

Les cellules souches du tissu adipeux humain : intérêt pharmacologique et thérapeutique

par Christian Dani

Équipe « Cellules souches et Différenciation », UMR6543 CNRS, Institut de Recherches Signalisation, Biologie du Développement et Cancer, Centre de Biochimie, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex, France
Correspondance : E-mail : dani@unice.fr

Reçu le 23 novembre 2005

RÉSUMÉ

Les cellules souches adultes constituent une source illimitée de cellules différenciées d'intérêt pharmacologique et médical. La présence de cellules souches multipotentes a été rapportée dans la moelle osseuse, les muscles, les vaisseaux. Cependant, les cellules souches sont rares dans ces tissus. Elles sont également difficiles à isoler et à amplifier *ex vivo*. Le tissu adipeux, permettant des prélèvements d'un gros volume de tissu sans inconvénient majeur pour le donneur, représente une source possible et prometteuse de cellules souches multipotentes. Récemment, notre laboratoire a identifié et isolé des cellules souches multipotentes à partir de tissu adipeux de jeunes donneurs. Ces cellules, nommées "human Adipose Derived Stem" (hMADS), possèdent les caractéristiques des cellules souches, à savoir une forte capa-

cité d'auto-renouvellement et le pouvoir de se différencier en différents types cellulaires à l'état clonal. La différenciation adipocytaire des cellules hMADS a été étudiée en détail. Les résultats montrent que les adipocytes dérivés des cellules hMADS sont fonctionnels. Les effets de substances anti-VIH sur le développement des adipocytes sont présentés. Enfin, la transplantation de cellules hMADS dans le muscle de souris mdx, un modèle animal de la dystrophie musculaire de la maladie de Duchenne, a révélé leur potentiel thérapeutique. En conclusion, les cellules souches du tissu adipeux représentent un puissant outil pour le criblage de molécules pharmacologiques et pourraient également à l'avenir présenter un intérêt en thérapie cellulaire régénératrice.

SUMMARY Stem cells from human adipose tissue: a new tool for pharmacological studies and for clinical applications

Multipotent adult stem cells constitute an unlimited source of differentiated cells that could be used in pharmacological studies and in medicine. The presence of stem cells in different tissues, such as bone marrow, skin, muscle, has been reported. However, stem cells are rare in these tissues, are difficult to isolate and to maintain *ex vivo*. As adipose tissue allows extraction of a large volume of tissue with limited morbidity, this tissue could be an exciting alternative stem cell source. We have recently identified and isolated multipotent stem cells from adipose tissue of young donors. These cells, named human Multipotent Adipose-Derived Stem (hMADS) cells, exhibit features of stem cells, *i.e.* a high ability to self-renew

and the capacity to differentiate in different lineages at the single cell level. The adipocyte differentiation of hMADS cells has been thoroughly studied and differentiated cells exhibit the unique characteristics of human adipocytes. The effects of HIV drugs on the development of hMADS cells into adipocytes will be discussed. Finally, the therapeutic potential of hMADS cells has been revealed after their transplantation into muscles of mdx mice, an animal model of Duchenne muscular dystrophy.

Therefore, hMADS cells provides a powerful cellular model for drug screenings and their regenerative properties suggest that these cells could be an important tool for cell-mediated therapy.

Une cellule souche multipotente est définie comme une cellule ayant les caractéristiques uniques d'auto-renouvellement, c'est-à-dire la capacité de proliférer pendant une période de temps infinie, tout en gardant le pouvoir de se différencier en de nombreux types cellulaires

différents. Ainsi, les cellules souches représentent une source illimitée de cellules pouvant engendrer des cellules différenciées intéressantes aussi bien pour le criblage de molécules *in vitro* que pour la réparation tissulaire *in vivo*.

