-time polymerase chain reaction (PCR) analyses. ATMs specifically expressed all 3 macrophage markers, together with LYVE-1, recently described in a murine macrophage subset involved in tissue remodeling²¹ (Figure 2A). In addition, flow cytometry analyses showed that ATMs lack the expression of CCR2 and CD62L (Figure 2B), both of which are involved in the recruitment of inflammatory monocytes. Moreover, immunohistochemical and flow cytometry analyses using Ki67 antibodies identified proliferative ATMs within the AT (Figure 2C and 2D).

ATM Phenotype and Secretory Activity

The ATM expression of M1 and M2 activation state markers (ie, cytokines and chemokines, iNOS, arginase,

Table 1. M1 and M2 Macrophage Activation Markers Expressed in Human ATMs

	M1 Markers	M2 Markers
Proinflammatory or antiinflammatory cytokines		
TNF- α	++	
IL-6	+	
IL-23	+	
IL-10		++
TGF- β		++
Chemokines		
MCP-1 (CCL-2)	++	
IL-8 (CXCL-8)	+++	
AMAC-1 (CCL-18)		++
Arginine metabolism enzymes		
iNOS	-	
ARG-1		+/-
Cyclooxygenases		
COX-2	++	
COX-1		+

ARG-1 indicates arginase-1. ATMs were isolated from the SVF (n=17), and real-time PCR analysis of relevant M1 and M2 activation state markers was assessed by mean $2^{\Delta Ct} \times 1000$ and categorized as follows: 0.001<+/-<0.01; 0.01<+<0.1; 0.1<++<1; and 1<++++.

and COX) was assessed by real-time PCR. As depicted in Table 1, total ATMs expressed both M1 and M2 markers. Markers related to arginine metabolism, arginase-1 and iNOS, were poorly or not expressed, respectively. No marked differences in gene expression between the subtypes of ATM sorted on the basis of CD16 expression were observed, although the CD14⁺/CD16⁻ ATMs tended to exhibit higher transcript levels both for the M1 markers IL-6 and MCP-1 and for LYVE-1 (Table 2). To assess the specific contribution of ATMs in the secretory activity of human AT, the expression of the inflammatory cytokines MCP-1 and IL-6, as well as the transcripts for adipokines involved in remodeling processes such as the proangiogenic VEGF-A, MMP-2, and MMP-9, was determined by real-time PCR in mature adipocytes, freshly isolated ATMs, and capillary endothelial cells from AT. Comparative analyses clearly showed that MCP-1 and IL-6 are expressed mainly in human AT capillary endothelial cells, as shown in Figure 3A. Interestingly, MMP-9 was found to be expressed mainly in ATMs, whereas VEGF-A and MMP-2 (data not shown) were found to be expressed in the 3 cell types (Figure 3B). The ATM-specific expression of MMP-9 was confirmed by comparative analysis of the gelatinolytic activity released by adipocytes, macrophages, and endothelial cells (Figure 3C). Finally, the production of MMP-9 by human AT was shown in situ. Indeed, arteriovenous measurements revealed that the epigastric venous plasma that drains the subcutaneous abdominal AT was statistically significantly enriched in MMP-9 compared with the arterial plasma (Figure 3D).

Table 2. Expression of Macrophage Markers in Human Total ATMs and CD14⁺/CD16⁺ and CD14⁺/CD16⁻ ATM Subtypes

	Total ATMs	CD14 ⁺ /CD16 ⁺	CD14 ⁺ /CD16 ⁻
IL-6	+++	++	+++
TGF- β	++	++	++
MCP-1 (CCL-2)	+++	++	+++
IL-8 (CXCL-8)	+++	+++	+++
COX-2	++	++	++
COX-1	+	+	+
MMP-9	+++	+++	+++
LYVE-1	++	+	++

Total ATMs and CD14⁺/CD16⁺ and CD14⁺/CD16⁻ ATM subtypes were isolated from the SVF (n=4 to 7), and real-time PCR analysis of relevant macrophage markers was assessed by mean $2^{\Delta Ct} \times 1000$ and categorized as follows: 0.001<+/-<0.01; 0.01<+<0.1; 0.1<++<1; and 1<++++.

Influence of the Degree of Adiposity on the ATMs

The percentage of CD14⁺ cells within the SVF increased with the BMI of the patients (data not shown). However, the positive statistically significant correlation between ATM percentage and the degree of adiposity was found to be restricted to the CD45⁺/CD14⁺/CD206⁺ population ($P=0.019$; Spearman $r=0.2664$; n=61) (Figure 4A). Indeed, BMI did not influence the percentage of the CD45⁺/CD14⁺/CD206⁻ cell subset within the SVF ($P=0.2$; Spearman $r=-0.1094$; n=61, data not shown). Furthermore, the number of CD45⁺/CD14⁺/CD206⁺/CD16⁻ cells normalized to the weight of AT correlated positively with BMI ($P=0.010$; Spearman $r=0.2986$; n=60; Figure 4B), whereas the number of CD45⁺/CD14⁺/CD206⁺/CD16⁺ cells remained constant ($P=0.189$; Spearman $r=-0.1159$; n=60; data not shown). In parallel with the increased number of CD45⁺/CD14⁺/CD206⁺/CD16⁻ cells, the difference measurement in MMP-9 concentration between arterial and epigastric venous plasma was statistically positively correlated with the BMI of the subjects, and the ATM expression of LYVE-1 was increased (Figure 4B and 4C, respectively). Finally, to assess a potential change in the activation state of the ATMs with the development of AT, the expression of the M1 and M2 markers was studied in ATMs. Among the studied genes, only IL-8 and COX-2 transcript levels were found to be downregulated (Figure 5A). Treatment of isolated ATMs for 24 hours with leptin led to a reduction in IL-8 and COX-2 expression, whereas adiponectin did not modify their expression (Figure 5B), suggesting that increased leptin production and secretion with obesity might contribute to the changes in IL-8 and COX-2 expression in ATMs.

Human ATMs Control Adipogenesis and Angiogenesis

The potential effects of ATMs on the differentiation of AT progenitor cells were investigated on primary cultures of human AT-derived CD34⁺/CD31⁻ cells under culture conditions that allowed the expression of specific adipocyte and endothelial cell markers, as previously described.^{16,22} Treatment of AT progenitor cells with ATM-conditioned

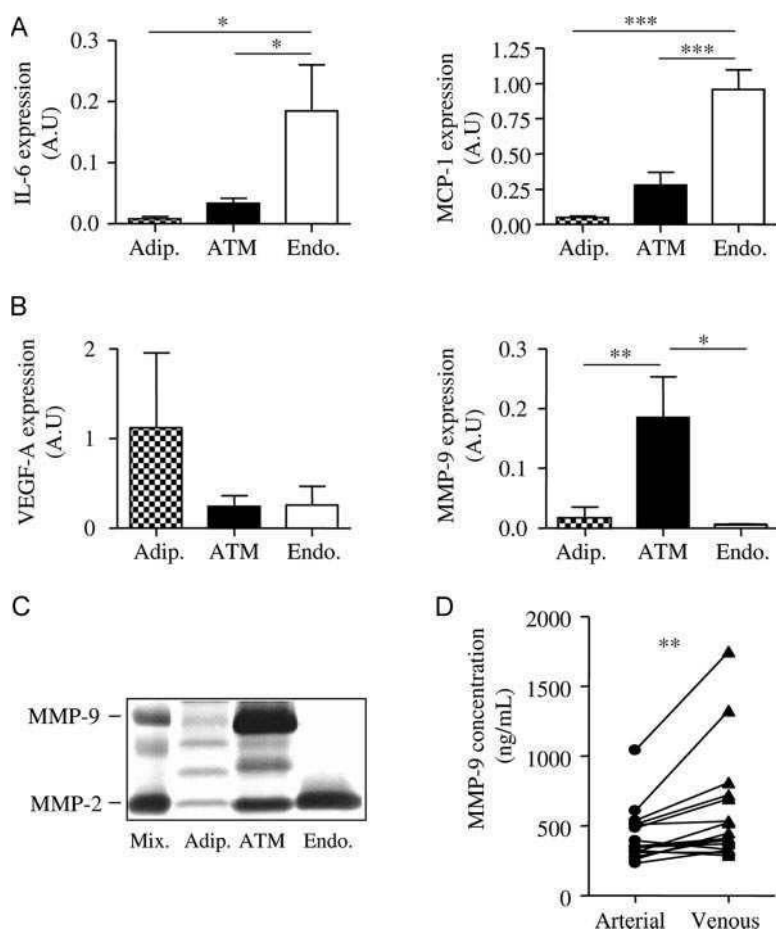


Figure 3. ATM-specific factor expression and secretion within AT. IL-6 (A), MCP-1 (A), VEGF-A (B), and MMP-9 (B) transcript levels were determined by real-time PCR in immunoselected ATMs, capillary endothelial cells (Endo.), and mature adipocytes (Adip.). Values are mean \pm SEM (arbitrary unit) of 3 to 5 independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ between cell types. C, Macrophages, endothelial cells, and adipocyte-conditioned media were analyzed by gelatin zymography, and a mixture of human recombinant MMP-2 and MMP-9 (Mix.) was used as positive control. D, Arterio-venous differences in MMP-9 plasma concentration determined by ELISA in 15 patients. ** $P < 0.01$, arterial vs venous plasma concentration.

media for 8 days resulted in reduced adipogenesis, as shown by the decreased Oil Red O staining associated with the reduction in triglyceride content of the cells (Figure 6A). Conversely, the number of cells expressing endothelium-specific genes such as CD31 and the organization in capillary-like structures increased in the presence of secretory products derived from human ATMs. Indeed, the length of the network of cells positive for CD31 showed a statistically significant increase (2-fold increase compared with control). Note that similar effects were observed when cells were treated with CD14⁺/CD16⁻-conditioned media (1.8-fold increase in CD31-positive network length compared with control; $P < 0.01$; $n = 4$; data not shown). The proangiogenic effect of ATMs was confirmed with an in vitro angiogenesis assay using AT-derived capillary endothelial cells cultured on growth factor-reduced matrigel. Indeed, as depicted in Figure 6B, ATM-conditioned media promoted the migration and organization of human AT capillary endothelial cells (2.3-fold increase in tube length; $P < 0.05$; $n = 5$).

Discussion

Human subcutaneous AT-derived CD14⁺ cells that were positive for a combination of common monocyte/macrophage markers, ie, CD45, CD14, CD44, CD31, and HLA-DR, also expressed markers distinct from the circulating blood monocytes. Indeed, they are composed mainly of

cells expressing CD206, described as being expressed in M2-activated macrophages,²³ as well as in tissue-resident macrophages such as tumor-associated macrophages²⁴ and ATMs, as recently described by a study that appeared during the preparation of this article.²⁵ Moreover, freshly isolated ATMs expressed specific macrophage differentiation markers, ie, lipoprotein lipase and MMP-9,^{21,26} as well as the newly described macrophage marker LYVE-1.²¹ On the basis of the combined expression of CD206 and CD16, 2 ATMs subsets were identified. Comparison of the M1 and M2 gene pattern expressed by ATMs sorted by CD16 revealed discrete discrepancies restricted to higher expression of IL-6, MCP-1, and LYVE-1 in the CD16⁻ subset, demonstrating that the CD16 expression in human ATMs is not clearly associated with a specific M1 or M2 activation state. However, a marked difference between both subsets was revealed with the growth of the fat mass because only the CD206⁺/CD16⁻ cells accumulated with increased adiposity, suggesting that both subsets may have distinct origin. Replenishment of tissue macrophages relies on a blood CD16⁺ monocyte subset.^{27,28} In addition, self-renewal of tissue macrophages through local proliferation has been described.²⁹ Macrophage recruitment to inflammatory sites involves the blood CD16⁻ monocyte subset that coexpresses CCR2 and CD62L.^{27,28} It is thus tempting to speculate that the CD206⁺/CD16⁺ ATMs might represent resident macrophages deriving from CD16⁺ monocytes,

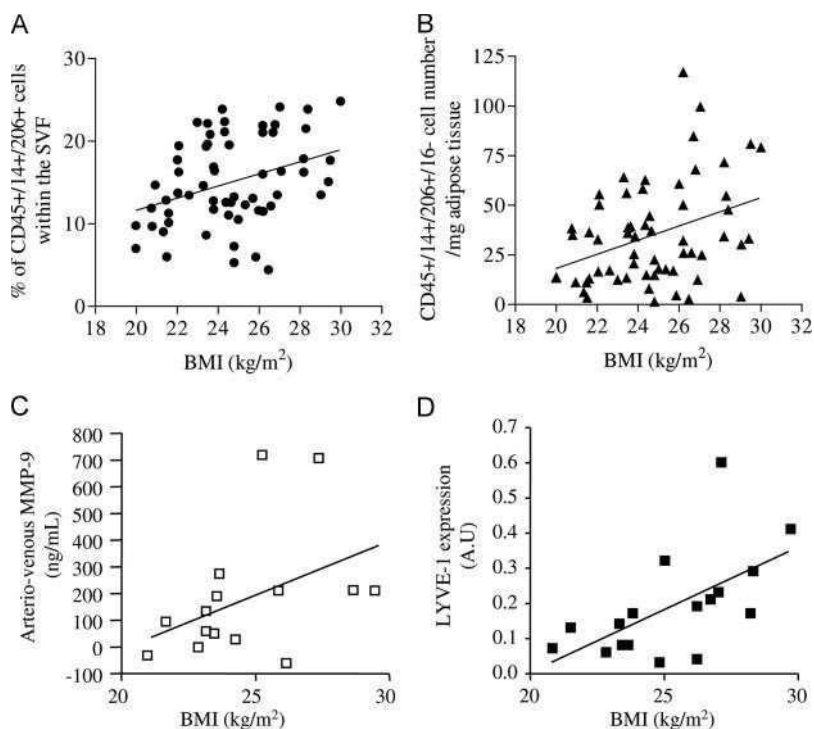


Figure 4. ATM populations with respect to AT growth. A and B, Multicolor fluorescent-activated cell sorter analyses were performed on the SVF of patients with increasing BMI using fluorescence-labeled antibodies CD14-PE, CD45-PerCP, CD206-APC, and CD16-FITC. A, Percentage of CD45⁺/CD14⁺/CD206⁺ cells within the SVF ($P < 0.05$; Spearman $r = 0.2664$; $n = 61$) and (B) cell number of CD45⁺/CD14⁺/CD206⁺/CD16⁻ per 1 mg AT ($P < 0.05$; Spearman $r = 0.2986$; $n = 60$). C, Correlation between arteriovenous MMP-9 plasma concentration, determined by ELISA, and BMI ($P < 0.05$; Spearman $r = 0.53$; $n = 15$). D, Correlation between LYVE-1 expression assessed by real-time PCR in isolated ATMs and BMI ($P < 0.001$; Spearman $r = 0.73$; $n = 17$).

whereas the CD206⁺/CD16⁻ ATMs may originate from recruitment of inflammatory CD16⁻ monocytes. However, neither CCR2 nor CD62L was detected in the AT CD14⁺ cells, and the AT minor CD14⁺/CD206⁻/CD16⁻ monocyte subset remained constant with AT growth, suggesting that this population corresponds to contaminating blood cells more than to inflammatory infiltrating monocytes recruited by the growing tissue. Although a rapid local differentiation of inflammatory infiltrating monocytes into macrophages, as recently described in a mouse model of atherosclerosis,³⁰ cannot be excluded, enhanced local proliferation might be involved in the accumulation of CD206⁺/CD16⁻ cells. Indeed ATMs exhibited proliferative abilities as shown by the positive Ki67 labeling. However, additional experiments are needed to clearly state the relative contribution of blood-derived cells and local proliferation in the ATM accumulation. Nevertheless, the phenotype exhibited by ATMs in the growing fat mass did not correspond to a classic inflammatory phenotype because both M1 markers, IL-8 and COX-2, were found to be downregulated, whereas LYVE-1 expression was enhanced. Interestingly, a recent study performed on mice after skeletal injury demonstrated that the phagocytotic activity may switch inflammatory recruited monocytes into antiinflammatory macrophages.²⁹ Moreover, it is now well accepted that the tissue microenvironment can influence the macrophage phenotype.³¹ Leptin and adiponectin are specifically produced and released by adipocytes, and the levels of leptin concentration are directly linked to the degree of adiposity. Leptin treatment of ATMs led to decreased expression of IL-8 and COX-2, whereas adiponectin had no effect. Taken together, these results strongly suggest that the changes in the microen-

vironment of the growing human AT and, more precisely, in leptin concentration may be involved in the modulation of ATM phenotype.

Extension of the capillary network has been shown to accompany the fat mass enlargement in mice and in humans.^{16,32} It has been suggested that adipocytes exert control over their own vascularization through their production of a wide range of proangiogenic factors.³³ However, an increasing number of reports show that tissue macrophages, particularly tumor-associated macrophages, and M2-activated macrophage subsets also might promote the formation of new blood vessels.^{5,21} The present results showed that ATMs specifically expressed and released MMP-9, a key enzyme involved in remodeling processes and particularly in angiogenesis³⁴ and atherosclerosis.⁶ Moreover, because the plasma concentration of MMP-9 increased after passage through the subcutaneous AT and was found to be positively correlated with the BMI of the patients, the present study demonstrates for the first time that MMP-9 is a true adipokine; ie, it is produced and released in the systemic circulation by the human AT. Moreover, it strongly suggests that the reported increase in MMP-9 plasma concentration with obesity^{35,36} might be related to the accumulated ATMs. The remodeling function of ATMs was further confirmed by the finding that ATMs expressed the receptor for hyaluronan, LYVE-1, and that the ATM expression of LYVE-1 was closely positively correlated with fat mass enlargement. LYVE-1⁺ macrophage subsets, recently described in mice, have been suggested to be specifically involved in tissue remodeling during tumor growth and wound healing and in the angiogenesis of the epididymal fat pad.^{21,37} In agreement with such observations, the present data showed that ATM-conditioned media stimulated the AT-derived endo-

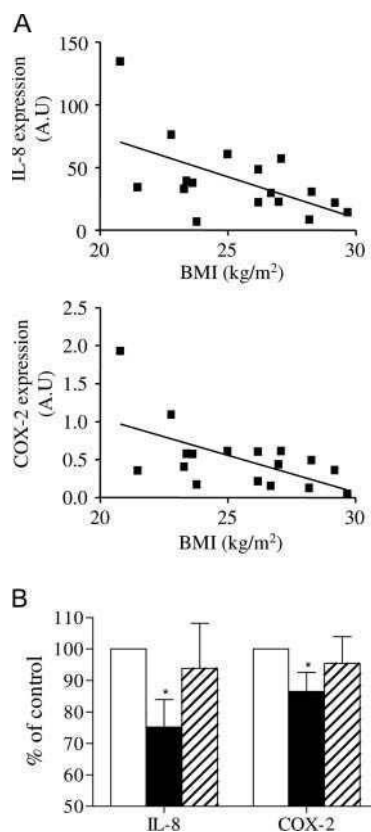


Figure 5. ATM phenotype with respect to AT growth. A, Real-time PCR analyses using specific Taqman probes for IL-8 and COX-2 were performed on immunoselected ATMs from patients with distinct BMIs. Correlations between ATM IL-8 and COX-2 transcript levels and BMI ($P < 0.01$, Spearman $r = -0.58$, $n = 17$; $P < 0.05$, Spearman $r = -0.47$, $n = 17$, respectively). B, Expression of IL-8 and COX-2 in ATMs cultured for 24 hours in ECBM/0.1% BSA (control, white bar) in the presence of leptin (2 ng/mL, black bar) or adiponectin (20 ng/mL, hashed bar). Values are mean \pm SEM (arbitrary units) of 6 independent experiments. * $P < 0.05$ vs control.

thelial cell migration and organization in matrigel assays. Moreover, secretory products originating from ATMs decreased adipogenesis, an observation in agreement with a recent study using different approaches,³⁸ but conversely increased angiogenesis by the human AT-derived progenitor cells. Although additional experiments are needed to clearly delineate the macrophage-derived factors responsible for such effects, the present results demonstrate that ATMs exhibit proangiogenic properties associated with an antiadipogenic effect.