Les cellules souches multipotentes adultes suscitent un engouement considérable dans le domaine de la thérapie cellulaire, d'autant plus que leur utilisation ne pose pas les problèmes éthiques rencontrés avec les cellules souches embryonnaires. Les cellules souches ont été mises en évidence dans de nombreux tissus chez l'adulte (Verfaillie, 2002). La moelle osseuse est la source de cellules souches la plus fréquemment utilisée (Jiang *et al.*, 2002a), mais des cellules souches ont également été caractérisées dans le muscle, la peau, les vaisseaux (Jiang *et al.*, 2002b; Sampaolesi *et al.*, 2003; Toma *et al.*, 2001). Le prélèvement de ces tissus nécessite des actes chirurgicaux douloureux non dépourvus de risques pour les donneurs. De plus, les cellules souches sont rares dans ces tissus, et sont difficiles à isoler et à amplifier *ex vivo*. Tout ceci constitue un obstacle majeur à l'étude et l'utilisation des cellules souches adultes humaines. Récemment le tissu adipeux est apparu comme une nouvelle source de cellules souches (Rodriguez *et al.*, 2005a). Contrairement aux autres organes, le tissu adipeux a la particularité unique d'être à la fois abondant (il représente 10 % du poids d'un individu sain et jusqu'à 50 % chez un obèse) et facilement prélevable, notamment par liposuction, et donc sans recourir à une chirurgie lourde de conséquences pour le donneur. Plusieurs travaux ont montré la présence, au sein du tissu adipeux, d'une population de cellules capables *ex vivo* de se différencier en divers types cellulaires : ostéoblastes, chondroblastes, myocytes (Zuk *et al.*, 2001). Plus récemment, il a été montré que les cellules de la fraction stromale du tissu adipeux contiennent une population de cellules ayant le pouvoir de se différencier en cardiomyocytes (Planat-Benard *et al.*, 2004a) et capables, chez la Souris, de reconstruire le réseau vasculaire d'un membre ischémié (Miranville *et al.*, 2004; Planat-Benard *et al.*, 2004b). Ces études suggèrent la présence de cellules souches sans pour autant les identifier. En effet, la fraction stromale du tissu adipeux est hétérogène. Elle comporte un grand nombre de types cellulaires différents, et les expériences citées ci-dessus ne permettent pas de faire la distinction entre la présence de cellules souches multipotentes possédant les caractéristiques citées ci-dessus, ou la présence de multiples progéniteurs engagés dans différentes voies de différenciation. Nous avons alors cherché à savoir si le tissu adipeux humain contient des cellules souches et avons concentré nos efforts sur leur isolement et leur caractérisation.

ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DES CELLULES SOUCHES MULTIPOTENTES DU TISSU ADIPEUX HUMAIN

Nous avons recherché, dans la fraction stromale du tissu adipeux, des cellules possédant les propriétés de cellules souches multipotentes, à savoir une forte capacité d'auto-renouvellement et de différenciation en plusieurs types cellulaires à l'état clonal. Des cellules présentant ces caractéristiques ont été isolées à partir de déchets opératoires de tissu adipeux de jeunes enfants. Ces cellules ont été nommées hMADS pour "human Multipotent Adipose Derived Stem". Les cellules hMADS possèdent une forte

capacité d'auto-renouvellement puisqu'elles sont capables de proliférer avec plus de 200 doublements de population *ex vivo* tout en conservant un caryotype diploïde normal. Le phénotypage immunologique révèle que les cellules hMADS expriment à leur surface les marqueurs CD105, CD44, CD49b, CD13 et CD90, mais sont négatives pour les marqueurs de surface Stro-1, CD34, CD15, CD117, Flk-1, CD133 et HLA-DR. Les cellules hMADS expriment faiblement le HLA-1 (Rodriguez *et al.*, 2005b). Nous verrons que cette caractéristique peut en partie expliquer le privilège immunitaire de ces cellules.

Les cellules hMADS peuvent se différencier *ex vivo*, en présence d'un mélange hormonal approprié, en adipocytes, ostéoblastes, chondroblastes, cellules endothéliales et myocytes striés. Des expériences de clonage cellulaire ont été réalisées qui ont permis de montrer qu'une même cellule hMADS est capable de se différencier en adipocytes, ostéoblastes et myocytes (Rodriguez *et al.*, 2005b). Ces résultats démontrent que la capacité des cellules hMADS à donner différents types cellulaires n'est pas due à une population hétérogène contenant un mélange de cellules précurseurs mais résulte de la multipotence d'une cellule hMADS.