The present study showed that human subcutaneous ATMs are composed of distinct macrophage subsets. Fat mass enlargement is associated with the accumulation of CD206⁺/CD11b⁻ ATMs that exhibits a remodeling phenotype characterized by decreased proinflammatory factors IL-8 and COX-2 and increased LYVE-1 expression. Recent studies performed in mice have clearly shown that obesity induced by either a high-fat diet or leptin deficiency is associated with the accumulation of M1 inflammatory monocyte/macrophages expressing iNOS, TNF- α , and CCR2.^{11–13} However, the accumulation of ATM in mice occurs after a long period of time under high-fat

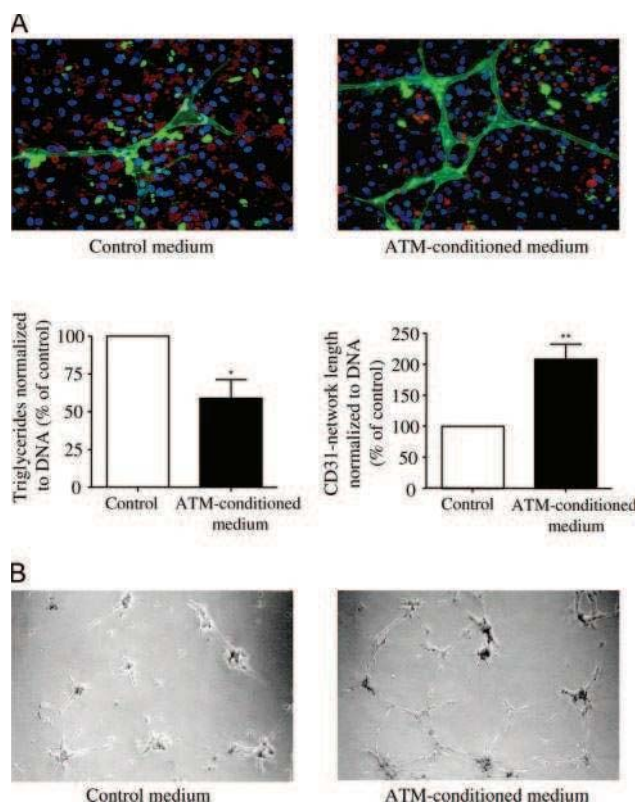


Figure 6. Roles of ATM-conditioned media in AT remodeling. A, Immunoselected AT progenitor cells were cultured in a medium allowing both adipogenic and angiogenic differentiation supplemented or not with macrophage (ATM)-conditioned media. After 8 days, cells were fixed and stained with antibody against CD31 and Oil Red O. In parallel, DNA and triglyceride contents were determined. Representative photomicrographs from 5 independent experiments are shown. Hoescht 33258 (blue) was used to stain nuclei. Values are mean \pm SEM of 5 independent experiments normalized to DNA and expressed as percentage of the control. B, Capillary endothelial cells were isolated from AT, plated on matrigel, and cultured for 24 hours with control or macrophage (ATM)-conditioned media. Representative photomicrographs from 5 independent experiments are shown. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control medium.

feeding and appears more related to the development of insulin resistance than directly linked to the extension of the fat mass.¹² In the present study, increased ATM number was already observed in the subcutaneous AT of overweight healthy women and thus was independent of the potential direct effects of a high-fat diet, recently shown to be associated with increased endotoxemia³⁹ and established obesity-associated pathologies. Moreover, discrepancies between mice and human macrophages are well documented, especially concerning iNOS and arginase-1 expression.^{15,40} The present results suggest that ATMs may be active players in the process of AT development through the extension of the capillary network and in the genesis of obesity-associated pathologies through the production of the proatherogenic MMP-9. Furthermore, the ATM-mediated antiadipogenic effect may contribute to lipotoxicity by promoting the ectopic deposition of free fatty acids in non-ATs.

Acknowledgments

We thank Dr Jean-Jacques Bénarous and Pauline Decaunes for their excellent technical support, as well as Drs Fatima Ezzahra L'Faqihi-Olive and Valérie Duplan-Eche (IFR30, Toulouse) for their availability, advice, and technical support for the cell sorting experiments.

Sources of Funding

This study was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR RIOMA). Drs Karpe and Frayn were funded by a Wellcome Trust Project Grant.

Disclosures

None.

References

- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:953–964.
- Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 2003;73:209–212.
- Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol*. 2006;177:7303–7311.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25:677–686.
- Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*. 2006;42:717–727.
- Deguchi JO, Aikawa M, Tung CH, Aikawa E, Kim DE, Ntziachristos V, Weissleder R, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages in vivo. *Circulation*. 2006;114:55–62.
- Bouloumie A, Curat CA, Sengenès C, Lolmede K, Miranville A, Busse R. Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2005;8:347–354.
- Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumie A. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*. 2004;53:1285–1292.
- Curat CA, Wegner V, Sengenès C, Miranville A, Tonus C, Busse R, Bouloumie A. Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia*. 2006;49:744–747.
- Cancello R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, Coussieu C, Basdevant A, Hen AB, Bedossa P, Guerre-Millo M, Clement K. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes*. 2006;55:1554–1561.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112:1796–1808.
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003;112:1821–1830.
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117:175–184.
- Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Red Eagle A, Vats D, Brombacher F, Ferrante AW, Chawla A. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*. 2007;447:1116–1120.
- Schneemann M, Schoeden G. Macrophage biology and immunology: man is not a mouse. *J Leukoc Biol*. 2007;81:579.
- Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 2004;110:349–355.
- Bourlier V, Zakaroff-Girard A, De Barros S, Pizzacalla C, de Saint Front VD, Lafontan M, Bouloumie A, Galitzky J. Protease inhibitor treatments reveal specific involvement of matrix metalloproteinase-9 in human adipocyte differentiation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312:1272–1279.
- Frayn KN, Whyte PL, Benson HA, Earl DJ, Smith HA. Changes in forearm blood flow at elevated ambient temperature and their role in the apparent impairment of glucose tolerance. *Clin Sci (Lond)*. 1989;76:323–328.
- Frayn KN, Coppack SW, Humphreys SM. Subcutaneous adipose tissue metabolism studied by local catheterization. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1993;17(suppl 3):S18–S21.
- McGuire EA, Helderman JH, Tobin JD, Andres R, Berman M. Effects of arterial versus venous sampling on analysis of glucose kinetics in man. *J Appl Physiol*. 1976;41:565–573.
- Cho CH, Koh YJ, Han J, Sung HK, Jong Lee H, Morisada T, Schwendener RA, Brekken RA, Kang G, Oike Y, Choi TS, Suda T, Yoo OJ, Koh GY. Angiogenic role of LYVE-1-positive macrophages in adipose tissue. *Circ Res*. 2007;100:e47–e57.
- Sengenès C, Lolmede K, Zakaroff-Girard A, Busse R, Bouloumie A. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol*. 2005;205:114–122.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:23–35.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002;23:549–555.
- Zeyda M, Farmer D, Todoric J, Aszmann O, Speiser M, Gyori G, Zlabinger GJ, Stulnig TM. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int J Obes (Lond)*. 2007;31:1420–1428.
- Mead JR, Ramji DP. The pivotal role of lipoprotein lipase in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2002;55:261–269.
- Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19:71–82.
- Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology*. 2006;211:609–618.
- Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*. 2007;204:1057–1069.
- Swirski FK, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas FW, Weissleder R, Pittet MJ. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytes and give rise to macrophages in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2007;117:195–205.
- Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol*. 2004;76:509–513.
- Rupnick MA, Panigrahy D, Zhang CY, Dallabrida SM, Lowell BB, Langer R, Folkman MJ. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:10730–10735.
- Hausman GJ, Richardson RL. Adipose tissue angiogenesis. *J Anim Sci*. 2004;82:925–934.
- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:463–516.
- Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation*. 2004;110:1564–1571.
- Laimer M, Kaser S, Kranebitter M, Sandhofer A, Muhlmann G, Schwelberger H, Weiss H, Patsch JR, Ebenbichler CF. Effect of pronounced weight loss on the nontraditional cardiovascular risk marker matrix metalloproteinase-9 in middle-aged morbidly obese women. *Int J Obes (Lond)*. 2005;29:498–501.
- Schledzewski K, Falkowski M, Moldenhauer G, Metharom P, Kzhyshkowska J, Ganss R, Demory A, Falkowska-Hansen B, Kurzen H, Ugurel S, Geginat G, Arnold B, Goerdts S. Lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor LYVE-1 is expressed by stabilin-1+, F4/80+, CD11b+ macrophages in malignant tumours and wound healing tissue in vivo and in bone marrow cultures in vitro: impli-

- cations for the assessment of lymphangiogenesis. *J Pathol.* 2006;209:67–77.
38. Lacasa D, Taleb S, Keophiphath M, Miranville A, Clement K. Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology.* 2007;148:868–877.
39. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmee E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrieres J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007;56:1761–1772.
40. Raes G, Van den Bergh R, De Baetselier P, Ghassabeh GH, Scotton C, Locati M, Mantovani A, Sozzani S. Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells. *J Immunol.* 2005;174:6561.

CLINICAL PERSPECTIVE

Obesity is characterized by a systemic low-grade inflammatory state that is thought to contribute to the genesis of obesity-associated cardiovascular diseases and type 2 diabetes mellitus. However, the cellular and molecular mechanisms underlying the link between fat mass enlargement, inflammation, and obesity-associated pathologies remain to be clearly defined. Adipose tissue (AT) itself produces a wide range of adipokines with inflammatory properties, and its excessive development has been associated in humans and mice with accumulation of AT macrophages (ATMs). The present study, performed in subcutaneous ATs from lean to overweight individuals, showed that ATMs coexpressed proinflammatory and antiinflammatory factors. Furthermore, ATMs specifically produced and released the key matrix remodeling enzyme matrix metalloproteinase-9 compared with mature adipocytes and AT capillary endothelial cells. Interestingly, the secretion of matrix metalloproteinase-9 from human AT in vivo, assessed by arteriovenous difference measurement, was correlated with the body mass index of the patients. An increase in body mass index also was found to be associated in ATMs with lower expression levels of 2 proinflammatory factors (ie, interleukin-8 and cyclooxygenase-2) and a higher expression level of the remodeling marker lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1. Finally, ATMs exerted marked in vitro proangiogenic effects on AT-derived capillary endothelial and progenitor cells. These overall results indicate that the human ATMs that accumulate within the fat mass during its growth exhibit a particular remodeling phenotype. ATMs may thus be active players in AT development via their proangiogenic effects but also in the genesis of obesity-associated cardiovascular pathologies through their release of matrix metalloproteinase-9.