LES CELLULES hMADS : UN NOUVEL OUTIL PHARMACOLOGIQUE

Dans un milieu de différenciation adipogénique, les cellules hMADS se différencient en adipocytes présentant les caractéristiques fonctionnelles des adipocytes humains (Rodriguez *et al.*, 2004). Les cellules expriment les facteurs de transcription clés de la différenciation (Fig. 1) et

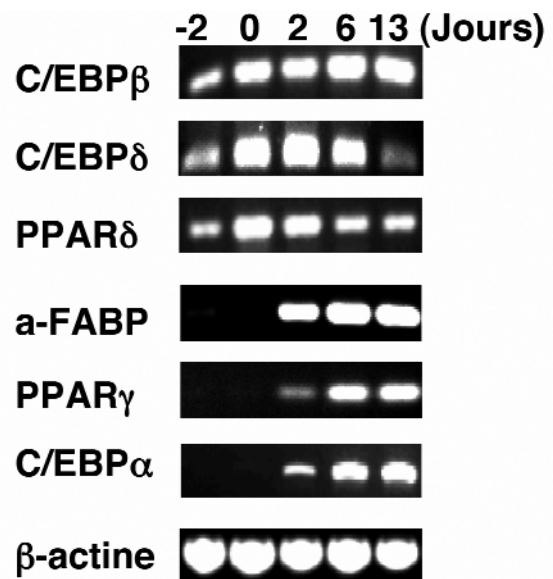


FIG. 1. – Expression des marqueurs de différenciation adipocytaire.

Les cellules hMADS ont été induites à se différencier en adipocytes au jour 0 correspondant au jour de la confluence cellulaire. Aux temps indiqués, les ARN ont été préparés et l'expression des gènes a été analysée par RT-PCR.

développent une réponse aux agents lipolytiques identique à celle observée avec les adipocytes isolés de tissu adipeux humain (Fig. 2). Enfin, les cellules hMADS sécrètent, au cours de leur différenciation en adipocytes, des taux de leptine et d'adiponectine comparables à ceux observés chez l'Homme (Fig 3). L'ensemble de ces

résultats indique que les cellules hMADS représentent un puissant outil pour étudier les effets d'agents pharmacologiques sur l'adipocyte humain. Cette propriété a été mise à profit récemment. En effet, notre laboratoire a étudié les effets des inhibiteurs de la protéase (IP) du VIH sur les adipocytes dérivés des cellules hMADS (Verno-

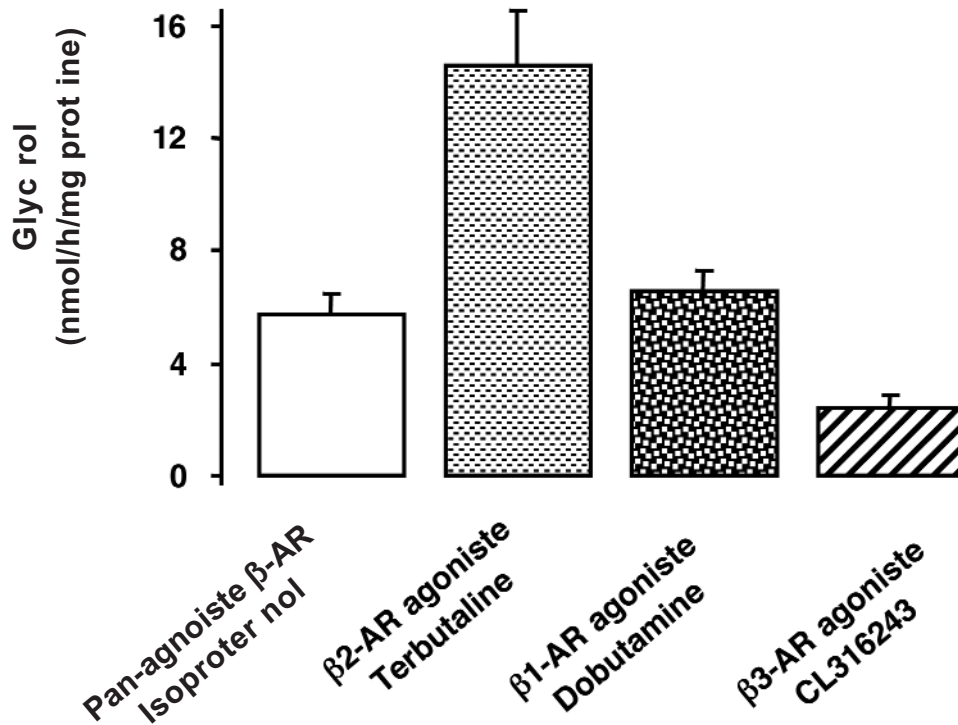


FIG. 2. – Réponse lipolytique des cellules hMADS différenciées en adipocytes. Les cellules différenciées ont été stimulées par les agents indiqués (1 μ M) puis le glycérol relargué a été dosé 1 heure après.

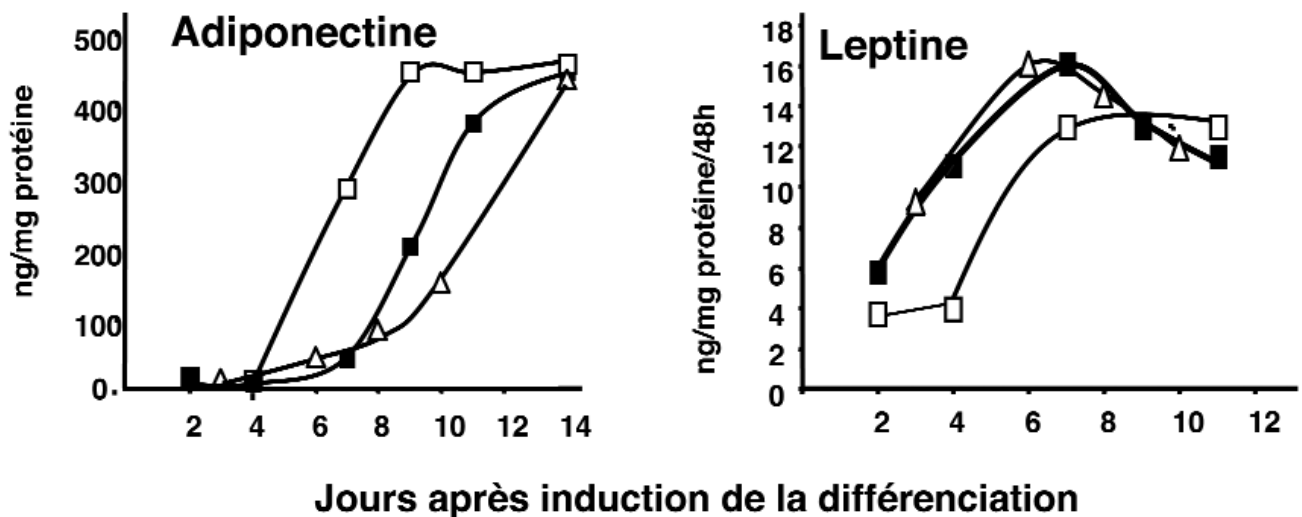


FIG. 3. – Sécrétion d'adipokines pendant la différenciation adipocytaire des cellules hMADS. Le milieu conditionné par les cellules a été collecté et l'adiponectine a été mesurée par un test RIA et la leptine par un test ELISA. Les niveaux de sécrétion par des cellules hMADS isolées de 3 patients sont montrés.