**Publication 5 : Interplay Between Human Adipocytes and T Lymphocytes in Obesity.
CCL20 as an Adipochemokine and T Lymphocytes as Lipogenic Modulators.**

Duffaut C, Zakaroff-Girard A, Bourlier V, Decaunes P, Maumus M, Chiotasso P, Sengenès C, Lafontan M, Galitzky J, Bouloumié A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Jul 30.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



Interplay Between Human Adipocytes and T Lymphocytes in Obesity. CCL20 as an Adipochemokine and T Lymphocytes as Lipogenic Modulators

Carine Duffaut, Alexia Zakaroff-Girard, Virginie Bourlier, Pauline Decaunes, Marie Maumus, Patrick Chiotasso, Coralie Sengenès, Max Lafontan, Jean Galitzky and Anne Bouloumié

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. published online Jul 30, 2009;

DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.192583

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association.
7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2009 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 1079-5642. Online ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://atvb.ahajournals.org>

Data Supplement (unedited) at:

<http://atvb.ahajournals.org/cgi/content/full/ATVBAHA.109.192583/DC1>

Subscriptions: Information about subscribing to Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is online at

<http://atvb.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:

journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at

<http://www.lww.com/reprints>

Interplay Between Human Adipocytes and T Lymphocytes in Obesity

CCL20 as an Adipochemokine and T Lymphocytes as Lipogenic Modulators

Carine Duffaut, Alexia Zakaroff-Girard, Virginie Bourlier, Pauline Decaunes, Marie Maumus, Patrick Chiotasso, Coralie Sengenès, Max Lafontan, Jean Galitzky, Anne Bouloumié

Objective—Adipose tissue (AT) plays a major role in the low-grade inflammatory state associated with obesity. The aim of the present study was to characterize the human AT lymphocytes (ATLs) and to analyze their interactions with adipocytes.

Methods and Results—Human ATL subsets were characterized by flow cytometry in subcutaneous ATs from 92 individuals with body mass index (BMI) ranging from 19 to 43 kg/m² and in paired biopsies of subcutaneous and visceral AT from 45 class II/III obese patients. CD3⁺ ATLs were composed of effector and memory CD4⁺ helper and CD8⁺ cytotoxic T cells. The number of ATLs correlated positively with BMI and was higher in visceral than subcutaneous AT. Mature adipocytes stimulated the migration of ATLs and released the chemokine CCL20, the receptor of which (CCR6) was expressed in ATLs. The expression of adipocyte CCL20 was positively correlated with BMI and increased in visceral compared to subcutaneous adipocytes. ATLs expressed inflammatory markers and released interferon gamma (IFN γ). Progenitor and adipocyte treatment with ATL-conditioned media reduced the insulin-mediated upregulation of lipogenic enzymes, an effect involving IFN γ .

Conclusions—Therefore, crosstalk occurs between adipocytes and lymphocytes within human AT involving T cell chemoattraction by adipocytes and modulation of lipogenesis by ATLs. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:00-00.)

Key Words: inflammation ■ visceral fat ■ macrophages ■ T lymphocyte subsets ■ CCR6

Adipocytes are the site of metabolic activity of adipose tissue (AT; ie, lipogenesis that corresponds to lipid storage and lipolysis that is responsible for triglyceride hydrolysis). In humans, lipogenesis is promoted by insulin, whereas lipolysis is mainly under the control of catecholamines.¹ Besides their metabolic activity, adipocytes produce a wide range of factors grouped under the term adipokines. Obesity is associated with alterations of the metabolic and secretory activities of adipocytes and is characterized by a chronic low-grade inflammatory state.² Chronic inflammation within the fat mass itself has been suspected to play a major role in systemic inflammation. Initial studies, focused on the myeloid cells (monocytes, macrophages and dendritic cells), have shown AT accumulation of these cells in obese conditions in both mice and humans.^{3–5} In mice, acquisition of a proinflammatory phenotype by the AT macrophages (ATMs) has been linked to the development of insulin resistance.⁶ In human obesity, however, ATMs appeared less polarized with proangiogenic abilities: hallmarks of cells involved in chronic nonresolved inflammatory processes.⁷

Murine fat depots contain lymphoid cells from the innate (natural killer [NK] cells, NKT cells and $\gamma\delta$ T cells) and the adaptive ($\alpha\beta$ T and B cells) immune systems.⁸ Recent studies have described the accumulation of CD3⁺ T lymphocytes in the AT of obese mice^{9–12} and patients.¹³ However, there are no data on the subsets and activation state of lymphocytes present in human AT. Chemokine secretion by adipocytes may promote lymphocyte homing within AT. Although T cell chemoattractants such as CCL5 and CXCL12 have been described to be expressed within AT,^{9,13} their cellular origin as well as the modulation of their expression according to adiposity are still unclear. The work of Pond et al has stressed the close interactions between lymphoid cells in lymph nodes and the surrounding AT in rodents.¹⁴ Recently, in mice models, lymphocytes have been involved in the regulation of the inflammatory response and insulin resistance associated with obesity through their production of interferon gamma.¹¹ The present study was undertaken to characterize human ATLs in term of subsets and activation state and relate this with the degree of adiposity and anatomic location in human AT. The interrelation between

Received March 11, 2009; revision accepted July 22, 2009.

From the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U858, Toulouse, France, Université Toulouse III Paul Sabatier, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, Equipe n°1 AVENIR (C.D., A.Z.-G., V.B., P.D., M.M., C.S., M.L., J.G., A.B.), Chirurgie générale et digestive (P.C.), CHU Purpan, Toulouse, France.

Correspondence to Anne Bouloumié, Equipe 1 AVENIR/INSERM U858, Hôpital Rangueil Bat L4, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 04, France. E-mail anne.bouloumie@inserm.fr

© 2009 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.192583

human ATs and mature adipocytes was studied in terms of adipocyte-derived T cell chemoattractant and ATL-mediated metabolic effects.

Materials and Methods

Materials

Chemicals were purchased from Sigma. Collagenase NB4 was purchased from Serva. Selection kits for CD34⁺, CD14⁺, and CD3⁺ cells were purchased from StemCell Technologies, and magnetic microbeads coupled with anti-CD31 antibodies were purchased from Dynal Biotech (Invitrogen). Culture media were from purchased Promocell. Antibodies for flow cytometry analysis were purchased from BD Biosciences.

Isolation of the Stroma-Vascular Fraction (SVF) and Mature Adipocytes

Human subcutaneous adipose tissue (AT) was obtained from healthy women undergoing elective procedures of fat removal for esthetic purposes. Their body mass index (BMI) ranged from 19 to 43 kg/m² (n=92, mean BMI=27.2±0.6kg/m², mean age=42.6±1.2 years). In addition, paired human omental and subcutaneous tissues were obtained from a group of class II/III obese nondiabetic patients undergoing bariatric surgery (n=45, 41 women/4 men, mean BMI=43±1kg/m², mean age=42±1 years). The protocols of fat collection were approved by the Institutional Research Board of INSERM and Toulouse University Hospital Ethics committee. The cells from the stroma-vascular fraction (SVF) and mature adipocytes from human AT were obtained after collagenase digestion as previously described.⁵

Isolation of Human Adipose Tissue Lymphocytes

The cells of the human AT-SVF were isolated using an immunoselection/depletion protocol as previously described^{5,15} with modifications to isolate the CD3⁺ ATs. Briefly, after depletion of the progenitor cells (CD34⁺/CD31⁻) and AT macrophages (ATMs; CD34⁻/CD14⁺) from the AT-SVF, the CD34⁻/CD14⁻ cells were incubated with a CD3⁺ Stem Cell System positive cocktail (Grenoble; 15 minutes at room temperature). After the addition of nanoparticles, cells were recovered by successive magnetic sorting steps. Freshly isolated CD34⁻/CD14⁻/CD3⁺ defined as ATs were counted, and either lysed (Qiagen) and stored at -20°C until mRNA extraction, analyzed by flow cytometry, or cultured. Conditioned media (CM) from ATs and ATMs were collected after 24-hour plating of the cells (200 000 to 250 000 cells/cm²) in basal medium (ECBM/0.5% bovine serum albumin free fatty acids-free [FFA-free BSA]), centrifuged (20 000g, 3 minutes, room temperature), and the media was stored at -20°C until further use. To isolate human blood CD3⁺ cells, peripheral blood was collected in heparinized tubes from 5 donors (3 women/2 men; mean BMI=20.7±0.6kg/m²; mean age=35±4 years). After isolation of blood mononuclear cells and removal of platelets by successive centrifugations, macrophages were depleted using magnetic CD14⁺ beads (Myltenyi Biotec), and the CD3⁺ cells were selected on the CD14 negative cell fraction with the same protocol described for the AT CD3⁺ cells. The blood CD3⁺ cells were then lysed (Qiagen) and stored at -20°C until mRNA extraction.

Flow Cytometry Analysis

Human SVF cells, ATs, or blood cells (100 000 cells) were incubated with FITC- (CD4, γ δ TCR, CD25, CD62L) PerCP- (CD45), PE-Cy7- (CD45-RO), PE- (CD3, CD14, CD45-RA), APC- (CD8, CD19, CD56) conjugated antibodies or respective isotype controls. For IFN γ intracellular staining, ATs were incubated in the presence or absence of brefeldin-A (BD Biosciences) and stained with FITC-CD4, PE-Cy7-IFN γ and APC-CD8 antibodies or respective isotype controls. Analyses were performed using a FACSCalibur flow cytometer and CellQuest Pro software (BD Bioscience).

Confocal Fluorescence Microscopy Analyses

After 1-hour fixation in 4% paraformaldehyde and extensive washing steps in PBS, pieces of human subcutaneous AT were incubated for 30 minutes at room temperature in PBS/2% BSA followed by a 2-hour incubation with the rabbit polyclonal antibody directed against human CD3 (Dako) (1:20). After washing (PBS/0.2% Tween and PBS) and 1-hour incubation with anti-rabbit antibody coupled to AlexaFluor488 (Invitrogen) (1:200), the tissues were placed on slides and a 3-dimensional reconstruction was performed using a Zeiss LSM 510 META confocal microscope.

Lipolysis and Modulation of Lipogenic Enzyme Expression in Mature Adipocytes and Progenitor Cells

For lipolysis measurement, mature adipocytes obtained after collagenase digestion of subcutaneous AT were plated in fibrin gels as previously described.⁵ After gel polymerization, basal medium, ATM-CM, or ATL-CM were added. After 24-hour incubation pharmacological agents (0.1 μ mol/L isoproterenol [ISO] or 10 μ mol/L noradrenaline [NA]) were added to the media for 90 minutes at 37°C. At the end of the incubation period, aliquots of the media were taken for glycerol and FFA determination (Sigma-Aldrich and Wako Unipath, respectively). Total lipid content was determined gravimetrically after solvent extraction. For gene expression analysis, mature adipocytes in fibrin gels were treated with basal medium in the presence or absence of 50 ng/mL human recombinant IFN γ or with ATL-CM in the presence or absence of 2 μ g/mL neutralizing antihuman IFN γ antibody or its isotype control (BD Bioscience) or with ATM-CM. After overnight incubation, 0.1 μ mol/L insulin was or not added for 24 hours. Media was then removed and adipocytes were lysed in Qiazol (Qiagen) (v/v) for mRNA extractions.