chet *et al.*, 2004). Le traitement des patients infectés par le VIH est une combinaison de trois groupes de molécules : des inhibiteurs nucléosidiques (INTIs) et non nucléosidiques (INNTIs) de la transcriptase inverse, et des inhibiteurs de la protéase (IPs) du VIH. Ces traitements antiviraux entraînent de nombreux effets secondaires qui affectent la qualité de vie des patients. Les cliniciens ont vu notamment apparaître des modifications de la répartition des tissus adipeux (lipoatrophie et/ou lipohypertrophie) regroupés sous le terme de « syndrome lipodystrophique ». Ce syndrome s'accompagne d'autres anomalies comme une hypercholestérolémie, une hyperlipidémie et le développement d'une résistance à l'insuline. Les mécanismes mis en jeu dans le développement de ces syndromes ne sont pas encore connus. L'utilisation de modèles préadipocytaires murins a permis de mettre en évidence que les IP modifient directement le développement de l'adipocyte. Cependant, nous avons montré que les différents IPs ont des effets différents selon la lignée de cellules préadipocytaires murines utilisée (Vernochet *et al.*, 2003), mettant en avant la nécessité de valider les résultats sur un modèle cellulaire humain. Nous avons voulu donc savoir, grâce à l'utilisation des cellules hMADS, dans quelle mesure les IPs du VIH s'y accumulent, modifient le développement de la cellule adipeuse et enfin modulent la sécrétion d'adipocytokines impliquées dans ces pathologies (Vernochet *et al.*, 2004).

Le ritonavir, l'IP le plus utilisé en thérapeutique, empêche la différenciation adipocytaire des cellules hMADS. Les IPs s'accumulent dans l'adipocyte au cours de son développement (Fig. 4), suggérant que ces molécules exercent leurs effets secondaires en agissant sur des cibles intracellulaires. L'obtention d'IPs fluorescents a permis de visualiser leur répartition intracellulaire dans l'adipocyte. Alors que certains IP, comme l'indinavir, s'accumulent dans le cytosol, d'autres, comme l'amprénavir, s'accumulent dans les gouttelettes lipidiques (Vernochet *et al.*, 2004). Il est intéressant de noter que les Ips ne sont pas retrouvés dans le noyau, suggérant que les

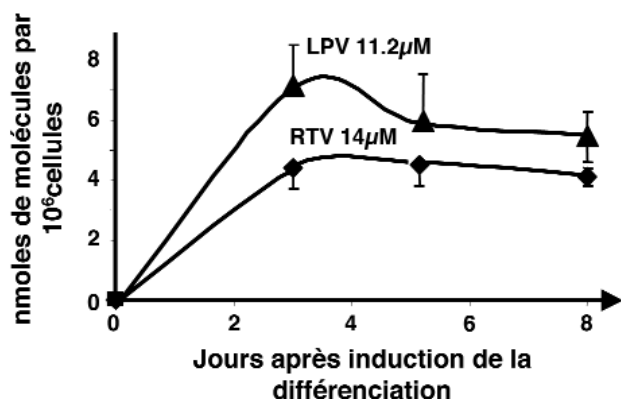


FIG. 4. – Accumulation intracellulaire du ritonavir (RTV) et du Lopinavir (LPV).

La différenciation des cellules hMADS en adipocytes a été induite en présence des drogues anti-VIH. Le dosage intracellulaire a été réalisé par un test ELISA.

TABLEAU I. – Régulation de l'expression d'adipokines par les inhibiteurs de la protéase (IP) du VIH dans les adipocytes hMADS.

	Leptine	IL6	Adiponectine
DMSO	1	1	1
LPV	1.1 +/- 0.4	1.1 +/- 0.2	1.1 +/- 0.3
APV	34 +/- 15	0.9 +/- 0.1	1.1 +/- 0.3
RTV	4.1 +/- 0.7	3.3 +/- 0.1	0.5 +/- 0.1

La différenciation des cellules hMADS en adipocytes a été induite, puis traitée par les différents IP. Cinq jours après, les ARN ont été préparés et l'expression des cytokines révélées par RT-PCR.

cibles directes des Ips ne sont pas nucléaires. Enfin, nous avons pu montrer que certains Ips modulent, dans l'adipocyte, l'expression de cytokines comme l'interleukine 6 (IL-6), la leptine et l'adiponectine (Tableau I), connues pour jouer un rôle critique dans l'établissement d'un état de résistance à l'insuline. L'ensemble de ces résultats montre que la différenciation adipocytaire des cellules hMADS permet le criblage de molécules d'intérêt pharmacologique ainsi qu'une analyse de leurs mécanismes d'action.