Freshly harvested AT-progenitor cells (CD34⁺/CD31⁻) were plated at a density of 120 000 cells/cm² in ECBM supplemented with 10% fetal calf serum (FSC) for 24 hours at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. Adipogenic differentiation was induced in defined medium (ECBM supplemented with 66 nmol/L Insulin, 10 μ g/mL Transferrin, 1 nmol/L Triiodothyronine, 1 μ g/mL Rosiglitazone, and 100 nmol/L cortisol). Cells were cultured either in a mixture (v/v) of 2 \times defined medium and ATL-CM or in a mixture (v/v) of 2 \times defined medium and ECBM/0.1% BSA (control). Media were changed every 4 days. At day 8, cells were lysed by sonication in PBS/0.2% Tween, and the triglyceride content was determined (GPO-trinder kit, Sigma, respectively), or lysed in Qiazol for mRNA extraction.

Migration Assays

Human ATL migration was assessed on 3 μ m-pore HTS FluoroBlock inserts (Falcon). After labeling for 60 minutes with 10 μ mol/L Calcein AM, ATs (20 000 cells in 300 μ L ECBM/0.1%BSA) were incubated in the upper side of the insert and 800 μ L mature adipocyte-conditioned media, or conditioned media without cells (control) was added to the companion plate under the insert. ATL migration was evaluated by counting the number of labeled lymphocytes attached to the lower surface of the wells after 4 hours.

Cytokine Detection

The RayBio Human Cytokine antibody Array V (RayBiotech Inc, Cliniscience) provides antibody array membranes to detect expression of 79 cytokines. The experiment was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1 mL of conditioned medium by human mature adipocytes originating (n=6) maintained in fibrin gels for 24 hours was added to the antibody-coated membrane and incubated on a plate shaker at 4°C overnight. After incubation with biotinylated antibodies and labeled streptavidin, the signal was detected from the membrane by chemiluminescence using Chemi-smart 3000 (Vilbert LourmatFrance). Data analysis was performed using BioID software (Vilbert Lourma). Positive controls were used to normalize the results from different membranes.

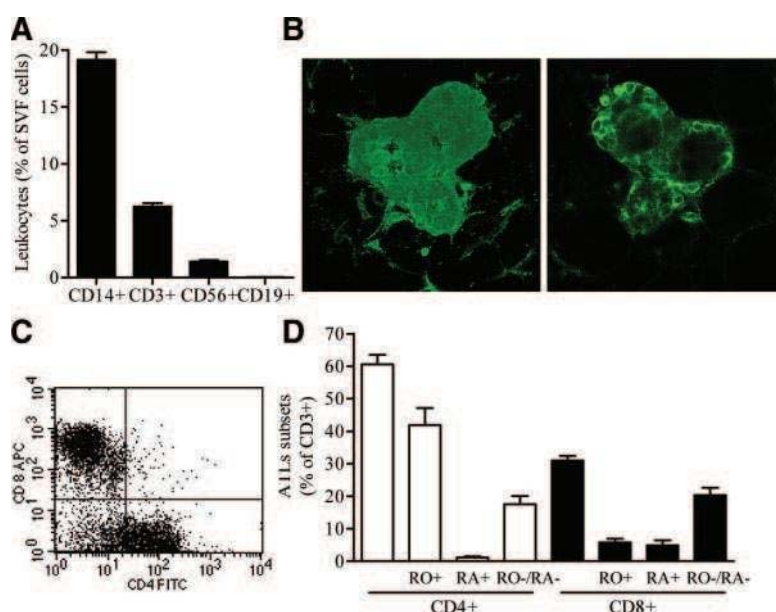


Figure 1. Characterization of the lymphocyte subsets in the human subcutaneous adipose tissue. A, Multicolour FACS analyses were performed on the SVF of subcutaneous AT using CD14⁻PE, CD3-PE, CD56-APC, and CD19-PerCP-Cy5.5 antibodies. Results are means±SEM (n=92 for CD14, CD3, and CD56; n=41 for CD19). B, Three-dimensional reconstruction of confocal fluorescence microscopy analyses of human adipose tissue with an antibody directed against CD3. The upper and lower views of CD3⁺ cell clusters surrounding three adipocytes are shown. C, Multicolor FACS analyses were performed on immunoselected AT CD3⁺ cells using CD4-FITC and CD8-APC antibodies. A representative dot plot is shown. D, Multicolor FACS analyses were performed on immunoselected AT CD3⁺ cells with CD4-FITC/CD8-APC/CD45RO-PeCy7/CD45RA-PE antibodies. Results are means±SEM (n=9).

RNA Extraction and Real-Time PCR

Total RNA was extracted from ATLS, adipocytes, and progenitor cells using the RNeasy kit (Qiagen). The RNA concentration was measured either by a spectrophotometer nanodrop[®] ND-1000 (Labtech) or by fluorimetric assay (Ribogreen, Invitrogen). The RNA was reverse-transcribed using the "Superscript II" kit (Invitrogen). Reverse transcription was also performed without the superscript enzyme on RNA samples to ensure the absence of contaminating genomic DNA. Primers for tumor necrosis factor α (TNF- α), IFN γ , RANTES (CCL5), CCL20, (CCR6), interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-6, perforin-1 (PRF-1), phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 alpha (PIK3R1), fatty acid synthase (FAS), lipoprotein lipase (LPL), and leptin receptor (Leptin-R) were from Applied Biosystems (Hs00174128_m1, Hs00174143_m1, Hs00174575_m1, Hs00171125_m1, Hs00171121_m1, Hs00174114_m1, Hs00174122_m1, Hs00174131_m1, Hs00169473_m1, Hs00381459_m1, Hs00188012_m1, Hs00173425_m1, Hs00174497_m1, respectively). The amplification reaction was done in duplicate on 15 ng of the cDNA samples in a final volume of 20 μ L in 96-well reaction plates (Applied Biosystems) in a GeneAmp 7500 detection system (Applied Biosystems). All reactions were performed under the same conditions: 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes, 40 cycles of 95°C for 15 seconds, and 60°C for 1 minute. Results were analyzed with the GeneAmp 7500 software and all the values were normalized to the levels of 18S rRNA.

Statistical Analysis

Values are given as mean±SEM for (n) separate experiments. Correlations were performed using a Spearman rank correlation. Comparisons between groups were analyzed by ANOVA for experiments with more than 2 subgroups followed by post hoc tests and the nonparametric Mann-Whitney test or using the Student *t* test, when appropriate (Prism 4, GraphPad Software, USA). Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Characterization of the Lymphocyte Subsets in the Human Subcutaneous Adipose Tissue

Flow cytometry analysis performed on the stroma-vascular fraction (SVF) obtained after collagenase digestion of human subcutaneous adipose tissue (AT) (n=92, mean BMI=27.2±0.6kg/m²) showed 2 main CD45⁺ leukocyte populations. A predominant CD14⁺ macrophage population (19±1% of total SVF cells) was identified. The lymphocyte population was mainly composed of CD3⁺ T lymphocytes

(6±0.5% of total SVF cells), a minor CD56⁺ NK cell population (1.5±0.1% of total SVF cells), and few CD19⁺ B-lymphocytes (Figure 1A). Three dimensional reconstitution of confocal fluorescence microscopy analyses using anti-CD3 antibody revealed the presence of CD3⁺ cells organized in clusters around adipocytes (Figure 1B). Some individual CD3⁺ cells were identified in the stroma and few in the capillaries (data not shown). Flow cytometry analyses performed under the same conditions on the AT-SVF and peripheral blood showed that the CD3⁺ cells identified in the AT exhibited a lower size but a higher granularity than the blood CD3⁺ cells (supplemental Figure 1A). Moreover, the expressions of the homing receptor CD62L and the naïve T cells CD45RA markers were markedly lower in the AT SVF CD3⁺ cells compared to peripheral blood (supplemental Figure 1B). To analyze the subsets of human AT CD3⁺ T lymphocytes, CD3⁺ cells were immunoselected from freshly-harvested SVF after depletion of the CD34 (progenitor and capillary endothelial cells) and CD14 (macrophages) positive cells. Helper CD4⁺ and cytotoxic CD8⁺ T cells were the major CD3⁺ T-lymphocyte subsets (Figure 1C). A minor subset of NKT cells (CD3⁺/CD56⁺) and few, if any, regulatory CD25⁺ and immature $\gamma\delta$ T lymphocytes were detected (data not shown). The helper CD4⁺ T cells were mainly memory (CD45RO⁺) as well as effector T cells (CD45RO⁻/RA⁻), whereas the CD8⁺ cells were mainly effector cells (Figure 1D).

Influence of the Degree of Adiposity and Fat Anatomic Location on the Number of Human Adipose Tissue T Lymphocytes

The number of AT lymphocytes (ATLS) determined by flow cytometry analysis of the SVF of the subcutaneous AT (n=92) increased with the degree of adiposity. Indeed, a statistically significant correlation was detected between the number of AT CD3⁺, CD4⁺, as well as CD8⁺ cells and the BMI of the individuals (data not shown). The patients were grouped according to BMI, and obese patients (BMI ≥ 30) exhibited a statistically significant higher numbers of AT CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ than lean patients (BMI ≤ 25 ;

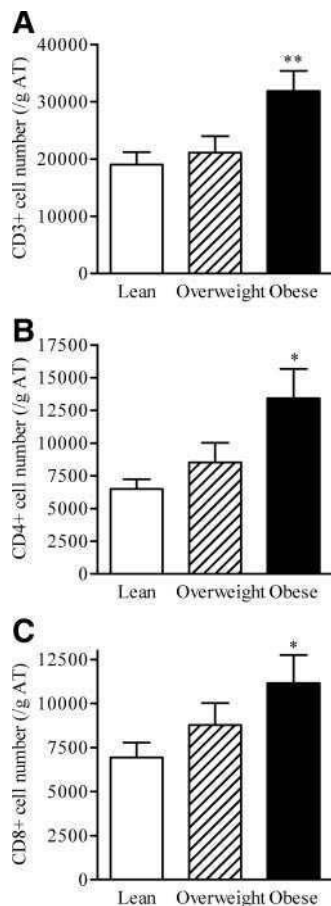


Figure 2. Influence of the degree of adiposity on the number of lymphocytes in the subcutaneous adipose tissue. The number of AT lymphocytes (normalized per gram of AT) was determined in the subcutaneous AT-SVF by flow cytometry analyses using (A) CD3-PE, (B) CD3-PE/CD4-FITC, (C) CD3-PE/CD8-APC antibodies in lean (open bars, $n=41$), overweight (hatched bars, $n=26$), and obese (filled bars, $n=25$) patients. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ obese vs lean.

Figure 2A through 2C). The number of CD56⁺-NK cells within the subcutaneous AT remained constant whatever the BMI (data not shown). The analysis of the SVFs of paired biopsies of subcutaneous and visceral ATs from class II/III obese patients ($n=45$, mean BMI=43±1 kg/m²) showed that the number of CD14⁺ cells (adipose tissue macrophages, ATMs) was slightly higher in visceral compared with subcutaneous AT (1.2-fold, $P<0.05$, Figure 3A). The number of AT CD3⁺ cells showed a marked increase in the visceral depot (3-fold, $P<0.001$, Figure 3A), because of a clear enhanced effector CD8⁺ cell number and a moderate increase in memory CD4⁺ cell numbers (Figure 3B through 3D).

Adipocyte Expression of the T Cell Chemoattractant CCL20

To assess whether adipocytes attracted ATs, we studied the effects of the adipocyte-derived factors contained in the media from human mature adipocytes of subcutaneous AT included in fibrin gel for 24 hours on the migration of ATs. As depicted in Figure 4A, ATs exhibited a marked migratory responsiveness to human mature conditioned media (5.5-fold increase, $P<0.01$). The human mature conditioned media were analyzed

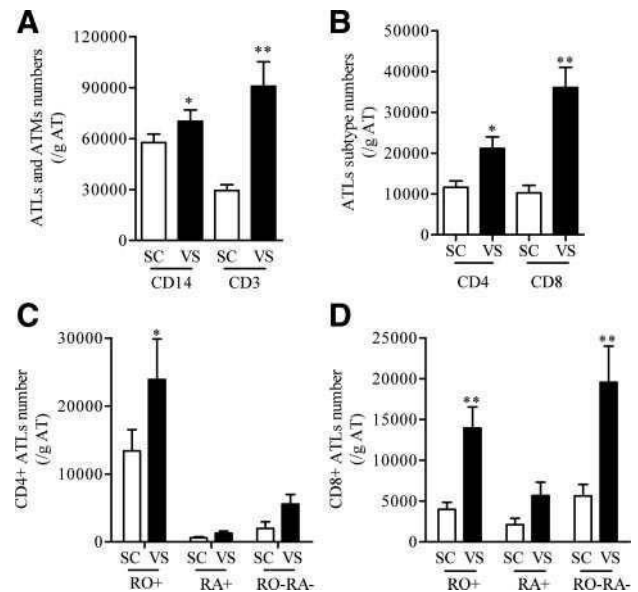


Figure 3. Influence of fat mass location on the number of lymphocytes in class II/III patients. Multicolor FACS analyses were performed on the SVF obtained from paired biopsies from subcutaneous (open bars) and visceral (filled bars) AT of class II/III obese patients using CD14-PE, CD3-PE, CD4-FITC, CD8-APC, CD45-RO-PeCy7, and CD45-RA-PE antibodies. A, Number of ATMs (CD14⁺) and ATs (CD3⁺; $n=45$). B, Numbers of CD4⁺ and CD8⁺ ATs ($n=45$; C and D) Number of memory (CD45RO⁺), naïve (CD45RA⁺), and effector (CD45RO⁻/RA⁻) CD4⁺ and CD8⁺ ATs ($n=19$). Results are means±SEM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ visceral vs subcutaneous.

on protein arrays allowing the simultaneous detection of 79 proteins (Figure 4B). As expected, strong positive signals were detected for the adipokine leptin and the cytokines and growth factors IL-6, vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor growth factor beta 2 (TGFβ2), oncostatin M (OSM), as well as tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (TIMP-1). Concerning chemokines, positive signals were obtained for chemokines active on neutrophils (CXCL1, CXCL2, and CXCL8), for MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, and MCP-4/CCL13. Interestingly, the lymphocyte chemoattractant chemokine CCL20 was also identified. Notably, no signals above the baseline were detected for CCL1, CCL8, CCL17, CCL18, CXCL5, CXCL6, CXCL9, CXCL10, CXCL12, and CXCL13. To further characterize the adipocyte-derived CCL20, real-time RT-PCR analyses were performed on mature adipocytes from subcutaneous AT ($n=18$ women, age=44±2 years, BMI=27±1 kg/m²) and from subcutaneous and visceral AT from class II/III obese women ($n=12$, age=41±3 years, BMI=44.7±1.3 kg/m²). The levels of CCL20 transcripts in adipocytes from subcutaneous AT correlated with the adiposity degree assessed by the BMI (Spearman $r=0.5$, $P<0.05$) but not with age. Adipocytes originated from obese individuals exhibited 7-fold more CCL20 transcripts than adipocytes from lean individuals (Figure 4C). The effects of conditioned media (CM) originating from native immunoselected human ATs and ATMs on adipocyte CCL20 expression were studied. Although treatment of adipocytes with AT-CM or IFNγ did not modify CCL20 expression, ATM-CM induced a marked increase in the levels of CCL20 transcript (3.8-fold increase, $P<0.05$, Figure 4D). In class II/III obese

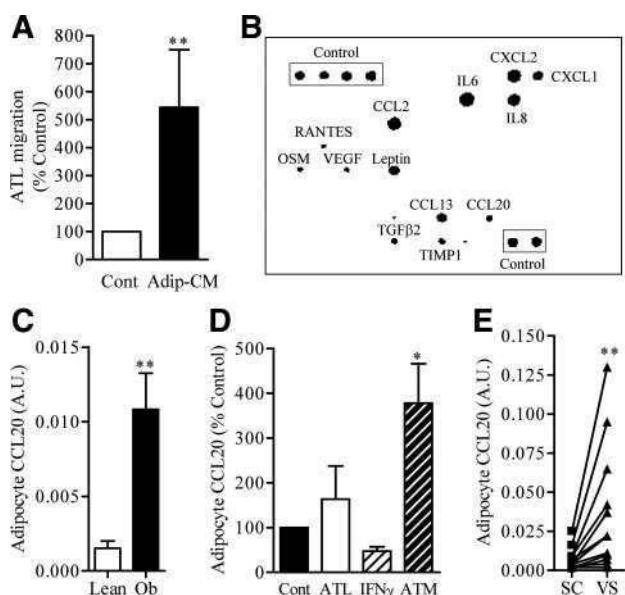


Figure 4. Production and expression of the T cell chemoattractant CCL20 by human mature adipocytes. A, Migration of human ATLs to human adipocyte-conditioned media. Results are expressed as percentage of control (media without cells) and are means±SEM of n=6. B, Representative photomicrograph of a cytokine antibody array membrane performed on conditioned media from pooled human mature adipocytes (n=6). C, mRNA levels of CCL20 determined by real-time RT-PCR analyses on mature adipocytes from subcutaneous AT of 6 lean and 6 obese patients. Results are means±SEM. ***P*<0.01. D, mRNA levels of CCL20 determined by real-time RT-PCR analyses in adipocytes (n=4) treated or not (Control) with ATL-CM (n=4), 50 ng/mL IFN γ , or ATM-CM (n=12). Results are expressed as percentage of control and are means±SEM. **P*<0.05 vs control. E, mRNA levels of CCL20 determined by real-time RT-PCR analyses on mature adipocytes isolated from paired biopsies of subcutaneous and visceral AT of class II/III obese patients (n=12). ***P*<0.01.

women, the expression of CCL20 in visceral adipocytes was higher than in the paired subcutaneous adipocytes (5-fold increase, *P*<0.05, Figure 4E).

Phenotype of the Human Adipose Tissue Lymphocytes

Real-time RT-PCR analysis was performed on the native immunoselected ATLs and compared to immunoselected CD3⁺ cells from peripheral blood from different donors. The study was restricted to subcutaneous AT because the amount of cells recovered from the paired biopsies of subcutaneous and visceral AT of obese patients was too low. ATLs exhibited a marked higher transcript level for IFN γ , TNF α , RANTES, IL-2, as well as perforin-1 (PRF-1) when compared with blood T lymphocytes (Table). The expression of IL-4 was not detected in ATLs. Interestingly, the expression of the CCL20 receptor CCR6 as well as the expression of the leptin receptor (Leptin-R) were markedly upregulated in human ATLs. The production of IFN γ by ATLs was further analyzed by flow cytometry (Figure 5A). Both CD4⁺ and CD8⁺ cells produced IFN γ (data not shown).

Specific Paracrine Effects of ATLs on Human Mature Adipocytes

The effects of conditioned media (CM) originating from native immunoselected human ATLs and ATMs on adipocyte

Table. Gene Expression in Blood and Adipose Tissue T Cells

Gene	Blood CD3 ⁺ Cells	Adipose CD3 ⁺ Cells
IFN γ	0.1±0.02	2.3±0.4*
TNF α	0.2±0.06	8.1±1.3*
CCL5	12±2	47±6*
CCR6	5×10 ⁻³ ±1×10 ⁻³	47×10 ⁻³ ±6×10 ⁻³ **
Leptin-R	7×10 ⁻³ ±2×10 ⁻³	73×10 ⁻³ ±10×10 ⁻³ *
IL-2	1×10 ⁻³ ±0.2×10 ⁻³	8×10 ⁻³ ±0.3×10 ⁻³ *
IL-4	1.6×10 ⁻⁵ ±0.7×10 ⁻⁵	Nondetectable
PRF-1	2±0.2	5.8±0.8*

Gene expression was determined by real-time RT-PCR. Results were normalized to the levels of 18S rRNA and expressed as 2^{- Δ CT}×10 000, blood CD3⁺ cells (n=5); adipose CD3⁺ cells (n=30 for IFN γ , TNF α , CCL5, PRF-1, n=18 for CCR6 and Leptin-R, n=7 for IL-2 and IL-4), Results are mean±SEM. **P*<0.05, ***P*<0.01.

metabolism were studied. Pretreatment of human mature adipocytes with ATL-CM or ATM-CM did not alter either basal lipolysis or the lipolytic activity stimulated with isoproterenol (ISO) or noradrenaline (NA), as assessed by the release of glycerol (data not shown) and free fatty acids (Figure 5B). Pretreatment of human mature adipocytes with ATL-CM altered the insulin responsiveness of the lipogenic enzymes fatty acid synthase (FAS) and lipoprotein lipase (LPL). Indeed, although ATL- and ATM-CMs did not alter the basal expression of FAS and LPL in human mature adipocytes (data not shown), ATL-CMs strongly inhibited the insulin-mediated upregulation of FAS and LPL transcript levels (Figure 5C and 5D). Furthermore, it was associated with the downregulation of a key component of the insulin-dependent intracellular pathway, the phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 alpha (PIK3R1; Figure 5E). Such an ATL-mediated inhibitory effect on FAS, LPL, and PIK3R1 expression was reversed by a neutralizing IFN γ antibody and mimicked by 50 ng/mL IFN γ treatment. ATM-CM did not modulate the insulin responsiveness of the adipocyte under the same conditions (Figure 5D and 5E). Human AT progenitor cells (CD34⁺/CD31⁻ cells) were treated with human ATL-conditioned media under adipogenic culture conditions. Human ATL-conditioned media led to a marked decrease of the expression of FAS and LPL that was associated with a lower triglyceride content (Figure 5F).