LES CELLULES HMADS EN THÉRAPIE CELLULAIRE

Le potentiel thérapeutique des cellules hMADS s'est révélé après leur transplantation chez la souris dystrophique mdx. En effet, la transplantation de cellules hMADS non différenciées dans le muscle de souris mdx, déficientes en dystrophine et constituant un modèle animal de la myopathie de Duchenne, compense le défaut génétique de la souris en induisant l'expression à long terme de dystrophine humaine (Fig. 5). De plus, 6 mois après transplantation, des fibres musculaires exprimant la dystrophine humaine sont trouvées dans le muscle adjacent au muscle transplanté suggérant une migration des cellules greffées (Rodriguez *et al.*, 2005b).

Nous avons constaté que les cellules hMADS ont un comportement immunologique inhabituel puisqu'elles réparent le muscle de souris mdx immunocompétentes sans être rejetées (Fig. 5). Cet « immunoprivilège » rend l'intérêt des cellules souches du tissu adipeux encore plus grand d'un point de vue thérapeutique en laissant entrevoir la possibilité de traitements par allotransplantation notamment dans le cas de maladies héréditaires. Il est alors essentiel de comprendre comment ces cellules réparatrices échappent au système immunitaire. La non immunogénicité des cellules hMADS à l'état non différencié peut s'expliquer, au moins en partie, par la faible expression en surface des molécules HLA de classe I limitant ainsi la réponse T CD8+ cytotoxique et la lyse NK, ainsi que par l'absence d'expression des molécules HLA de classe II et donc de réponse immune à médiation humorale. Toutefois, le profil d'expression HLA ne permet pas d'expliquer à lui seul comment la dystrophine humaine, décrite comme fortement immunogène

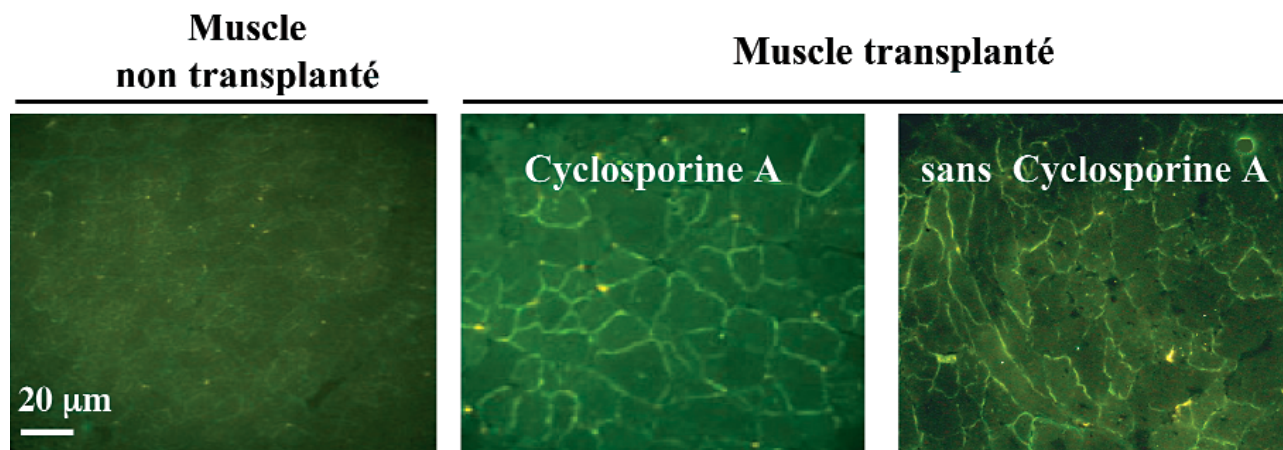


FIG. 5. – Expression de la dystrophine humaine dans le muscle de souris mdx après transplantation de cellules hMADS.