Discussion

The present study demonstrates that, in humans, the degree of adiposity is positively correlated with the accumulation of adipose tissue lymphocytes (ATLs). Flow cytometry analyses of the subcutaneous AT-SVF showed the presence of CD3⁺ T lymphocytes but few CD19⁺ B lymphocytes and innate lymphocytes (NK, NKT, and γ δ T-cells). These results clearly show that human AT and murine AT are different in terms of relative proportion of T lymphocyte subsets within the SVF.^{8,16} Among the T lymphocytes, CD4⁺ and CD8⁺ cells were characterized as memory (CD45RO⁺) and effector (CD45RO⁻/RA⁻) cells. Compared to the blood cells, few naïve CD45RA⁺ as well as CD62L T cells were identified in the human adipose tissue. Moreover, the mean size of the tissue lymphocytes was lower than the blood CD3⁺ cells,

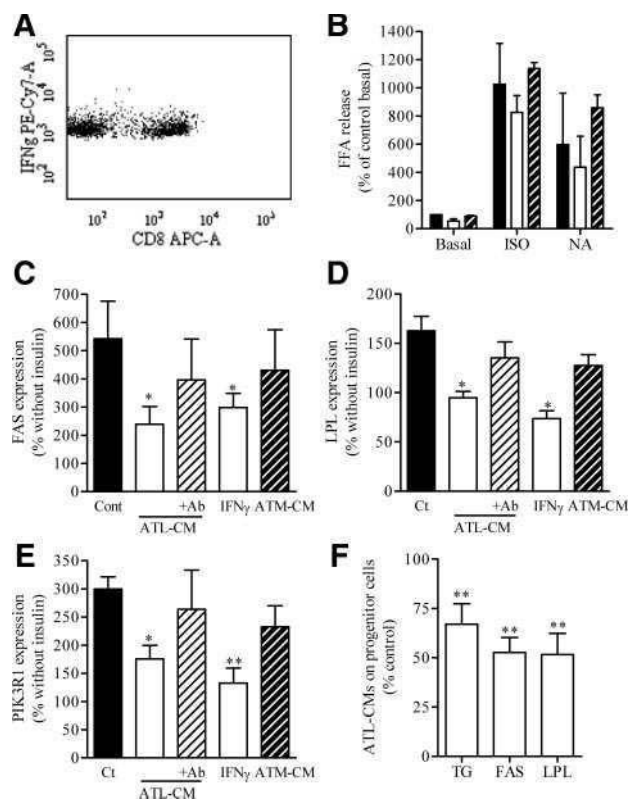


Figure 5. IFN γ production by adipose tissue T lymphocytes and paracrine effects on adipocyte metabolism. IFN γ production by immunoselected ATs was determined by multicolour FACS analyses using CD4-FITC/CD8-APC/IFN γ -PeCy7 antibodies. A, A representative dot plot is shown obtained on gated IFN γ positive cells. B, FFA released by human mature adipocytes pretreated or not (open bars) by conditioned media from ATs (filled bars, n=6) or from ATMs (hatched filled bars, n=6) and stimulated or not (basal) by 0.1 μ mol/L isoproterenol (ISO) or 10 μ mol/L noradrenaline (NA). Results are expressed as percentage of the values obtained for the control nonstimulated adipocytes (basal) and are means \pm SEM. The mRNA levels of fatty acid synthase (FAS; C), lipoprotein lipase (LPL; D), phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 alpha (PIK3R1; E) were determined by real-time RT-PCR analyses in adipocytes (n=4) treated or not (Control, filled bars) for 36 hours with ATL-CM in the presence (+Ab, hatched bars, n=4) or absence (open bars, n=12) of 2 μ g/mL neutralizing anti-human IFN γ antibody or 50 ng/mL IFN γ or ATM-CM (hatched filled bars, n=12), in the presence or absence of insulin for 24 hours. Results are means \pm SEM and are expressed as percentage of cells without insulin. * P <0.05, ** P <0.01 vs control +insulin. F, The mRNA levels of FAS and LPL as well as the triglyceride content (TG) of human progenitor cells treated or not with ATL-CMs. Results are expressed as percentage of the control and are means \pm SEM of n=3.

whereas the higher granularity of the ATs compared to the blood suggested distinct activation states. The direct comparison in the expression of several activation markers in the immunoselected blood and AT CD3⁺ cells confirmed that human ATs exhibited higher expression of inflammatory markers. Taken together, the low levels of B cells and of CD62L and naïve T cells together with the high proportion of effector T cells demonstrate that the human ATs exhibit a specific and distinct profile than the one found in peripheral blood. ATs are therefore mostly infiltrated or resident cells. This was confirmed by confocal analyses that revealed that ATs were localized in the stroma and more specifically surrounding some adipocytes. However, we cannot rule out

the presence of a minor contamination from blood. Increased adiposity, assessed by BMI, was associated with a specific accumulation of CD4⁺ as well as CD8⁺ ATs in subcutaneous AT, whereas the number of NK cells was not modulated. In addition to an adiposity-dependent increase of AT numbers, an AT location-dependent pattern of ATs was observed. Indeed, in paired biopsies from subcutaneous and visceral AT of class II/III obese patients, a marked increase in ATs together with a modest increase in the number of adipose tissue macrophages (ATMs) was observed in visceral ATs. In mice, the AT infiltration of T lymphocytes during a high-fat diet has been speculated to involve several chemokines such as stromal-derived factor 1 alpha/CXCL12¹³ and RANTES/CCL5.⁹ In the present study, ATs exhibited an enhanced migration in response to adipocyte-conditioned media. Protein arrays performed on conditioned media from human native mature adipocytes showed no adipocyte production of CXCL12. Both CCL5 and CCL20 were detected in the adipocyte conditioned media. Because CCL20 release by adipocytes has not been reported previously, we further analyzed the adipocyte expression of CCL20. Mature adipocytes from subcutaneous AT of obese individuals expressed higher levels of CCL20 than adipocytes from lean individuals. In class II/III obese patients, adipocytes from visceral AT expressed higher levels of CCL20 than subcutaneous adipocytes. Moreover, ATs expressed the CCL20 receptor, CCR6. The ligand-receptor pair CCL20-CCR6 has been described to be responsible for the chemoattraction of effector/memory T-cells in skin and mucosal surfaces under homeostatic and inflammatory conditions, as well as in pathology, including cancer and rheumatoid arthritis.¹⁷ The present results suggest that the adipocyte CCL20 may also play a major role in the accumulation of T lymphocytes within the AT. Interestingly, CCL20 expression in adipocytes was increased in the presence of soluble factors originated from human ATMs, suggesting that ATMs may contribute via the stimulation of CCL20 expression in adipocytes to the accumulation of ATs. Freshly immunoselected ATs exhibited a proinflammatory profile of activation, with clear expression of TNF α , IFN γ , and RANTES, whereas the expression of IL-4 (the T_H2-type cytokine) was not detected. The mechanisms involved in the promotion of the AT phenotype remain to be established. However, because ATs were found to express high transcript levels of the leptin receptor and considering that leptin is well described to promote T_H1 activation,¹⁸ we propose that leptin locally produced by human mature adipocyte may be involved in the activation of ATs. The lack of B cells together with the accumulation of Th1 type effector T cells and the previously reported characterization of human ATMs that were strongly positive for MHC-II,⁷ suggest that a cell-mediated immune reaction takes place in the AT with obesity. However, additional experiments are clearly needed to define whether the T lymphocytes of human adipose tissue are selected toward specific antigens.

Because the lymphocyte clusters identified by immunohistochemistry were localized in the vicinity of adipocytes, paracrine effects of ATs on adipocyte metabolism were investigated and compared to that of human ATMs. Although

ATL- as well as ATM-derived secretory products did not affect lipolysis, soluble factors originated from ATLS markedly inhibited the insulin-mediated upregulation of both lipogenic enzymes FAS and LPL. Such an effect was associated with the lower expression of PIK3R1 (encoding the 85kD regulatory subunit of PIK), a key component in the insulin-stimulated pathway.^{19,20} Moreover, the effect was specific to lymphocyte-derived products because conditioned media from human ATMs had no effect. Because human ATLS were shown to produce IFN γ , adipocytes were treated by IFN γ . IFN γ , as ATL-conditioned media, reduced the insulin sensitivity of FAS, LPL, and PIK3R1 and its neutralization in ATL-conditioned media reversed the effects. Therefore, IFN γ produced by ATLS is a paracrine mediator of the T-cells on adipocyte metabolism. The experiments performed on the human progenitor cells confirmed the effects of ATLS on the expression of both LPL and FAS. Moreover, because a decreased triglyceride accumulation was also observed, it is suggested that ATLS interact with the insulin-mediated promotion of triglyceride storage. Accumulation of visceral AT is now well recognized to be associated with an increased risk of developing type 2 diabetes. Visceral AT exhibits marked differences compared with subcutaneous AT in terms of metabolic and secretory activities,²¹ and increased local inflammation has been suspected to underlie such differences.^{22,23} It is therefore tempting to speculate that the increased accumulation of ATLS in human visceral AT participate in the pathogenic potential of the visceral AT via local paracrine effects on insulin-mediated lipogenesis.

To conclude, the present study focused on a large number of normal weight, overweight, and obese patients and showed that the accumulation of helper CD4⁺ and cytotoxic CD8⁺ ATLS increases in parallel with adiposity and has a location-dependent pattern. We report a new adipochemokine, CCL20, the expression of which is modulated by the degree of adiposity and the anatomic location of AT. We also show that ATLS are potent local regulators of adipocyte metabolism and more specifically insulin-mediated lipogenesis.

Acknowledgments

The authors thank Dr Dylan Thompson (University of Bath, UK) for his critical reading of the manuscript and Marie-Adeline Marquès (INSERM U858, Team 4) for her technical support for the lipolysis experiments. We are grateful to the excellent technical support and advice of Bruno Payre (IFR31, Toulouse, France) for the confocal microscopy.

Sources of Funding

This study was supported by grants from INSERM (AVENIR), the Agence Nationale de la Recherche (ANR "RIOMA"), the European Union (FP7 ADAPT HEALTH-F2-2008-2010), and Pierre Fabre Laboratories. This work was sponsored by the University Hospital of Toulouse for regulatory and ethic submission (No. 06 029 03).

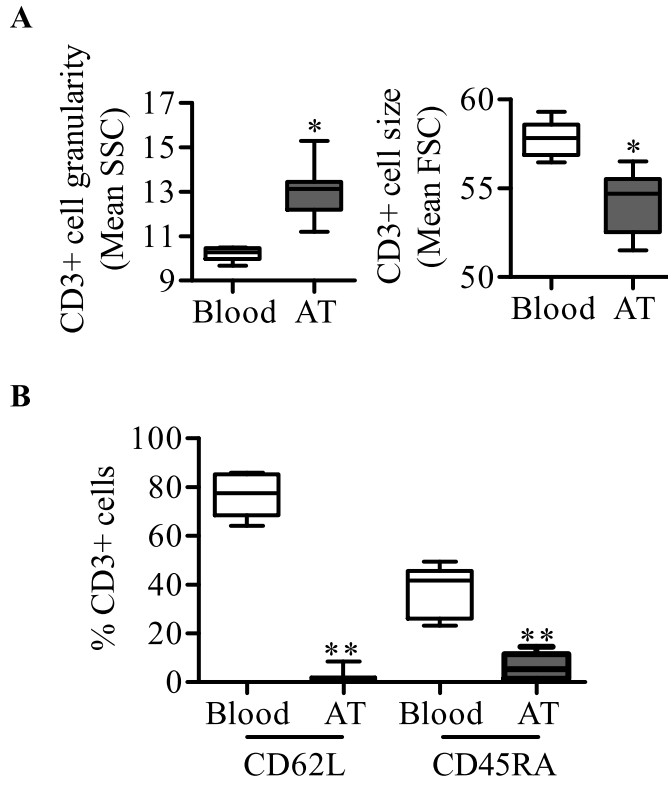
Disclosures

None.

References

- Lafontan M. Advances in adipose tissue metabolism. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32:S39–S51.
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444:860–867.
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003;112:1821–1830.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112:1796–1808.
- Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumie A. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*. 2004;53:1285–1292.
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117:175–184.
- Bourlier V, Zakaroff-Girard A, Miranville A, De Barros S, Maumus M, Sengenès C, Galitzky J, Lafontan M, Karpe F, Frayn KN, Bouloumie A. Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation*. 2008;117:806–815.
- Caspar-Bauguil S, Cousin B, Galinier A, Segafredo C, Nibbelink M, Andre M, Casteilla L, Penicaud L. Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. *FEBS Lett*. 2005;579:3487–3492.
- Wu H, Ghosh S, Perrard XD, Feng L, Garcia GE, Perrard JL, Sweeney JF, Peterson LE, Chan L, Smith CW, Ballantyne CM. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation*. 2007;115:1029–1038.
- Rausch ME, Weisberg S, Vardhana P, Tortoriello DV. Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32:451–463.
- Rocha VZ, Folco EJ, Sukhova G, Shimizu K, Gotsman I, Vernon AH, Libby P. Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity. *Circ Res*. 2008;103:467–476.
- Bour S, Caspar-Bauguil S, Iffiu-Soltesz Z, Nibbelink M, Cousin B, Mfiluniemi M, Salmi M, Stolen C, Jalkanen S, Casteilla L, Penicaud L, Valet P, Carpenè C. Semicarbazide-sensitive amine oxidase/vascular adhesion protein-1 deficiency reduces leukocyte infiltration into adipose tissue and favors fat deposition. *Am J Pathol*. 2009;174:1075–1083.
- Kintscher U, Harte M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P, Barth TF, Dragun D, Skurk T, Hauner H, Bluher M, Unger T, Wolf AM, Knippschild U, Hombach V, Marx N. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1304–1310.
- Pond CM. Adipose tissue and the immune system. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005;73:17–30.
- Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 2004;110:349–355.
- Caspar-Bauguil S, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Galinier A, Periquet B, Casteilla L, Penicaud L. Weight-dependent changes of immune system in adipose tissue: importance of leptin. *Exp Cell Res*. 2006;312:2195–2202.
- Bromley SK, Mempel TR, Luster AD. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol*. 2008;9:970–980.
- La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:371–379.
- Sanchez-Margalet V, Goldfine ID, Vlahos CJ, Sung CK. Role of phosphatidylinositol-3-kinase in insulin receptor signaling: studies with inhibitor, LY294002. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;204:446–452.
- Shepherd PR, Nave BT, O'Rahilly S. The role of phosphoinositide 3-kinase in insulin signalling. *J Mol Endocrinol*. 1996;17:175–184.
- Lafontan M, Girard J. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism. Part I: heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue. *Diabetes Metab*. 2008;34:317–327.
- Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes*. 2007;56:1010–1013.
- Cancello R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, Coussieu C, Basdevant A, Hen AB, Bedossa P, Guerre-Millo M, Clement K. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes*. 2006;55:1554–1561.

Figure S1



Autor : Marie Maumus

Title : Characterization of human adipose-derived CD34⁺/CD31⁻ stem/progenitor cells and influence of the microenvironment on their proliferation, differentiation and mobilization.

Abstract: Adipose tissue (AT) contains stem/progenitor cells included in the CD34⁺/CD31⁻ fraction which have adipogenic and angiogenic abilities. The aim of this work was to characterize human CD34⁺/CD31⁻ cell phenotype and location within AT and to study the effect of the microenvironment on their proliferation, differentiation and mobilization capacities.

The present work demonstrate that native AT stem/progenitor cells are positive for the CD34 antigen that is inversely correlated to cell expansion *in vitro* whereas the expression of pericyte makers is induced by cell culture. The CD34⁺/CD31⁻ cells are localized in AT stroma and nearby capillaries but rarely display a pericytic position. The CD34⁺/CD31⁻ cells exhibit a proliferative activity *in situ* which is increased by the degree of obesity. Concerning the effect of microenvironment on CD34⁺/CD31⁻ cell proliferation, adipocyte- and capillary endothelial cells (CECs)-conditioned media (CM), hypoxia, leptin, IL-6, LPA, and VEGF, all increase CD34⁺/CD31⁻ cell proliferation *in vitro*. Macrophage-CM has an anti-proliferative effect that is suppressed by an antioxidant. During AT extensive development, the appearance of a population of small adipocytes, *in situ*, is associated with a decrease in CD34⁺/CD31⁻ cell number and molecular profile modifications toward an adipogenic lineage suggesting a commitment of CD34⁺/CD31⁻ cells toward an adipogenic phenotype. Conversely, adipocyte-, CECs- and macrophage-CM have an angiogenic activity on CD34⁺/CD31⁻ cells *in vitro*. Finally, the migration and differentiation of CD34⁺/CD31⁻ cells are modulated by CECs *in vitro*. SDF-1 secreted by CECs promote the chemotaxis and differentiation of CD34⁺/CD31⁻ cells and thus might contribute to the formation of AT-vascular network during the development of AT.

Taken together, these results characterize the influence of the “adipose niche” on the control of AT-stem/progenitor cell proliferation, differentiation and migration.

Auteur : Marie Maumus

Titre : Caractérisation des cellules souches/progénitrices CD34⁺/CD31⁻ du tissu adipeux humain et influence du microenvironnement sur leur prolifération, migration et différenciation.

Directeur de thèse : Dr Anne Bouloumié et Dr Coralie Sengenès

Lieu et date de soutenance : Toulouse, le 30 octobre 2009

Résumé : Le tissu adipeux (TA) contient une population de cellules souches/progénitrices contenues dans la fraction cellulaire CD34⁺/CD31⁻ potentiellement capables de participer au renouvellement et à la croissance du TA. Le but de ce travail a été de déterminer la caractérisation phénotypique et génotypique de ces cellules à l'état natif ainsi que l'influence du microenvironnement et de l'état d'obésité sur leur nombre, leurs capacités de prolifération, de différenciation et de migration.

Au sein du TA, les cellules CD34⁺/CD31⁻ ont une localisation stromale et périvasculaire mais sont différentes des péricytes. Le développement excessif du TA est associé à une augmentation de l'expression de certains marqueurs adipogéniques par les cellules CD34⁺/CD31⁻ et à une diminution de leur nombre. *In situ*, une fraction des cellules CD34⁺/CD31⁻ est en phase de prolifération qui est augmentée chez les obèses et qui peut être régulée par les sécrétions des adipocytes matures, des cellules endothéliales capillaires (CECs), des macrophages, ainsi qu'un environnement hypoxique. De plus, les CECs sécrètent un facteur chimiotactique, le stromal derived factor-1, qui induit la migration des cellules CD34⁺/CD31⁻ du TA via son récepteur, le CXCR-4. Enfin, concernant le contrôle de la différenciation des cellules CD34⁺/CD31⁻ par le microenvironnement, nous avons montré, *in vitro* dans nos conditions de culture, que les sécrétions des adipocytes, des macrophages et des CECs ont des effets pro-angiogéniques et anti-adipogéniques.

L'ensemble de ce travail a ainsi permis de caractériser l'influence de la « niche adipeuse » sur le contrôle de la prolifération, migration et différenciation des cellules CD34⁺/CD31⁻ natives du TA.

Mots clés : tissu adipeux, cellules souches, obésité, prolifération, migration

Discipline : Pharmacologie

Intitulé et adresse du laboratoire : Equipe 1 – Réseau vasculaire, cellules progénitrices et cellules immunitaires du tissu adipeux. INSERM U858/I2MR, Bat L4, Hôpital de Rangueil, 1 avenue Jean Poulhès, 31059 Toulouse.