L'expression de dystrophine humaine est révélée, par immunohistochimie, 3 mois après transplantation des cellules hMADS dans le muscle de souris traitées ou non par un agent immunosuppresseur (cyclosporine A). Comme attendu, le muscle non transplanté n'exprime pas de dystrophine.

chez la souris mdx, ne provoque aucune réaction lymphocytaire. Nous pouvons émettre un certain nombre d'hypothèses non exclusives. En premier lieu, les cellules hMADS pourraient avoir des propriétés immuno-suppressives similaires à celles qui sont rapportées pour les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse. Une analyse transcriptomique révèle en effet que les cellules hMADS expriment des cytokines immuno-suppressives telles que IL10 et TGF- β (résultats non encore publiés). En second lieu, le mécanisme même de réparation tissulaire pourrait également contribuer à cette tolérance immunitaire. En effet, des expériences préliminaires effectuées au laboratoire suggèrent fortement que les cellules hMADS n'acquièrent le phénotype musculaire qu'après fusion avec les myoblastes de la souris hôte. La fusion pourrait ainsi limiter la présentation d'antigènes d'origine humaine à la souris mdx.

Les cellules hMADS ne forment pas de tumeurs après transplantation chez la souris immuno-déprimée. Néanmoins, dans un avenir proche, il faudra examiner attentivement dans quelle mesure les cellules hMADS peuvent affecter les réponses immunitaires de l'hôte et notamment la réponse anti-tumorale.

En conclusion, les travaux futurs devraient nous dire si les cellules souches du tissu adipeux constituent un outil prometteur pour la thérapie cellulaire régénérative et le traitement de maladies génétiques par allotransplantation.

BIBLIOGRAPHIE

- Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L., Schwartz R. E., Keene C. D., Ortiz-Gonzalez X. R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M. *et al.*, Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002a, 418, 41-49.
- Jiang Y., Vaessen B., Lenvik T., Blackstad M., Reyes M. & Verfaillie C. M., Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp. Hematol.*, 2002b, 30, 896-904.
- Miranville A., Heeschen C., Sengenès C., Curat C. A., Busse R. & Bouloumie A., Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*, 2004, 110, 349-355.
- Planat-Benard V., Menard C., Andre M., Puceat M., Perez A., Garcia-Verdugo J. M., Penicaud L. & Casteilla L., Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ. Res.*, 2004a, 94, 223-229.
- Planat-Benard V., Silvestre J. S., Cousin B., Andre M., Nibbelink M., Tamarat R., Clergue M., Manneville C., Saillan-Barreau C., Duriez M. *et al.*, Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*, 2004b, 109, 656-663.
- Rodriguez A. M., Elabd C., Amri E. Z., Ailhaud G. & Dani C., The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*, 2005a 87, 125-128.
- Rodriguez A. M., Elabd C., Delteil F., Astier J., Vernochet C., Saint-Marc P., Guesnet J., Guezennec A., Amri E. Z., Dani C. & Ailhaud G., Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, 315, 255-263.
- Rodriguez A. M., Pisani D., Dechesne C. A., Turc-Carel C., Kurzenne J. Y., Wdziekonski B., Villageois A., Bagnis C., Breittmayer J. P., Groux H. *et al.*, Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J. Exp. Med.*, 2005b, 201, 1397-1405.
- Sampaoli M., Torrente Y., Innocenzi A., Tonlorenzi R., D'Antona G., Pellegrino M. A., Barresi R., Bresolin N., De Angelis M. G., Campbell K. P. *et al.*, Cell therapy of α -sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science*, 2003, 301, 487-492.
- Toma J. G., Akhavan M., Fernandes K. J., Barnabe-Heider F., Sadikot A., Kaplan D. R. & Miller F. D., Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell Biol.*, 2001, 3, 778-784.
- Verfaillie C. M., Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.*, 2002, 12, 502-508.

- Vernochet C., Azoulay S., Duval D., Guedj R., Ailhaud G. & Dani C., Differential effect of HIV protease inhibitors on adipogenesis: intracellular ritonavir is not sufficient to inhibit differentiation. *AIDS*, 2003, 17, 2177-2180.
- Vernochet C., Azoulay S., Duval D., Guedj R., Cottrez F., Vidal H., Ailhaud G. & Dani C., Human immunodeficiency virus protease inhibitors accumulate into cultured human adipocytes and alter expression of adipocytokines. *J. Biol. Chem.*, 2004, 280, 2238-2005.
- Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P. & Hedrick M. H., Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*, 2001, 7, 211-228.
-